

2m11.2779.4

Université de Montréal

"Topographie et Cinétique du Développement des Lymphocytes T
Extrathymiques sous l'Influence de l'Oncostatin M"

Par Catherine Boileau

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en microbiologie et immunologie

Décembre, 1999

©Catherine Boileau, 1999



W
4
U58
2000
V.023

Ce mémoire intitulé:

"Topographie et Cinétique du Développement des Lymphocytes T
Extrathymiques sous l'Influence de l'Oncostatin M"

Par Catherine Boileau

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Sera évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Claude Perreault

Jacques Thibodeau

Lambert Busque

Mémoire accepté le: _____

Sommaire

Des souris transgéniques ont été créées chez lesquelles l'expression de l'oncostatin M (OM), une cytokine de la famille de l'interleukin-6 (IL-6), est restreinte aux lymphocytes T immatures par l'emploi du promoteur proximal de la tyrosine kinase p56^{lck}. Ces souris, nommées LckOM, dévoilent des particularités fascinantes du système immunitaire que nos connaissances actuelles ne permettent pas de bien définir. Les organes lymphoïdes des souris LckOM sont étrangement affectés par la surexpression d'OM, de telle sorte que le thymus perd sa capacité de générer des nouveaux lymphocytes T, et les ganglions acquièrent cette fonction thymique et se mettent à produire une quantité phénoménale de lymphocytes T. Les mécanismes qui contrôlent cette voie de différenciation donnent naissance à des populations polyclonales de lymphocytes T matures CD4⁺ et CD8⁺ indépendamment de la fonction thymique. Une littérature abondante démontre l'existence de populations lymphocytaires extrathymiques dans le foie, les intestins et la moelle. En revanche, très peu d'études observent directement une thymopoïèse extrathymique de telle envergure dans les ganglions

La présente étude a pour but de déterminer les caractéristiques des lymphocytes T issus de la différenciation extrathymique modulée par l'OM. Les travaux menés au cours de ce projet de maîtrise visaient à caractériser phénotypiquement, par cytométrie en flux, ces lymphocytes extrathymiques et à établir la topographie et la cinétique de leur développement ainsi qu'à examiner leur comportement migratoire.

Le modèle choisi pour l'étude de ces lymphocytes T d'origine extrathymique est un modèle de chimère hématopoïétique thymectomisée et reconstituée à l'aide d'une source de cellules souches hématopoïétiques (CSH) provenant de moelle osseuse transgénique (LckOM) et de foie foetal normal (C57BL/6). Ce modèle permet d'étudier spécifiquement le développement extrathymique de lymphocytes T normaux dans un environnement dépourvu d'influences thymiques. La prolifération et la demi-vie des

lymphocytes extrathymiques sont établies grâce au marqueur de division cellulaire bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) qui est incorporé dans l'ADN lors de sa synthèse, tandis que leur migration est suivie à l'aide de la molécule fluorescente carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE).

Les résultats de ces travaux illustrent l'étonnant pouvoir de modulation qu'exerce l'OM sur le développement et l'homéostasie du système immunitaire. Ils démontrent premièrement que les lymphocytes T extrathymiques possèdent un répertoire V β polyclonal et un phénotype indiquant qu'ils ont vécu une expérience antigénique antérieure. Deuxièmement, ils démontrent que le niveau de prolifération de ces lymphocytes extrathymiques est supérieur à celui des lymphocytes normaux. Troisièmement, ils démontrent que les lymphocytes T matures LckOM sont fortement attirés vers les ganglions. Ces travaux laissent sous-entendre que l'OM a des effets pléiotropiques qui engendrent des changements morphologiques et fonctionnels dans les organes lymphoïdes et des changements dans le comportement de circulation et de prolifération des lymphocytes.

Ce phénomène hors du commun de thymopoïèse extrathymique est digne d'intérêt puisqu'il fait surgir des faits importants à propos de l'organisation globale et de l'homéostasie du système immunitaire qui suscite actuellement beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique.

Table des Matières

Sommaire.....	II
Liste des figures.....	IX
Liste des abréviations.....	X
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Le thymus.....	1
1.2 La sénescence thymique et l'évolution.....	1
1.3 Lymphocytes T thymo-indépendants : Leur lien avec les souris LckOM...	2
2. LA FAMILLE DE L'IL-6.....	3
2.1 Signalisation via les récepteurs de la famille de l'IL-6.....	3
2.2 Pléiotropisme et redondance des cytokines de la famille de l'IL-6.....	4
2.3 Rôles physiologiques de gp130.....	5
2.3.1 Déficience en gp130.....	5
2.4 Rôles physiologiques de l'oncostatin M.....	5
1.4.1 L'oncostatin M se lie à des récepteurs différents chez les souris et chez les humains.....	5
1.4.2 L'oncostatin M : Propriétés anti-inflammatoires et rôles dans la réparation des dommages tissulaires.....	6
3. SUREXPRESSION D'ONCOSTATIN M DANS DES MODÈLES TRANSGÉNIQUES.....	7
3.1 Surexpression de l'oncostatin M dans une variété d'organes.....	7
3.2 Surexpression d'oncostatin M par les lymphocytes T : les souris LckOM.	8

4. MODÈLE SEMBLABLES AUX SOURIS LckOM.....	9
4.1 Surexpression de LIF.....	9
4.2 Surexpression d'IL-6 et du récepteur soluble à l'IL-6.....	9
5. DÉVELOPPEMENT EXTRATHYMIQUE DANS LES GANGLIONS.....	10
5.1 Caractéristiques du modèle transgénique LckOM.....	10
5.1.1 Présence de lymphocytes immatures dans les ganglions des souris LckOM.....	10
5.1.2 La thymopoïèse extrathymique est un phénomène thymo- indépendant.....	11
5.1.3 La thymopoïèse extrathymique est un phénomène dépendant de l'IL-7.....	11
6 LES LYMPHOCYTES T LckOM ET LES LYMPHOCYTES T NON- CONVENTIONNELS DES SOURIS NORMALES.....	12
6.1 Les lymphocytes T d'origine extrathymique chez des souris normales....	12
6.1.1 Les lymphocytes intestinaux (IEL).....	12
6.1.2 Les lymphocytes hépatiques.....	13
6.1.3 La moelle osseuse.....	14
6.2 Comparaison du phénotype des lymphocytes LckOM et des autres lymphocytes d'origine extrathymique.....	14
6.2.1 Les lymphocytes immatures CD4 ⁺ CD8 ⁺	14
6.2.2 Les lymphocytes matures CD4 ⁺ et CD8 ⁺	15
7. L'AUTOIMMUNITÉ CHEZ LES SOURIS LckOM.....	15
7.1 Le thymus comme site de production de lymphocytes B auto-réactifs.....	15
7.2 L'auto-immunité et la thymopoïèse extrathymique chez les souris LckOM sont deux phénomènes indépendants	16

8. PERSPECTIVES ET RETOMBÉS SCIENTIFIQUES: UTILITÉS DE CES TRAVAUX.....	17
9. FACTEURS A CONSIDÉRER POUR L'UTILISATION THÉRAPEUTIQUE DE L'ONCOSTATIN M.....	17
9.1 Répertoire V β polyclonal.....	17
9.2 Tests sur la fonction des lymphocytes d'origine extrathymique.....	18
10. DESCRIPTION DU PROJET DE MAÎTRISE.....	18
10.1 Devis expérimental.....	19
10.2 Questions générales qui orientent ce projet.....	19
10.3 Stratégies pour répondre à ces questions.....	19
Article: REGULATION OF EXTRATHYMIC T CELL DEVELOPMENT AND TURNOVER BY ONCOSTATIN M.....	22
11. DISCUSSION.....	67
11.1 La pertinence d'étudier ce modèle transgénique.....	67
11.2 Thymopoïèse extrathymique dans les ganglions.....	68
11.2.1 Évidence qui démontre que les ganglions peuvent soutenir la maturation de lymphocytes T déjà « commis » dans le thymus.....	68
11.2.2 Présence de DP dans les ganglions de souris néonatales.....	69
11.2.3 Présence de DP dans les ganglions de rats traités à la cyclosporine A.....	69
11.2.4 Présence de DP dans les ganglions causée par une expression aberrante du gène <i>Hlx</i>	70

11.3 Facteurs essentiels pour l'établissement de la thymopoïèse extrathymique dans les ganglions.....	71
11.3.1 Migration des cellules souches vers les ganglions.....	71
11.3.2 Organisation structurale : Niches pour les processus de sélection positive et négative.....	71
11.3.3 Le rôle de l'épithélium thymique dans la sélection positive des thymocytes.....	72
11.3.4 Nécessité de cytokines : l'IL-7.....	72
11.4 L'Accumulation de lymphocytes T matures dans les ganglions.....	73
11.4.1 La production <i>in situ</i> de nouveaux lymphocytes T.....	74
11.4.2 Prolifération rapide des lymphocytes T dans les ganglions.....	74
11.4.3 Migration préférentielle vers les ganglions.....	74
11.5 Hétérogénéité entre le phénotype de la rate et celui des ganglions	
LckOM.....	75
11.5.1 Distinction entre les ganglions et la rate des souris normales... durant l'organogénèse : Expression de gènes homéotiques.....	75
11.5.2 <i>Hox11</i>	76
11.5.3 Les lymphotoxines (LT α et β).....	76
11.6 Recrutement des progéniteurs hématopoïétiques dans les ganglions.....	77
11.6.1 Rôle des chémokines dans la colonisation du thymus: La chémokine TECK	78
11.6.2 Différentiation anormale de cellules des ganglions par induite par l'oncostatin M	79
11.7 Homéostasie : L'hypothèse des niches.....	79
11.7.1 Les cellules dendritiques (CD) : leur importance dans l'initiation des réponses immunitaires et dans l'homéostasie.....	80
11.8 Hypothèse sur le phénotype particulier des lymphocytes d'origine extrathymique.....	81

11.8.1	Phénotype des lymphocytes CD4 ⁺	81
11.8.2	Phénotype des lymphocytes CD8 ⁺	82
11.8.3	Le phénotype des lymphocytes matures CD4 ⁺ et CD8 ⁺ correspond à une rencontre antigénique antérieure.....	82
11.9	Prolifération accélérée : Interprétation des Résultats de BrdU.....	83
11.9.1	Expansion des population T dans un système lymphopénique..	83
11.9.2	Source de la stimulation causant la prolifération des lymphocytes T matures d'origine extrathymique.....	84
11.10	La biologie des chémokines et leur contrôle de l'homéostasie.....	85
11.10.1	Hypothèse : expression anormale de chémokines chez les souris LckOM.....	85
11.10.2	SLC, ELC et CCR7.....	86
11.11	Optique thérapeutique.....	89
11.11.1	Traitement de L'immunodéficience reliée à l'infection par le VIH-1.....	89
11.11.2	L'immunodéficience suite à des traitements de chimiothérapie et de radiothérapie.....	89
	L'immunodéficience reliée à l'âge.....	90
12	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	92
	Références.....	93

Liste des figures:

- FIGURE 1:** Les récepteurs de la famille de l'interleukin-6 (IL-6)..... 4
- FIGURE 2:** Comparaison entre les organes lymphoïdes des souris LckOM et C57BL/6 de 12 semaines..... 9

Liste des Abréviations

BrdU : Bromo-2,-deoxyuridine

CD: cellule dendritique

CFSE : carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester

Cellule NK: cellule natural killer

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CPA: cellule présentatrice d'antigène

CSH: cellule souche hématopoïétique

hi: high

IL: interleukine

int: intermédiaire

LIF: leukemia inhibitory factor

Lo: low

LT α/β : lymphotoxine α/β

OM: oncostatin M

PP: plaques de Peyer

TCR: T cell receptor

VCEC: venule à cellules endothéliales cubiques (high endothelial venules)

1. Introduction

Depuis son origine chez les vertébrés à mâchoire ^{1,2}, et à travers les forces sélectives de l'évolution, le système immunitaire a su développer une vaste diversité de récepteurs afin garantir la survie de l'organisme vivant qu'il protège. L'énorme diversité des récepteurs est bien représentée par les lymphocytes T, qui exécutent lors de leur maturation, un nombre important de réarrangements géniques afin de créer un répertoire pouvant répondre à tous les pathogènes sans répondre aux antigènes du soi.

1.1 Le thymus

Dans le thymus, les lymphocytes T trouvent l'environnement propice à leur développement et à leur sélection ^{3,4}. Dirigés par des mécanismes obscures, des précurseurs T quittent la moelle osseuse et vont coloniser le thymus tôt dans l'ontogénie. Le rôle du thymus dans le développement et la sélection des lymphocytes T est crucial, et il est bien illustré par l'absence presque totale de lymphocytes T chez des souris congénitalement athymiques (*nu/nu*). Chez celles-ci, le système immunitaire hypoplasique est peuplé uniquement par des lymphocytes particuliers qui se développent par des voies de différenciation extrathymiques. Les souris *nude* possèdent un système immunitaire incomplet et sont par conséquent très susceptibles aux maladies infectieuses ⁵.

1.2 La sénescence thymique et l'évolution

Malgré l'incontestable importance du thymus pour établir un répertoire complet de lymphocytes T, la période de fonction optimale de cette glande est éphémère. Le boum de la production thymique a lieu très tôt dans la vie, et ensuite ralentit, de sorte que chez de très vieilles souris, le thymus exporte seulement 0.7% de sa production initiale de lymphocytes T ⁶. Le système immunitaire conserve donc son répertoire de lymphocytes T en périphérie par des

mécanismes d'expansion et de sélection indépendants de la fonction thymique, ce qui permet de préserver un bon système de défense ^{7,8}. La sénescence thymique est interprétée comme une conséquence inévitable de l'évolution qui sélectionne négativement les processus qui consomment trop d'énergie. L'évolution de la fonction thymique apparaît donc comme un compromis entre l'économie d'énergie et la nécessité de maintenir un niveau adéquat de diversité du répertoire T. ⁶

1.3 Lymphocytes T thymo-indépendants : leur lien avec les souris LckOM.

La découverte de populations de lymphocytes T d'origine thymo-indépendante a ouvert la porte à un intéressant domaine de recherche qui remet en question les mécanismes de production et de sélection des lymphocytes T orchestrés par le thymus. En effet, la production de lymphocytes T n'est pas exclusivement réservée au thymus. Les intestins, le foie et la moelle osseuse ont une capacité lymphopoïétique qui suscite un intérêt particulier de par les populations inhabituelles qu'ils produisent.

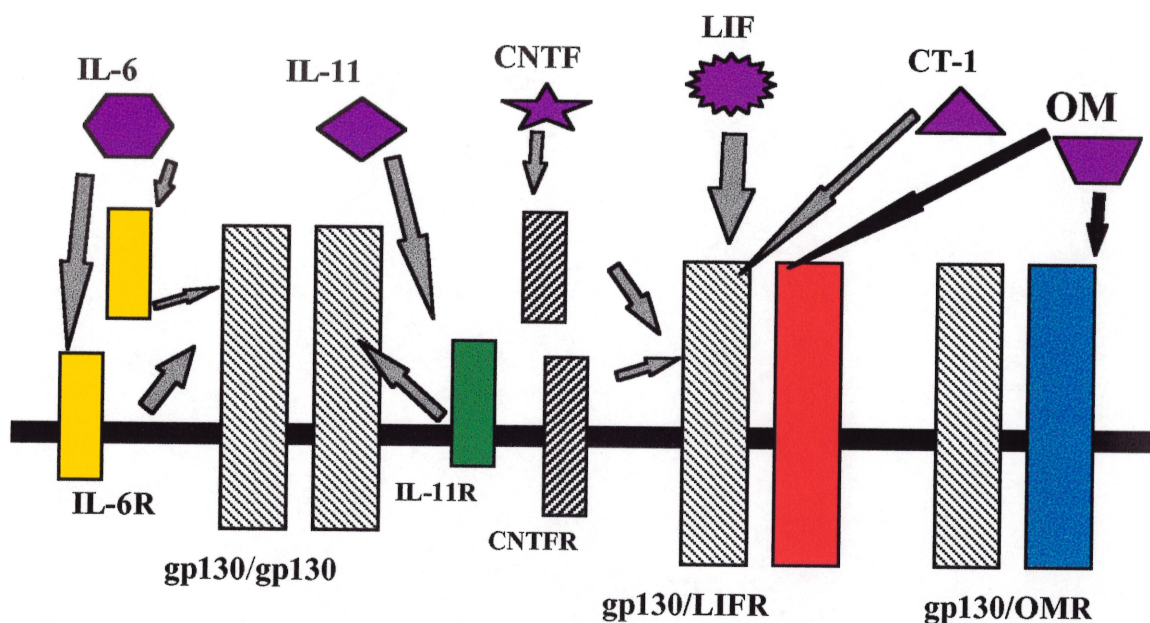
Les travaux suivants contribuent à l'avancement des connaissances dans ce domaine de recherche puisqu'ils décrivent l'existence d'une nouvelle voie de maturation extrathymique dans les ganglions, et tentent de caractériser en profondeur les lymphocytes issus de cette voie ontogénique. Ce phénomène surprenant est initié lorsque l'oncostatin M (OM), une cytokine de la famille de l'IL-6, est surexprimée par les lymphocytes T de souris transgéniques nommées LckOM. Afin d'approfondir nos connaissances sur cette thymopoïèse extrathymique, ce projet de maîtrise a pour objectifs principaux de déterminer **i)** le phénotype, **ii)** la cinétique et **iii)** la topographie du développement des lymphocytes T issus d'une différenciation extrathymique sous l'influence de l'OM.

2. La Famille de l'IL-6

2.1 Signalisation via les récepteurs de la famille de l'IL-6.

L'OM fait partie de la famille des cytokines hématopoïétiques et neurotrophiques reliées à l'IL-6. Cette famille comprend l'IL-11, le LIF, le CNTF, le CT-1 et évidemment l'OM et l'IL-6⁹. Ces cytokines sont regroupées dans une même famille parce que leurs récepteurs ont en commun une glycoprotéine membranaire nommée gp130¹⁰. Cette molécule constitue une partie essentielle des récepteurs à chaînes multiples de ces cytokines, et par ce fait, est impliquée dans la signalisation intracellulaire engendrée par l'association des cytokines à leur récepteur (Fig.1). De façon générale, l'attachement d'une de ces cytokines à son récepteur membranaire ou soluble, permet le recrutement de gp130 au complexe ligand-récepteur. Ces molécules appariées forment des récepteurs dont l'affinité est favorable à la transmission de signaux intracellulaires. Du regroupement de gp130 et de ses partenaires de dimérisation initié par l'association avec une de ces cytokines, s'ensuit la signalisation intracellulaire qui débute par l'activation des kinases Jaks¹¹. Ce système de signalisation relie efficacement la stimulation du récepteur à la transcription de gènes. Le gp130 n'étant pas doté d'une activité enzymatique, ce sont ces kinases associées à la chaîne intracellulaire du récepteur qui sont activées et qui participent à la cascade de signalisation qui initiera la transcription de gènes. Les cascades de signalisation qu'empruntent les cytokines hématopoïétiques de cette famille, comprennent les Jaks, les activateurs de transcription STATs et la phosphatase SHP-2 qui amorce la cascade de signalisation MAPK. La quantité de chaque kinase Jaks et de facteurs de transcription STATs, ainsi que le degré d'activation de ceux-ci varient dans chaque type de cellules, et par conséquent, la cascade moléculaire engendrée par l'association d'une même cytokine à son récepteur unique peut aboutir à des résultats différents¹¹.

FIG 1: Récepteurs de la famille de l'IL-6 chez la souris



2.2 Pléiotropisme et redondance des cytokines de la famille de l'IL-6

La présence de gp130 comme composante de tous les récepteurs des cytokines mentionnées auparavant reflète bien la redondance qui caractérise leurs fonctions ^{10,12}. De plus, l'expression ubiquitaire de gp130 dans presque tous les organes, ainsi que la production de chacune des cytokines par plusieurs types cellulaires, confèrent aux membres de la famille de l'IL-6, la particularité d'être pléiotropiques. La redondance de fonction et de production dans ce système de cytokines entraîne une promiscuité considérable. Par contre, c'est cette propriété de redondance qui rend le système de cytokines efficace et relativement insensible aux changements. Par exemple, les souris déficientes en IL-6, LIF et CNTF qui ont été créées afin d'étudier les fonctions biologiques de ces molécules *in vivo* manifestent des phénotypes moins sévères qu'attendus parce que la fonction de la cytokine manquante peut être compensée par la présence d'une autre cytokine de la même famille ¹³⁻¹⁵.

2.3 Rôles physiologiques de gp130

2.3.1 Déficience en gp130

Par ailleurs, un déficit en gp130 chez la souris, cause de nombreuses anomalies qui interrompent le développement normal et entraînent la mort *in utero* à partir du jour 12.5 post-coitum ¹⁶. Les souris gp130^{-/-} démontrent une hypoplasie du myocarde ventriculaire, un nombre réduit de cellules pluripotentes hématopoïétiques dans le foie fœtal, ainsi qu'une réduction du nombre de mégakaryocytes. Afin d'examiner avec plus de détails le rôle physiologique de gp130, des chercheurs intéressés ont dû surmonter ce problème de mort précoce, en créant un modèle murin dans lequel l'expression de gp130 peut être inactivée après la naissance grâce à un système de recombinaison Cre-LoxP ¹⁷. L'amplitude des fonctions de gp130 est reflétée dans ce modèle car les souris mutantes manifestent des anomalies touchant presque tous les organes. L'inactivation de gp130 chez ces souris cause une dégénérescence progressive des nerfs périphériques, une thrombopoïèse réduite, des changements histologiques dans le foie qui entraînent une réduction de la synthèse d'APP (acute phase protéine), une susceptibilité accrue aux infections virales et bactériennes, et de l'emphysème résultant d'un déficit en fibres élastiques dans les poumons.

2.4 Rôles physiologiques de l'OM

2.4.1 L'OM se lie à des récepteurs différents chez les souris et chez les humains

L'OM est sécrété par les macrophages et les lymphocytes T activés suite à l'activation de Jak2 et STAT5 par des cytokines telles : l'IL-2, l'IL-3 et l'erythropoïétine (EPO) ¹⁸. Son expression est détectée dans la moelle osseuse, le thymus et le foie fœtal ¹⁹. Comme les autres membres de la famille de l'IL-6, l'OM se distingue par ses nombreuses fonctions biologiques. Chez l'humain, l'OM peut se lier à deux récepteurs: un récepteur composé de gp130 et de OSMR,

et l'autre composé de gp130 et de LIFR qu'il partage avec le LIF, le CT-1 et le CNTF (Fig.1) ^{11,12}. Par contre chez la souris, l'OM se lie à un unique récepteur composé aussi de gp130, qui s'assemble avec l'OMR qui partage de 20%-30% d'homologie avec le LIFR ^{20,21}. Cette différence entre espèces laisse sous-entendre qu'il y a une distinction au niveau physiologique entre l'OM murin et l'OM humain, mais les raisons ou les conséquences de ceci n'ont pas été établies. Néanmoins, le LIF et l'OM activent des réseaux de signalisation similaires et par conséquent, ils partagent la plupart de leurs fonctions biologiques, autant chez l'humain que chez la souris.

2.4.2 L'OM : Propriétés anti-inflammatoires et rôles dans la réparation des dommages tissulaires.

L'OM, qui fut originalement identifié pour sa capacité d'inhiber la prolifération d'une lignée de cellules de mélanome humain (A375) sans interrompre la croissance de fibroblastes normaux ²², est maintenant considérée comme une cytokine multi-fonctionnelle pouvant modifier la croissance et/ou la morphologie d'une variété de cellules cancéreuses et normales ²³⁻²⁶. Entre autres, son rôle dans les réactions inflammatoires et dans la réparation de dommages tissulaires ont suscité de l'intérêt.

Premièrement, l'OM possède une activité fibrogénique puisqu'il stimule directement la production de matrice extracellulaire. Des souris transgéniques qui surexpriment l'OM dans les cellules β du pancréas souffrent de fibrose ²⁷. Deuxièmement, des travaux récents démontrent que l'OM inhibe la production de TNF- α induite par les LPS bactériens car il induit la sécrétion de la protéine anti-inflammatoire α 1-glycoprotéine ²⁸. Troisièmement, l'OM peut, soit inhiber la sécrétion de l'IL-1 par son induction de la sécrétion de la protéine anti-inflammatoire amyloïde A du sérum, soit agir en synergie avec l'IL-1 afin de diminuer l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires telles, l'IL-8 et le GM-CSF, et d'induire l'expression de cortisol, et d'IL-6 ²⁸. Quatrièmement, l'OM atténue l'influence des protéases associées à l'inflammation en stimulant la production d'inhibiteur de métalloprotéinase (TIMP-1), d'antichymotrypsine et de

α 1-inhibiteur de protéase ²⁸. Cette capacité de contrôler la phase fibroproliférative, d'atténuer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'induire l'expression de plusieurs inhibiteurs de protéases confère à cette cytokine un rôle prépondérant dans la réparation des dommages tissulaires et le retour à l'homéostasie. Chez la souris, les effets cliniques de l'OM dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques démontrent de façon convainquante que cette cytokine peut atténuer l'inflammation, et peut réduire la destruction tissulaire associée à ces maladies ²⁸.

3. Surexpression d'OM dans des modèles transgéniques

3.1 Surexpression de l'OM dans une variété d'organes

Pour l'étude du rôle physiologique de l'OM *in vivo*, un groupe de chercheurs dirigé par C. Clegg a fait le choix judicieux de cibler l'expression du gène bovin dans une variété d'organes chez la souris C57BL/6 afin de pouvoir observer les effets locaux plutôt que systémiques de cette cytokine ²⁹. L'emploi de promoteurs particuliers permet de restreindre l'expression du transgène, facilitant ainsi la compréhension des fonctions d'une protéine dans un système spécifique. La surexpression d'OM bovin chez ces souris transgéniques entraîne des anomalies dans la croissance des os, dans la spermatogenèse, dans la mégakaryocytogenèse, dans le développement des lymphocytes T et B ainsi que des problèmes de fibrose.

Ciblée dans les neurones, l'expression d'OM entraîne une mortalité de 50% à la naissance, et les survivants décèdent entre l'âge de 6 à 8 semaines. Une mortalité de 100% est constatée lorsque l'expression de OM est ciblée dans les cellules épithéliales kératinées. Sous le contrôle du promoteur de l'insuline, l'OM cause une importante fibrose dans le pancréas, ainsi qu'une mégakaryocytose. Finalement, la morphologie et les fonctions des organes lymphoïdes sont affectées

par la surexpression de l'OM dans les lymphocytes T immatures sous le contrôle du promoteur proximal de la tyrosine kinase $p56^{lck}$ ²⁹.

3.2 Surexpression d'OM par les lymphocytes T : les souris LckOM

Les souris LckOM dont l'expression de l'OM est sous le contrôle du promoteur de $p56^{lck}$, possèdent un thymus, une rate et des ganglions dont l'architecture est désorganisée et la taille est anormale (Fig.2). Une lymphoprolifération remarquable de cellules T et B cause la splénomégalie, et les lymphadénopathies observées chez ces souris LckOM. L'OM semble transformer les ganglions en organes lymphoïdes primaires, puisque ceux-ci se mettent à produire des lymphocytes T immatures ($CD4^+CD8^+$), qui sont normalement retrouvés exclusivement dans le thymus. Parallèlement, l'OM provoque un effet inverse sur le thymus en transformant ce dernier en organe lymphoïde secondaire, n'étant plus capable de subvenir à la production de lymphocytes T. Les souris LckOM développent une maladie auto-immune systémique similaire au *Lupus* chez l'humain (SLE) et qui se manifeste initialement par l'apparition de lésions cutanées. Une quantité d'auto-anticorps anti-ADN double brins, trait typique du *Lupus*, peut être détectée à partir de l'âge de 3 semaines et cette quantité d'auto-anticorps croît graduellement au détriment des organes dans lesquels ils se fixent²⁹.

Parmi toutes les conséquences qu'entraîne la surexpression d'OM chez ces souris, la production de lymphocytes T immatures par les ganglions est le phénomène qui a attiré le plus notre attention, et pour les fins de ces travaux nous avons décidé d'y consacrer tous nos efforts.

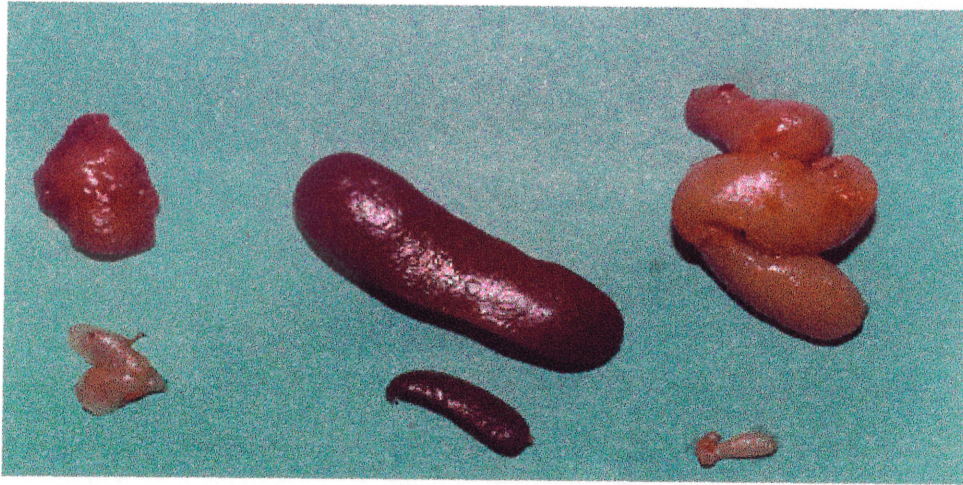


FIG. 2 Thymus, rate et ganglions mésentériques LckOM (en haut) et C57BL/6 (en bas).

4. Modèles semblables aux souris LckOM

4.1 Surexpression de LIF

Il est intéressant de constater que la surexpression de LIF dans les lymphocytes T chez des souris transgéniques provoque des anomalies similaires, incluant l'apparition du phénomène de lymphopoïèse extrathymique³². Chez ces souris, comme chez les souris LckOM, il y a une inter-conversion dans la morphologie et dans les fonctions du thymus et des ganglions. Il n'est pas surprenant d'observer les mêmes phénomènes chez ces deux types de transgéniques puisque l'OM et le LIF partagent le plus haut degré d'homologie parmi les cytokines de la même famille.

4.2 Surexpression d'IL-6 et du récepteur soluble à l'IL-6

Contrairement à ces deux modèles, la surexpression de l'IL-6 ne stimule pas une production de lymphocytes T par les ganglions périphériques³³. Toutefois, les phénotypes d'hyperplasie des lymphocytes B et d'hypergammaglobulinémie peuvent être remarqués autant chez les souris LckOM, que chez les souris qui surexpriment LIF ou l'IL-6. Les souris qui surexpriment l'IL-6 et son récepteur spécifique (sIL-6R) sous forme soluble,

manifestent un phénotype beaucoup plus sévère que celui exprimé par les souris qui surexpriment uniquement l'IL-6 ou l'IL-6R³⁴. Le récepteur soluble IL-6R est un agoniste, et le complexe qu'il forme avec l'IL-6 confère aux cellules qui ne possèdent pas le récepteur membranaire de l'IL-6, une sensibilité à cette cytokine. En plus d'avoir une taille réduite par rapport aux souris normales, ces souris possèdent une hématopoïèse extramédullaire excessive dans le foie et la rate. La présence de nombreux foyers d'hématopoïèse où prolifèrent et se différencient principalement des cellules des lignées granuloïdes et monocytaires, perturbe l'architecture de la rate ainsi que celle du foie.

5. Développement extrathymique dans les ganglions

5.1 Caractéristiques du modèle transgénique LckOM.

Les souris LckOM, s'avèrent être un excellent modèle pour étudier un phénomène inconnu jusqu'à présent; celui de la production extrathymique de lymphocytes T par les ganglions périphériques. La cellularité des ganglions des souris LckOM de 10 semaines peut représenter jusqu'à 20 fois celle des ganglions de souris normales du même âge. L'accumulation de cellules immatures dans ces ganglions débute dès la première semaine de vie, et la proportion des CD4⁺CD8⁺ peut y atteindre 80% des lymphocytes T totaux; un pourcentage qui s'approche de la proportion des CD4⁺CD8⁺ retrouvés dans le thymus d'une souris normale³⁵.

5.1.1 Présence de lymphocytes immatures dans les ganglions des souris LckOM.

Les évidences appuyant l'idée que les lymphocytes T sont originaires des ganglions périphériques chez la souris LckOM sont: **i)** la présence de précurseurs T (Thy1⁺, CD4⁺, CD8⁻, CD25⁺, HSA⁺) dans les ganglions transgéniques **ii)** l'expression du gène pré-T α qui est spécifiquement activé lors du stade de

différentiation où les lymphocytes procèdent à la recombinaison génique d'où naîtra un récepteur fonctionnel ²⁹.

5.1.2 La thymopoïèse extrathymique est un phénomène thymo-indépendant.

Cette production inhabituelle de lymphocytes T se déroule indépendamment de la fonction thymique car la reconstitution immunitaire de souris congénitalement athymiques *nu/nu* avec de la moelle transgénique, entraîne une abondante accumulation de lymphocytes CD4⁺CD8⁺ et de lymphocytes T matures CD4⁺ et CD8⁺ dans les ganglions de ces souris. L'effet lymphopoïétique directe de cette cytokine chez les souris *nu/nu* irradiées peut être observé suite à des injections quotidiennes de 10ug d'OM, appuyant ainsi le fait que l'OM agit de la même façon sur des cellules non transgéniques ²⁹.

5.1.3 La thymopoïèse extrathymique est un phénomène dépendant de l'IL-7

En observant ce phénomène, Clegg et son équipe ont évalué l'importance d'autres cytokines pour établir une telle lymphopoïèse extrathymique. L'IL-6 qui est induit par l'OM *in vivo* ³⁶ était un candidat possible, puisqu'il est reconnu comme co-stimulant pour les thymocytes humains ³⁷ et les lymphocytes T matures, ainsi que comme facteur de croissance et de différenciation des lymphocytes B normaux chez la souris ^{38,39}. Des expériences impliquant des croisements entre les souris LckOM et des souris déficientes en IL-6 ou en IL-7, ont fourni les preuves que la voie de différenciation initiée par l'OM est indépendante de l'IL-6, mais dépend directement de l'expression d'IL-7 ⁴⁰.

6. Les lymphocytes T LckOM et les lymphocytes T non-conventionnels des souris normales

6.1 Les lymphocytes T d'origine extrathymique chez des souris normales

Un certain nombre de lymphocytes retrouvés chez les souris normales et chez les êtres humains se développent indépendamment de la fonction thymique. Plusieurs travaux ont confirmé que le foie, les intestins, et la moelle osseuse pouvaient produire des lymphocytes T sans l'aide du thymus ⁴¹⁻⁵².

Certains de ces lymphocytes expriment un phénotype et un répertoire V β distinct de ceux exprimés par les lymphocytes conventionnels issus d'une maturation intrathymique ^{42,46}. Par exemple, ils peuvent être caractérisés par l'expression de la chaîne β du récepteur à l'IL-2 (IL-2R β), un niveau intermédiaire de l'expression du récepteur CD3 (CD3^{int}), ou l'expression d'un homodimère du co-récepteur CD8 $\alpha\alpha$, hors peu de choses sont connus sur les fonctions et l'ontogénie de ces populations.

6.1.1 Les lymphocytes intestinaux (IEL)

Des travaux dirigés par Poussier *et al.* révèlent que les lymphocytes intraépithéliales intestinaux proviennent d'une maturation et d'une sélection *in situ*, qui ne requièrent pas la présence d'un thymus, car les cellules souches hématopoïétiques (CSH) de foie fœtal peuvent peupler les intestins de chimères hématopoïétiques athymiques ^{44,47}. De plus, la quantité et les proportions des types de lymphocytes T retrouvés dans les intestins de ces chimères sont équivalentes à celles des souris normales ⁴⁵. À part les populations CD4⁺ et CD8⁺ qui sont identiques aux lymphocytes exportés par le thymus, les intestins comptent deux autres sortes de lymphocytes qui expriment un homodimère $\alpha\alpha$ du co-récepteur CD8. La vaste majorité des lymphocytes intestinaux sont CD8⁺, et le récepteur T de ceux-ci est soit $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. Les populations CD8⁺ expriment le

phénotype $CD4^+CD8\alpha^+\beta^-$ et $CD4^-CD8\alpha^+\beta^-$, et sont caractérisées par la présence significative de clones auto-réactifs $V\beta6$ et $V\beta11$ (chez des lignées de souris $I-E^+$ et $Mls1^a$) absents en périphérie car ils sont normalement éliminés par la sélection négative intrathymique ⁴⁶. Comme dans le thymus, les populations résidentes de l'épithélium intestinal sont un mélange de lymphocytes T matures et immatures. La présence d'ARN_m pour l'expression de RAG-1, qui dirige le réarrangement génique du récepteur T, valide aussi ces observations ⁴⁵. Poussier *et al.* proposent que les lymphocytes matures $CD4^+$ et $CD8^+$ de l'épithélium intestinal migrent dans la *lamina propria* et y demeurent. Inversement, les lymphocytes d'origine thymique de la périphérie ne logent pas dans l'épithélium intestinal⁴⁷. En ce qui concerne la migration de lymphocytes thymo-dépendent dans les intestins, contrairement à ce qui est proposé par Poussier, des travaux exécutés par l'équipe de Vassalli portent à croire que les intestins sont constitués partiellement de lymphocytes thymo-indépendents ($CD8\alpha\alpha$ $TCR\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$) de lignée ontogénique indéterminée mais distinctes des lymphocytes d'origine thymique activés dans les Plaques de Peyer et qui sont recrutés à ce site par des propriétés attractives ⁴⁶. Mise à part cette divergence de pensée, il est clair que les intestins constituent un organe de lymphopoïèse extrathymique, et que les processus de sélection positive et négative qui donnent naissance aux lymphocytes intestinaux, et aux autres lymphocytes thymo-indépendents ne se déroulent pas de la même façon que dans le thymus.

6.1.2 Les lymphocytes hépatiques.

Le foie est aussi peuplé de lymphocytes issus d'une différenciation extrathymique, indiquant que cet organe procure aux précurseurs lymphoïdes, le micro-environnement nécessaire à leur maturation et à leur survie. On retrouve ces lymphocytes dans des souris athymiques *nu/nu*, et dans des chimères hématopoïétiques thymectomisées et reconstituées uniquement avec une source de CSH ⁴⁸⁻⁵⁰. Ces lymphocytes se distinguent par un phénotype particulier ($CD3^{int}$, $IL-2R\beta^+$, $CD44^{int/hi}$ et $CD62L^-$) suggérant qu'ils proviennent d'une lignée

ontogénique distincte des lymphocytes thymiques. Ce type de cellules est aussi détecté en faibles nombres dans la rate dans des conditions athymiques. De plus, une proportion élevée des lymphocytes hépatiques est constituée de clones à potentiel auto-réactif qui sont normalement éliminés en périphérie. Il est intéressant de noter que des auteurs ont mis en évidence une augmentation du nombre de cellules avec un tel phénotype dans les organes cibles de maladies auto-immunes.

6.1.3 La moelle osseuse

La moelle osseuse constitue le site principal du développement de toutes les lignées hématologiques. Des expériences *in vitro* démontrent que, lorsqu'entièrement déplétée des lymphocytes T matures, la moelle osseuse procure aux lymphocytes T un environnement favorable à leur différenciation ainsi qu'à leur sélection. Les lymphocytes T immatures $CD4^-CD8^-$ procèdent à une différenciation vers un stade $CD4^+CD8^+$ pour ensuite acquérir le phénotype mature $CD4^+$ ou $CD8^+$ comme le font les lymphocytes T dans le thymus^{51,52}.

6.2 Comparaison du phénotype des lymphocytes LckOM et des autres lymphocytes d'origine extrathymique.

Les études de cytométrie de Clegg *et al.* démontrent que les lymphocytes T LckOM ne ressemblent pas entièrement aux populations lymphocytaires thymo-indépendantes retrouvées dans les intestins et dans le foie, mais plutôt ressemblent aux lymphocytes conventionnels issus d'une maturation intrathymique^{29,35,40}.

6.2.1 Les lymphocytes immatures $CD4^+CD8^+$

Les lymphocytes DP des ganglions LckOM semblent identiques aux thymocytes DP du cortex par rapport à leur niveau d'expression des molécules de surface suivantes : $CD90(\text{thy-1})$, $CD8\alpha\beta$, $CD24(\text{HSA})$, $TCR\alpha\beta$, $CD3$, $CD5$ et $CD69$ ³⁵.

6.2.2 Les lymphocytes matures CD4⁺ et CD8⁺

Les lymphocytes matures CD4⁺ et CD8⁺ qui s'accumulent dans les ganglions mésentériques de ces souris possèdent une expression élevée du CD3. Les lymphocytes matures expriment un hétérodimère $\alpha\beta$ du co-récepteur CD8⁺, et ne s'identifient donc pas aux lymphocytes thymo-indépendants des intestins, qui auraient pu s'infiltrer dans les ganglions mésentériques à partir de l'épithélium intestinal.

7. L'auto-immunité chez les souris LckOM

7.1 Le thymus comme site de production de lymphocytes B auto-réactifs

Récemment C. Clegg *et al.* ont étudié le thymus et l'auto-immunité chez les souris LckOM. Les résultats de ces recherches suggèrent fortement que la maladie auto-immune est initiée par les lymphocytes B, et que le thymus est un site de développement et de prolifération de lymphocytes B auto-réactifs ⁴⁰. Il y a une infiltration importante de lymphocytes B conventionnels (CD5⁺, B220⁺, CD19⁺, CMH II⁺, et IgG⁺) dans le thymus. L'architecture thymique est désorganisée à cause d'une prolifération considérable de lymphocytes B et T matures, comme si cet organe lymphoïde primaire s'enveloppait de tissu lymphoïde secondaire. La fonction primordiale du thymus semble inhibée par la présence de structures folliculaires où prolifèrent des lymphocytes B et T, car il y a une disparition graduelle de la population immature (CD4⁺CD8⁺) dans le cortex thymique ⁴⁰.

L'identification de lymphocytes B immatures (pro/pre-B B220⁺ 6C3⁺ IgM⁻ et pre-B/B B220⁺ 6C3⁺ IgM⁺) présents principalement dans l'épithélium thymique, et qui sont normalement restreints à la moelle osseuse, nous porte à croire que le thymus est transformé en site de lymphopoïèse B ⁴⁰. Il est plausible

qu'un précurseur lymphoïde puisse migrer dans le thymus transgénique très tôt après la naissance et se commettre à la lignée des lymphocytes B. Jusqu'à présent, aucun travail ne permet d'évaluer cette hypothèse. Plusieurs travaux illustrent la plasticité du thymus en démontrant que celui-ci procure les interactions cellulaires adéquates pour accomplir le rôle de la moelle osseuse et diriger le développement des lymphocytes B⁵⁴. Néanmoins, il est indéniable que certaines populations de précurseurs présentes dans le thymus ne sont pas nécessairement engagées à devenir des lymphocytes T et peuvent, dans des conditions propices, se différencier en lymphocytes B. Des travaux sur ce sujet démontrent que ce développement nécessite la présence d'IL-7 et du ligand du flt-3⁵⁴.

7.2 L'auto-immunité et la thymopoïèse extrathymique chez les souris LckOM sont deux phénomènes indépendants.

Les phénotypes d'auto-immunité et de lymphopoïèse T extrathymique ne démontrent pas d'interdépendance et par conséquent, ils peuvent être dissociés. La récapitulation du phénomène de maturation extrathymique, par une greffe de moelle osseuse LckOM dans un environnement athymique n'est pas accompagnée d'hyperplasie lymphofolliculaire, de plasmocytose ou de production d'auto-anticorps comme chez la souris LckOM⁴⁰. Clegg *et al.* ont conclu que l'auto-immunité qui se manifeste chez les souris LckOM découle du développement aberrant de lymphocytes B auto-réactifs par le thymus, et que l'OM à elle seule a des effets opposés sur les organes lymphoïdes en stimulant la thymopoïèse extrathymique et en inhibant la fonction normale du thymus.

8. Perspectives et retombés scientifiques: Utilités de ces travaux

La découverte du potentiel de l'OM de reconstituer un système immunodéficient est surprenante, et mènera peut-être à des applications thérapeutiques. Plusieurs cas d'immunodéficiences sont incurables car le thymus, sénéscent dans la plus part des cas, ne possède plus la capacité de régénérer une quantité suffisante de lymphocytes T afin de peupler un système immunitaire lymphopénique. Les infections par le VIH, les traitements de chimiothérapie et de radiothérapie sont des causes majeures d'immunodéficiences qui laissent les individus concernés susceptibles à des infections de tous genres. Il est imaginable d'entrevoir l'impact que l'administration pharmacologique de l'OM pourrait avoir sur la santé de ces individus si elle réussissait à reconstituer de façon efficace les systèmes immunitaires endommagés. Mais avant tout, cette découverte ouvre les portes à d'autres découvertes dans le domaine de l'immunologie. L'ampleur des effets de cette cytokine sur le fonctionnement, l'homéostasie et le développement du système immunitaire peut être examinée à l'aide de ce modèle murin qui dévoile des particularités fascinantes.

9. Facteurs à considérer pour l'utilisation thérapeutique de l'OM.

9.1 Répertoire V β polyclonal

Pour qu'une voie alternative de production de lymphocytes T soit considérée comme traitement pour des cas d'immunodéficiences, les cellules produites par ce mécanisme doivent être entièrement fonctionnelles, c'est-à-dire capables de reconnaître une variété d'antigènes étrangers dans le contexte des

molécules du CMH du soi, sans toutefois initier de réactions auto-immunes ou de réponses excessives incontrôlées.

Les travaux exécutés par l'équipe de C. Clegg^{29,35,40} concernant la souris LckOM, démontrent que les lymphocytes T CD4⁺CD8⁺ présents dans les ganglions LckOM possèdent un répertoire V β polyclonal qui suit un patron d'expression similaire à celui exprimé par les thymocytes DP des souris normales. Ceci laisse sous-entendre que les lymphocytes T des souris LckOM ont la capacité de réagir à différents antigènes.

9.2 Tests sur la fonction des lymphocytes d'origine extrathymique.

La compétence immunitaire des lymphocytes transgéniques issus de cette différenciation intra-ganglionnaire a été évaluée chez des souris *nu/nu* irradiées et reconstituées avec de la moelle LckOM, suite à l'injection de cellules allogéniques H-2D^k tumorales. Chez ces chimères hématopoïétiques, les tumeurs implantées ne grossissent pas, indiquant que les lymphocytes qui peuplent le système immunitaire de ces souris *nu/nu* ont la capacité de rejeter des cibles allogéniques²⁹.

10. Description du projet de maîtrise

Les travaux dirigés par C. Clegg ont permis de découvrir un phénomène intéressant où l'on peut entrevoir des répercussions avantageuses pour de nombreux traitements dans des cas d'immunodéficience. Ce projet de maîtrise a permis de son côté d'approfondir les connaissances sur « la cinétique et la topographie du développement de lymphocytes T chez les souris transgéniques LckOM ».

10.1 Devis expérimental.

La réalisation de ce projet impliquait la création de chimères hématopoïétiques en utilisant des souris normales (C57BL/6) thymectomisées, et reconstituées avec un mélange (1 :1) de CSH provenant de moelle transgénique LckOM (Thy1.2), et de foie fœtal normal de souris congéniques B6.PL(Thy1.1). Ce devis expérimental a permis d'étudier le développement extrathymique de lymphocytes normaux (Thy1.1) sous les effets paracrines de l'OM dans un environnement où la contribution thymique est nulle, comme l'ont fait auparavant C. Clegg²⁹ et ses collaborateurs. Les caractéristiques des cellules générées par cette voie de développement extrathymique ont été examinées avec des techniques de cytométrie en flux en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques aux molécules de surfaces d'intérêt.

10.2 Questions générales qui orientent ce projet

Ce projet était centré sur les questions suivantes :

i) Dans quels organes, et avec quelle intensité se déroulent la production et l'accumulation des lymphocytes T d'origine extrathymique chez les souris LckOM? **ii)** Quels sont le rythme de prolifération, la longévité et le répertoire V β des lymphocytes qui se développent dans les conditions décrites pour les chimères hématopoïétiques? **iii)** Quelles sont les propriétés migratoires qui favorisent l'accumulation de lymphocytes T matures dans les ganglions des souris transgéniques LckOM?

10.3 Stratégies pour répondre à ces questions.

Nous avons premièrement entrepris une phase descriptive dont le but était de caractériser et de visualiser à quel rythme s'établit la lymphoprolifération qui se manifeste chez les souris LckOM. Pour ceci, il était important d'identifier les populations lymphocytaires qui se retrouvent dans les organes lymphoïdes des souris LckOM en fonction de leur âge. Les résultats de ces travaux soulignent

l'importante différence qu'il y a entre la rate et les ganglions transgéniques en ce qui concerne les proportions et les quantités de cellules lymphoïdes peuplant ces organes. De plus ils mettent en évidence la production de lymphocytes immatures DP dans les ganglions transgéniques.

Une carte topographique du développement des lymphocytes T a dû être ensuite établie chez les souris LckOM en évaluant la présence de lymphocytes immatures DP dans différents organes. La présence de lymphocytes $CD4^+CD8^+$, détectées directement par cytométrie, est un indice assez fiable de lymphopoïèse. Les organes candidats étaient: le foie, la moelle osseuse et les intestins, puisqu'ils représentent des sites de lymphopoïèse T extrathymique chez des souris normales. Si le nombre absolu de lymphocytes DP dans un des organes candidats, était significativement supérieur à celui retrouvé chez des souris normales du même âge, nous avons conclu qu'il y avait présence de lymphopoïèse dans cet organe. Nous avons démontré ainsi que la lymphopoïèse T extrathymique est réservée exclusivement aux ganglions.

La cinétique de prolifération et de la demi-vie des lymphocytes sont des caractéristiques fondamentales à la compréhension de l'homéostasie et du fonctionnement général du système immunitaire des souris LckOM. La cinétique des lymphocytes peut être mesurée à l'aide d'une technique de marquage au BrdU (bromo-déoxy-uridine) mise au point par J. Sprent et B. Rocha et utilisée de plus en plus pour des expériences *in vivo* ^{56,57}. Cet analogue de la thymidine est incorporé dans l'ADN lors de sa synthèse, et peut être ensuite détecté avec des anticorps spécifiques en cytométrie en flux. Cette technique est avantageuse puisqu'elle permet d'examiner des populations cellulaires spécifiques en combinant des marquages intracellulaires et extracellulaires. Ces expériences de marquage au BrdU ont permis de démontrer que les lymphocytes qui se développent sous l'influence de l'OM possèdent un niveau de prolifération accéléré par rapport à la normale.

Nous avons abordé la dernière partie du projet afin de définir les propriétés migratoires des lymphocytes transgéniques $CD4^+$ et $CD8^+$ ainsi qu'évaluer l'influence de composantes propres aux organes transgéniques sur la recirculation de ces lymphocytes. Autrement dit, nous voulions déterminer si l'accumulation

de lymphocytes matures dans les ganglions est due à une qualité intrinsèque des lymphocytes T transgéniques, ou est reliée à l'effet de l'OM sur d'autres types de cellules. Ces expériences ne visaient pas à identifier les facteurs responsables du comportement migratoire des lymphocytes T chez les souris LckOM, mais plutôt à avoir une idée globale de l'organisation du système immunitaire sous l'influence de cette cytokine. Pour répondre à la dernière question de ce projet, nous avons donc injecté par voie intraveineuse des lymphocytes T matures transgéniques ou normaux, marqués *ex vivo* à l'aide du marqueur fluorescent CFSE dans des souris normales ou des souris LckOM. Le homing des cellules injectées peut être suivi grâce à ce marqueur fluorescent détectable en cytométrie en flux. De ces expériences, nous avons conclu que l'OM confère aux ganglions LckOM la propriété d'attirer les lymphocytes CD4⁺ ou CD8⁺ peu importe leur origine.

Ce projet tente de peindre un portrait plus élaboré du développement, et de la production de lymphocytes T extrathymiques chez les souris LckOM. Les implications cliniques sont peu définies mais semblent très intéressantes car elles touchent un grand nombre d'individus qui souffrent d'immunodéficience. Ces travaux contribuent à l'approfondissement des connaissances dans le domaine de l'immunologie par leurs efforts pour découvrir l'intrigante plasticité du système immunitaire en examinant comment celui-ci peut se transformer sous l'influence d'une unique molécule.

Regulation of extrathymic T cell development and turnover by
Oncostatin M¹

Catherine Boileau*, Magali Houde*, Gaël Dulude*, Christopher H. Clegg[†],
and Claude Perreault*²

*Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec,
Canada H1T 2M4

[†]ZymoGenetics Inc., Seattle, WA

Keywords: Homing, Lymph node, Lymphoid organization, Recirculation/recruitment,
T lymphocytes

Abstract

Chronic exposure to oncostatin M (OM) has been shown to stimulate extrathymic T cell development. The present work shows that in OM-transgenic mice, i) massive extrathymic T cell development takes place exclusively the lymph nodes (LNs) and not in the bone marrow, liver, intestines, and spleen, and ii) LNs are the sole site where the size of the mature CD4⁺ and CD8⁺ T cell pool is increased (6 to 7-fold). Moreover, when injected into OM-transgenic mice, both transgenic and non-transgenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells preferentially migrated to the LNs rather than the spleen. Studies of athymic recipients of fetal liver grafts showed that lymphopoietic pathway modulated by OM was truly thymus-independent, and that non-transgenic progenitors could generate extrathymic CD4⁺CD8⁺ cells as well as mature T cells under the paracrine influence of OM. The progeny of the thymic-independent differentiation pathway regulated by OM was polyclonal in terms of V β usage, exhibited a phenotype associated with previous TCR ligation, and displayed a rapid turnover rate (5-bromo-2'-deoxyuridine pulse-chase assays). This work suggests that chronic exposure to OM i) discloses a unique ability of LNs to sustain extrathymic T cell development, and ii) increases the number and/or function of LN niches able to support seeding of recirculating mature T cells. Regulation of the lymphopoietic pathway discovered in OM-transgenic mice could be of therapeutic interest for individuals with thymic hypoplasia or deficient peripheral T cell niches.

Changes in T lymphocyte function underlie much of the age-related decline in protective immune responses (1). Indeed, senescence-associated thymic atrophy leads to the progressive replacement of virgin T cells by memory cells that display decreased proliferative potential and a restricted repertoire diversity (2-5). Numerous observations suggest that immune competence has a major influence on life span, and that disturbed T cell responses are implicated in the age-related increase in the incidence of infections, cancer, and autoimmune diseases (6-11). The mechanisms responsible for thymic involution are unknown (12). Its occurrence may reflect the fact that, from an evolutionary perspective, thymopoiesis can be considered as an energy-expensive process, and that there is no selective pressure for maintaining the same level of T cell repertoire diversity in aged as in young individuals (12). Importantly, thymic output and the size of peripheral T cell pools are independently regulated. Thus, increase in thymic export (by thymic grafts) does not bring about a commensurate enlargement of peripheral T cell compartments (5,13). The size of peripheral T cell compartments is rather determined by the number of available T cell niches. The term niche designates an environment that provides local conditions (such as expression of specific chemokines, cytokines, and MHC molecules) required for T cells to seed and survive long-term in the peripheral compartment (14,15). Furthermore, thymic output does not increase in the presence of peripheral T cell depletion (16). Hence, the consequences of the progressive age-associated decline in thymic function are magnified in individuals whose peripheral lymphoid compartments have been rendered hypoplastic by various factors such as chemotherapy and human immunodeficiency virus-1 infection (17-21).

In athymic subjects, continuous production of new T cells is afforded by proliferation of post-thymic T cells and by extrathymic T cell development (22-24). In various mouse models, extrathymic differentiation of hematopoietic stem cells has been detected in selected organs such as the bone marrow (25,26), intestinal cryptopatches (27), and the liver (28,29). However, under normal circumstances, the ability of these organs to replenish and maintain LN and spleen T cell compartments is inferior to that of the thymus. Nevertheless, it was recently shown that expression of an oncostatin M (OM)³ transgene, under the control of the proximal Lck promoter or the CD34 gene promoter, causes thymus atrophy and thymus-independent accumulation of immature and mature T cells in LNs. (30-32). OM is a member of the IL-6 family of cytokines that acts as a growth regulator for many types of mammalian cells (33). In normal mouse, this pleiotropic cytokine is produced late in the activation cycle of T cells and macrophages, and its best known activities *in vivo* are antiinflammatory (34,35). Breeding experiments with IL-6^{-/-} and IL-7^{-/-} deficient mice showed that induction of extrathymic development by the OM transgene occurs in the absence of IL-6, but is strictly dependent on IL-7 receptor signaling (32). Intraperitoneal administration of recombinant human OM produced the same effect in non-transgenic mice (31).

The striking occurrence of extrathymic T cell development in LckOM transgenic mice provides unforeseen evidence for the existence of a lymphopoietic pathway whose regulation could possibly be of therapeutic interest for individuals with senescence- or disease-associated thymic hypoplasia. Thus, the goal of this study was to evaluate the development and turnover of extrathymic T cell produced under the influence of OM. We

found that chronic production of OM endowed LNs with the unique ability to sustain T cell development and to attract mature T cells. These extrathymically produced T cells had a diversified TCR V β repertoire, showed a rapid turnover rate, and expressed differentiation markers associated with previous TCR ligation.

Materials and methods

Mice. C57BL/6J (B6; Thy-1.2⁺) and B6.PL-*Thy-1^a/Cy* (B6.PL; Thy1.1⁺) mice were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). LckOM transgenic mice were initially kindly provided by Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute (Seattle, WA). In LckOM mice, the p56^{lck} proximal promoter targets expression of the bovine OM gene to thymocytes (30,31). Fertilized oocytes from (C3H x B6) F1 mice were used for pronuclear injections, and transgenic mice were back-crossed with nontransgenic B6 mice. The mice that we obtained from Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute, and that were used in this work, had been bred in this manner for greater than 13 generations. LckOM mice used in our experiments were heterozygous. As LckOM females develop ovarian failure at about 10 weeks of age, heterozygous transgenic mice were obtained by breeding heterozygous LckOM males with B6 females. The LckOM genotype was confirmed by PCR assay using 200 ng of genomic tail DNA and the following primers: 5'→3' AGTCCCGTACTGCAGGAACA and GCTCACACCATTAAGTGC. Mice were bred and housed under specific pathogen-free conditions (in sterile ventilated racks in the case of LckOM mice) at the Guy-Bernier Research Center according to the standards of the Canadian Committee for Animal Protection.

Thymectomy. At 4-5 weeks of age, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 75mg/Kg sodium pentobarbital (Somnotol; MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada), and the thymus was removed with a suction cannula introduced over the suprastrenal notch. Completeness of thymectomy was verified in each animal by visual

inspection at the time of sacrifice. Cell transplantation was performed at least two weeks after surgery.

Bone marrow and fetal liver cell transplantation. Bone marrow collected from the femurs and tibias of LckOM donors was T cell-depleted with a specific anti-Thy-1.2 monoclonal Ab (Cedarlane; Hornby, Ontario, Canada) and rabbit serum (Low-Tox-M rabbit complement; Cedarlane) as a source of complement. Efficacy of depletion was assessed by flow cytometry. Timed pregnancies were established for B6.PL mice and fetal liver cells were collected on day 13 post-coitum. Hematopoietic chimeras were created by injecting 4×10^6 LckOM bone marrow cells + 4×10^6 B6.PL fetal liver cells into irradiated (10 Gy) B6 recipients. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) labeling experiments were initiated in hematopoietic chimeras 75-90 days after transplantation.

Isolation of hepatic and intestinal lymphocytes. Isolation of hepatic and intestinal intraepithelial lymphocytes was performed using density centrifugation as previously described (29,36).

mAbs. The following Abs were obtained from PharMingen (Mississauga, Ontario, Canada): Cy-chrome™ conjugated anti-CD4 (RM4-5; rat IgG_{2a},κ), and anti-CD8α (53-6.7; rat IgG_{2a},κ), biotinylated-anti-CD8α (53-6.7; rat IgG_{2a},κ) detected with Cy-chrome™-streptavidin or APC-streptavidin, biotinylated-anti-Thy1.1 (OX-7; mouse IgG₁,κ), biotinylated-anti-Vβ3 TCR (KJ25; hamster IgG) detected with FITC-streptavidin, FITC-conjugated anti-Thy1.2 (53-2.1; rat IgG_{2a},κ) anti-Vβ5.1,2 TCR (MR9-4 ; mouse IgG₁,κ), anti-Vβ6 TCR (RR4-7; rat IgG_{2b},λ), anti-Vβ7 TCR (TR310; rat IgG_{2b},κ), anti-Vβ8.1,2 TCR (MR5-2; mouse IgG_{2a},κ), anti-Vβ9 TCR (MR10-2; mouse IgG₁,κ), anti-Vβ10^b TCR (B21.5; rat IgG_{2a},λ), anti-Vβ11 TCR (RR3-15; rat IgG_{2b},κ), anti-Vβ13 TCR (MR12-3;

mouse IgG₁,κ), anti-Vβ14 TCR (14-2; rat IgM,κ), anti-Vβ17^a TCR (KJ23; mouse IgG_{2a},κ), PE-conjugated-anti-Thy1.1 (OX-7; mouse IgG_{2a},κ), -Thy1.2 (30-H12; rat IgG_{2b},κ), -CD19 (ID3; rat IgG_{2a},κ), -CD44 (IM7; rat IgG_{2b},κ), -CD45RB (23G2; rat IgG_{2a},κ), -CD62L (MEL-14; rat IgG_{2a},κ), -CD122 (IL-2 Receptor β chain) (TM-β1; rat IgG_{2b},κ) and -NK1.1 (PK136; mouse IgG_{2a},κ) Abs and their isotypic controls. PE-conjugated-anti-CD8α was purchased from Cedarlane, FITC-conjugated anti-BrdU from Becton Dickinson, (Mountain View, CA), and CyTM5-streptavidin from Jackson Immunoresearch (West Grove, PA).

Flow cytometry and BrdU labeling. Cell surface staining and BrdU labeling were performed as previously described (37,38). Analyses were performed with a FACScalibur[®] flow cytometer using the CellQuest software, or with a FACScan[®] flow cytometer using the LysisII software (all from Becton Dickinson).

In vivo cell trafficking: Spleen cells from 12-20 wk old B6 or LckOM donors were labeled with carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR) as previously described (39). Splenocytes (10⁸) were incubated at 37°C for 15 min in PBS (2 ml) supplemented with CFSE (0.5μM), and washed twice in cold PBS. Then, unirradiated recipients were injected via the lateral tail vein with a spleen cell suspension containing $43 \pm 5 \times 10^6$ CFSE-labeled T lymphocytes, and their spleen and mesenteric LNs were removed 36 h later for flow cytometry analysis.

Results

LNs represent the sole site of extrathymic T cell development in LckOM mice. The relative and absolute numbers of lymphocyte subsets found in the thymus, LNs and spleen of LckOM mice and normal B6 controls aged 4-20 wk are depicted in Fig. 1 and 2, respectively. The most dramatic findings were observed in the LNs which, at 12 wk, showed a 30-fold increase in cellularity relative to controls (Table I). This was caused primarily by a massive accumulation of double-positive $CD4^+CD8^+$ lymphocytes that reached a maximum at 12 wk, and to a lesser extent, by a more progressive increase in the numbers of B cells and single-positive $CD4^+$ and $CD8^+$ lymphocytes that rose progressively from 4 to 20 wk. Data depicted in Fig. 1 and 2 concern mesenteric LNs; other LNs (axillar and cervical) showed the same proportions of various lymphocyte subsets but were slightly less hypercellular than mesenteric nodes (data not shown). LckOM spleen were also hypercellular. In the spleen, however, increased cellularity was due essentially to an accumulation of B lymphocytes; there was a minimal accumulation of immature T cells, and no significant increase in the number of $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells. Young (4 wk) LckOM mice presented a severe thymic hypoplasia with very low numbers of immature thymocytes. Thymic cellularity increased with age in LckOM mice, but this was due mainly to a major accumulation of B cells and, to a lesser extent, to increasing numbers of single-positive $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. Immature thymocytes were virtually absent from the thymus of old (20 wk) LckOM mice.

Since extrathymic T cell development can take place in the liver (28,29), intestine (27,40), and bone marrow (25,26), we assessed the number of CD4⁺CD8⁺ thymocytes as well as single positive CD4⁺ and CD8⁺ T cells in these organs in LckOM mice (Fig. 3). We found no notable increase in the number of CD4⁺CD8⁺, CD4⁺, or CD8⁺ T cells in the bone marrow and intestines when compared to B6 mice. A minimal, but statistically significant, accumulation of CD4⁺CD8⁺ cells was observed. Together, these results indicate that LckOM LNs are remarkable in at least two points. First, assuming that developing thymocytes must go through a CD4⁺CD8⁺ stage, we can conclude that the LNs constitute the sole site where massive extrathymic thymopoiesis occurs in LckOM mice. As judged by the number of CD4⁺CD8⁺ T cells, the level of T cell production in the LNs of LckOM mice is considerable. Thus, in the mesenteric LNs alone, it reaches a level of 214×10^6 at 12 wk of age (Table I). Second, LNs of OM-transgenic mice also present a conspicuous increase in the pool size of mature CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Fig. 2). Hence, the mean numbers of single-positive T cells in the mesenteric LNs at age 12 and 20 wk were 43 and 92×10^6 in the case of LckOM mice comparatively with 7 and 12×10^6 for B6 mice (Table I and data not shown).

CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes are CD44^{hi} in LckOM mice. Analysis of expression of CD44, CD45RA or RB, CD62L and IL-2R β gives important information regarding previous antigen encounter by T cell populations. As depicted in figure 4, the phenotype of LN CD4⁺ and CD8⁺ cells was strikingly different in LckOM mice relative to B6 controls. In LckOM mice, most CD4⁺ T cells were CD44^{hi}, CD45RB^{lo}, CD62L^{lo} and IL-2R β ^{lo}, a phenotype found following TCR engagement either by non-self antigens or

self-ligands (41-43). In addition, the vast majority of CD8⁺ T cells were CD44^{hi}, CD45RB^{hi}, CD62L^{hi} and IL-2Rβ^{hi}. The CD44^{hi}CD62L^{hi} phenotype is found in two types of CD8⁺ cells: revertants and class I-restricted T cells triggered by self-ligands (42-44). Thus, the phenotype of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells of LckOM mice does not correspond to that of resting cells, but rather suggests that these cells have sustained significant levels of TCR signaling by heretofore undetermined ligands. Parenthetically, an “activated phenotype” can also be found in NK T cells which harbor a CD4⁺CD8⁻ or CD4⁻CD8⁺ phenotype (45-47). However, their NK1.1⁻ phenotype shows that LckOM T cells do not correspond to NK T cells (Fig. 4). Interestingly, while aforementioned phenotypic analyses have been done on LckOM LN cells, similar results were observed in LckOM spleen cells, and in LNs and spleen of irradiated B6 mice transplanted with LckOM hematopoietic progenitors (data not shown).

Extrathymic T cells have a polyclonal Vβ repertoire and a rapid turnover rate. In LckOM mice aged 12-20 wk, the total numbers of single-positive CD4⁺ and CD8⁺ T cells is significantly increased relative to normal mice (Fig. 2). Therefore, we asked whether these mature T cells had a polyclonal origin and how could their expansion be explained in kinetic terms. Functional *in vitro* studies on cytokines of the IL-6 family suggest that OM could possibly have pleiotropic effects on T cell development *in vivo*. Thus, OM has been shown to support the differentiation of CD34⁺ cells into CD3⁺ T cells (48). In addition, IL-6, which shares the gp130 receptor subunit with OM (49), can prolong T cell survival (15), and can provide costimulation for naïve T cells (50) (51) by preventing apoptosis (52). Therefore, to address these questions, we created hematopoietic chimeras by

injecting a 1:1 mixture of B6.PL fetal liver cells and T cell-depleted LckOM bone marrow cells into lethally irradiated thymectomized B6 mice, and performed studies specifically on Thy1.1⁺ cells (of B6.PL origin). Under these experimental conditions, Thy1.1⁺ cells were 100% of extrathymic origin as they were derived from the differentiation of fetal liver cells in athymic hosts. Furthermore, Thy1.1⁺ cells were not transgenic themselves, but rather developed under the paracrine influence of OM (Fig. 5).

Among spleen Thy1.1⁺ cells, both CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressed a TCR V β repertoire that was as diverse as that of age-matched B6 controls when assessed by flow cytometry analysis (Fig. 5). Although analyses based on size heterogeneity or on sequence of the CDR3 region will be required to assess more precisely the diversity of extrathymic T cells (53,54,54), our results indicate that CD4⁺ and CD8⁺ extrathymic T cells have a polyclonal origin. Parenthetically, the V β repertoire of Thy1.1⁺ cells in chimeras was similar to that of T cells in LckOM mice (data not shown).

BrdU pulse-chase experiments were performed to evaluate the turnover of extrathymic T cells in chimeras. Specifically, we sought to determine whether OM-dependent expansion of extrathymic T cell compartments was due to prolonged survival of resting cells or to an increased proliferation rate. During the pulse period, chimeras and control mice were given BrdU-supplemented water for 20 days (38,55). Again, analyses in chimeras were performed specifically on Thy1.1⁺ cells. Results for CD62L⁺ and CD62L⁻ subsets were analyzed separately since CD62L⁻ cells divide more rapidly than CD62L⁺ cells (38,55), and because similar to LckOM mice (Fig. 4), the proportion of CD4⁺CD62L⁻

cells was much increased in chimeras relative to B6 controls. The key finding was that BrdU-labeled $CD4^+$ and $CD8^+$ cells accumulated more rapidly among extrathymic T cells than in controls. Thus, when $CD62L^+$ and $CD62L^-$ subsets in chimeras were compared to their normal counterparts in euthymic controls, the rate of appearance of BrdU-labeled cells was more rapid for extrathymic T cells than classic T cells (Fig. 6). In contrast, the kinetics of BrdU incorporation by $Thy1.1^+CD4^+CD8^+$ thymocytes in chimeras' mesenteric LNs was similar to that of $CD4^+CD8^+$ cells in the thymus of B6 mice (data not shown). After being placed on BrdU water for 20 days, mice were transferred to normal water to examine the rate of decay of BrdU-labeled cells up to day 70. The disappearance of BrdU-labeled T cells was swifter for extrathymic T cells than for classic T cells (Fig. 6). This was conspicuous in the first 10 days after BrdU withdrawal, when the proportion of BrdU⁺ elements was relatively stable in B6 controls but sharply decreased in extrathymic T cells. Collectively, these results indicate that extrathymic T cells proliferate actively and have a high turnover rate.

LNs of LckOM attract $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. In LckOM mice, LNs differ from the spleen as well as other organs, not only in that they are the sole site of extrathymic T cell development, but also because the numbers of LN $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells are increased approximately 6 to 7-fold relative to age matched B6 mice (Fig. 2). The selective expansion of the LN single positive T cell compartment is likely due, at least to a minimal extent, to the accumulation of T cells produced *in situ*. However, another explanation would be the preferential homing of recirculating extrathymic T cells to the LNs. To evaluate the latter possibility, we assessed the *in vivo* distribution of CFSE-

labeled splenocytes from B6 and LckOM donors 36 h after injection into B6 and LckOM hosts. Figure 7A depicts the results from these studies in the form of mesenteric LN/spleen ratios calculated from the absolute numbers of injected CD4⁺ and CD8⁺ that were recovered from these two sites. The notable finding was that, whatever their source (B6 or LckOM) or their type (CD4⁺ or CD8⁺), the proportion of T cells that home to the LNs was greatly increased in LckOM recipients. Increased mesenteric LN/spleen ratios in OM-transgenic recipients were due to both an increased accumulation of T cells in the LN and decreased homing to the spleen (Fig. 7B). It was also observed that the propensity to home to the LN rather than the spleen was greater for B6 than for LckOM T cells. The latter characteristic was T cell autonomous since, when B6 and LckOM splenocytes were co-injected, their respective recovery from the mesenteric LNs and spleen was exactly alike that shown in Fig. 7 (data not shown). The preferential LN homing of T cells injected into LckOM hosts was quite remarkable considering that the size of the T cell pool in LckOM LNs was already increased and that, in a variety of experimental models, the recovery of injected T cells was found to be inversely related to the number of host T cells already present in lymphoid organs (22,43,56,57).

Discussion

Extrathymic T cell development in LckOM mice points to the existence of a novel pathway of T cell maturation whose unique characteristics raise fundamental issues concerning the regulation of T cell production and homeostasis. From a topographical point of view, the LNs of these mice are most peculiar. They are the sole site of a massive extrathymic T cell production, and they display an unusual propensity to attract recirculating CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The single-positive progeny of this extrathymic pathway is polyclonal, shows a phenotype associated with earlier antigen encounter, and displays a rapid turnover rate.

Why T cell development normally takes place in the thymus is not known yet. No adhesion molecule –ligand pair has been identified on T cell precursors or thymic stroma that explains convincingly a selective entry or preferential survival of T cell precursors in the thymic microenvironment (58-61). Accordingly, the reason why extrathymic T cell production induced by OM is limited to the LNs, and particularly the mesenteric LNs, is not inherently obvious. The fact that we found no evidence of extrathymic T cell development in other sites reported to have some ability to support T cell production (namely the liver, bone marrow and intestines), suggests that chronic exposure to OM induces changes that uniquely affect LN stromal (non-lymphoid) cells. An alternative possibility would be that the LN stroma normally expresses a unique structure/molecule that is essential for the homing and development of OM-conditioned pre-thymic cells. The absence of immature thymocytes in the spleen of LckOM mice discloses unanticipated

heterogeneity in the ability of secondary lymphoid organs to sustain T cell development. The latter observation is consistent with recent evidences that the rules governing the development of organized structure in the spleen and LNs are different. Thus, mice deficient either in osteoprotegerin ligand (a TNF-family molecule) or in transcription factor Id2 lack LNs but have a normal spleen, while the reverse is observed in Hox11-deficient mice (62-64). Likewise, B cell/T cell segregation is differentially affected in the spleen vs LNs of $LT\alpha^{-/-}$ and $TNFR-I^{-/-}$ mice (65). Moreover, some $CD4^{-}CD8^{-}$ intrathymic thymocytes (but not pre-thymic progenitors present in fetal liver) can, when injected into thymectomized non-transgenic mice, develop into both $CD4^{+}CD8^{+}$ and single-positive T cells into the LNs but not into the spleen (66). Clearly, further investigations must be pursued to decipher the molecular interactions responsible for the striking ability of LNs to support extrathymic T cell development under the influence of OM.

When transplanted into thymectomized hosts together with OM-transgenic bone marrow, non-transgenic fetal liver cells yielded a major accumulation of $CD4^{+}CD8^{+}$ T cells in the LNs and generated mature T cells with a polyclonal $V\beta$ repertoire. This suggests that significant levels of thymic-independent positive selection takes place extrathymically (presumably in the LNs) under the paracrine influence of OM, otherwise $CD4^{+}CD8^{+}$ would die by neglect (67,68). This observation is consistent with evidence that thymic epithelial cells are not the only cells that can support positive selection, and that *in vivo* positive selection can be mediated by hematopoietic cells (69,70). Nevertheless, it remains to be determined whether the extrathymic pathway modulated by OM follows the same rules regarding positive and negative repertoire selection as the classical thymic pathway.

Other important questions that must be addressed concern the immunocompetence of extrathymic T cells and whether or not they are self tolerant. Since reconstitution of nu/nu mice with LckOM bone marrow restored immune responsiveness to allogeneic mouse melanoma cells, the progeny of the OM-dependent pathway shows at least some level of immunocompetence (31). However, it remains to be determined whether T cells that have differentiated in the LNs can generate protective immune responses against microbial pathogens as efficiently as conventional T cells do.

When injected into 12-20 wk old LckOM mice, T cells harvested from the spleen of normal or LckOM donors preferentially homed to the LNs rather than the spleen. This was somewhat unexpected since i) in LckOM recipients the size of the T cell pool was normal in the spleen but increased 6 to 7-fold in the LNs, and ii) injected T cells usually home preferentially to lymphoid organs that contain less T cells (22,43,56,57). This bias is attributed to the higher number of available (or “empty”) T cell niches in T-depleted as opposed to T-replete lymphoid organs. Thus, one logical extension of our findings is that the number of T cell niches increases under the influence of sustained OM production. Recently, a number of indications have been presented suggesting that resident dendritic cells represent fundamental constituents of the peripheral T cell niches (71-74). Because of their abundant expression of MHC class I and class II molecules and their specific chemokine and cytokine expression profile, dendritic cells seem to have a unique ability to control the homing of post-thymic T cells and to provide the continuous TCR ligation required for the survival of naïve and memory T cells in the periphery (72,75-77). Interestingly, OM and Flt3 ligand act synergistically to enhance the *in vitro* proliferation of

hematopoietic stem cells committed to macrophage/dendritic cell formation (78). Therefore, it will be of great interest to evaluate the influence of OM on the number, phenotype and function of dendritic cells *in vivo*. The postulated ability of OM to increase the number of functional T cell niches would be, to our knowledge, unprecedented, and could be of medical interest in circumstances where the number of such niches is deficient (38).

T cells that have developed extrathymically under the influence of OM display two striking features that are perhaps related: these T cells have a rapid turnover rate and the phenotype of antigen-experienced cells ($CD44^{hi}CD45RB^{lo}CD62L^{lo}$ for $CD4^{+}$ cells, and $CD44^{hi}CD45RB^{hi}IL2R-\beta^{hi}$ for $CD8^{+}$ cells). As stated above, a $CD44^{hi}$ activated phenotype is indicative of previous TCR interaction either with conventional non-self antigen or with peripheral self-ligands (42-44). Two findings argue against the possibility that $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ extrathymic T cells have been primed en masse by environmental antigens. First, we observed the same “non-naïve” phenotype (depicted in Fig. 4), without conspicuous skewing of the $V\beta$ repertoire, in LckOM mice aged 4 to 18 wk (data not shown). The second argument is based on the $CD62L$ phenotype of $CD8^{+}$ elements. Indeed, although some $CD8^{+}$ cells that respond to non-self antigens can revert to a $CD62L^{hi}$ phenotype, a $CD8^{+}$ compartment composed primarily of $CD44^{hi}CD62L^{hi}$ elements has been found, to our knowledge, in only one situation: following expansion driven by self-ligands in lymphopenic hosts (44). In the latter situation, it has been proposed that, consecutive to lymphopenia, the increased level of available (empty) T cell niches may allow greater accessibility to niches APCs presenting self-ligands or growth factors that promote T cell

division (43,44). LckOM are certainly not lymphopenic. Thus, we surmise that the activated phenotype of LckOM T cells supports the concept that LckOM mice show a major increase in the number and/or function of T cell niches. This strengthens the need to study the effect of OM on the numbers, phenotype and function of dendritic cells. In this regard, it is noteworthy that IL-6, which belongs to the same family as OM, has been reported to modify the processing of self-ligands by dendritic cells, and to increase the presentation of otherwise cryptic epitopes (79). Such mechanism could be instrumental in expanding the size of the peripheral T cell compartment by increasing the reactivity of T cells toward self-ligands.

Acknowledgements

We are indebted to Ms. Nathalie Beaudoin and the animal caretakers of the Guy-Bernier Research Center for their invaluable help during the course of these studies.

References

1. Miller, R. A. 1996. The aging immune system: primer and prospectus. *Science* 273:70.
2. Weng, N. P., L. Granger, and R. J. Hodes. 1997. Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:10827.
3. Tanchot, C. and B. Rocha. 1997. Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output. *J.Exp.Med.* 186:1099.
4. Mackall, C. L., F. T. Hakim, and R. E. Gress. 1997. T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunol.Today* 18:245.
5. Berzins, S. P., R. L. Boyd, and J. F. Miller. 1998. The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. *J.Exp.Med.* 187:1839.
6. Covelli, V., D. Mouton, M. V. Di, Y. Bouthillier, C. Bangrazi, J. C. Mevel, S. Rebessi, G. Doria, and G. Biozzi. 1989. Inheritance of immune responsiveness, life span, and disease incidence in interline crosses of mice selected for high or low multispecific antibody production. *J.Immunol.* 142:1224.
7. Ferguson, F. G., A. Wikby, P. Maxson, J. Olsson, and B. Johansson. 1995. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish

- people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J.Gerontol.A.Biol.Sci.Med.Sci.* 50:B378.
8. Wayne, S. J., R. L. Rhyne, P. J. Garry, and J. S. Goodwin. 1990. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J.Gerontol.* 45:M45.
 9. Bender, B. S., J. E. Nagel, W. H. Adler, and R. Andres. 1986. Absolute peripheral blood lymphocyte count and subsequent mortality of elderly men. The Baltimore longitudinal study of aging. *J.Am.Geriatr.Soc.* 34:649.
 10. Boersma, W. J., F. A. Steinmeier, and J. J. Haaijman. 1985. Age-related changes in the relative numbers of Thy-1- and Lyt-2-bearing peripheral blood lymphocytes in mice: a longitudinal approach. *Cell Immunol.* 93:417.
 11. Miller, R. A., P. Turke, C. Chrisp, J. Ruger, A. Luciano, J. Peterson, K. Chalmers, G. Gorgas, and S. VanCise. 1994. Age-sensitive T cell phenotypes covary in genetically heterogeneous mice and predict early death from lymphoma. *J.Gerontol.* 49:B255.
 12. George, A. J. and M. A. Ritter. 1996. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol.Today* 17:267.
 13. Metcalf, D. 1963. The autonomous behaviour of normal thymus grafts. *Austr.J.Exp.Biol.* 41:437.

14. Freitas, A. A., F. Agenes, and G. C. Coutinho. 1996. Cellular competition modulates survival and selection of CD8⁺ T cells. *Eur.J.Immunol.* 26:2640.
15. Teague, T. K., P. Marrack, J. W. Kappler, and A. T. Vella. 1997. IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J.Immunol.* 158:5791.
16. Gabor, M. J., R. Scollay, and D. I. Godfrey. 1997. Thymic T cell export is not influenced by the peripheral T cell pool. *Eur.J.Immunol.* 27:2986.
17. Mackall, C. L., T. A. Fleisher, M. R. Brown, I. T. Magrath, A. T. Shad, M. E. Horowitz, L. H. Wexler, M. A. Adde, L. L. McClure, and R. E. Gress. 1994. Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. *Blood* 84:2221.
18. Mackall, C. L., T. A. Fleisher, M. R. Brown, M. P. Andrich, C. C. Chen, I. M. Feuerstein, M. E. Horowitz, I. T. Magrath, A. T. Shad, and S. M. Steinberg. 1995. Age, thymopoiesis, and CD4⁺ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N.Engl.J.Med.* 332:143.
19. Mackall, C. L., T. A. Fleisher, M. R. Brown, M. P. Andrich, C. C. Chen, I. M. Feuerstein, I. T. Magrath, L. H. Wexler, D. S. Dimitrov, and R. E. Gress. 1997. Distinctions between CD8⁺ and CD4⁺ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 89:3700.
20. Hakim, F. T., R. Cepeda, S. Kaimei, C. L. Mackall, N. McAtee, J. Zujewski, K. Cowan, and R. E. Gress. 1997. Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in

- adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. *Blood* 90:3789.
21. McCune, J. M., R. Loftus, D. K. Schmidt, P. Carroll, D. Webster, L. B. Swor-Yim, I. R. Francis, B. H. Gross, and R. M. Grant. 1998. High prevalence of thymic tissue in adults with human immunodeficiency virus-1 infection. *J.Clin.Invest.* 101:2301.
 22. Sprent, J., M. Schaefer, M. Hurd, C. D. Surh, and Y. Ron. 1991. Mature murine B and T cells transferred to SCID mice can survive indefinitely and many maintain a virgin phenotype. *J.Exp.Med.* 174:717.
 23. Rocha, B., D. Guy-Grand, and P. Vassalli. 1995. Extrathymic T cell differentiation. *Curr.Opin.Immunol.* 7:235.
 24. Abo, T., H. Watanabe, T. Iiai, M. Kimura, K. Ohtsuka, K. Sato, M. Ogawa, H. Hirahara, S. Hashimoto, and H. Sekikawa. 1994. Extrathymic pathways of T-cell differentiation in the liver and other organs. *Int.Rev.Immunol.* 11:61.
 25. Dejbakhsh-Jones, S., L. Jerabek, I. L. Weissman, and S. Strober. 1995. Extrathymic maturation of $\alpha\beta$ T cells from hemopoietic stem cells. *J.Immunol.* 155:3338.
 26. Garcia-Ojeda, M. E., S. Dejbakhsh-Jones, I. L. Weissman, and S. Strober. 1998. An alternate pathway for T cell development supported by the bone marrow microenvironment: recapitulation of thymic maturation. *J.Exp.Med.* 187:1813.

27. Saito, H., Y. Kanamori, T. Takemori, H. Nariuchi, E. Kubota, H. Takahashi-Iwanaga, T. Iwanaga, and H. Ishikawa . 1998. Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science* 280:275.
28. Collins, C., S. Norris, G. McEntee, O. Traynor, L. Bruno, H. von Boehmer, J. Hegarty, and C. O'Farrelly. 1996. RAG1, RAG2 and pre-T cell receptor α chain expression by adult human hepatic T cells: evidence for extrathymic T cell maturation. *Eur.J.Immunol.* 26:3114.
29. Sato, K., K. Ohtsuka, K. Hasegawa, S. Yamagiwa, H. Watanabe, H. Asakura, and T. Abo. 1995. Evidence for extrathymic generation of intermediate T cell receptor cells in the liver revealed in thymectomized, irradiated mice subjected to bone marrow transplantation. *J.Exp.Med.* 182:759.
30. Malik, N., H. S. Haugen, B. Modrell, M. Shoyab, and C. H. Clegg. 1995. Developmental abnormalities in mice transgenic for bovine oncostatin M. *Mol.Cell Biol.* 15:2349.
31. Clegg, C. H., J. T. Rulffes, P. M. Wallace, and H. S. Haugen. 1996. Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature* 384:261.
32. Clegg, C. H., H. S. Haugen, J. T. Rulffes, S. L. Friend, and A. G. Farr. 1999. Oncostatin M transforms lymphoid tissue function in transgenic mice by stimulating lymph node T-cell development and thymus autoantibody production. *Exp.Hematol.* 27:712.

33. Malik, N., J. C. Kallestad, N. L. Gunderson, S. D. Austin, M. G. Neubauer, V. Ochs, H. Marquardt, J. M. Zarling, M. Shoyab, and C. M. Wei. 1989. Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol.Cell Biol.* 9:2847.
34. Wallace, P. M., J. F. MacMaster, K. A. Rouleau, T. J. Brown, J. K. Loy, K. L. Donaldson, and A. F. Wahl. 1999. Regulation of inflammatory responses by oncostatin M. *J.Immunol.* 162:5547.
35. Loy, J. K., T. J. Davidson, K. K. Berry, J. F. Macmaster, B. Danle, and S. K. Durham. 1999. Oncostatin M: development of a pleiotropic cytokine. *Toxicol.Pathol.* 27:151.
36. Poussier, P., P. Edouard, C. Lee, M. Binnie, and M. Julius. 1992. Thymus-independent development and negative selection of T cells expressing T cell receptor $\alpha\beta$ in the intestinal epithelium: evidence for distinct circulation patterns of gut- and thymus-derived T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 176:187.
37. Dulude, G., S. Brochu, P. Fontaine, C. Baron, M. Gyger, D. C. Roy, and C. Perreault. 1997. Thymic and extrathymic differentiation and expansion of T lymphocytes following bone marrow transplantation in irradiated recipients. *Exp.Hematol.* 25:992.
38. Dulude, G., D. C. Roy, and C. Perreault. 1999. The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J.Exp.Med.* 189:1329.

39. Wells, A. D., H. Gudmundsdottir, and L. A. Turka. 1997. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J.Clin.Invest.* 100:3173.
40. Poussier, P. and M. Julius. 1994. Thymus independent T cell development and selection in the intestinal epithelium. *Annu.Rev.Immunol.* 12:521.
41. Walker, P. R., T. Ohteki, J. A. Lopez, H. R. MacDonald, and J. L. Maryanski. 1995. Distinct phenotypes of antigen-selected CD8 T cells emerge at different stages of an in vivo immune response. *J.Immunol.* 155:3443.
42. Sprent, J. 1997. Immunological memory. *Curr.Opin.Immunol.* 9:371.
43. Ernst, B., D. S. Lee, J. M. Chang, J. Sprent, and C. D. Surh. 1999. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 11:173.
44. Goldrath, A. W. and M. J. Bevan. 1999. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8⁺ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity* 11:183.
45. Watanabe, H., C. Miyaji, Y. Kawachi, T. Iiai, K. Ohtsuka, T. Iwanaga, H. Takahashi-Iwanaga, and T. Abo. 1995. Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1⁺ T cells in various immune organs. NK1.1⁺ T cells are present within a population of intermediate TCR cells. *J.Immunol.* 155:2972.

46. Eberl, G. and H. R. MacDonald. 1998. Rapid death and regeneration of NKT cells in anti-CD3 ϵ - or IL-12- treated mice: a major role for bone marrow in NKT cell homeostasis. *Immunity* 9:345.
47. Bendelac, A., M. N. Rivera, S. H. Park, and J. H. Roark. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu.Rev.Immunol.* 15:535.
48. Pawelec, G., R. Muller, A. Rehbein, K. Hahnel, and B. L. Ziegler. 1999. Finite lifespans of T cell clones derived from CD34⁺ human haematopoietic stem cells in vitro. *Exp.Gerontol.* 34:69.
49. Peters, M., A. M. Iler, and S. Rose-John. 1998. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 92:3495.
50. Uyttenhove, C., P. G. Coulie, and J. Van Snick. 1988. T cell growth and differentiation induced by interleukin-HP1/IL-6, the murine hybridoma/plasmacytoma growth factor. *J.Exp.Med.* 167:1417.
51. Lotz, M., F. Jirik, P. Kabouridis, C. Tsoukas, T. Hirano, T. Kishimoto, and D. A. Carson. 1988. B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 167:1253.

52. Kishimoto, H. and J. Sprent. 1999. Strong TCR ligation without costimulation causes rapid onset of Fas-dependent apoptosis of naive murine CD4⁺ T cells. *J.Immunol.* 163:1817.
53. Gapin, L., Y. Fukui, J. Kanellopoulos, T. Sano, A. Casrouge, V. Malier, E. Beaudoin, D. Gautheret, J. M. Claverie, T. Sasazuki, and P. Kourilsky. 1998. Quantitative analysis of the T cell repertoire selected by a single peptide-major histocompatibility complex. *J.Exp.Med.* 187:1871.
54. Friedman, T. M., M. Gilbert, C. Briggs, and R. Korngold. 1998. Repertoire analysis of CD8⁺ T cell responses to minor histocompatibility antigens involved in graft-versus-host disease. *J.Immunol.* 161:41.
55. Tough, D. F. and J. Sprent. 1994. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J.Exp.Med.* 179:1127.
56. Modigliani, Y., G. Coutinho, O. Burlen-Defranoux, A. Coutinho, and A. Bandeira. 1994. Differential contribution of thymic outputs and peripheral expansion in the development of peripheral T cell pools. *Eur.J.Immunol.* 24:1223.
57. von Boehmer, H. and K. Hafen. 1993. The life span of naive α/β T cells in secondary lymphoid organs. *J.Exp.Med.* 177:891.
58. Imhof, B. A. and D. Dunon. 1995. Leukocyte migration and adhesion. *Adv.Immunol.* 58:345.

59. Anderson, G., N. C. Moore, J. J. Owen, and E. J. Jenkinson. 1996. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu.Rev.Immunol.* 14:73.
60. Westermann, J. and U. Bode. 1999. Distribution of activated T cells migrating through the body: a matter of life and death. *Immunol.Today* 20:302.
61. Campbell, J. J., J. Pan, and E. C. Butcher. 1999. Developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J.Immunol.* 163:2353.
62. Roberts, C. W., J. R. Shutter, and S. J. Korsmeyer. 1994. *Hox11* controls the genesis of the spleen. *Nature* 368:747.
63. Yokota, Y., A. Mansouri, S. Mori, S. Sugawara, S. Adachi, S. Nishikawa, and P. Gruss. 1999. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* 397:702.
64. Kong, Y. Y., H. Yoshida, I. Sarosi, H. L. Tan, E. Timms, C. Capparelli, S. Morony, A. J. Oliveira-dos-Santos, G. Van, A. Itie, W. Khoo, A. Wakeham, C. R. Dunstan, D. L. Lacey, T. W. Mak, W. J. Boyle, and J. M. Penninger. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397:315.
65. Fu, Y. X. and D. D. Chaplin. 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu.Rev.Immunol.* 17:399.
66. Antica, M. and R. Scollay. 1999. Development of T lymphocytes at extrathymic sites. *J.Immunol.* 163:206.

67. Jameson, S. C., K. A. Hogquist, and M. J. Bevan. 1995. Positive selection of thymocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 13:93.
68. Anderson, G., K. J. Hare, and E. J. Jenkinson. 1999. Positive selection of thymocytes: the long and winding road. *Immunol.Today* 20:463.
69. Zinkernagel, R. M. and A. Althage. 1999. On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:8092.
70. Zerrahn, J., A. Volkmann, M. C. Coles, W. Held, F. A. Lemonnier, and D. H. Raulet. 1999. Class I molecules on hematopoietic cells can support intrathymic positive selection of T cell receptor transgenic T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:11470.
71. Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565.
72. Nestic, D. and S. Vukmanovic. 1998. MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8⁺ thymic emigrants. *J.Immunol.* 160:3705.
73. Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur.J.Immunol.* 28:2760.
74. Willmann, K., D.F. Legler, M. Loetscher, R. Stuber Roos, M. Belen Delgado, I. Clark-Lewis, M. Bagglioni, and B. Moser. 1998. The chemokine SLC is expressed

- in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur.J.Immunol.* 28:2025.
75. Tanchot, C. and B. Rocha. 1998. The organization of mature T-cell pools. *Immunol.Today* 19:575.
76. Tanchot, C., F. A. Lemonnier, B. Perarnau, A. A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276:2057.
77. Sallusto, F., B. Palermo, D. Lenig, M. Miettinen, S. Matikainen, I. Julkunen, R. Forster, R. Burgstahler, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur.J.Immunol.* 29:1617.
78. Metcalf, D. 1997. Murine hematopoietic stem cells committed to macrophage/dendritic cell formation: stimulation by Flk2-ligand with enhancement by regulators using the gp130 receptor chain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:11552.
79. Drakesmith, H., D. O'Neil, S. C. Schneider, M. Binks, P. Medd, E. Sercarz, P. Beverley, and B. Chain. 1998. In vivo priming of T cells against cryptic determinants by dendritic cells exposed to interleukin 6 and native antigen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95:14903.

Footnotes

¹This work was supported by the National Cancer Institute of Canada (CP).

²Corresponding author: Claude Perreault

Guy-Bernier Research Center

Maisonneuve-Rosemont Hospital

5415 de l'Assomption blvd.

Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

Telephone: (514) 252-3557, Fax: (514) 252-3430

Internet: c.perreault@videotron.ca

³Abbreviations used in this paper: B6, C57BL/6J; B6.PL, B6.PL-*Thy-1^a*/Cy; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; CFSE, carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester; OM, oncostatin M

Figure Legends

Figure 1. Proportion of lymphocyte subsets in the thymus, mesenteric LNs and spleen of LckOM mice and B6 controls. Based on three-color staining, cells were defined as double negative T cells ($\text{Thy1}^+\text{CD4}^-\text{CD8}^-$), double positive T cells ($\text{Thy1}^+\text{CD4}^+\text{CD8}^+$), single positive T cells ($\text{Thy1}^+\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ or $\text{Thy1}^+\text{CD4}^-\text{CD8}^+$), or B lymphocytes ($\text{Thy1}^-\text{CD19}^+$). Results represent the mean of 3-4 mice per group.

Figure 2. Absolute numbers of lymphocyte subsets in the thymus, mesenteric LNs and spleen of LckOM mice and B6 controls. Populations were defined as in Fig. 1. Results represent the mean of 3-4 mice per group.

Figure 3. T lymphocyte subsets in the bone marrow (tibiae + femurs), liver, and intestine of LckOM and B6 mice. Populations were defined as in Fig. 1. DP = $\text{Thy1}^+\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ cells. The number (mean \pm SD) of DP cells in the various organs is shown above the bars. Three to four mice per group.

Figure 4. Expression of differentiation markers (CD44, CD45RB, CD62L, IL-2R β and NK1.1) by CD4^+ and CD8^+ mesenteric LN T lymphocytes from 6 wk old LckOM (bold line) and B6 mice (dotted line). Three-color staining was performed with anti-CD4, anti-CD8, and either anti-CD44, anti-CD45RB, anti-CD62L, anti-IL-2R β or anti-NK1.1 antibodies. The percentages of LckOM cells on each side of the marker are indicated. These results are representative of three such experiments.

Figure 5. TCR repertoire of extrathymic T cells. Hematopoietic chimeras were created by injecting a 1:1 mixture of B6.PL fetal liver cells and T cell-depleted LckOM bone marrow cells into lethally irradiated/thymectomized B6 mice. **A)** Presence of CD4⁺CD8⁺ cells in the mesenteric LNs of hematopoietic chimeras, 75 days after transplantation. **B)** A large proportion of CD4⁺CD8⁺ cells originate from non-transgenic fetal liver cells (i.e., are Thy1.1⁺). Dot plot histogram gated on CD4⁺CD8⁺ cells. **C)** V β expression patterns in CD4⁺ and CD8⁺ splenocytes from euthymic B6 mice (thymic T cells), LckOM mice, and Thy1.1⁺ cells (derived from B6.PL fetal liver cells) of hematopoietic chimeras (extrathymic T cells). These results represent the mean of 5 - 7 individuals per group. Error bars represent SD.

Figure 6. Incorporation (pulse) and decay (chase) of BrdU label in extrathymic vs conventional CD4⁺ and CD8⁺ spleen T cells. Normal B6 mice and hematopoietic chimeras were given BrdU water for 20 days, then BrdU was chased for 50 days by transferring mice to normal drinking water. At various time points, splenocytes were harvested and analysed by four-color staining. In hematopoietic chimeras, created as in Fig. 5, analyses were done on Thy1.1⁺ T cells i.e., extrathymic T cells derived from B6.PL fetal liver cells. Each point represents the mean of 2-3 individuals.

Figure 7. Migration of CFSE-labeled LckOM and B6 T cells. Spleen cell suspensions containing $43 \pm 5 \times 10^6$ CFSE-labeled T lymphocytes derived from LckOM or B6 mice were injected through the tail vein of LckOM or B6 recipients. Recipients were sacrificed

after 36 h to assess the numbers of CFSE-labeled T cells in the spleen and mesenteric LNs.

A) The mesenteric LN/spleen ratio was calculated from the absolute number of CFSE⁺ T cells recovered from these two sites. Each dot represents one individual. The bar indicates the mean of the group. MLN/spleen ratio differences in LckOM vs B6 recipients were significant ($p < 0.05$, Student's *t* test) for CD4⁺ and CD8⁺ T cells from B6 as well as LckOM donors. **B)** Absolute number (mean $\times 10^6 \pm$ SD) of CD4⁺ and CD8⁺ B6-derived T cells harvested from the spleen and mesenteric LN of B6 and LckOM recipients. Five to seven mice per group.

Table I. *Absolute number of lymphocytes in the thymus, mesenteric LNs, and spleen of 12 week-old LckOM and C57BL/6 mice^c.*

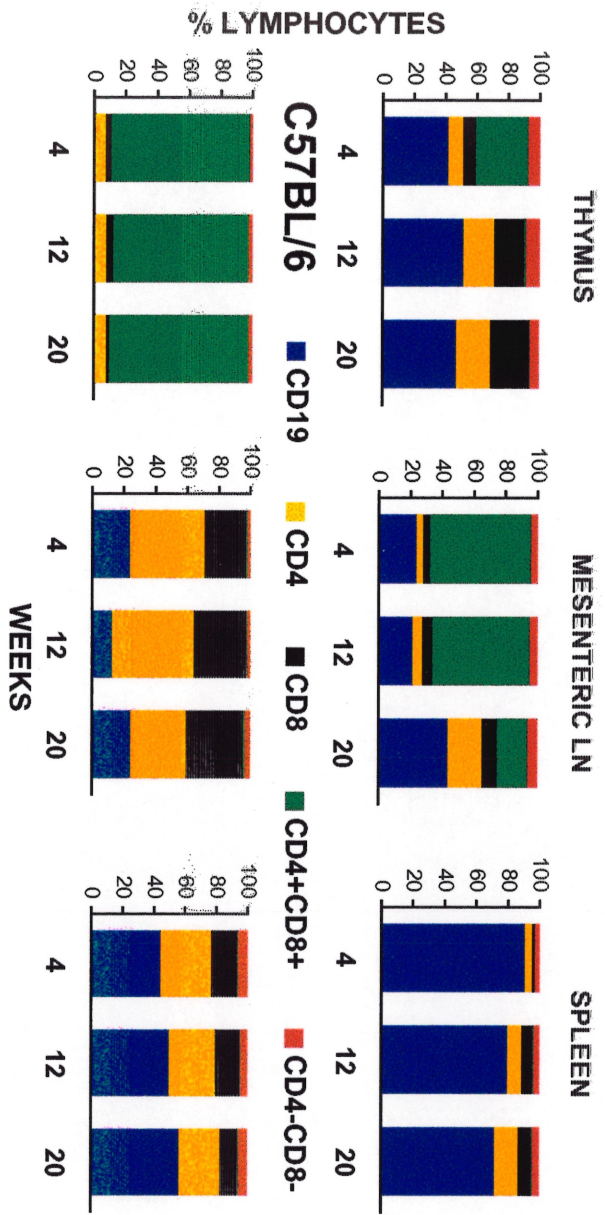
Organ	Phenotype	LckOM	C57BL/6
		Lymphocytes x10 ⁶ ±SD	
Thymus	CD19 ⁺	24.32±12.4	0.39±0.29
	CD4 ⁺	8.53±0.96	5.59±0.19
	CD8 ⁺	8.83±3.31	3.52±1.83
	DP ^a	0.5±0.32	63.57±7.7
	DN ^b	3.49±0.12	1.63±0.2
Mes LNs	CD19 ⁺	95.62±83.8	3.87±1.91
	CD4 ⁺	24.34±20.8	4.23±0.65
	CD8 ⁺	18.18±6.63	2.82±0.7
	DP ^a	214.8±121.9	0.11±0.12
	DN ^b	17.41±13.1	0.32±0.17
Spleen	CD19 ⁺	147.3±143.5	29.07±13.6
	CD4 ⁺	14.61±12.9	17.85±9.72
	CD8 ⁺	12.57±12.6	9.46±4.18
	DP ^a	2.25±3.23	0.21±0.02
	DN ^b	4.84±3.03	2.44±1.0

^a DP, double positive T lymphocytes (Thy1.2⁺ CD4⁺ CD8⁺)

^b DN, double negative T lymphocytes (Thy1.2⁺ CD4⁻ CD8⁻)

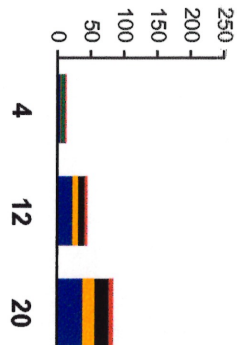
^c 4-5 mice per group

LckOM

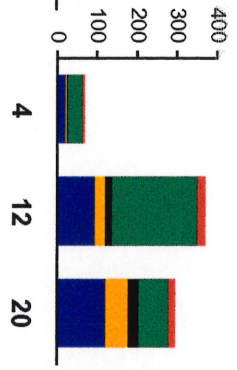


LckOM

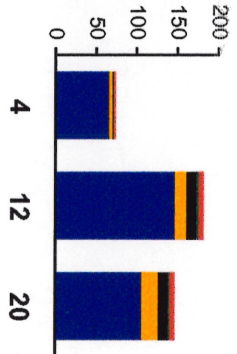
THYMUS



MESENTERIC LN



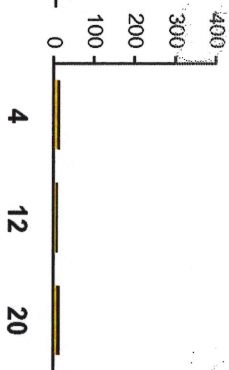
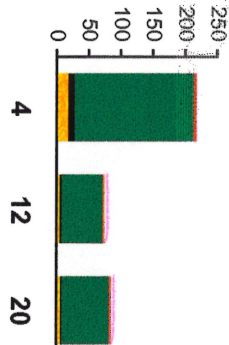
SPLEEN



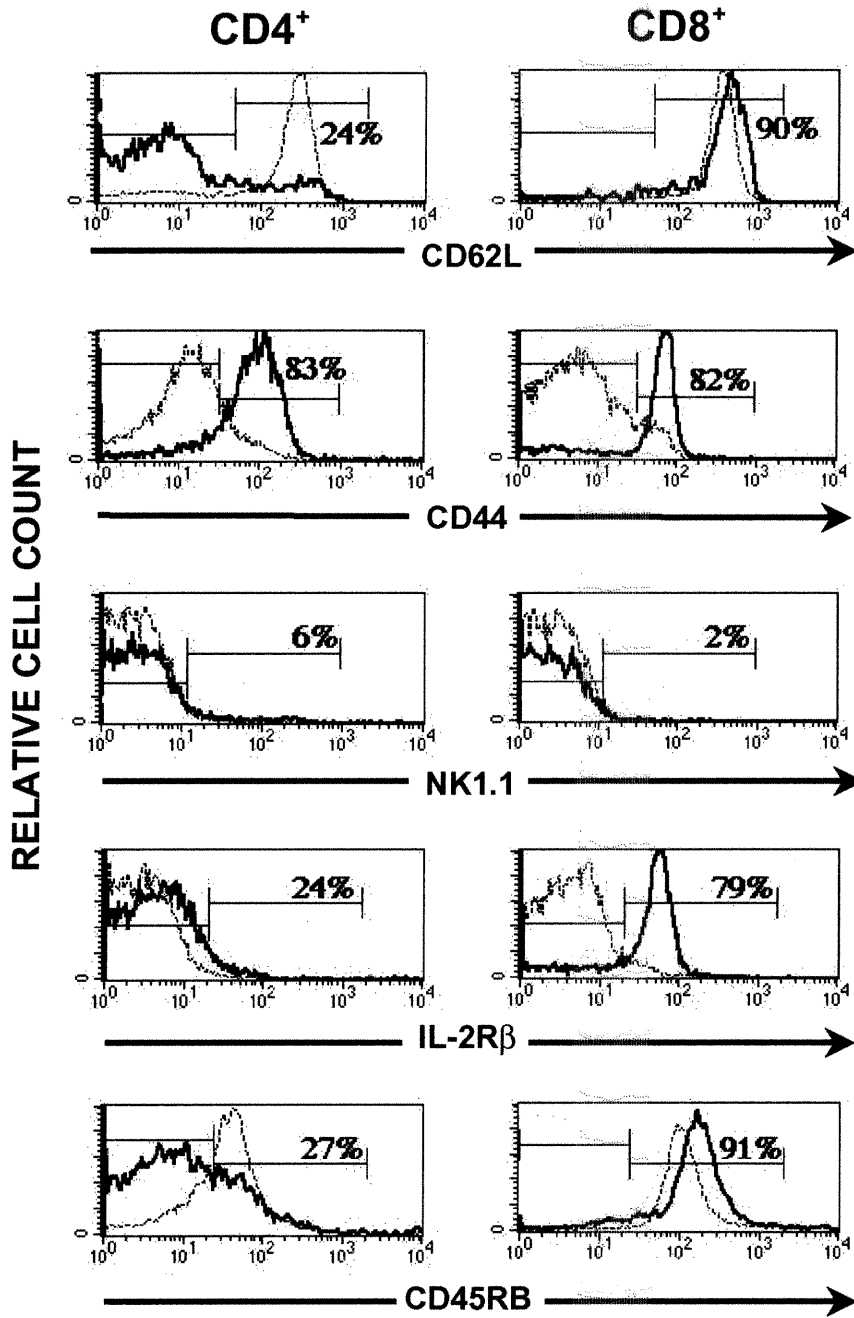
C57BL/6

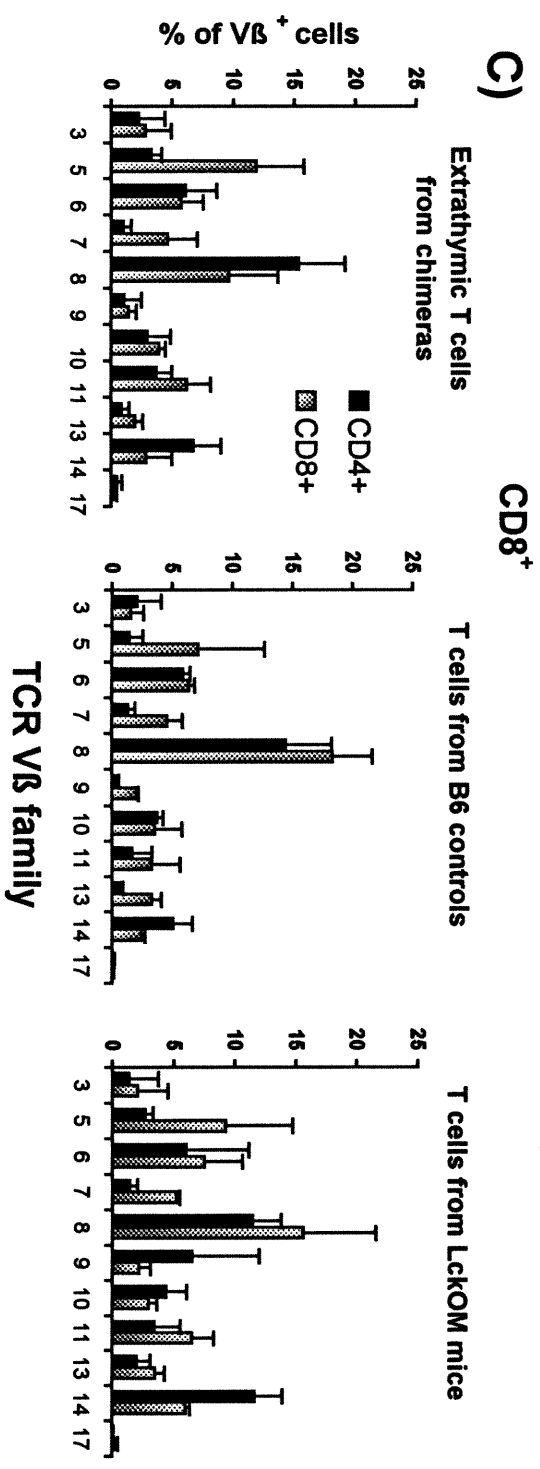
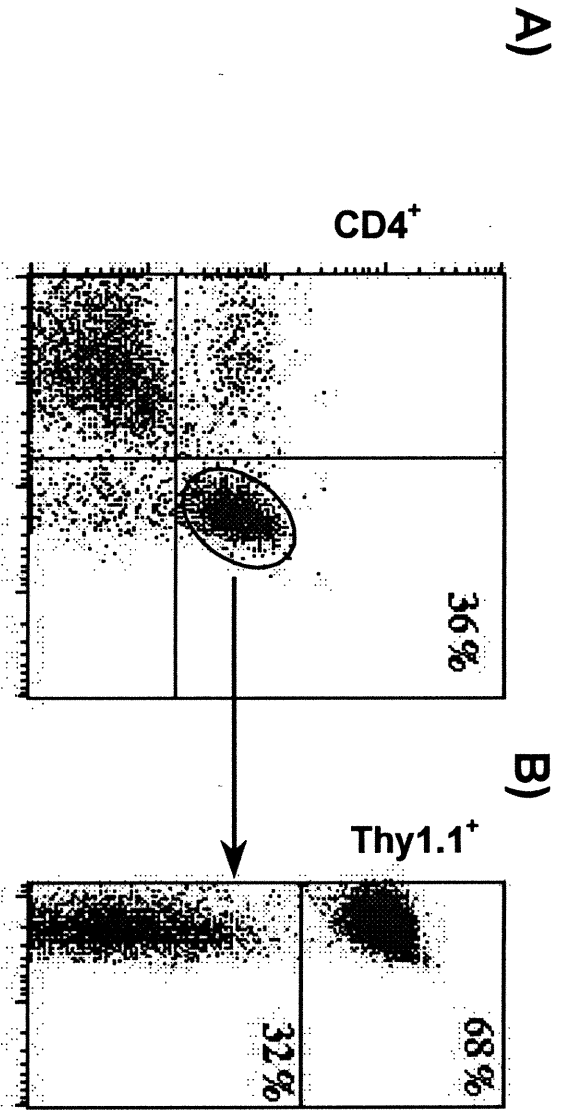
■ CD19
 ■ CD4
 ■ CD8
 ■ CD4+CD8+
 ■ CD4-CD8-

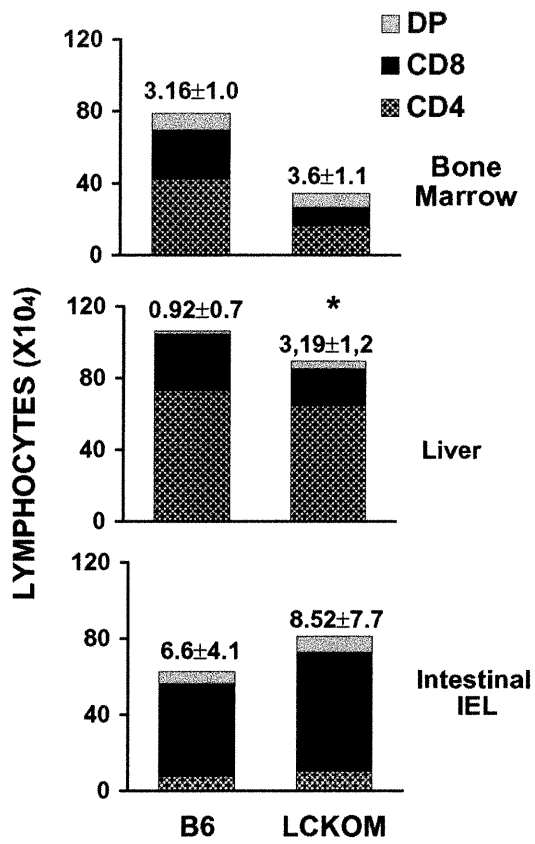
LYMPHOCYTES (X million)

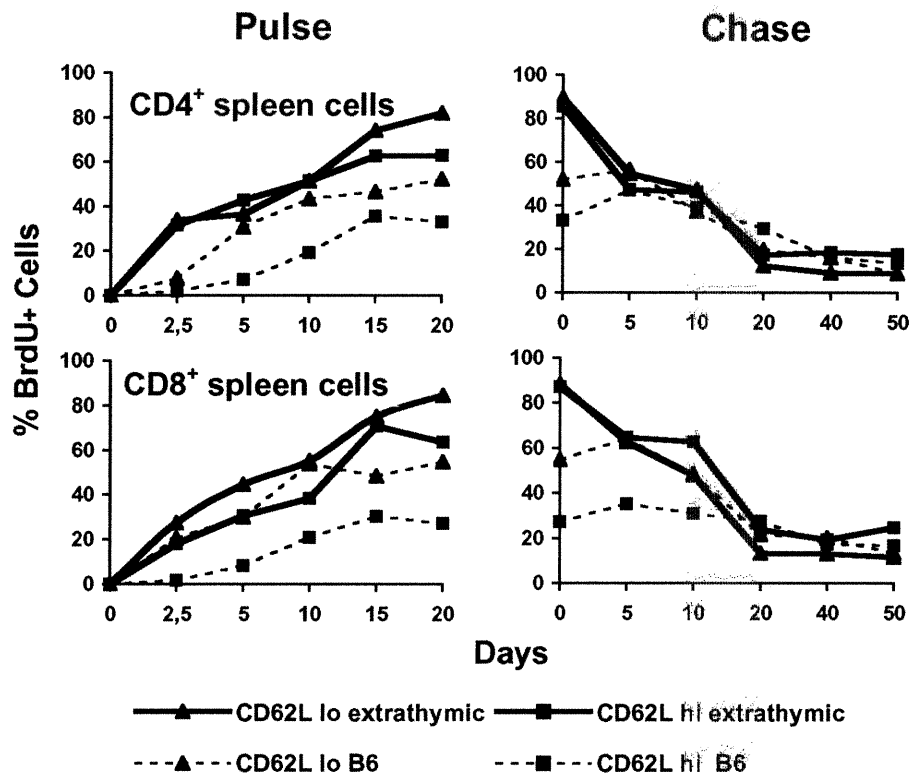


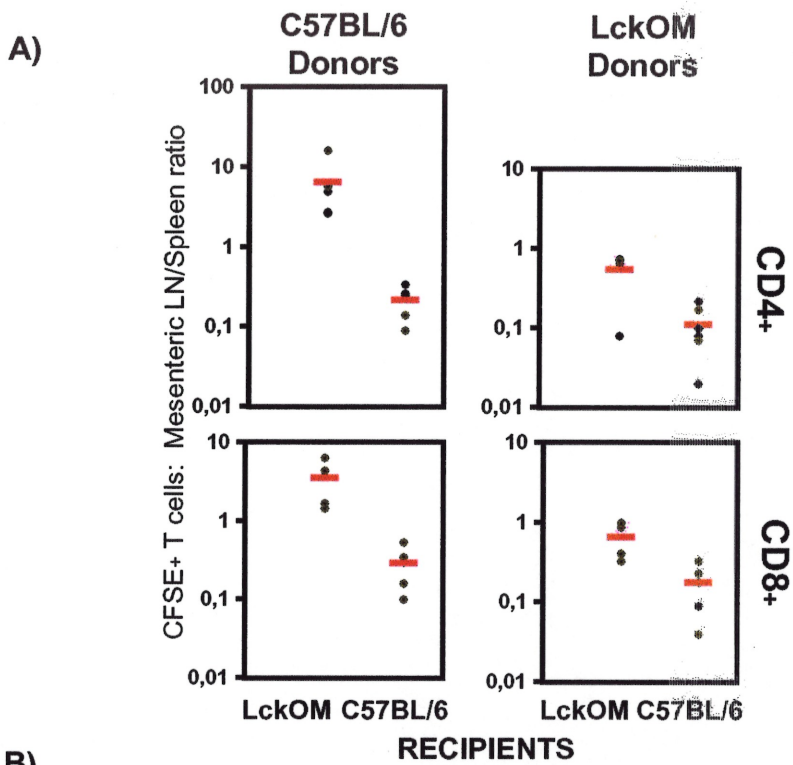
WEEKS











B)

Phenotype	Number of CFSE ⁺ T Lymphocytes (mean x10 ⁶ ±SD)			
	B6 LN	LckOM LN	B6 Spleen	LckOM Spleen
CD4 ⁺	0,53±0,33	1,43±1,12	2,40±0,80	0,27±0,19
CD8 ⁺	0,44±0,24	1,01±0,89	1,34±0,29	0,14±0,14

11. Discussion

Depuis la découverte d'une voie de lymphopoïèse extrathymique chez les souris LckOM, la capacité de changer la production et la prolifération des lymphocytes T peut être attribuée à l'OM lorsque celui-ci est exprimé en abondance. Le but général de ce projet de maîtrise était de décrire un phénomène complexe se produisant lorsque l'OM est surexprimé par les lymphocytes T immatures. Premièrement, ces travaux ont démontré que chez la souris LckOM les organes lymphoïdes secondaires sont affectés différemment. Alors que la lymphopoïèse T extrathymique est strictement réservée aux ganglions, qui développent dès l'âge de 1 semaine un nombre considérable de lymphocytes immatures, la rate accumule un nombre important de lymphocytes B sans être surpeuplée par des lymphocytes T. Deuxièmement, les expériences sur le modèle de chimères hématopoïétiques confirment la thymo-indépendance du phénomène étudié. En absence de toutes contributions thymiques, des CSH provenant de foies fœtaux normaux, sous l'influence paracrine de l'OM, colonisent exclusivement les ganglions de souris irradiées et se différencient en lymphocytes T dont le répertoire est polyclonal. Troisièmement, sous l'influence de l'OM, les lymphocytes matures expriment un phénotype particulier suggérant la survenue d'une expérience antigénique antérieure. Les lymphocytes T $CD4^+$ sont $CD62L^{lo}$, $CD44^{hi}$, $IL-2R\beta^-$, $NK1.1^-$, $CD45RB^{lo}$ et les lymphocytes T $CD8^+$ sont $CD62L^{hi}$, $CD44^{hi}$, $IL-2R\beta^+$, $NK1.1^-$, $CD45RB^{hi}$. Finalement, tous les lymphocytes qui se développent sous l'influence l'OM adoptent un rythme de prolifération rapide et migrent préférentiellement dans les ganglions.

11.1 La pertinence d'étudier ce modèle transgénique.

La souris transgénique LckOM représente un modèle intéressant pour étudier le développement de lymphocytes T extrathymiques, par contre, nous ne sommes pas convaincus que les phénomènes retrouvés chez cette souris correspondent à l'amplification de phénomènes normaux. La présence de lymphocytes immatures $CD4^+CD8^+$ dans les ganglions est à peine perceptible dans les conditions

physiologiques normales, probablement car l'OM n'est ni exprimé en quantité suffisante, ni au moment propice pour favoriser le développement d'une telle population. Les animaux transgéniques représentent de puissants outils de recherche devenus presque indispensables aux progrès scientifiques. Par contre, les modèles transgéniques peuvent parfois dépasser les limites du « physiologique » car l'expression ectopique et la quantité non physiologique d'un transgène peuvent déséquilibrer l'organisme et engendrer de nombreux effets secondaires. En suivant ce raisonnement il est donc impossible d'attribuer à l'OM un rôle dans le développement extrathymique de lymphocytes T puisque les conditions observées ne sont pas normales, ou physiologiques. Ce qui est possible d'affirmer est qu'à l'état normal, les ganglions ne produisent pas de lymphocytes de façon significative, mais que sous l'influence de l'OM, ces organes initient un mécanisme de lymphopoïèse qui semble entrer en compétition avec la thymopoïèse normale du thymus. À ce niveau, il faudra évaluer la possibilité d'utiliser l'OM pour des fins thérapeutiques.

11.2 Thymopoïèse extrathymique dans les ganglions

L'observation sans doute la plus intrigante de ces travaux est le nombre impressionnant de lymphocytes $CD4^+CD8^+$ dans les ganglions des souris LckOM. Les mécanismes par lesquels ces organes lymphoïdes dirigent une telle production de lymphocytes T seront le sujet des études ultérieures du laboratoire de C.Perreault. Jusqu'à présent, quelques travaux nous aident à comprendre comment les ganglions peuvent subvenir aux besoins des lymphocytes en voie de maturation.

11.2.1 Évidence qui démontre que les ganglions peuvent soutenir la maturation de lymphocytes T déjà « commis » dans le thymus.

Des travaux récents menés par l'équipe de Scollay, mettent en évidence une voie de différenciation de lymphocytes T dans les ganglions⁵⁸. Ceux-ci démontrent que les ganglions peuvent supporter la maturation de thymocytes immatures $CD4^-CD8^-$ en lymphocytes T $CD4^+$ ou $CD8^+$ matures. Les lymphocytes immatures

d'origine thymique (adulte ou fœtal), mais non ceux qui proviennent du foie fœtal, migrent vers ces organes lymphoïdes lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse dans des receveurs irradiés et thymectomisés, indiquant que ce phénomène se fait en absence de contributions thymiques. L'incapacité des cellules souches du foie fœtal de se différencier dans les ganglions, suggèrent que ces organes ne peuvent pas jouer la totalité des rôles du thymus : les précurseurs thymiques doivent passer par le thymus avant de générer des cellules $CD4^+$ et $CD8^+$ dans les ganglions. L'accumulation dans les ganglions des receveurs, d'une population donneur $CD4^+CD8^+$, qui normalement est presque exclusivement retrouvée dans le cortex thymique, est un indice que les ganglions peuvent procurer aux lymphocytes immatures l'environnement requis pour leur croissance. Cette population DP est très rarement détectée à l'extérieur du thymus, mais certains cas ont été documentés^{59,60}.

11.2.2 Présence de DP dans les ganglions de souris néonatales

Chez des souris néonatales jusqu'à l'âge de 10 jours, le thymus exporte en périphérie des lymphocytes T immatures avant le processus de sélection négative, et ceux-ci vont se loger dans les ganglions, mais pas dans la rate⁵⁹. Ces lymphocytes T DP peuvent représenter jusqu'à 70% des lymphocytes T de ces organes, et malgré l'incertitude qui existe au sujet de leur destinée, l'hypothèse a été émise qui décrit que ces lymphocytes pourraient se différencier et donner naissance à une population lymphocytaire auto-réactive.

11.2.3 Présence de DP dans les ganglions de rats traités à la cyclosporine A

Des chercheurs ont observé la présence d'une population de lymphocytes $CD4^+CD8^+$ dans les ganglions de rats adultes qui développent des maladies auto-immunes suite à des traitements avec le médicament immunosuppresseur cyclosporine A⁵⁹. Les observations faites par ces chercheurs appuient l'hypothèse qui stipule que les thymocytes relâchés prématurément par le thymus et qui se différencient dans les ganglions possèdent un potentiel auto-réactif.

Dans ces deux cas, la présence de DP résultait d'une sortie prématurée du thymus, une sortie avant la sélection négative qui élimine les cellules auto-réactives, et ceci entraîne probablement l'apparition de maladies auto-immunes.

11.2.4 Présence de DP dans les ganglions causée par une expression aberrante du gène homéotique *Hlx*

Une mutation dans le gène homéotique *Hlx* induit son expression constitutive dans les lymphocytes T et B, et cause des troubles importants dans le développement des lymphocytes. L'expression aberrante de *Hlx* entraîne une disparition des populations matures $CD4^+$ et $CD8^+$ dans le thymus, et parallèlement, une apparition de lymphocytes T $CD4^+CD8^+$ dans les ganglions, mais cette fois-ci cette présence de DP est aussi détectée dans la rate ⁶⁰. Dans le compartiment lymphoïde, le gène *Hlx* est normalement exprimé uniquement lors des stades précoces de maturation des lymphocytes B, mais les anomalies qui surviennent chez ces souris mutantes indiquent que *Hlx* peut influencer la maturation des lymphocytes T aussi bien que des lymphocytes B. Le thymus de ces souris est déficient en lymphocytes T matures, phénomène qui est peut-être dû à la sortie prématurée de lymphocytes immatures dans la périphérie à cause d'un manque de molécules d'adhésions.

Collectivement, les résultats présentés dans la section 11.2 montrent à quel point le développement des lymphocytes T, de l'embryogenèse jusqu'à l'âge adulte, est sensible aux changements dans l'organisme. Malgré l'impression dégagée que le rôle de chaque organe du système immunitaire est bien défini, ces travaux révèlent une plasticité surprenante dans ce système de défense.

11.3 Facteurs essentiels pour l'établissement de la thymopoïèse extrathymique dans les ganglions.

11.3.1 Migration de cellules souches vers les ganglions

Les facteurs essentiels à l'engendrement de la production de lymphocytes T par les ganglions impliquent sans doute la migration de précurseurs hématopoïétiques dans ces organes, laissant sous-entendre que l'expression de molécules d'adhésion ou de chémokines par les cellules des ganglions est favorable à cette migration ⁶¹.

11.3.2 Organisation structurelle : Niches pour les processus de sélection positive et négative

Afin que la thymopoïèse extrathymique chez les souris LckOM soit un phénomène efficace, l'organisation structurelle des ganglions doit en principe faciliter les interactions cellulaires qui sont nécessaires à la sélection, à la prolifération et à la survie des cellules qui s'y développent. L'architecture des ganglions LckOM, comme celle du thymus normal, doit consister de niches où les cellules en voie de différenciation peuvent interagir sans encombrement avec les CPA. Avec une telle découverte sur le développement extrathymique de lymphocytes T fonctionnels et d'origine polyclonale, nous devons reconsidérer le rôle du thymus comme site exclusif de thymopoïèse, et devons réanalyser les notions établies sur les phénomènes de sélection positive et négative. Nos travaux ne nous permettent pas pour le moment de spéculer sur une éventuelle sélection négative dans les ganglions LckOM. Nous pouvons cependant souligner que Matzinger *et al.* ont déjà démontré que les CPA périphériques peuvent initier une sélection négative aussi efficacement que les CPA thymiques ⁶².

11.3.3 Le rôle de l'épithélium thymique dans la sélection positive des thymocytes

Une récente publication par l'équipe de Zinkernagel tente d'éclaircir le rôle de l'épithélium thymique dans la sélection positive des thymocytes⁶³. Ceux-ci stipulent que le répertoire des lymphocytes T peut être sélectionné par les molécules du CMH exprimées à la surfaces des cellules hématopoïétiques, et que le soi-disant rôle exclusif de l'épithélium thymique peut être suppléé par ces cellules. Ce raisonnement vient du fait que des souris athymiques *nu/nu* H-2^d reconstituées avec un thymus de donneur incompatible H-2^b développent un répertoire de lymphocytes T qui est spécifique au génotype des souris *nu/nu* H-2^d et pas à celui du donneur de thymus allogénique. D'après ces travaux, chez les souris *nu/nu* greffées avec un thymus, le rôle du greffon se limiterait donc à procurer un environnement adéquat afin de promouvoir la différenciation et le réarrangement génique du récepteur T. La conclusion proposée par Zinkernagel annonce la chose suivante :

« La sélection positive et négative quoiqu'exécutées efficacement par le thymus, ne dépendent pas de cellules distinctes, et ne représentent pas nécessairement des événements séparés, il est possible que ces étapes résultent d'un événement unique guidé par l'affinité/avidité d'une interaction cellulaire qui pourrait avoir lieu dans un organe lymphoïde autre que le thymus. »

11.3.4 Nécessité de cytokines : l'IL-7

Néanmoins, en tentant d'approfondir les notions sur la lymphopoïèse ectopique remarquée chez les souris *LckOM*, Clegg *et al* ont signalé le rôle incontestable de l'IL-7 dans le développement de ce phénomène⁴⁰. L'IL-7 joue un rôle fondamental dans le développement des lymphocytes T matures normaux. Cette cytokine abondante dans le thymus et dans la moelle osseuse influence la prolifération des lymphocytes B et T progéniteurs, et envoie des signaux d'activation aux lymphocytes matures^{64,65}. Le rôle physiologique de l'IL-7 peut être observé chez des souris déficientes en récepteurs de l'IL-7. La maturation des lymphocytes T est interrompue chez ces souris, il y a très peu de thymocytes immatures ou matures.

De plus, les anomalies thymiques chez la souris congénitalement athymique *nu/nu* peuvent être corrigées grâce à l'insertion d'un transgène qui dirige l'expression de l'IL-7 dans les cellules lymphoïdes ⁶⁶.

11.4 L'Accumulation de lymphocytes T matures dans les ganglions

Les souris LckOM souffrent d'un phénotype de lymphoprolifération caractérisé par une splénomégalie et par une lymphadénopathie importante. Des phénotypes lymphoprolifératifs ont été décrits chez plusieurs types de souris mutantes, dont les souris *lpr/lpr* et *gld/gld* caractérisées par un dérèglement dans l'apoptose contrôlée par la molécule Fas et son ligand FasL ^{67,68}, et aussi les souris CTLA-4^{-/-} qui accumulent un nombre exagéré de lymphocytes T suite à leur activation via le TCR ⁶⁹⁻⁷¹. Par contre, le phénotype observé chez les souris LckOM se distingue de ces derniers particulièrement dans la distribution des lymphocytes T et B qui infiltrent la rate et les ganglions. Alors que les ganglions sont envahis par des lymphocytes T immatures et matures, la rate est infiltrée en majorité par des lymphocytes B et le nombre absolu de lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ reste normal. L'accumulation préférentielle de lymphocytes matures dans les ganglions et non dans la rate, suggère que l'OM influence spécifiquement les composantes du stroma ganglionnaire de telle sorte que cet organe est le site exclusif de production de lymphocytes T.

Les facteurs qui peuvent contribuer à une accumulation sélective dans les ganglions sont les suivants : **i)** la proportion de cellules qui immigrent par rapport aux cellules qui quittent les ganglions, **ii)** le degré de prolifération et **iii)** la durée de vie des cellules dans ces organes, et **iv)** la quantité de nouveaux lymphocytes produits *in situ*. À l'aide des expériences de marquage au BrdU et au CFSE, nous avons étudié les mécanismes de l'accumulation de lymphocytes T dans les ganglions.

11.4.1 La production *in situ* de nouveaux lymphocytes T

Nos expériences avec le BrdU ne permettent pas de quantifier précisément la production de nouveaux lymphocytes T par les ganglions. Par contre, d'après l'importante proportion de DP dans les ganglions et en prenant pour acquis que la différenciation de ceux-ci vers un stade mature est relativement efficace, nous pouvons déduire que la production *in situ* contribue à l'accumulation sélective dans ces organes.

11.4.2 Prolifération rapide des lymphocytes T dans les ganglions.

Les expériences de marquages au BrdU ont établi que les lymphocytes matures possèdent un rythme de prolifération supérieure à la normale dans la rate ainsi que dans les ganglions des souris LckOM et des chimères hématopoïétiques, ce qui favorise sans aucun doute l'accroissement de ces populations dans ces organes.

11.4.3 Migration préférentielle vers les ganglions.

Les expériences de migration nous ont démontré clairement qu'il y a un déplacement préférentiel des lymphocytes T matures vers les ganglions. Par contre, nous ne pouvons quantifier de façon précise dans quelle mesure l'accumulation de cellules T matures dans les ganglions est due à leur production *in situ* vs. à l'immigration préférentielle des cellules T en circulation, puisque les ganglions LckOM sont considérés comme des organes lymphoïdes primaires, où naissent de nombreux lymphocytes T, et aussi comme des organes lymphoïdes secondaires, visités perpétuellement par un flot de lymphocytes en circulation.

Nous percevons la migration vers les ganglions comme un événement dirigé par l'expression de molécules spécialisées dans le domaine de la chémotaxie : les chémokines, certaines cytokines, et les molécules d'adhésion.

Les lymphocytes T qui circulent dans l'organisme sont attirés par la présence de chémokines relâchées dans la circulation. Ils migrent en suivant un gradient de concentration de chémokines afin d'arriver à une destination où les molécules

d'adhésion entrent en jeu en solidifiant les contacts cellulaires qui favorisent le ralentissement de leur circulation et la pénétration dans les organes cibles ⁷²⁻⁷⁴. Entre autres, ces molécules orchestrent les mécanismes d'homéostasie ⁷⁵, les premières étapes de recrutement lors d'une inflammation ⁷⁴, le recrutement des cellules souches qui vont coloniser le thymus fœtal durant l'embryogenèse ⁷⁶⁻⁷⁷, ainsi que les interactions matrice extracellulaire-cellules nécessaires à l'angiogenèse et à la myélopoïèse ⁷⁷.

Une explication probable de l'attraction des lymphocytes matures vers les ganglions LckOM, ainsi que la restriction du phénomène de lymphopoïèse aux ganglions est que l'OM induit l'expression spécifique d'une ou plusieurs chémokines (ou récepteurs de chémokines) dans ces organes mais pas dans la rate, et par conséquent favorise le recrutement de progéniteurs T et de lymphocytes T matures vers les ganglions.

11.5 Hétérogénéité entre le phénotype de la rate et celui des ganglions LckOM

11.5.1 Distinction entre les ganglions et la rate des souris normales durant l'organogenèse : Expression de gènes homéotiques.

Il est fascinant de constater comment l'expression exagérée d'une unique molécule peut stimuler la production de lymphocytes T dans les ganglions en inhibant la fonction normale du thymus, et surtout engendrer l'apparition de phénotypes distincts dans la rate et dans les ganglions qui sont tous les deux des organes lymphoïdes secondaires semblables à la base. Nos observations des souris LckOM, nous poussent à partir à la recherche des raisons pour lesquelles une telle hétérogénéité est établie par l'OM.

Durant l'ontogénie, l'expression de certains gènes est essentielle au développement spécifique de la rate et des ganglions. Ces gènes sont, par exemple : Hox 11 ⁷⁸ Id2 ⁷⁹, OPGL ⁸⁰, LT α et LT β ⁸¹. Grâce à certains modèles de souris

mutantes, il est possible de cerner des différences entre les ganglions et la rate au courant de leur organogenèse.

11.5.2 *Hox11*

Le gène homéotique *Hox11* est en partie responsable de la morphogenèse de la rate ⁷⁹. Ce rôle attribué au gène *Hox11* par C. Roberts, J. Shutter et S. Korsmeyer est mis en évidence chez des souris déficientes *Hox11*^{-/-}, caractérisées par une absence totale de la rate. Chez ces souris, tous les organes internes semblent normaux et fonctionnent adéquatement, le nombre et les proportions de lymphocytes retrouvés dans le thymus et les ganglions sont normaux, le seul défaut apparent est l'absence de la rate.

11.5.3 Les lymphotoxines (LT α et β)

D'un autre côté, les gènes codant pour les lymphotoxines (LT α et β), membre de la famille du TNF, et pour leur récepteur spécifique (LT β R), sont essentiels au développement des ganglions, des Plaques de Peyer (PP), et des tissus lymphoïdes associés aux intestins ⁸¹⁻⁸⁵. Les souris dont ces gènes ont été inactivés souffrent d'alymphoplasie (absence de ganglions lymphatiques). La rate est présente mais démontre une architecture désorganisée, puisque la ségrégation entre les zones T et B, et le réseau de cellules dendritiques (CD) est aberrant chez des souris LT β R^{-/-}, LT α ^{-/-} et LT β ^{-/-}. Les travaux menés chez ces souris mutantes prouvent directement que la LT est primordiale pour le développement des ganglions et des PP ainsi que pour l'organisation structurelle de la rate. De plus, la LT supporte et maintient la formation des réseaux de CD et des structures folliculaires de lymphocytes B. Les lymphocytes B participent intégralement au développement de ces organes lymphoïdes puisque ce sont eux qui transmettent le signal de la LT.

Nous constatons que, malgré les similitudes de fonctions et de morphologies qui existent entre la rate et les ganglions, ces deux types d'organes lymphoïdes se distinguent au courant de leur biogenèse. Une panoplie de facteurs contribuent à la divergence dans le développement de la rate et des ganglions, et ces facteurs sont

entre autre responsables de l'absence de vaisseaux lymphatiques afférents et de VCEC dans la rate. Il est possible que l'OM influence de façon très spécifique ces structures proprement ganglionnaires.

11.6 Recrutement des progéniteurs hématopoïétiques dans les ganglions.

Notre compréhension de la thymopoïèse normale est constamment bouleversée par l'introduction de nouvelles notions sur les mécanismes complexes d'interactions cellulaires et moléculaires qui gouvernent la différenciation des lymphocytes T et leur sélection positive et négative. Jusqu'à présent, la raison fondamentale pour laquelle les lymphocytes T sont produits et éduqués principalement dans cet organe est inconnue. Certains spéculent que les cellules souches non différenciées guidées par des molécules spécialisées (comme la molécule Vanin-1⁸⁶), migrent préférentiellement dans le thymus. D'autres croient que ce n'est pas un « homing », préférentiel mais plutôt une survie favorisée qui permet la colonisation du thymus⁸⁷. L'approfondissant des connaissances dans ce domaine de la recherche serait avantageux pour la compréhension du phénomène de lymphopoïèse extrathymique observé chez les souris LckOM.

Le « homing » des précurseurs T vers le thymus résulte d'une combinaison complexe d'événements dirigés par **i)** des interactions entre les chémokines et leurs récepteurs, **ii)** les cellules stromales du thymus et les précurseurs T, **iii)** les molécules d'adhésion et leurs ligands spécifiques. Ces interactions assurent la migration des CSH vers le thymus durant l'embryogenèse ainsi qu'à l'âge adulte, et par conséquent dirigent la colonisation de cet organe par une population destinée à devenir des lymphocytes T fonctionnels. Chez les souris qui expriment l'OM en quantité excessive, ces cellules non différenciées empruntent un chemin qui mène à la colonisation des ganglions. La migration vers les ganglions est sûrement dirigée par l'expression de certaines chémokines. Les travaux menés par l'équipe de C. Clegg identifient des cellules très immatures dans les ganglions des souris LckOM avant le réarrangement génique du récepteur T³⁵, suggérant que le homing dans les

ganglions est initié par des cellules à un stade de différenciation précoce, comme dans le thymus.

11.6.1 Rôle des chémokines dans la colonisation du thymus: la chémokine TECK

A. Zlotnik et ses collaborateurs ont découvert en 1996 une chémokine reliée aux chémokines CC qu'ils ont nommée TECK (thymus expressed chémokine), puisqu'elle est exprimée spécifiquement par les CD du thymus, et non par les CD de la rate ⁸⁸. En plus de son expression dans le thymus, TECK se retrouve dans les intestins et dans le foie, deux organes reconnus pour leur capacité de générer des lymphocytes T. Le patron relativement restreint d'expression de TECK suggère que cette chémokine est impliquée dans le développement des lymphocytes T. Le rôle précis de TECK dans la lymphopoïèse n'est pas défini, mais il nous semble prioritaire d'étudier s'il y a un lien entre l'expression de cette chémokine et la thymopoïèse extrathymique observée chez les souris LckOM ainsi que chez les chimères hématopoïétiques. Parmi toutes les conséquences de son expression excessive, l'OM pourrait entraîner l'expression de TECK dans les ganglions et ainsi favoriser le développement des lymphocytes T dans ces organes.

Il est nécessaire de noter que, si l'OM recrute des CSH de la moelle osseuse et les dirige vers les ganglions, ce n'est pas parce que le thymus a été dépossédé de ses fonctions. Le thymus LckOM est peuplé par des progéniteurs T, car nous y retrouvons une proportion de lymphocytes immatures DP à l'âge de 4 semaines, mais cette population est remplacée graduellement par des populations de lymphocytes T matures CD4⁺ et CD8⁺, ainsi que par une importante proportion de lymphocytes B. Ceci suggère que la défaillance thymique chez les souris LckOM, n'est pas due à des troubles dans la colonisation de cet organe par des CSH, mais plutôt à une série de facteurs indéterminés qui se produisent tôt dans la vie de ces souris et qui entraînent à la métamorphose du thymus en organe lymphoïde secondaire peuplé de lymphocytes B et de T matures.

11.6.2 Différentiation anormale de cellules des ganglions induite par l'OM

Au lieu d'une circulation de cellules souches dirigée vers les ganglions chez les souris LckOM, serait-il possible que des cellules originaires de la moelle, destinées à devenir des cellules autres que des lymphocytes puissent changer leur sort?

Des travaux exécutés par l'équipe de Mebius et Rennert identifient une population de cellules hématopoïétiques $CD4^+CD3^-LT\beta^+$, présente dans les ganglions de souris à un stade embryonnaire, qui se différencie en cellules NK et CD, mais n'a pas la capacité de générer des lymphocytes T ou B ⁸⁹. Étant donné l'incontestable influence des cytokines à plusieurs étapes de la différenciation cellulaire et le rôle fondamental de l'organisation structurale du micro-environnement dans le développement des cellules, il est imaginable que les conditions créées par l'OM durant le développement embryonnaire des souris provoquent des altérations morphologiques, ainsi que des modifications dans l'expression de certaines cytokines qui entraînent la différenciation des cellules $CD4^+CD3^-LT\beta^+$ en précurseurs de lymphocytes T.

11.7 Homéostasie : L'hypothèse des niches

Physiologique ou non, l'effet que l'OM peut exercer sur le système immunitaire est exceptionnel. Il crée un nouvel équilibre dans ce système de telle sorte que celui-ci puisse subvenir aux besoins d'une énorme quantité de lymphocytes. Il est bien établi que les thymocytes, afin de devenir matures, nécessitent des contacts avec les molécules du CMH exprimées sur les cellules épithéliales du cortex thymique ^{90,91}. Les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ qui ont quittés le thymus ont aussi besoin de contacts directs avec des CPA qui expriment les molécules du CMH associés à des peptides afin de survivre en périphérie ⁹²⁻⁹⁵, et de conserver en mode activé une partie des populations mémoires ⁹⁶⁻⁹⁸. Les lymphocytes circulent entre le sang et les organes lymphoïdes secondaires à la recherche de ce contact essentiel sans lequel ils sont condamnés à mourir par

apoptose. Le nom de « niche » a été donné récemment à l'environnement physique où ce contact a lieu.

11.7.1 Les cellules dendritiques (CD) : leur importance dans l'initiation des réponses immunitaires et dans l'homéostasie.

En périphérie, les niches sont constituées de CPA spécialisées, entre autres, les CD, sans lesquelles les lymphocytes ne peuvent survivre en périphérie, et ne peuvent donc pas coloniser les organes lymphoïdes secondaires⁹⁹. Dans le domaine de la présentation antigénique, les CD sont les cellules les plus compétentes, car elles sécrètent une quantité importante de cytokines et chémokines et expriment de nombreuses molécules de co-stimulation ainsi que les molécules du CMH de classes I et II. Les CD jouent le rôle de sentinelle dans l'organisme car elles captent efficacement les antigènes étrangers. Elles migrent ensuite du site de leur rencontre antigénique jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, où elles sont requises pour l'initiation d'une réponse immunitaire dirigée spécifiquement contre les antigènes étrangers en question¹⁰⁰. C'est donc par l'intermédiaire des CD que les lymphocytes T peuvent voir le monde antigénique. En entrant en contact avec ces antigènes spécifiques présentés par les molécules du CMH, les lymphocytes T sont activés ou rendus tolérants.

Plusieurs travaux visant à décrypter les mécanismes de l'homéostasie des lymphocytes T, nous ont renseignés sur la sélection périphérique et sur le maintien d'une population de cellules T grâce à leur expansion stimulée par la rencontre avec un complexe CMH-peptide du soi. Des études menées par plusieurs chercheurs ont aidé à décrire l'organisation des populations de lymphocytes T mémoires et naïfs en périphérie¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Le consensus général stipule que le système immunitaire a la capacité de gérer chacune des populations T, mémoire, naïves, et activées de façon indépendante^{105,106}. La production thymique est un phénomène constant qui n'est pas influencé par les conditions des lymphocytes en périphérie. Une profonde déplétion lymphocytaire en périphérie ne stimule pas le thymus à exporter plus de nouveaux lymphocytes T, mais amorce une prolifération accélérée des clones présents en périphérie. Les lymphocytes T sont conditionnés à occuper l'espace (les

niches) qui leur est offert, et ceci est bien illustré par l'expansion phénoménale de lymphocytes T normaux qui se produit lorsqu'ils sont transférés dans des souris *nude*, et SCID¹⁰⁷.

Étant donné l'expansion importante des populations matures CD4⁺ et CD8⁺ chez les souris LckOM, particulièrement dans les ganglions mésentériques, où le nombre absolu de ces lymphocytes est de 6 à 7 fois supérieur à la normale, la prolifération accrue de ceux-ci, et le rôle primordial des CD dans le maintien de ces populations, une hypothèse séduisante peut être formulée : l'OM favorise, de façon directe ou indirecte, l'augmentation des niches en stimulant la fonction, la production, ou la prolifération des CD.

11.8 Hypothèse sur le phénotype particulier des lymphocytes d'origine extrathymique.

La caractérisation phénotypique des lymphocytes T étudiés est fondamentale à notre compréhension du phénomène de thymopoïèse extrathymique, puisque certaines molécules présentes à la surface cellulaire fournissent des indices sur la situation, le rôle et le devenir des cellules.

Le phénotype particulier et le cycle accéléré de prolifération des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ produits sous le contrôle de l'OM, indiquent que ces lymphocytes ont vécu antérieurement une expérience antigénique, et qu'ils ne sont donc pas des cellules naïves au repos.

11.8.1 Phénotype des lymphocytes CD4⁺

Les lymphocytes CD4⁺ des souris LckOM sont caractérisés par le phénotype suivant : CD62L^{lo}, CD44^{hi}, IL-2Rβ⁻, NK1.1⁻, CD45RB^{lo} qui, selon les études menées par J. Sprent, reflète bien le profil des lymphocytes mémoires/activés^{53,108}. De plus, l'absence d'expression des molécules NK1.1 et IL-2Rβ exclut la possibilité que ces lymphocytes fassent partie d'une lignée distincte de cellules connues sous le nom de cellules TNK qui sont retrouvées en quantité minimales dans le thymus, le

foie, la rate, la moelle osseuse et les ganglions, et dont les fonctions sont encore ignorées ¹¹⁰⁻¹¹².

11.8.2 Phénotype des lymphocytes CD8⁺

Les cellules CD8⁺ des souris LckOM sont CD62L^{hi}, CD44^{hi}, IL-2Rβ⁺, NK1.1⁻ CD45RB^{hi}, ce phénotype singulier n'est pas observé dans des situations habituelles puisque le profil d'expression des molécules de surfaces s'identifie partiellement aux lymphocytes mémoire/activés (CD44^{hi}, IL-2Rβ⁺) et aux lymphocytes naïfs (CD62L^{hi}, CD45RB^{hi}). Lors d'une activation, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ diminuent l'expression de la molécule d'adhésion CD62-L qui sert de code pour entrer dans les ganglions. Par contre, l'utilisation de cette molécule comme signal d'activation n'est pas idéal, puisque la rétention de CD62L par des lymphocytes CD8⁺ mémoire est un phénomène qui a été observé auparavant ⁵³. L'expression de CD45RB est aussi une indication peu fiable puisque J. Sprent rapporte l'existence de populations de lymphocytes CD8⁺ mémoire qui sont parfois CD45RB⁺ et parfois CD45RB⁻ ¹¹⁴. Néanmoins, la combinaison des molécules exprimées à la surface des lymphocytes CD8⁺ des souris LckOM, ainsi que la vitesse à laquelle ils se multiplient, indiquent que ces lymphocytes représentent une population lymphocytaire mémoire/activée.

11.8.3 Le phénotype des lymphocytes matures CD4⁺ et CD8⁺ correspond à une rencontre antigénique antérieure

Une particularité intéressante des lymphocytes matures (CD4⁺ et CD8⁺) qui se développent sous l'influence de l'OM, est que la majorité exprime un phénotype CD25⁺, CD69⁺ et CD44^{hi}, qui se manifeste suite à la rencontre avec un antigène, et qui peut correspondre à un stade d'activation ⁵³. Selon des analyses de cytométrie, l'OM provoque la différenciation intra-ganglionnaire de lymphocytes T semblables aux lymphocytes thymiques et entraîne l'apparition d'un phénotype qui correspond à une expérience antigénique antérieure. L'agent qui stimulerait cette activation globale est sans doute des antigènes du soi.

11.9 Prolifération accélérée : interprétation des Résultats de BrdU

Nous avons démontré, grâce aux marquages au BrdU, que le niveau de prolifération des lymphocytes naïfs et mémoire/activés d'origine extrathymique est supérieur à celui des lymphocytes conventionnels issus d'une maturation intrathymique. Maintenant nous nous attardons à des questions fondamentales sur la cinétique de prolifération de ces lymphocytes au sein de leur milieu en réfléchissant sur les causes de cette prolifération accélérée.

La cinétique du développement et de la prolifération n'est pas uniquement une qualité intrinsèque des lymphocytes, mais reflète plutôt l'environnement dans lequel circulent ces cellules. De façon générale, les lymphocytes prolifèrent en réponse à une stimulation antigénique, mais des facteurs moins directes, comme la présence de cytokines et l'augmentation du nombre de niches périphériques disponibles influencent aussi le comportement prolifératif des lymphocytes T.

11.9.1 Expansion des population T dans un système lymphopénique

L'expansion périphérique de lymphocytes T naïfs dans un système lymphopénique dépend de leur interaction avec les molécules du CMH liées à des peptides du soi ¹¹⁵⁻¹¹⁷. Cette interaction dans un système où le nombre total de lymphocytes est réduit, cause une expansion homéostatique. Dans des conditions de lymphopénie, les lymphocytes T naïfs deviennent plus susceptibles à une stimulation par des antigènes du soi et prolifèrent pour combler l'espace libre ¹¹⁵. Les lymphocytes naïfs stimulés par les antigènes du soi dans ces conditions particulières acquièrent un phénotype caractéristique des lymphocytes mémoire/activé (CD44^{hi}) sans toutefois provoquer de réactions auto-immunes. De toute évidence, les souris LckOM ne sont pas lymphopéniques, car leur système immunitaire est peuplé d'un nombre important de lymphocytes T matures. Il est possible que l'OM cause une augmentation drastique du nombre de niches en favorisant une accumulation de CD dans les ganglions, favorisant ainsi une induction de prolifération homéostatique des lymphocytes T.

11.9.2 Sources de la stimulation causant la prolifération des lymphocytes T matures d'origine extrathymique.

1) *Les antigènes du soi*

Compte tenu des observations présentées dans cette section nous émettons l'hypothèse suivante : les agents responsables de la prolifération et de l'apparition du phénotype d'activation des lymphocytes produits sous l'influence de l'OM seraient des antigènes du soi présentés par les molécules du CMH dans un contexte où le nombre de niches périphériques vacantes est augmenté. À cette effet, notons que l'IL-6 favorise la présentation de peptides qui ne sont pas normalement présentés par les molécules du CMH à la surfaces des CD ¹¹⁸. Étant donné que l'OM induit la sécrétion d'IL-6, l'influence qu'exerce cette cytokine sur les CD est peut-être impliquée dans la production et la prolifération des lymphocytes extrathymiques qui se développent en présence d'OM.

2) *Les cytokines*

Malgré les nombreuses évidences qui soulignent l'importance des interactions directes entre le récepteur T et les molécules du CMH associées aux peptides pour la survie et l'activation des lymphocyte naïfs en périphérie, nous ne pouvons exclure la possibilité que la prolifération accélérée des lymphocytes extrathymiques ainsi que l'expression de leur phénotype particulier soient induites par l'effet de cytokines sécrétées en réponse à l'OM ^{119,120}. Un exemple pertinent est illustré par les conditions entraînées par l'IL-15 . Une stimulation par la cytokine IL-15 induit une puissante activation sélective des lymphocytes CD8⁺ mémoire (CD44^{hi}), sans influencer les CD4⁺ mémoire ¹¹⁵. Les travaux de J. Sprent et ses collègues suggèrent que cette activité sélective est due à l'expression de l'IL-2R β , le récepteur de l'IL-15, qui est exprimé en concentration élevée sur les lymphocytes CD8⁺ CD44^{hi} mémoire, mais en plus faible quantité sur les lymphocytes CD4⁺ CD44^{hi} et sur les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ naïfs. La majorité des CD8⁺ qui découlent de la différenciation extrathymique dirigée par l'OM, expriment fortement l'IL-2R β et sont

donc susceptibles aux effets homéostatiques de l'IL-15¹²¹ sur la prolifération et la migration des lymphocytes.

11.10 La biologie des chémokines et leur contrôle de l'homéostasie

Une panoplie de facteurs, dont les chémokines, les cytokines, et des molécules d'adhésion contribuent au bon fonctionnement des CD au sein du système immunitaire. Les CD doivent circuler de façon contrôlée, vers les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent les antigènes captés aux lymphocytes T et B, et initient des réponses d'activation ou d'induction de tolérance suite à la rencontre antigénique. Tout au long de leur voyage, les CD se transforment en CPA très spécialisées, en exprimant à leurs surface des récepteurs de chémokines, des molécules d'adhésion et de costimulation, et en sécrétant une quantité de cytokines et chémokines¹²²⁻¹²⁴. Tout ce processus complexe de migration et maturation, est orchestré par plusieurs molécules, dont les fameuses chémokines. Des combinaisons précises de chémokines, récepteurs de chémokines et molécules d'adhésion, dictent le devenir des CD ainsi que celui des autres cellules du système immunitaire. C'est grâce à ces combinaisons précises qu'une cellule donnée se retrouve au bon endroit et au bon moment¹²⁵⁻¹²⁷.

11.10.1 Hypothèse sur la sécrétion anormale de chémokines chez les souris LckOM.

Il nous apparaît plausible que chez les souris LckOM, l'expression d'OM aboutit des changements dans la sécrétion d'une ou de plusieurs chémokines ou dans l'expression de leurs récepteurs, ce qui pourrait avoir des répercussions remarquables sur l'équilibre total des populations lymphocytaires en affectant soit la production, la prolifération, la migration et/ou les fonctions des CD. Comme il a été mentionné auparavant, l'OM amorce une série d'événements d'où découlent une lymphopoïèse extrathymique et une lymphoprolifération d'origine T dans les ganglions. Ils est

concevable que les facteurs responsables de ces événements soient des chémokines et leurs récepteurs et qu'ils puissent **i)** recruter des CSH pour coloniser les ganglions initiant ainsi la lymphopoïèse extrathymique, **ii)** favoriser la formation de niches périphériques spécifiquement dans les ganglions via leurs effets sur les CD, contribuant ainsi à l'accumulation, la sélection et la survie de lymphocytes dans les ganglions LckOM, **iii)** contribuer à l'accumulation sélective des lymphocytes T matures dans les ganglions par leurs effets chémotactiques directement sur ces lymphocytes, et par leurs effets sur l'expression de molécules d'adhésion qui favorisent la pénétration dans les ganglions.

TARC ¹²⁸, ELC, SLC ¹²⁹, LARC, et DK-CK1 sont de chémokines de la même famille qui jouent des rôles significatifs dans l'homéostasie du système immunitaire car elles sont impliquées dans la régulation de la circulation physiologique des CD. À l'exception de LARC, toutes ces chémokines sont constamment exprimées dans le thymus et les organes lymphoïdes secondaires ¹²⁵. Des travaux de Gunn et de Nakano, démontrent que les chémokines SLC et ELC dirigent sélectivement la migration de CD vers les compartiments T de la rate et des ganglions lymphatiques^{130,132}.

11.10.2 SLC, ELC et CCR7

Les souris dont l'expression de SLC est défectueuse (paucity of lymph node T cell : *plt*) sont caractérisées par un faible nombre de lymphocytes T naïfs dans les ganglions, dans les Plaques de Peyer (PP) et dans la rate ^{129,130}. Ce défaut est accompagné par une migration défectueuse des CD dans la rate, et une réduction importante de ces cellules dans les ganglions ainsi que dans les PP. L'étude des souris *plt* met en évidence l'importance de cette chémokine (ainsi que la chémokine ELC dont l'expression est aussi diminuée dans les souris *plt*) pour la localisation des CD dans les organes lymphoïdes, et par conséquent pour la traversée des VCEC par des lymphocytes naïfs, afin qu'ils se logent dans les zones T de ces organes.

Les lymphocytes spléniques d'origine LckOM ou C57BL/6 (CD4⁺ et CD8⁺), lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse, migrent préférentiellement dans la rate des souris normales mais vont spécifiquement dans les ganglions des souris LckOM.

Ceci implique que les ganglions LckOM expriment un ou plusieurs facteurs qui attirent les lymphocytes T matures, peu importe leur origine. De plus, nous avons démontré dans ces expériences de migration, que les ganglions LckOM favorisent l'entrée de lymphocytes normaux par rapport aux lymphocytes LckOM, et ceci dérive du fait que la majorité des lymphocytes de souris normales sont naïfs et que les lymphocytes transgéniques ont un phénotype de mémoire/activé. Étant donné la distinction phénotypique entre ces deux types de cellules, il est possible que les lymphocytes LckOM et les lymphocytes normaux empruntent des chemins différents pour parvenir à pénétrer dans les ganglions, soit par les lymphatiques afférents, et par les VCEC respectivement. Nous croyons que l'expression de chémokines comme SLC dont l'activité chimotactique est particulièrement réservée aux lymphocytes qui expriment le récepteur CCR7¹²⁹ favorise la migration des cellules vers les ganglions LckOM.

CCR7, le récepteur des chémokines ELC et SLC, exprimé par les lymphocytes T et B et par les CD matures, joue un rôle crucial dans l'organisation du système immunitaire¹²⁹⁻¹³¹. Grâce à la production de souris déficientes en CCR7, détaillée dans les plus récents travaux de Förster *et al.*,¹³³ ces chercheurs ont introduit un élément d'étude fascinant dans le domaine de la biologie des chémokines. Les anomalies qui sont manifestées chez les souris CCR7^{-/-} soutiennent entièrement notre hypothèse qui stipule que l'OM entraîne des altérations dans l'expression de CCR7, SLC ou ELC, manifestés probablement par une induction exagérée d'expression, qui influencent les CD et ainsi chambarde tout l'équilibre du système immunitaire. Les CD sont très importantes dans le maintien de l'homéostasie car elles sont la source et les cibles de nombreuses chémokines. Il est logique de croire que des modifications dans l'expression de chémokines ou de leurs récepteurs entraînent subséquemment une amplification et/ou un maintien du réseau de signalisation entre les lymphocytes T et les CD (ainsi que les lymphocytes B). Certains phénomènes observés chez les souris CCR7^{-/-} semblent être l'inverse de la situation observée chez les souris LckOM. À l'opposé des souris LckOM, les lymphocytes T naïfs des souris CCR7^{-/-} n'ont pas d'attraction envers les ganglions, et par conséquent les ganglions de ces souris mutantes ont une taille réduite. Les lymphocytes T naïfs qui ne peuvent pas répondre aux signaux chimotactiques de ELC sont exclus des ganglions et se

retrouvent dans la circulation sanguine, dans la rate et dans la moelle osseuse. L'absence de CCR7 entraîne des problèmes de circulation et de localisation des lymphocytes T qui s'accumulent dans le sang, des lymphocytes B qui émigrent précocement des PALS (periarteriolar lymphoid sheath) de la rate, et des CD qui ne peuvent plus migrer de la peau vers les ganglions¹³³. Les anomalies qui apparaissent dans ces conditions démontrent à quel point l'expression de ce récepteur de chémokine est primordial à l'établissement d'une architecture fonctionnelle dans les organes lymphoïdes secondaires, et par conséquent au développement de réponses immunitaires efficaces. Les résultats obtenus dans cette étude nous portent à croire que contrairement à l'absence de CCR7, une surexpression de cette molécule et/ou des chémokines se liant à elle, entraînerait une migration excessive de CD, de lymphocytes T et de lymphocytes B vers les ganglions.

De toute évidence, la communication entre les lymphocytes T et les CD est centrale à l'initiation d'une réponse immunitaire primaire, et CCR7 oriente ces interactions cellulaires en guidant l'entrée des lymphocytes et des CD dans les ganglions. Des travaux de Sallusto et ses collègues démontrent que CCR7 est exprimé principalement sur les lymphocytes T naïfs qui pénètrent dans les ganglions, mais aussi par une population nouvellement intitulée « lymphocytes mémoire centrales » (central memory lymphocytes)^{134,135}. Ces lymphocytes se distinguent des lymphocytes activés par leur patron de circulation, par les cytokines qu'ils sécrètent, par leur fonction et par l'expression de CCR7. Grâce à l'expression de CCR7, ces lymphocytes ont un accès privilégié dans les ganglions, contrairement aux lymphocytes activés qui circulent essentiellement en périphérie vers des sites d'inflammation. Dans les ganglions, ces lymphocytes mémoire centrale ont la capacité de diminuer le seuil d'activation des CD, qui répondent promptement en sécrétant de l'IL-12¹³⁵. Les lymphocytes qui circulent dans les ganglions LckOM ont sans doute expérimenté une expérience antigénique au cours de leur existence. Étant donné le favoritisme qu'ils démontrent envers les ganglions, il est possible que ces lymphocytes sont en fait des lymphocytes « mémoire centrale » et qu'ils exercent les mêmes effets d'activation sur les CD.

11.11 Optique thérapeutique.

La métamorphose des ganglions chez les souris LckOM reflète bien la plasticité du système lymphoïde. Les principaux changements perçus sous les effets de l'OM sont: la thymopoïèse extrathymique et l'auto-immunité qui sont deux phénomènes indépendants (section 7.2), rendant ainsi l'utilisation thérapeutique de l'OM plus sécuritaire. L'idée d'exploiter la particularité des ganglions de produire des lymphocytes T sous l'effet de l'OM est séduisante, particulièrement afin de remédier aux fréquents problèmes d'immunodéficience qui accompagnent certaines infections virales, les greffes de moelle osseuse, les traitements de chimiothérapie pour vaincre le cancer, et aussi la vieillesse.

11.11.1 Traitement de L'immunodéficience reliée à l'infection par le VIH-1

Une cause majeure d'immunodéficience est celle reliée à l'infection des cellules CD4⁺ et des macrophages par le virus d'immunodéficience humain-1 (VIH-1) qui est responsable du SIDA. Ce virus mène souvent le système immunitaire à épuisement, et par conséquent les individus infectés meurent à cause d'infections opportunistes¹³⁶. En plus d'endommager le système immunitaire en détruisant les lymphocytes CD4⁺¹³⁷, des travaux visant à quantifier la production thymique des gens infectés, démontrent que l'infection par le VIH-1 affecte négativement la fonction thymique¹³⁸. De nombreuses thérapies antivirales qui utilisent des combinaisons de médicaments s'avèrent relativement efficaces pour diminuer la charge virale¹³⁹, mais les patients souffrent d'immunodéficience prolongée dû à l'effet des médicaments et à la destruction de lymphocytes T par le virus. Chez ces individus, l'administration d'un traitement servant à aider à la régénération du système immunitaire par la production de nouveaux lymphocytes T pourrait être bénéfique.

11.11.2 L'immunodéficience suite à des traitements de chimiothérapie et de radiothérapie.

Les bénéfices d'une voie alternative de production de lymphocytes T pourraient être appréciés chez des individus ayant reçus des doses de chimiothérapie ou de radiothérapie. Certains traitements pour la leucémie impliquent une greffe de moelle osseuse qui s'accompagne habituellement de radiations et de médicaments immunosuppresseurs pour éviter le rejet du greffon ¹⁴⁰. La reconstitution du système immunitaire en lymphocytes T, particulièrement en lymphocytes CD4⁺, chez des patients ayant reçus de tels traitements est souvent inadéquate, car le thymus, dans la majorité des cas, ne possède pas un bon potentiel de reconstitution ^{141,142}. Seuls les jeunes enfants possèdent une fonction thymique assez efficace pour reconstituer efficacement le système immunitaire ¹⁴³. La fragilité du système immunitaire suite à ces interventions thérapeutiques repose sur l'incompétence du thymus sénescant, mais peut être aussi amplifiée par une complication fréquemment observée dans ces circonstances; la maladie du greffon versus l'hôte (GVH) qui s'attaque au stroma des organes lymphoïdes et réduit le nombre de niches périphériques ¹⁴⁴. Dans de telles conditions, l'administration pharmacologique de l'OM serait avantageuse puisque cette cytokine semble augmenter le nombre de niches

De nombreux cas cliniques témoignent de l'incontestable rôle du thymus dans le rétablissement d'un système immunitaire robuste après une profonde déplétion en lymphocytes T ¹⁴⁵. La population CD4⁺ qui possède un potentiel de régénération plus faible que les CD8⁺, emprunte une voie de reconstitution plus thymo-dépendante que ces derniers. La majorité, mais pas la totalité des CD8 repeuple probablement le système immunitaire par l'expansion de certains clones matures, de phénotype mémoire, présents en périphérie, ou par différenciation extrathymique ^{142,146}. Ceci provoque un déséquilibre entre les populations CD4⁺ et CD8⁺ et un amoindrissement de la diversité du répertoire T ^{147,148}. Comme les individus atteints du VIH, les greffés médullaires et les patients ayant reçus de la chimiothérapie ou radiothérapie, sont susceptibles aux infections par des pathogènes opportunistes.

11.11.3 L'immunodéficience reliée à l'âge.

La vieillesse est un phénomène inévitable qui n'épargne aucun être vivant et ne laisse donc pas les humains indifférents. L'organisme qui vieillit perd sa vigueur, et il est de même pour le système immunitaire qui ne livre plus de combats aussi efficaces contre les pathogènes ou les cellules néoplasiques. L'immunosénescence, et spécifiquement les changements quantitatifs et qualitatifs qu'elle amène aux lymphocytes, a des conséquences immédiates sur la longévité des êtres vivants¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

Dans un système immunitaire sénescent, il y a une diminution du nombre absolus (plus important chez les $CD4^+$ que chez les $CD8^+$), et des fonctions (prolifération, production d'IL-2, réponse DTH) des lymphocytes T¹⁵². Le vieillissement s'accompagne aussi d'une transition des populations naïves vers un phénotype mémoire, et ceci découle du fait que le thymus n'exporte plus une quantité appréciable de lymphocytes naïfs pour réussir à maintenir cette population en nombre majoritaire. L'expansion périphérique qui maintient le pool des lymphocytes T, n'est pas égale pour tous les clones, particulièrement dans le cas des lymphocytes $CD8^+$, et provoque par conséquent un changement ou une instabilité dans leur répertoire¹⁵³⁻¹⁵⁵. Le répertoire des lymphocytes en périphérie devient très différent pour chaque individu âgé, en fonction de son histoire immunologique. Il est logique de déduire qu'un système immunitaire dont le répertoire est moins diversifié n'est plus disposé à réagir aux assauts pathogéniques de façon optimale.

Peu importe la cause de la déplétion en lymphocytes T du système immunitaire, un obstacle majeur aux progrès des traitements pour cette condition, est de parvenir à stimuler l'organisme afin qu'il produise une quantité suffisante de lymphocytes diversifiés et fonctionnels, et préférentiellement de phénotype naïfs. La récapitulation de la thymopoïèse ou d'un mécanisme alternatif à cette thymopoïèse serait donc un but ultime à accomplir pour régler ces nombreux problèmes.

12 Conclusions et Perspectives

L'effet que l'OM exerce sur chacune des chémokines et de leurs récepteurs demeure inexploré. Il est donc essentiel pour notre laboratoire, d'évaluer l'influence de cette cytokine sur la fonction globale des CD et sur l'expression de nombreuses chémokines et récepteurs de chémokines impliqués dans l'homéostasie, dont les candidats d'intérêt prioritaires sont les chémokines SLC et ELC et leur récepteur spécifique CCR7. Cependant, nous pouvons émettre le raisonnement suivant : l'OM, en tant que facteur essentiel d'un phénomène complexe, permet de modifier l'organisation structurelle des ganglions afin de créer un micro-environnement propice au développement de lymphocytes T. De plus nous pouvons imaginer que les effets directs ou indirects de cette cytokine sur l'expression de chémokines ou de leurs récepteurs, permettent un recrutement, une activation et/ou une prolifération de CD favorisant ainsi une lymphoprolifération T dans les ganglions, mais pas dans la rate.

Présentement, nous nous retrouvons dans une étape stimulante de nos recherches où il est permis de faire de nombreuses spéculations et d'imaginer l'impact majeur que pourrait avoir l'OM sur la santé humaine. Les études entreprises par C. Clegg *et al.* sur la fonction des lymphocytes produits par cette voie extrathymique, indiquent que les lymphocytes T des souris LckOM sont compétents pour réagir à des cibles allogéniques, mais ne permettent pas d'affirmer qu'ils exercent des fonctions normales puisque ces travaux n'examinent pas la compétence immunitaire des lymphocytes LckOM envers des infections virales, qui représentent des situations plus réelles. Nous considérons que des travaux plus élaborés sur les fonctions de ces lymphocytes issus de la différenciation extrathymique sont fondamentales à l'avancement de nos recherches dans ce domaine.

Nos travaux amènent de nombreuses questions concernant l'homéostasie et le bon fonctionnement de notre système de défense et nous dirigent vers une étude plus élaborée des fonctions des lymphocytes T d'origine extrathymique et des chémokines et des récepteurs qui orchestrent précisément tout cet équilibre biologique.

Références

1. Matsunaga T, Rahman A : What brought the the adaptive immune system to vertebrates? The jaw hypothesis and the seahorse. **Immunol.Reviews.** 166 :177, 1998.
2. Magor KE, Vasta GR : Ancestral immunity comes of age. **Immunol.Today.** 19 :54, 1998.
3. Jameson SC, Hogquist KA, Bevan MJ : Positive selection of thymocytes. **Annu.Rev.Immunol.** 13 :93, 1995.
4. Anderson G, Hare KJ, Jenkinson EJ : Positive selection of thymocytes : the long and winding road. **Immunol.Today** 20 :463, 1999.
5. Reth M : Immunodeficiency. Trapping the nude mouse gene. **Curr. Biol.** 5 : 18.1995.
6. George AJ, Ritter MA : Thymic involution with aging : obsolescence or good housekeeping? **Immunol.Today** 17 :267, 1996.
7. Berzin SP, Boyd RL, Miller JF : The role of thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. **J.Exp.Med.** 187 :1839, 1998.
8. Gabor MJ, Scollay R, Godfrey DI : Thymic T cell export is not influenced by the peripheral T cell pool. **Eur.J.Immunol.** 27 :2986, 1997.
9. Rose TM, Bruce AG : Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia inhibitory factor, granulocyte colony stimulating factor, and interleukin-6. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.** 88 :8641, 1991.
10. Taga T : The signal transducer gp130 is shared by interleukin-6 family of haematopoietic and neurotrophic cytokines. **Ann.Med.** 29:63, 1997.
11. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L : Interleukin-6-type cytokine signalling trough the gp130/Jak/STAT pathway. **Biochem.J.** 334 :297, 1998.

12. Loy JK, Davidson TJ, Berry KK, MacMaster JF, Danle B, Durham SK : Oncostatin M : development of a pleiotropic cytokine. **Toxicol.Pathol.** 27 :151, 1999.
13. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G : Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. **Nature.** 368 :339, 1994.
14. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ : Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. **Nature.** 359 :76, 1993.
15. Masu Y, Wolf E, Höltnann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H : Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. **Nature.** 365 :27, 1993.
16. Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, Fujiwara H, Hirata M, Yamagami T, Nakahata T, Hirabayashi T, Yoneda Y, Tanaka K, Wang WZ, Mori C, Shiota K, Yoshida N, Kishimoto T : Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin-6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. **Proc.Nat.Acad.Sci.USA.** 93:407, 1996.
17. Betz UAK, Bloch W, van den Broek M, Yoshida K, Taga T, Kishimoto T, Addicks K, Rajewski K, Müller W : Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, hepatic, and pulmonary defects. **J.Exp.Med.** 188 :1955, 1998.
18. Yoshimura A, Ichihara M, Kinjyo I, Moriyama M, Copeland NG, Gibert DJ, Jenkins NA, Takahiko H, Miyajima A : Mouse oncostatin M : an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. **EMBO.** 15 :1055, 1996.
19. Malik N, Kallestad JC, Gunderson NL, Austin SD, Neubauer MG, Ochs V, Marquart H, Zarling JM, Shoyab M, Wei CM : Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, Oncostatin M. **Mol.Cell Biol.** 9 :2847, 1989.

20. Lindberg RA, Juan TS, Welcher AA, Sun Y, Cupples R, Guthrie B, Fletcher FA : Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M. **Mol.Cell.Biol.** 18 :3357, 1998.
21. Ichihara M, Hara T, Kim H, Murate T, Miyajima A : Oncostatin M and leukemia inhibitory factor do not use the same functional receptor in mice. **Blood.** 90 :165, 1997
22. Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H : Oncostatin M : A growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.** 83 :9739, 1986.
23. Metcalf D : Murine hematopoietic stem cells committed to macrophage/dendritic cell formation : stimulation by Flk2-ligand with enhancement by regulators using gp130 receptor chain. **Proc.Natl.Aca.Sci.USA.** 94 :11552, 1997.
24. Mukoyama Y, Hara T, Xu M, Tamura K, Donovan PJ, Kim H, Kogo H, Tsuji K, Nakahata T, Miyajima A : In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from embryonic aorta-gonad-mesonephros region. **Immunity.** 8 :105, 1998.
25. Jay PR, Centrella M, Lorenzo J, Bruce AG, Horowitz MC : Oncostatin M : A new bone active cytokine that activates osteoblasts and inhibits bone resorption. **Endocrinology.** 137 :1151, 1996.
26. Wallace PM, MacMaster JF, Rillema JR, Rouleau KA, Hanson MB, Burstein SA, Shoyab M : In vivo properties of oncostatin M. **Ann.NY.Acad.Sci.** 762 :42, 1995
27. Bamber B, Reife RA, Haugen HS, Clegg CH : Oncostatin M stimulates excessive extracellular matrix accumulation in a transgenic mouse model of connective tissue disease. **J.Mol.Med.** 76 :61, 1998.
28. Wallace PM, MacMaster JF, Rouleau KA, Brow TJ, Loy JK, Donaldson KL, Wahl AF : Regulation of inflammatory response by oncostatin M. **J.Immunol.** 162 :5547, 1999.
29. Malik N, Haugen HS, Modrell B, Shoyab M, Clegg CH : Developmental abnormalities in mice transgenic for bovine oncostatin M. **Mol.Cell.Biol.** 15 :2349, 1995.

30. Allen JA, Forbush KA, Perlmutter RM : Functional dissection of *lck* proximal promotor. **Mol.Cell.Biol.** 12:2758, 1992.
31. Wildin RS, Garvin AM, Pawar S, Lewis DB, Abraham KM, Forbush KA, Ziegler SF, Allen JM, Perlmutter RM : Developmental regulation of *lck* gene expression in T lymphocytes. **J.Exp.Med.** 173 :383, 1991.
32. Shen MM, Skoda RC, Cardiff RD, Campos-Torres J, Leder P, Ornitz DM : Expression of LIF in transgenic mice results in altered thymic epithelium and apparent interconversion of thymic lymph node morphologies. **EMBO.** 13 :1375, 1994.
33. Woodroffe C, Muller W, Ruther U : Long-term consequences of interleukin-6 overexpression in transgenic mice. **DNA.Cell.Biol.** 11 :587, 1992.
34. Peters M, Schirmacher P, Goldschmitt J, Odenthal M, Peschel E, Fattori E, Ciliberto G, Dienes H, Meyer zum Büschenfelde K, Rose-John S : Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in interleukin (IL)-6-sIL-6R double transgenic mice. **J.Exp.Med.** 185 :755, 1997.
35. Clegg CH, Rulffes JT, Wallace PM, Haugen HS : Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. **Nature** 384 :261, 1996.
36. Brown TJ, Rowe JM, Liu J, Shoyab M : Regulation of IL-6 by oncostatin M. **J.Immunol.** 147 :2175, 1991.
37. Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, Tsoukas C, Hirano T, Kishimoto T, Carson DA : B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. **J.Exp.Med.** 167 :1253, 1998.
38. Uyttenhove C, Coulie PG, Van Snick J : T cell growth and differentiation induced by interleukin-HP1/IL-6, the murine hybridoma/plasmacytoma growth factor. **J.Exp.Med.** 167 :1417, 1998.
39. Peters M, Iier AM, Rose-John S : Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor : direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. **Blood** 92 :3495, 1998.

40. Clegg CH, Haugen HS, Rulffes JT, Friend SL, Farr AG : Oncostatin M transforms lymphoid tissue intransgenic mice by stimulating lymph node T-cell development and thymus autoantibody production. **Exp.Hematol.** 27 :712, 1999.
41. Rocha B, Guy-Grand D, Vassali P : Extrathymic T cell differentiation. **Curr.Opin.Immunol.** 7 :235, 1995.
42. Yamada H, Ninomiya T, Hashimoto A, Tamada K, Takimoto H, Nomoto K : Positive selection of extrathymically developed T cells by self-antigens. **J.Exp.Med.** 188 :779, 1998.
43. Saito H, Kanamori Y, Takemori T, Nariuchi H, Kubota E, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T, Ishikawa H : Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopathes. **Science** 280 :275, 1998.
44. Poussier P, Julius M : Thymus independent T cell development and selection in the intestinal epithelium. **Annu.Rev.Immunol.** 12 :521, 1994.
45. Guy-Grand D, Cerf-Bensussan N, Malissen B, Malassis-Seris M, Briottet C, Vassalli P. Two gut intraepithelial CD8⁺ lymphocyte population with different T cell receptors : A role for the gut epithelium in T cell differentiation. **J.Exp.Med.** 173 :471, 1991.
46. Rocha B, Vassali P, Guy-Grand D : The V β repertoire of mouse gut homodimeric α CD8⁺ intraepithelial T cell receptor $\alpha\beta$ ⁺ lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. **J.Exp.Med.** 173 :483, 1991.
47. Poussier P, Edouard P, Lee C, Binnie M, Julius M : Thymus-independent development and negative selection of T cells expressing T cell receptor $\alpha\beta$ in the intestinal epithelium : evidence of distinct circulation patterns of gut- and thymus- derived T lymphocytes. **J.Exp.Med.** 176 :187, 1992.
48. Sato K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Yamagiwa S, Watanabe H, Asakura H, Abo T : Evidence for extrathymic generation of intermediate T cell receptor cells in the liver

revealed in thymectomized, irradiated mice subjected to bone marrow transplantation. **J.Exp.Med.** 183 :759, 1995.

49. Abo T, Watanabe H, Imai T, Kmura M, Ohtsuka K, Sato K, Sato K, Ogawa M, Hirahara H, Hashimoto S, Sekikawa H : Extrathymic pathway of T-cell differentiation in the liver and other organs. **Int.Rev.Immunol.** 11 :61, 1994.
50. Collins C, Norris S, McEntee G, Traynor O, Bruno L, von Boehmer H, Hegarty J, O'Farrelly c : RAG1, RAG2 and pre-T cell receptor α chain expression by adult human hepatic T cells : evidence for extrathymic T-cell maturation. **Eur.J.Immunol.** 26 :3114, 1996
51. Garci-Ojeda ME, Dejbakhsh-Jones S, Weissman IL, Strober S : An alternate pathway for T cell development supported by the bone marrow microenvironment : recapitulation of thymic maturation. **J.Exp.Med.** 187 :1813, 1998.
52. Dejbakhsh-Jones S, Jerabek L, Weissman IL, Strober S : Extrathymic maturation of $\alpha\beta$ T cells from hemopoietic stem cells. **J.Immunol.** 155 :3338, 1995.
53. Sprent J : Immunological memory. **Curr.Opin.Immunol.** 9 :371, 1997.
54. McKenna HJ, Morrissey PJ : Flt3 ligand plus IL-7 supports the expansion of murine thymic B cell progenitors that can mature intrathymically. **J.Immunol.** 160 :4801, 1998.
55. Screpanti I, Musiani P, Bellavia D, Cappelletti M, Aiello FB, Maroder M, Frati L, Modesti A, Gulino A, Poli V : Inactivation of the IL-6 gene prevents development of multicentric Castleman's disease in C/EBP β -deficient mice. **J.Exp.Med.** 184:1561, 1996.
56. Rocha B, Penit C, Baron C, Vasseur F, Dautigny N, Freitas AA : Accumulation of bromodeoxyuridine-labeled cells in central and peripheral lymphoid organs : minimal estimates of production and turnover rates of mature lymphocytes. **Eur.J.Immunol.** 20 :1697, 1990.

57. Tough DF, Sprent J : Turnover of naïve- and memory-phenotype T cells. **J.Exp.Med.** 179 :1127, 1994.
58. Antica M, Scollay R : Development of T lymphocytes at extrathymic sites. **J.Immunol.** 163 :206, 1999.
59. Bonomo A, Kehn PJ, Shevach EM : Premature escape of double-positive thymocytes to the periphery of young mice. Possible role in auto-immunity. **J.Immunol.** 152 :1509, 1994.
60. Allen JD, Harris AW, Bath ML, Strasser A, Scollay R, Adams JM : Perturbed development of T and B cells in mice expressing an *Hlx* homeobox transgene. **J.Immunol.** 154 :1531, 1995.
61. Wilkinson B, Owen JJT, Jenkinson EJ : Factors regulating stem cell recruitment to the fetal thymus. **J.Immunol.** 162 :3873, 1999.
62. Matzinger P, Guerder S : Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell?: **Nature.** 338 :74, 1989.
63. Zinkernagel RM, Althage A : On the role thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** 96 :11470, 1999.
64. Akashi K, Kondo M, Weissman IL : Role of interleukin 7 in T-cell development from hematopoietic stem cells. **Immunol.Reviews.** 165 :13, 1998.
65. Rich BE, Campos-Torres J, Tepper RI, Moreadith RW, Leder P : Cutaneous lymphoproliferation and lymphomas in interleukin 7 transgenic mice. **J.Exp.Med.** 177 :305, 1993.
66. Rich BE, Leder P : Transgenic expression of interleukin-7 restores T cell populations in nude mice. **J.Exp.Med.** 181 :1223, 1995.
67. Russell JH, Rush B, Weaver C, Wang R : Mature T cells of autoimmune *lpr/lpr* mice have a defect in antigen-stimulated suicide. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.** 90 :4409, 1993.

68. Nagata S, Suda T : Fas and FasL : *lpr* and *gld* mutations. **Immunol.Today.** 16 :39, 1995.
69. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Henrik G, Mak TW : Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *CTLA-4*. **Science.** 270 :985, 1995.
70. Chambers CA, Krummel MF, Boitel B, Hurwitz A, Sullivan TJ, Fournier S, Cassell D, Brunner M, Allison JP : The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses. **Immunol.Reviews** 153 :27, 1996.
71. Thompson CB, Allison JP : The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. **Immunity.** 7 :445, 1997.
72. Imhof BA, Dunon D : Leukocyte migration and adhesion. **Adv.Immunol.** 58 :345, 1995.
73. Springer TA : Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration : the multistep paradigm. **Cell.** 76 :301, 1994.
74. Baggiolini M : Chemokine and leukocyte traffic. **Nature** 392 : 565, 1998.
75. Jung S, Littman DR : Chemokine receptors in lymphoid organ homeostasis. **Curr.Opin.Immunol.** 11 :319, 1999.
76. Quesenberry PJ, Becker PS : Stem cell homing : Rolling, crawling and nesting. **Proc.Natl.Aca.Sci.USA.** 95 :15155, 1998.
77. Borxmeyer HE, Kim CH : Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. **Exp.Hematol.** 27 :1113, 1999.
78. Roberts CW, Shutter JR, Korsmeyer SJ : *Hox 11* controls the genesis of the spleen. **Nature** 368 :747, 1994.

79. Yokota Y, Mansouri A, Mori S, Sugaeara S, Adachi S, Nishikawa S, Gruss P : Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. **Nature** 397 :702, 1999.
80. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira dSA, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM : OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. **Nature** 397 :315, 1999.
81. Fütterer A, Mink K, Lüz A, Kosco-Vilbois MH, Pfeffer K : The lymphotoxin β receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. **Immunity** 9 :59, 1998.
82. Rennert PD, James D, Mackay F, Browning JL, Hochman PS : Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin β receptor. **Immunity**. 9 :71, 1998.
83. Ngo VN, Korner H, Gunn MD, Schmidt KN, Riminton DS, Cooper MD, Browning JL, Sedgwick JD, Cyster JG : Lymphotoxin α/β and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. **J.Exp.Med.** 189 :403, 1999.
84. Cuff CA, Sacca R, Ruddle NH : Differential induction of adhesion molecule and chemokine expression by $LT\alpha_3$ and $LT\alpha/\beta$ in inflammation elucidates potential mechanisms of mesenteric and peripheral lymph node development. **J.Immunol.** 162 :5965, 1999.
85. Chaplin DD, Fu Y : Cytokine regulation of secondary lymphoid organ development. **Curr.Opin.Immunol.** 10 :289, 1998.
86. Aurrand-Lions M, Galland F, Bazin H, Zakharyev VM, Imhof BA, Naquet P : Vanin-1, a novel GPI-linked perivascular molecule involved in thymus homing. **Immunity**. 5 :392, 1996.
87. Westermann J, Bode U : Distribution of activated T cells migrating through the body : a matter of life and death. **Immunol.Today** 20 :302, 1999.

88. Vicari AP, Figueroa DJ, Hedrick JA, Foster JS, Singh KP, Menon S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Bacon KB, Zlotnik A : TECK a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. **Immunity**. 7 :291, 1997.
89. Mebius RE, Remmert P, Weissman IL : Developing lymph nodes collect CD4+CD3-LT-beta+ cells that can differentiate to APC, NK cells and follicular cells but not T or B cells. **Immunity**. 7 :493, 1997.
90. Kisielow P, Miazek P : Positive selection of T cells : Rescue from programmed cell death and differentiation require continual engagement of the T cell receptor. **J.Exp.Med**. 181 :1975, 1995.
91. Anderson G, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ : Cellular interactions in thymocyte development. **Annu.Rev.Immunol**. 14 :73, 1996.
92. Kirberg J, Berns A, von Boehmer H : Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. **J.Exp.Med** 186 :1269, 1997.
93. Nesic D, Vukmanovic S : MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8⁺ thymic emigrants. **J.Immunol**. 160 :3705, 1998.
94. Brocker T : Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. **J.Exp.Med**. 186 :1223, 1997.
95. Tanchot C, Lemonnier FA, Pérarnau B, Freitas AA, Rocha B : Differential requirements for survival and proliferation of naïve and memory T cells. **Science**. 276 :2057, 1997.
96. Kündig TM, Bachmann MF, Oehen S, Hoffmann UW, Simard JLL, Kalberer CP, Pircher H, Ohashi PS, Hengartner H, Zinkernagel RM : On the role of antigen in maintaining cytotoxic T-cell memory. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**. 93 :9716, 1996.

97. Markiewicz MA, Girao C, Opferman JT, Sun J, Qinghui H, Agulnik AA, Bishop CE, Thompson CB, Ashton-Rickardt PG : Long-term T cell memory requires the surface expression of self-peptide/major histocompatibility complex molecules. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** 95 :3065, 1998.
98. Bruno L, Kirberg J, von Boehmer H : On the basis of immunological T cell memory. **Immunity** 2 :37, 1995.
99. Wu Q, Wang Y, Wang J, Hedgeman EO, Browning JL, Fu Y : The requirement of membrane lymphotoxin for the presence of dendritic cells in lymphoid tissues. **J.Exp.Med.** 190 :629, 1999.
100. Banchereau J, Steinman RM : Dendritic cells and the control of immunity. **Nature.** 392 :245, 1998.
101. Tanchot C, Rocha B : The organisation of mature T-cell pools. **Immunol.Today** 19 :575, 1998
102. Rocha B, Freitas AA, Coutinho AA : Population dynamics of the T lymphocytes. Renewal rate and expansion in the peripheral lymphoid organs. **J.Immunol.** 131 :2158, 1983.
103. Modigliani Y, Coutinho G, Burlen-Defranoux O, Coutinho O, Bandeira A : Differential contribution of thymic output and peripheral expansion in the development of peripheral T cell pools. **Eur.J.Immunol.** 24 :1223, 1994.
104. Freitas AA, Agnes F, Coutinho GC : Cellular competition modulates survival and selection of CD8+ T cells. **Eur.J.Immunol.** 26 :2640, 1996
105. Rocha B, von Boehmer H : Peripheral selection of the T cell repertoire. **Science.** 251 :1225, 1991.
106. Tanchot C, Rocha B : Peripheral selection of T cell repertoires : the role of continuous thymus output. **J.Exp.Med.** 186 : 1099, 1997.

107. Sprent J, Schaefer M, Hurd M, Surh CD, Ron Y : Mature T and B cells transferred to SCID mice can survive indefinitely and many maintain a virgin phenotype. **J.Exp.Med.** 174 :717, 1991.
108. Sprent J, Tough DF : Lymphocyte life-span and memory. **Science.** 265 :1395, 1994.
109. Watanabe H, Kawachi Y, Iiai T, Ohtsuka K, Iwanaga T, Takahashi-Iwanaga H, Abo T : Relationship between intermediate TCR cells and NK1.1⁺ T cells in various immune organs. NK1.1⁺ T cells are present within a population of intermediate TCR cells. **J.Immunol.** 155:2972, 1995.
110. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH : Mouse NKT cells : development, specificity and function. **Annu.Rev.Immunol.** 15 :535, 1997.
111. Robson MacDonald H : NK1.1⁺ T cell receptor- α/β ⁺ cells : New clues to their origin, specificity and function. **J.Exp.Med.** 182 :633, 1995.
112. Eberl G, MacDonald HR : Rapid death and regeneration of NKT cells in anti-CD3e- or IL-12- treated mice : a major role for bone marrow in NKT cell homeostasis. **Immunity.** 9 :345 1998.
113. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J : Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. **Immunity** 8 :591, 1998.
114. Walker PR, Ohetki T, Lopez JA, MacDonald HR, Maryanski JL : Distinct phenotypes of antigen-selected CD8 T cells emerge at different stages of an in vivo immune response. **J.Immunol.** 155 :3443, 1995.
115. Ernst B, Lee DS, Chang JM, Sprent J, Surh CD : The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. **Immunity** 11 :173, 1999.
116. Bender J, Mitchell T, Krappler J, Murrack P : CD4⁺T cell division in irradiated mice requires peptides distinct from those responsible for thymic selection.. **J.Exp.Med.** 190 :367, 1999.

117. Goldrath AW, Bevan MJ : Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8⁺ T cells in lymphopenic hosts. **Immunity** 11 :183, 1999.
118. Drakesmith H, O'Neil D, Schneider SC, Binks M, Medd P, Sercarz E, Beverley P, Chain B : In vivo priming of T cells against cryptic determinants by dendritic cells exposed to interleukin 6 and native antigen. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** 95 :14903, 1998.
119. Unutmaz D, Baldoni F, Abrignani S : Human naive T cells activated by cytokines differentiate into a split phenotype with functional features intermediate between naive and memory T cells. **Int. Immunol.** 7 :1417, 1995.
120. Unutmaz D, Pileri P, Abrignani S : Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. **J.Exp.Med.** 180 :1159, 1994.
121. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, Ma A : IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. **Immunity** 9 :669, 1998.
122. Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, Förster R, Burgstahler R, Lipp M, Lanzavecchia A : Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. **Eur.J.Immunol.** 29 :1617, 1999.
123. Campbell JJ, Pan J, Butcher EC : Developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. **J.Immunol.** 163 :2353, 1999.
124. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Makay CR, Qin S, Lanzavecchia A, Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. **Eur.J.Immunol.** 28 :2760, 1998.
125. Cyster JG : Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. **J.Exp.Med.** 189 :447, 1999.

126. Tang HL, Cyster JG : Chemokine upregulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. **Science**. 284 :819, 1999.
127. Baggiolini M : Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**. 392 :565, 1998.
128. Lieberam I, Förster I : The murine β -chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4⁺ T cells. **Eur.J.Immunol**. 29 :2684, 1999.
129. Willmann K, Legler DF, Loetscher P, Stuber Roos R, Belen Delgado M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B, The chemokine SLC is expressed in T cell areas of the lymph nodes and mucosal lymphoid tissue and attracts activated T cells via CCR7. **Euro.J.Immunol**. 28 :2025, 1998.
130. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, Nakano H : Mice lacking expressing of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. **J.Exp.Med**. 189 :451, 1999.
131. Fu YX, Chaplin DD : Development of T lymphocyte and maturation of secondary lymphoid tissues. **Annu.Rev.Immunol**. 17 :399, 1999.
132. Sallusto F, Kremmer E, Palermo B, Hoy A, Ponath P, Qin S, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A : Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. **Eur.J.Immunol**. 29 :2037, 1999.
133. Förster R, Schübel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, Lipp M : CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. **Cell**. 99 :23, 1999.
134. Mackay CR : Dual personality of memory cells. **Nature**. 401 :659, 1999.
135. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A : Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**. 401 :708, 1999.

136. Pantaleo G, Grakiosi C, Fauci A : The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **New.Engl.J.Med.** 328 :327, 1993.
137. Khang Z-Q, *et al* : Kinetics of CD4+ T cell repopulation of lymphoid tissue after treatment of HIV-1 infection. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.** 95 :1054, 1998.
138. Douek DC, McFarland RD, Keisser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan LJ, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Kroup RA : Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. **Nature** 396 :690, 1998.
139. Autran B. *et al* : Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. **Science.** 277 :112, 1997.
140. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Magrath IT, Shad AT, Horowitz ME, Wexler LH, Adde MA, McClure LL, Gress RE : Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. **Blood** 84 :2221, 1994.
141. Mackall CL, Gress RE : Pathways of T-cell regeneration in mice and humans : implication for bone marrow transplantation and immunotherapy. **Immunol.Reviews.** 157 :61, 1997.
142. Parkman R, Weinberg KI, Immunological reconstitution following bone marrow transplantation. **Immunol.Reviews.** 157 :73, 1997.
143. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Horowitz ME, Magrath IT, Shad AT, Steinberg SM : Age, thymopoiesis and CD4+-T lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. **N.Engl.Med.** 332 :143, 1995.
144. Dulude G, Roy DC, Perreault C : The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. **J.Exp.Med.** 189 :1329, 1999.
145. Hakim FT, Cepeda R, Kaimei S, Mackall CL, McAtee N, Zujewski J, Cowan K, Gress RE : Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults : thymic

- insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. **Blood** 90 :3789, 1997.
146. Dulude G, Brochu S, Fontaine P, Baron C, Gyger M, Roy DC, Perreault C : Thymic and extrathymic differentiation and expansion of T lymphocytes following bone marrow transplantation in irradiated recipients. **Exp.Hematol.** 25 :992, 1997.
147. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Magrath IT, Wexler LH, Dimitrov DS, Gress RE : Distinction between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways results in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. **Blood** 89 :3700, 1997.
148. Mackall CL, Hakim FT, Gress RE : T-cell regeneration : all repertoires are not created equal. **Immunol.Today** 18 :245, 1997.
149. Ferguson FG, Wilkby A, Maxson p, Olsson J, Johanson B : Immune parameters in the longitudinal study of a very old population of Swedish people : a comparison between survivors and nonsurvivors. **J.Gerontol.A.Biol.Sci.Med.Sci.** 50 :B378; 1995.
150. Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS : Cell mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. **J.Gerontol.** 45 :M45, 1990.
151. Bender BS, Nagel JE, Alder WH, Andres R : Absolute peripheral blood lymphocyte count and subsequent mortality of elderly men. The Baltimore longitudinal study of aging. **J.Am.Geriatr.Soc.** 34 :649, 1986.
152. Miller RA : The aging immune system : primer and prospectus. **Science** 273 :70, 1996.
153. González-Quintial R, Theofilopoulos AN : V β gene repertoire in aging mice. **J.Immunol.** 149 :230, 1992.
154. Chi Ku C, Kotzin B, Kappler J, Marrack P : CD8⁺ T-cell clones in old mice. **Immunol.Reviews.** 160 :139, 1997.

155. Callahan JE, Kappler JW, Marrack P : Unexpected expansions of CD8-bearing cells in old mice. **J.Immunol.** 151 :6657, 1993.