

Université de Montréal

**Étude du mécanisme par lequel la thérapie à l'IL7 induit
l'expansion homéostatique des lymphocytes T CD4⁺**

par

Olga HENNION-TSCHELTZOFF

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Microbiologie et Immunologie

Août 2011

© Olga Hennion-Tscheltzoff, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Étude du mécanisme par lequel la thérapie à l'IL7 induit
l'expansion homéostatique des lymphocytes T CD4⁺**

Présenté par :

Olga HENNION-TSCHELTZOFF

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre. Françoise LE DEIST,
président-rapporteur

Dr. Martin GUIMOND,
directeur de recherche

Dr. Jean-Sébastien DELISLE,
membre du jury

Résumé

Dans les cas de lymphopénie, les lymphocytes T résiduels prolifèrent exagérément dans un phénomène appelé «expansion homéostatique périphérique» (HPE), qui est efficace pour la régénération des T CD8⁺, mais inefficace pour les T CD4⁺. L'interleukine-7 (IL7) est une cytokine homéostatique utilisée afin d'augmenter les comptes lymphocytaires T des patients lymphopéniques. Toutefois, la raison de l'expansion préférentielle des lymphocytes T CD8⁺ par l'IL7 demeure toujours inconnue. Nous montrons que cette expansion est due au fait que l'IL7 induit une prolifération efficace des T CD8⁺ périphériques (CD8⁺_{PERI}) ainsi que des émigrants thymiques CD8⁺ (CD8⁺_{RTEs}). Par contre, l'effet prolifératif de l'IL7 est restreint presque uniquement aux CD4⁺_{RTEs} même si les CD4⁺_{PERI} survivent mieux que les CD4⁺_{RTEs}. De plus faibles doses d'IL7 sont nécessaires aux CD4⁺_{RTEs} afin de phosphoryler STAT5 ou de proliférer comparativement aux CD4⁺_{PERI} et nous démontrons que les contacts TCR/CMHII sont nécessaires à la prolifération induite par l'IL7 des CD4⁺_{RTEs} en périphérie. De fait, augmenter au Flt3 ligand le nombre de cellules dendritiques périphériques d'une souris donneuse, avant de transférer ses T_{PERI} dans des souris receveuses traitées à l'IL7 induit une prolifération significative des CD4⁺_{PERI}. Nos résultats indiquent donc que l'abondance des contacts TCR/CMHII reçus dans le thymus semble contrôler la sensibilité à l'IL7 des CD4⁺_{RTEs}. Finalement, l'observation que les CD8⁺_{PERI} et CD8⁺_{RTEs} prolifèrent pareillement pendant la thérapie à l'IL7, alors que la prolifération des T CD4⁺ est largement restreinte aux RTEs expliquerait pourquoi, dans les cas de lymphopénie, la régénération des T CD4⁺ est aussi dépendante de la thymopoïèse.

Mots-clés : Interleukine-7, émigrants thymiques, lymphocytes T, CD4, CD8, homéostasie, lymphopénie, TCR, cellules dendritiques, Flt3 ligand

Abstract

In lymphopenic settings, residual T lymphocytes typically undergo exaggerated proliferation via homeostatic peripheral expansion (HPE). While HPE efficiently regenerates CD8⁺ T cells, it is unable to normalize CD4⁺ T-cell counts. Interleukin-7 (IL7) is a homeostatic cytokine, currently used in trials in order to increase T-cell counts in lymphopenic humans. Nowadays, it is still not known why IL7 therapy is more effective toward the expansion of CD8⁺ T cells rather than CD4⁺ T cells. Here we show that CD8⁺ T cells preferential expansion is due to IL7-induced efficient proliferation of peripheral CD8⁺ T cells (CD8⁺_{PERI}) and CD8⁺ recent thymic emigrants (CD8⁺_{RTEs}). In contrast, the proliferative action of IL7 is largely restricted to CD4⁺_{RTEs} although CD4⁺_{PERI} survive better than CD4⁺_{RTEs}. Interestingly, CD4⁺_{RTEs} require lower concentrations of IL7 in order to phosphorylate STAT5 or proliferate when compared to CD4⁺_{PERI}, and we demonstrate the requirement for TCR/MHCII contacts to support the IL7-induced HPE of CD4⁺_{RTEs} in the periphery. Furthermore, augmenting the number of MHCII expressing cells in the periphery of donor mice by treating them with Flt3 ligand (Flt3L) prior transferring their T_{PERI} cells in IL7 therapy-treated recipients, significantly enhances the IL7-induced proliferation of CD4⁺_{PERI}. Our results indicate so far that the abundance of TCR triggering occurring inside the thymus drives IL7 responsiveness of CD4⁺_{RTEs}. Moreover, the observation that CD8⁺_{PERI} and CD8⁺_{RTE} proliferate similarly during IL7 therapy, while proliferation of CD4⁺ T cells is largely restricted to RTEs, may explain why CD4⁺ T cells regeneration in lymphopenic settings is highly dependent on thymopoiesis.

Key words: Interleukin-7, recent thymic emigrants, T lymphocytes, CD4, CD8, homeostasis, lymphopenia, TCR triggering, dendritic cells, Flt3 ligand

Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>ii</i>
<i>Table des matières</i>	<i>iii</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>v</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>vi</i>
<i>Liste des abréviations utilisées</i>	<i>viii</i>
<i>Dédicace</i>	<i>xiii</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xiv</i>
<i>Chapitre 1</i>	<i>1</i>
<i>INTRODUCTION</i>	<i>1</i>
1.1 La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	<i>2</i>
<i>1.1.1 L'hématopoïèse et la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)</i>	<i>2</i>
1.1.1.1 L'hématopoïèse	<i>2</i>
1.1.1.2 La greffe de CSH	<i>3</i>
<i>1.1.2 L'importance du système HLA</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3 Les maladies traitées par greffe de CSH</i>	<i>6</i>
1.2 La régénération du système immunitaire	<i>7</i>
<i>1.2.1 Les facteurs influençant la reconstitution du système immunitaire</i>	<i>7</i>
<i>1.2.2 La régénération des cellules myéloïdes</i>	<i>12</i>
<i>1.2.2 La régénération des cellules lymphoïdes</i>	<i>14</i>
<i>1.2.4 L'importance d'une thymopoïèse efficace</i>	<i>17</i>
1.2.4.1 La différenciation extra-thymique.....	<i>17</i>
1.2.4.2 L'importance des sélections positive et négative.....	<i>19</i>
1.3 Les traitements pour accélérer la reconstitution thymique chez l'Homme.....	<i>23</i>
<i>1.3.1 L'administration de facteurs de croissance</i>	<i>24</i>
1.3.1.1 Le facteur de croissance des kératinocytes	<i>24</i>
1.3.1.2 L'hormone de croissance et l'Insulin-like Growth Factor 1	<i>25</i>
1.3.1.3 La lymphopoïétine stromale thymique.....	<i>25</i>
<i>1.3.2 Les cytokines γ</i>	<i>27</i>

1.3.2.1	Présentation des cytokines γ c	27
1.3.2.2	Les cytokines IL2; IL15; IL21 et IL7 comme agents immunothérapeutiques	30
1.4	La souris comme modèle d'étude	33
1.4.1	<i>L'IL7 humaine comme thérapie dans des modèles murins</i>	33
1.4.2	<i>Les émigrants thymiques humains et les émigrants thymiques murins</i>	34
1.5	Justification du projet	39
1.6	Hypothèse et objectifs	40
1.6.1	<i>Hypothèse de recherche</i>	40
1.6.2	<i>Objectifs</i>	40
<i>Chapitre 2</i>		41
<i>ARTICLE SCIENTIFIQUE : Le nombre de contacts TCR/CMHII reçus dans le thymus contrôle la sensibilité à l'interleukine-7 (IL7) des émigrants thymiques CD4⁺ dans un modèle murin sauvage</i>		41
2.1	Contribution des auteurs	42
2.2	Résumé français	43
<i>Chapitre 3</i>		78
<i>DISCUSSION</i>		78
3.1	Rappel de l'hypothèse du projet et des résultats obtenus	79
3.2	Mise en contexte avec la littérature et discussion des résultats	80
3.3	Modèle proposé	87
<i>Chapitre 4</i>		89
<i>CONCLUSION</i>		89
4.1	Rappel de l'hypothèse et des objectifs du projet et Conclusion	90
4.2	Limitations de l'étude et Plans futurs	90
<i>Chapitre 5</i>		92
<i>ANNEXE</i>		92
<i>Bibliographie</i>		<i>i</i>

Liste des tableaux

Tableau I : Désordres acquis et innés pour lesquels une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques peut être envisagée comme traitement.....**p.7**

Liste des figures

Figure 1 : L'hématopoïèse.....	p.3
Figure 2 : Facteurs influençant les immunités innée et adaptative avant et après une greffe de CSH.....	p.11
Figure 3 : Comptes approximatifs des cellules immunitaires avant et après une greffe myéloablative de cellules souches hématopoïétiques.....	p.13
Figure 4 : Stades de différenciation lymphocytaire T dans le thymus.....	p.22
Figure 5 : Les récepteurs des cytokines γc et de la TSLP.....	p.30
Figure 6 : Expression de la GFP dans le thymus et en périphérie (rate, ganglions lymphatiques) d'une souris RAG2p-GFP.....	p.38
Figure 7 : Modèle proposé.....	p.88
Figure 1 de l'article : IL7 therapy induces T-cell expansion in lymph nodes and spleen of wild-type mice.....	p.66
Figure 2 de l'article : IL7 therapy induces preferential proliferation of $CD8^{+}_{PERI}$ T cells.....	p.67
Figure 3 de l'article : IL7 therapy induces stronger proliferation of $CD4^{+}_{RTEs}$ compared to $CD4^{+}_{PERI}$ T cells.....	p.68
Figure 4 de l'article : $CD4^{+}_{PERI}$ GFP^{+} and thymic $CD4^{+}$ GFP^{+} T cells respond differently to IL7 therapy.....	p.70
Figure 5 de l'article : $CD4^{+}_{RTEs}$ require TCR/MHCII contact to proliferate under IL7 therapy.....	p.71
Figure 6 de l'article : $CD4^{+}_{RTEs}$ are more sensitive to IL7 therapy than $CD4^{+}_{PERI}$ T cells.....	p.72

Figure 7 de l'article : CD4⁺_{RTEs} are more responsive to IL7 therapy than CD4⁺_{PERI} T cells.....**p.73**

Figure S1 de l'article : Phenotypic analysis of CD4⁺_{PERI} GFP⁺ and thymic CD4⁺ GFP⁺ T cells.....**p.74**

Figure annexe 1 : Pourcentage de cellules dendritiques en périphérie d'une souris WT et d'une souris WT traitée au Flt3L.....**p.93**

Liste des abréviations utilisées

ADN	Acide désoxyribonucléique
Aire	<i>Autoimmune regulator</i>
APCs	Cellules présentatrices d'antigènes / <i>Antigen Presenting Cells</i>
B6	Modèle murin C57BL/6Ly5.2 CD45.2 ⁺
B7	Intégrine $\beta 7 / \beta 7$ <i>integrin</i>
Bad	<i>Bcl-xL/Bcl-2-Associated Death promoter</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell Lymphoma-2</i>
BCR	Récepteur des cellules B / <i>B-cell Receptor</i>
Bim	<i>Bcl-2 Interacting Mediator of cell death</i>
BrdU	Bromodéoxyuridine
CD4⁺_{PERI}	Lymphocytes T CD4 ⁺ périphériques
CD4⁺_{RTEs}	Émigrants thymiques CD4 ⁺
CD62L	L-sélectine CD62 / <i>CD62 L-selectin</i>
CD8⁺_{PERI}	Lymphocytes T CD8 ⁺ périphériques
CD8⁺_{RTEs}	Émigrants thymiques CD8 ⁺
CFSE	<i>Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl diester</i>
cjTRECs	<i>coding-joint T-cell Receptor Excision Circles</i>
CLP	Cellule progénitrice commune lymphoïde / <i>Common Lymphoid Progenitor</i>
CMA	Conditionnement myéloablatif
CMHI	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMHII	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CMP	Cellule progénitrice commune myéloïde / <i>Common Myeloid Progenitor</i>
CMV	Cytomégalovirus
CNMA	Conditionnement non myéloablatif
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
cTEC	Cellules épithéliales du cortex thymique / <i>cortical Thymic Epithelial Cells</i>

DCs	Cellules dendritiques / <i>Dendritic Cells</i>
DN	Double négatif / <i>Double Negative</i>
DN1/2/3/4	Stade de maturation thymique DN1/2/3/4
DP	Double positif / <i>Double Positive</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ETP	<i>Early Thymic Progenitor</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FIt3L	<i>Fms-like tyrosine kinase receptor-3 Ligand</i>
FOXO3a	<i>Forkhead box O3a</i>
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GH	Hormone de croissance / <i>Growth Hormon</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GMP	Cellule progénitrice des granulocytes et des macrophages / <i>Granulocyte/Macrophage Progenitor</i>
GvHD	Maladie du greffon contre l'hôte / <i>Graft versus Host Disease</i>
GvL	<i>Graft versus Leukemia</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	<i>Human Leucocytes Antigens</i>
HPE	Expansion homéostatique périphérique / <i>Homeostatic Peripheral Expansion</i>
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cells</i>
i.e.	id est (c'est à dire)
i.p.	Intrapéritonéal / <i>Intraperitoneal</i>
i.v.	Intraveineux / <i>Intravenous</i>
IFN-γ	Interféron- γ
Ig	Immunoglobulines

IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IL2	Interleukine-2
IL3	Interleukine-3
IL4	Interleukine-4
IL5	Interleukine-5
IL6	Interleukine-6
IL7	Interleukine-7
IL9	Interleukine-9
IL12	Interleukine-12
IL13	Interleukine-13
IL15	Interleukine-15
IL18	Interleukine-18
IL21	Interleukine-21
IL2Rβ	Chaîne β du récepteur de l'IL2
IL7Rα	Chaîne α du récepteur de l'IL7
IL15Rα	Chaîne α du récepteur de l'IL15
JAK	Janus kinases
KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>
KO	<i>Knock-out</i>
Lck	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
IDCs	DCs lymphoïdes
LN	Ganglions lymphatiques / <i>Lymph Nodes</i>
LT-HSC	CSH pouvant générer une hématopoïèse de long terme / <i>Long-Term repopulating HSC</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia sequence-1</i>
mDCs	DCs myéloïdes
MEP	Progéniteur des mégakaryocytes et des érythrocytes / <i>Megakaryocyte/Erythroid Progenitor</i>

MFI	Intensité de fluorescence moyenne / <i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MHCI	Class I Major Histocompatibility Complex
MHCII	Class II Major Histocompatibility Complex
MPP	Cellule progénitrice multipotente / <i>Multipotent Progenitor</i>
mTEC	Cellules épithéliales de la médulla thymique / <i>medullar Thymic Epithelial Cells</i>
N^{-/-}	Modèle murin déficient en facteur N (exemple : CMHII ^{-/-} : modèle murin déficient en molécules de CMHII)
NK	<i>Natural Killer</i>
NKT	<i>Natural Killer T</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pDCs	DCs plasmacytoïdes
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
pSTAT5	Forme phosphorylée de STAT5
PTK-7	Protéine tyrosine kinase-7
q-PCR	PCR quantitative
RAG	<i>Recombination Activating Genes</i>
RAG2p-GFP	GFP sous le promoteur de l'enzyme RAG2
rhIL7	IL7 recombinante humaine / <i>recombinant human IL7</i>
RTEs	Émigrants thymiques / <i>Recent Thymic Emigrants</i>
RT-PCR	PCR en temps réel
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SCID	Immunodéficiences combinées sévères / <i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SE	<i>Standard Error of the mean</i>
Sirp-α	<i>Signal-regulatory protein-α</i>
SJL	Modèle murin C57BL/6Ly5.1 CD45.1 ⁺
sjTRECs	<i>signal-joint T-cell Receptor Excision Circles</i>
SP	Simple positives / <i>Single Positive</i>

STAT5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription-5</i>
ST-HSC	CSH pouvant générer une hématopoïèse de court terme / <i>Short-Term repopulating HSC</i>
T-bet	<i>T-box transcription factor expressed in T cells</i>
TCR	Récepteur des cellules T / <i>T-cell Receptor</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
Th	<i>T-helper</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TPO	Thrombopoïétine
TRECs	Cercles d'excision du TCR / <i>TCR Excision Circles</i>
Tregs	T régulateurs
TSLP	Lymphopoïétine stromale thymique / <i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i>
TSLPR	Récepteur de la TSLP
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WT	type sauvage / <i>Wild-Type</i>
X-SCID	Immunodéficience combinée sévère reliée au chromosome X / <i>X-linked Severe Combined Immunodeficiency</i>
ZAP70	<i>ζ-Associated Protein-70</i>

Dédicace

À la très tendre mémoire de mon grand-père,

Jacques HENNION.

Remerciements

Je remercie du fond du cœur mon directeur de recherche, le Dr. Martin Guimond, de m'avoir permis d'entreprendre et de compléter cette maîtrise avec succès. Merci Martin d'avoir cru en moi.

Je remercie chaleureusement tous les membres du laboratoire, passés ou actuels, pour leur aide, leur amitié ou simplement leur présence. Ce fut un plaisir de travailler avec vous tous. Un merci tout spécial à Dominique et Simon.

Je remercie sincèrement Héloïse, Marilaine, Charles-Étienne, Mona et Elena, membres du laboratoire de la Dre. Janetta Bijl, de m'avoir aussi spontanément offert leurs conseils et leur amitié; vous côtoyer fut un réel bonheur. Un merci particulier à Héloïse.

Je remercie également tous les membres du Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont qui ont participé à ma formation durant ces deux ans et qui, de fait, ont permis à ce projet de s'accomplir.

Je remercie Sara, Estelle et Monique, d'avoir été à mes côtés, particulièrement dans les moments difficiles. Je vous aime les filles.

Finalement, je remercie du fond du cœur Sophie, ma mère, Denis, mon père, Dmitri, mon frère et Ludmila, ma sœur, pour leur amour et leur soutien. Merci d'être toujours là pour moi. Люблю тебя, моя семейка!

Chapitre 1

INTRODUCTION

1.1 La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)

1.1.1 L'hématopoïèse et la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)

1.1.1.1 L'hématopoïèse

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules pluripotentes, présentes dans la moelle osseuse, qui peuvent générer toutes les cellules du système hématopoïétique d'un individu (Figure 1). Il y a deux types de CSH fonctionnellement distinctes : les LT-HSC et les ST-HSC. Les LT-HSC sont des cellules parmi les plus immatures du système hématopoïétiques et peuvent générer une hématopoïèse de long terme. Les ST-HSC, quant à elles sont des cellules souches capables de générer une hématopoïèse de court terme. Le processus de l'hématopoïèse lui-même est complexe et hiérarchisé; les CSH ont un potentiel d'auto-renouvellement et peuvent se différencier en cellules multipotentes appelées cellules progénitrices, capables à leur tour, suivant les signaux reçus, de se différencier en cellules matures du sang et du système immunitaire [1-3]. Il y a deux lignées de différenciation, la lignée myéloïde et à la lignée lymphoïde. La lignée myéloïde produit les érythrocytes, les plaquettes, les monocytes et les granulocytes (regroupant les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles). La lignée lymphoïde produit les cellules Natural-Killer (NK), les lymphocytes B et les lymphocytes T qui sont eux-mêmes sous-divisés en deux groupes : les lymphocytes T exprimant le co-récepteur CD4 (T CD4⁺) et les lymphocytes T exprimant le co-récepteur CD8 (T CD8⁺). Les deux lignées peuvent produire des cellules dendritiques (DCs) [4] (Figure 1). Dans les cas de greffe de CSH, les CSH peuvent être mobilisées de la moelle vers le sang périphérique par l'administration de différents facteurs de croissance [5, 6]. Elles migrent ensuite au niveau de la moelle osseuse et servent à régénérer le système hématopoïétique du patient.

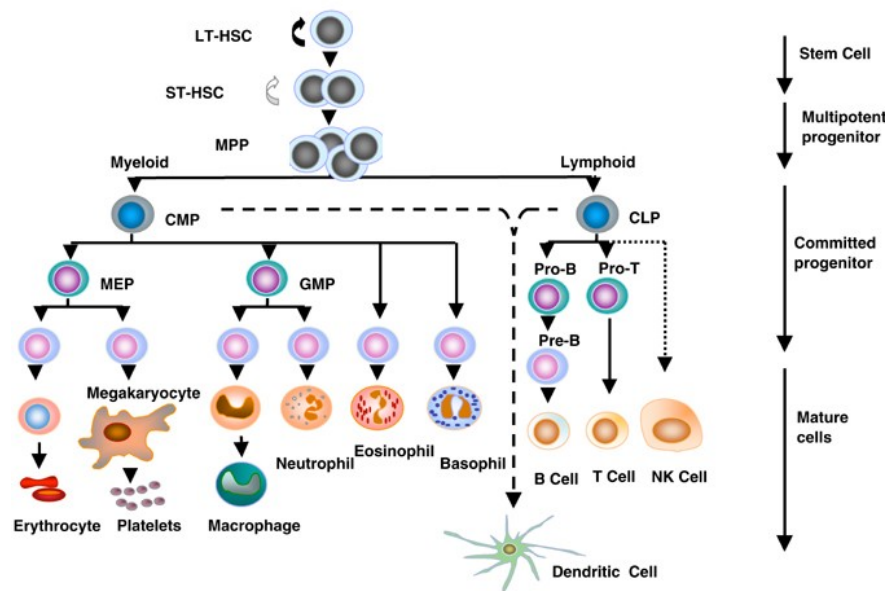


Figure 1. L'hématopoïèse. LT-HSC, cellule souche hématopoïétique pouvant générer une hématopoïèse de long terme; ST-HSC, cellule souche hématopoïétique pouvant générer une hématopoïèse de court terme; MPP, cellule progénitrice multipotente; CMP, cellule progénitrice myéloïde commune; CLP, cellule progénitrice lymphoïde commune; MEP, cellule progénitrice des mégakaryocytes et des érythrocytes; GMP, cellule progénitrice des granulocytes et des macrophages. Adaptée de J. Larsson et S. Karlsson. 2005. *Oncogene*. 24(37): p.5676-92.

1.1.1.2 La greffe de CSH

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) a initialement été développée pour deux raisons : la première était de soigner des patients avec des anémies ou des immunodéficiences congénitales en remplaçant leur système hématopoïétique défectueux par celui d'un donneur sain. La seconde raison était de permettre l'administration de traitements chimio- et radiothérapeutiques à hautes doses (appelés traitements myéloablatifs) à des patients atteints de divers cancers hématologiques. Malheureusement, un effet secondaire sérieux de ces traitements est la destruction des cellules progénitrices saines, ce qui oblige le patient à subir une greffe de CSH provenant d'un donneur sain

(greffe allogénique). Ce type de greffe induit le risque non-négligeable d'un développement de la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD; Graft *versus* Host Disease), maladie grave durant laquelle les lymphocytes T du donneur s'activent contre les cellules saines du receveur. Par contre, l'effet bénéfique de la GvHD réside également dans la reconnaissance des cellules tumorales du patient par les lymphocytes T du donneur (effet GvL; Graft *versus* Leukemia) [7]. Plusieurs facteurs peuvent contribuer au développement d'une GvHD, parmi lesquels un des plus importants est une incompatibilité au niveau des antigènes majeurs d'histocompatibilité (système HLA; discuté plus bas). Toutefois, d'autres facteurs peuvent également jouer un rôle non-négligeable dans le développement de la GvHD, parmi lesquels les antigènes d'histocompatibilité mineurs, les gènes contrôlant les processus inflammatoires de même que les cytokines, chemokines et leurs récepteurs [8]. Une étude a, de fait, récemment démontré que le niveau d'expression de SMAD3, un composant de la voie de signalisation du TGF- β , dans les cellules T du donneur constituait un facteur prédictif important du développement d'une GvHD [9].

La première greffe de CSH date de 1957 [10] et le premier succès de 1959 [11], et cette approche demeure toujours la seule thérapie cellulaire curative pour traiter des désordres hématologiques malins et parfois certaines tumeurs solides. De fait, la greffe de CSH s'est rapidement individualisée, après la découverte et la confirmation de l'importance de l'histocompatibilité induite par le système des antigènes leucocytaires humains (HLA; Human Leucocytes Antigens), afin de réduire les risques et le degré de GvHD.

1.1.2 L'importance du système HLA

L'histocompatibilité a été découverte en 1958 par Jean Dausset, un médecin français qui démontre l'existence d'antigènes particuliers à la surface des lymphocytes et de toutes les cellules nucléées de l'organisme. Ces antigènes d'histocompatibilité sont différents d'un individu à l'autre si bien qu'ils constituent une identité immunologique unique à chacun. Lorsque les premières greffes de CSH ont été effectuées, les antigènes

d'histocompatibilité ont d'abord été appelés «antigènes de transplantation» car ils semblaient déterminer le rejet ou la prise de la greffe [12].

Les gènes qui codent pour ces antigènes sont situés sur le chromosome 6 et sont appelés «complexe majeur d'histocompatibilité» (CMH), ou «système HLA» chez l'Homme. Les gènes du système HLA sont répartis en deux classes : les gènes de classe I et les gènes de classe II. Les gènes de classe I (HLA I) codent les antigènes d'histocompatibilité présents sur toutes les cellules de l'organisme alors que les gènes de classe II (HLA II) codent pour les antigènes présents uniquement sur certains types cellulaires tels que les lymphocytes T CD4⁺ activés (et non activés chez la souris), les lymphocytes B, les monocytes et les macrophages [13]. Les HLA I et II sont eux-mêmes sous-divisés en trois groupes; les HLA I en groupes A, B et C et les HLA II en groupes DP, DQ et DR. Chaque parent transmet la moitié de ses gènes HLA à ses enfants et plus de 800 allèles sont connus pour les gènes du système HLA, ce qui explique la très grande diversité de combinaisons et la difficulté de trouver un donneur parfaitement compatible avec un receveur dans les cas de greffes de cellules souches hématopoïétiques.

Cette disparité dans le système HLA entre donneur et receveur peut donc mener à une activation plus ou moins sévère des cellules T et NK du donneur contre celles du receveur, ce qui induit l'effet bénéfique de la GvL, mais également l'effet néfaste de la GvHD. De plus, dans certains cas où la moelle du receveur n'est pas totalement détruite, cette incompatibilité peut mener à l'activation des cellules du receveur contre le greffon, menant au rejet de greffe [7, 14]. La meilleure histocompatibilité possible est donc de 12 allèles sur 12, ce qui est possible notamment en cas de greffe de CSH provenant d'un donneur apparenté. Lorsque les CSH proviennent d'un donneur non-apparenté, 10 allèles sont testés au niveau moléculaire. Une compatibilité allélique de 10/10 est donc la meilleure possible, avec une compatibilité parfaite obligatoire au niveau du HLA-A, -B et -C afin d'éviter une reconnaissance des cellules du receveur par les cellules NK du donneur, ainsi qu'une compatibilité parfaite au niveau du HLA-DR et HLA-DQ. Si la compatibilité est inférieure à 10/10, la survie des patients chute drastiquement [15]. Toutefois, lorsque la

source des CSH est le sang de cordon ombilical (ou sang de cordon), une compatibilité de 6 allèles sur 6 est la meilleure possible avec une compatibilité parfaite au niveau des antigènes HLA-A, -B et -DR. Cette permissivité est due entre autres à l'immaturation des lymphocytes T et B présents dans le sang de cordon, qui diminue le risque d'un développement de GvHD ou d'un rejet de greffe [14, 16].

1.1.3 Les maladies traitées par greffe de CSH

La greffe allogénique de CSH est une approche thérapeutique envisagée dans de nombreuses maladies malignes et non-malignes ainsi que des désordres d'immunodéficiences innées (Tableau I). A peu près 55 000 à 60 000 greffes sont effectuées chaque année à travers le monde; les causes les plus fréquentes en Amérique du Nord (environ 70 % des greffes) étant les leucémies aiguës et chroniques, les désordres myélodysplasiques et les syndromes myéloprolifératifs. Viennent ensuite les autres conditions malignes telles que les lymphomes Hodgkiniens et non-Hodgkiniens ainsi que les myélomes multiples (environ 15 % des greffes). Finalement, les désordres tels que l'anémie aplasique, les immunodéficiences diverses et les autres désordres non-malins peuvent également être traités par greffe allogénique de CSH (environ 10 à 15 % des greffes) [17].

Tableau I. Désordres acquis et innés pour lesquels une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques peut être envisagée comme traitement.

Désordres acquis	Désordres innés
Leucémies lymphoïdes aiguës et chroniques	Thalassémies
Leucémies myéloïdes aiguës et chroniques	Drépanocytose
Désordres myélodysplasiques	Anémie de Fanconi
Syndromes myéloprolifératifs	Syndrome de Diamond-Blackfan
Lymphomes Hodgkiniens et non-Hodgkiniens	Dyskératose congénitale
Myélomes multiples et autres désordres des plasmocytes	Syndrome de Shwachman-Diamond
Anémie aplasique	Immunodéficiences combinées sévères et autres immunodéficiences congénitales
Hémoglobinurie paroxysmale nocturne	Syndrome de Hurler et autres désordres métaboliques
Certains désordres auto-immuns	

Adapté de B. Gyurkocza *et al.* 2010. Expert Rev Hematol. 3(3): p. 285-99.

1.2 La régénération du système immunitaire

1.2.1 Les facteurs influençant la reconstitution du système immunitaire

La régénération du système immunitaire ne se fait pas instantanément après une greffe de moelle osseuse, et le patient demeure lymphopénique et prédisposé aux rechutes et aux infections opportunistes pendant des semaines voire pendant des mois suivant sa greffe [18]. Les mécanismes régissant la reconstitution du système hématopoïétique, et particulièrement immunitaire dans les cas de lymphopénie restent encore à élucider. Certains facteurs connus peuvent néanmoins influencer la reconstitution du système immunitaire, parmi lesquels le conditionnement pré-greffe, la compatibilité HLA, la source des CSH (sang périphérique, moelle ou sang de cordon ombilical), la durée de la lymphopénie, les traitements immunosuppresseurs administrés après la greffe ainsi que l'âge du patient [19] (Figure 2).

Il y a deux sortes de conditionnement pré-greffe : le conditionnement myéloablatif (CMA) et le conditionnement atténué ou conditionnement non-myéloablatif (CNMA). Le CMA est caractérisé par des doses élevées de chimio- et/ou radio-thérapies qui auront pour résultat d'éliminer le maximum de cellules malignes du patient/receveur et de permettre la prise de greffe [20]. En effet, dû à sa non-spécificité, ce conditionnement entraîne la destruction des cellules lymphoïdes saines du receveur et, de fait, permet une prise de greffe efficace même lors de greffes apparentées mais HLA-incompatibles. Il a été montré que l'effet anti-leucémique de la greffe est induit par les lymphocytes T présents dans le greffon – effet GvL, en contre partie de la GvHD [21]. Par contre, le CMA peut entraîner une mortalité élevée due à une toxicité systémique, une thrombopénie et une lymphopénie persistante touchant tous les sous-types de lymphocytes, prédisposant les patients à des infections bactériennes, virales et fongiques diverses [22]. La toxicité du conditionnement se traduit par un risque d'insuffisance au niveau de plusieurs organes mais également au niveau des barrières muqueuses, plus ou moins endommagées, qui favorisent donc l'entrée de différents pathogènes [19]. La lymphopénie observée post-greffe est principalement responsable des infections mais les médicaments immunosuppresseurs administrés comme prophylaxie ou traitements contre la GvHD jouent également un rôle [19, 23-25].

Le CNMA a donc été développé dans l'objectif d'induire une prise de greffe efficace sans détruire complètement le système hématopoïétique du receveur en induisant un effet anti-leucémique plus élevé afin de réduire les complications observées post-greffe. La régénération immuno-hématopoïétique est donc mixte au départ (donneur-receveur); graduellement le système hématopoïétique ne va provenir que du donneur. La toxicité mucosale et médullaire est donc grandement réduite [19]. De fait, le CNMA induit une immunosuppression intense mais temporaire [24], permettant une période d'aplasie plus courte que le CMA, avec une médiane du chimérisme de 100% atteinte en 4 mois [26], ainsi qu'une régénération des T et des NK plus rapide et peu ou pas de neutropénie et de thrombopénie [21]. L'incidence d'infections et de GvHD dans les cent jours post-greffe est donc diminuée [27, 28]. Par contre, le CNMA ne réduit pas l'incidence des infections au

cytomégalo virus (CMV), bien au contraire, il l'exacerbe de 75% [29, 30]. Le CNMA permet par conséquent à des patients plus âgés, avec un historique d'infections chroniques, ou en rechute de leur maladie d'avoir accès à une greffe.

Il existe deux types de greffes de moelle osseuse : la greffe autologue et la greffe allogénique. Dans les cas de greffe autologue, le patient/receveur se voit ré-infuser ses propres cellules souches. En effet, les CSH sont prélevées avant le conditionnement pré-greffe, sont congelées et retournées au patient par voie intraveineuse après les traitements chimiothérapeutiques de ce dernier. La greffe autologue est pratiquée lorsque la maladie n'affecte pas les cellules souches ou dans les cas où il est possible d'éliminer les cellules progénitrices malades par chimiothérapie ou radiothérapie.

Dans ces cas de greffe, le patient subit des dommages muqueux et une neutropénie est observée, principalement due aux traitements de chimiothérapie. De même, une lymphopénie du système immunitaire adaptatif est observable pendant un an. Par contre, le sous-type cellulaire qui souffre le plus après une greffe autologue, comme après une greffe allogénique, sont les lymphocytes T $CD4^+$, et la régénération de ce sous-type pendant la première année suivant la greffe repose presque entièrement sur l'expansion des cellules mémoires résiduelles [19].

Dans les cas de greffes allogénique HLA-compatibles, les $CD4^+$ ainsi que les cellules B peuvent mettre 7 à 9 mois avant de se régénérer, en absence de GvHD. Lorsqu'il est impossible de trouver un donneur parfaitement compatible avec le receveur, une greffe peut être effectuée à partir de donneurs non-compatibles ou partiellement compatibles (haplo-identiques).

Dans les cas de greffes à partir de donneurs non-compatibles, les lymphocytes T sont retirés *ex vivo* ou *in vivo* par l'administration d'anticorps spécifiques (CAMPATH, globuline anti-thymocytaire). Très souvent, une recrudescence d'infections bactériennes, virales ou fongiques est alors observée et la régénération du système immunitaire est grandement

retardée [19, 31, 32]. De plus, le fait de retirer les lymphocytes T du greffon augmente les risques de rechutes leucémiques par l'absence de l'effet GvL.

Dans les cas de greffe à partir de donneurs haplo-identiques, les lymphocytes T sont également retirés du greffon, ce qui prédispose, là encore, le receveur à des infections opportunistes virales ou fongiques et une reconstitution immunitaire retardée [33]. Par contre, le retrait des lymphocytes T aura pour effet de diminuer le risque de GvHD et de rejet de greffe. La régénération du système immunitaire dépendant de la quantité de cellules progénitrices contenues dans le greffon.

Finalement, la greffe de CSH effectuée à partir de sang de cordon ombilical diminue grandement les problèmes liés à l'histocompatibilité. En effet, les lymphocytes T présents dans le sang de cordon semblent plus immatures que ceux retrouvés dans les autres sources de cellules souches (sang périphérique, moelle). En effet, lorsque comparés aux lymphocytes T adultes, les lymphocytes T présents dans le sang de cordon affichent une production cytokinique diminuée et une absence de sécrétion de granzymes et de perforine [34-36]. Ce défaut dans la sécrétion de cytokines et particulièrement d'IFN- γ expliquerait l'effet allogénique diminué des lymphocytes T du sang de cordon, le phénotype Th1 étant impliqué dans la pathophysiologie de la GvHD aiguë [37]. De plus, le sang de cordon contient plus de cellules naïves (émigrants thymiques) et plus de lymphocytes T régulateurs par rapport au sang périphérique adulte [38, 39]. Par contre, en nombres absolus, le sang de cordon contient beaucoup moins de CSH et de lymphocytes que les autres sources [40]. Ceci prédispose donc les receveurs à une neutropénie prolongée [41, 42] ainsi qu'à des infections virales et fongiques. La régénération d'un système immunitaire fonctionnel peut donc être retardée chez les receveurs de sang de cordon par rapport aux receveurs de CSH provenant du sang périphérique ou de la moelle [19, 38].

Avec les avancées actuelles en termes de greffe, l'âge des patients recevant une greffe de CSH augmente et, de fait, l'âge des donneurs apparentés va également augmenter. Or l'âge du donneur ainsi que du receveur sont des facteurs importants dans la régénération

du système immunitaire. En effet, le CMA est mieux toléré chez les patients pédiatriques que chez les patients adultes. Les raisons sont que les receveurs plus âgés démontrent une toxicité sur les organes plus élevée, une intolérance accrue à une lymphopénie prolongée, ainsi qu'un risque plus élevé de souffrir d'une GvHD sévère [43]. De même, la mortalité post-greffe associée aux transplantations chez les receveurs âgés est plus élevée que chez les receveurs pédiatriques [44, 45]. De plus, une étude a montré que la reconstitution des cellules T chez un receveur adulte est significativement plus lente que chez un patient pédiatrique et qu'un patient adulte est plus à risque de développer une infection opportuniste [46]. Une des raisons serait que dans un greffon provenant d'un donneur adulte, le nombre de cellules progénitrices CD34⁺ est diminué par rapport à un donneur pédiatrique. Le délai de prise de greffe ne semble pas affecté [47] mais les receveurs ayant reçu un greffon contenant moins de cellules progénitrices affichent une régénération immunitaire retardée [48].

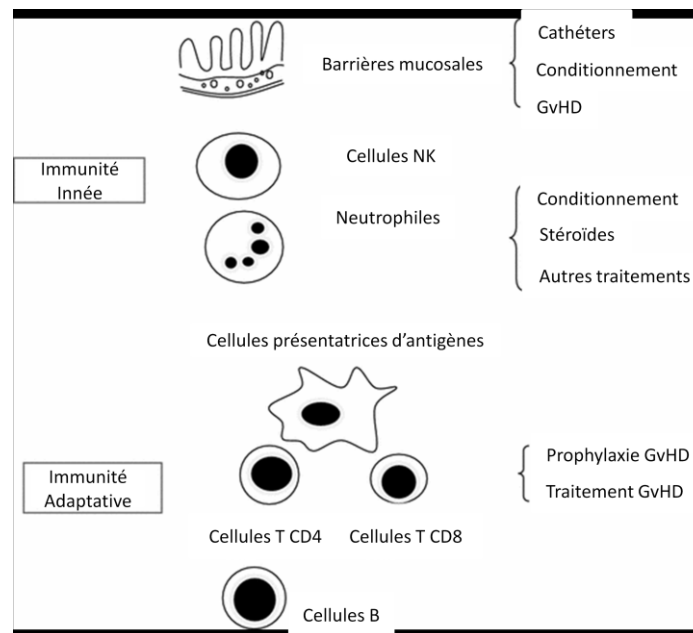


Figure 2. Facteurs influençant les immunités innée et adaptative avant et après une greffe de CSH. Adaptée de M.A. Mir et M. Battiwalla. 2009. Mycopathologia. **168**: p.271-82.

1.2.2 La régénération des cellules myéloïdes

La lignée myéloïde contient les globules rouges, les plaquettes, les monocytes et macrophages ainsi que les granulocytes. Ces cellules sont celles qui reviennent le plus rapidement après une greffe de CSH [18, 49].

Les globules rouges (ou érythrocytes) sont parmi les premières détectables dans le sang avec une médiane de prise de greffe des réticulocytes (cellules progénitrices des globules rouges) de moins d'un mois, à condition que la greffe ait été effectuée avec une compatibilité ABO parfaite ou avec une incompatibilité mineure. Si la greffe est effectuée avec une incompatibilité ABO majeure, la prise de greffe des réticulocytes est significativement retardée [50].

Les plaquettes (ou thrombocytes) sont des cellules cruciales dans la coagulation sanguine et reviennent en même temps que les globules rouges. Leur régénération semble dépendre du type de greffe utilisée. En effet, à 60 jours post-greffe, 40% des patients affichent un taux de plaquettes normal dans les cas de greffe à partir de sang de cordon, 57% dans les cas de greffe non-apparentée et 74% dans les cas de greffe apparentée. Les facteurs de risque documentés, associés à une faible régénération plaquettaire, sont : un conditionnement myéloablatif, une greffe non-apparentée, une incompatibilité ABO majeure, la présence de GvHD aiguë et une régénération lente des neutrophiles [51, 52]. La régénération des plaquettes semble être également corrélée avec la présence dans le sang de deux cytokines nécessaires à la thrombopoïèse : la thrombopoïétine (TPO) et l'interleukine-6 (IL6) [53].

Deux études menées par Scholl *et al.* [54, 55] sur la régénération du système immunitaire après une greffe de cellules souches provenant du sang périphérique (PBSCT) démontrent que les monocytes (cellules dont proviennent les macrophages) sont des cellules détectables dans le sang très rapidement post-greffe (Figure 3) et retrouvent leur capacité de phagocytose en même temps.

Les neutrophiles sont des cellules du système immunitaire inné, faisant partie des granulocytes (avec les basophiles et les éosinophiles). Ils sont importants pour l'immunité anti-bactérienne [56, 57] et réapparaissent dans le sang très rapidement, comme les monocytes, entre 2 et 4 semaines post-greffe (Figure 3). Les neutrophiles récupèrent leur capacité de phagocytose à peu près lorsqu'ils sont détectables dans le sang mais récupèrent leur potentiel de produire des composants réactifs de l'oxygène plus rapidement que les monocytes [58]. De fait, il a été montré qu'un des facteurs prédictifs d'une régénération des neutrophiles est le nombre absolu de cellules obtenu dans un frottis bucal [59, 60]. Un autre facteur prédictif d'une régénération serait la longueur des télomères présents dans les cellules progénitrices infusées dans le greffon [61]. Par contre, comme les plaquettes, le développement d'une GvHD ralentit la régénération des neutrophiles [56, 62].

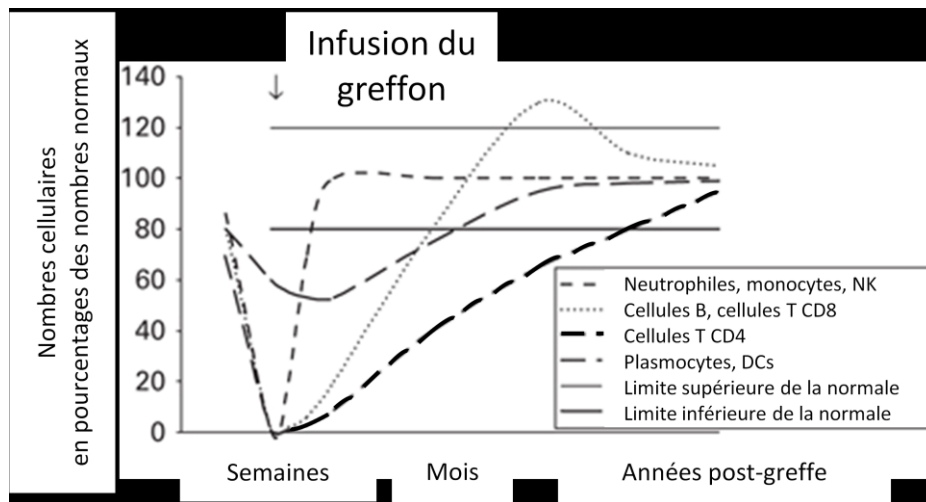


Figure 3. Comptes approximatifs des cellules immunitaires avant et après une greffe myéloablatrice de cellules souches hématopoïétiques. Les comptes sont exprimés en pourcentages des comptes cellulaires normaux. Adaptée de C. Mackall *et al.* 2009. Bone Marrow Transplant. 44(8): p.457-62.

1.2.2 La régénération des cellules lymphoïdes

Parmi les cellules différenciées provenant de la lignée lymphoïde, on distingue les cellules Natural-Killer (ou NK), les lymphocytes B et les lymphocytes T. Les cellules dendritiques (ou DCs) peuvent provenir des deux lignées, myéloïde et lymphoïde.

Les cellules dendritiques sont cruciales à l'initiation des réponses immunitaires innées et acquises [63, 64] et font partie des cellules qui reviennent rapidement après une greffe de cellules souches hématopoïétiques [18] (Figure 3). Les cellules dendritiques retrouvées en périphérie se divisent en trois groupes : les cellules dendritiques myéloïdes (mDCs), les cellules dendritiques lymphoïdes (IDCs) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) [64, 65]. Étant donné la susceptibilité des receveurs de greffe de CSH aux infections virales, particulièrement par des virus de la famille des *herpesviridae*, une étude a évalué et montré que la régénération des pDCs est plus lente comparée à celle des autres sous-types de cellules dendritiques et que les pDCs présentent des défauts fonctionnels, particulièrement dans la production d'interféron de type I [66]. Plusieurs facteurs modulant la régénération des cellules dendritiques ont été rapportés, parmi lesquels le type de conditionnement effectué, la voie d'infusion du greffon et l'administration de cytokines. Baba *et al.* [64] ont démontré qu'une infusion intra-osseuse permet une meilleure régénération des cellules dendritiques, tous sous-types confondus. Deux études s'opposent sur l'avantage que donne un conditionnement réduit; Mohty *et al.* [67] démontrent en effet une régénération plus rapide des cellules dendritiques en absence de chimérisme mixte. Par contre, l'équipe de Gastl *et al.* [63] démontre qu'un conditionnement réduit entraîne un chimérisme mixte des cellules dendritiques produites pendant les premiers mois associé à une incidence de rechute plus élevée. Le mécanisme serait une plus faible expression des molécules de co-stimulation et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) à la surface des cellules dendritiques myéloïdes. Finalement, l'administration de cytokines telles que le G-CSF, le GM-CSF ou le Flt3 ligand (Flt3L) a également été étudiée. Le G-CSF est corrélé à une diminution des molécules de co-stimulation à la surface des cellules dendritiques myéloïdes, ce qui entrainerait une

diminution de ces cellules dans le sang des patients au profit des cellules dendritiques lymphoïdes ou plasmacytoïdes [65]. Chez la souris, le GM-CSF a été montré très efficace pour stimuler le retour des DCs, avec un nombre détectable de cellules 2 semaines après la greffe. Le Flt3L a également été montré comme un stimulateur des cellules dendritiques, avec un nombre détectable de DCs à 3 semaines après la greffe [68]. Par conséquent, l'administration de cytokines peut accélérer la régénération des DCs.

Les cellules Natural-Killer (NK) sont un sous-type de lymphocytes qui ont un rôle de pont entre l'immunité innée et adaptative. Plusieurs études dans des modèles murins ont montré leur importance en réponse à des infections virales, à des pathogènes intracellulaires ou à certaines tumeurs [69-71]. Les cellules NK exercent leur activité cytotoxique en libérant la perforine et les granzymes et en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , le GM-CSF et le TNF- α . Les cellules NK peuvent être activées par plusieurs cytokines incluant l'IL2, l'IL12, l'IL15 ou l'IL18 et les interférons de type I [71-74]. Après une greffe de CSH, les cellules NK font partie des cellules qui reviennent le plus rapidement, quelques semaines après la greffe, tout comme les granulocytes et les monocytes [18, 75] (Figure 3). Leur régénération est dépendante de la présence des cellules progénitrices lymphoïdes, présentes dans la moelle osseuse. Plusieurs études ont démontré leur potentiel anti-GvHD sans affecter l'effet GvL [76, 77]. L'administration d'IL2 et d'IL15 dans des modèles murins a également montré le potentiel de ces cytokines à promouvoir la régénération des NK et de là permettre une meilleure reconstitution du compartiment lymphoïde [76].

Contrairement à la régénération des autres types cellulaires, définitivement en place en quelques semaines après une greffe de CSH, la reconstitution des lymphocytes B est un processus qui peut prendre des mois, voire des années, ce qui prédispose les patients aux infections et rechutes de leur maladie [78, 79] (Figure 3). La régénération des B est, comme celle des NK, dépendante de la présence de cellules progénitrices lymphoïdes dans la moelle osseuse. Par contre, contrairement aux NK, la lymphopoïèse B a également besoin d'un microenvironnement spécifique dans la moelle («bursal équivalent»).

Malheureusement, cet environnement est hautement sensible aux radiations et aux traitements de chimiothérapie ainsi qu'à la GvHD et à ses traitements, ce qui explique en partie le délai de réapparition de ces cellules dans le sang [18]. De plus, une reconstitution complète de l'immunité humorale requiert non seulement la régénération des cellules B naïves mais également des cellules B mémoires. Celles-ci ne se régènèrent que suivant une exposition aux pathogènes communs et ont, de plus, besoin de l'aide des cellules T CD4⁺ [49]. Par conséquent, jusqu'à un an post-greffe, tous les receveurs de CSH sont à risque d'infections par des virus et des bactéries encapsulées, pathogènes contre lesquels les anticorps neutralisants sont la première ligne de défense [80]. Généralement, les niveaux d'immunoglobulines G (IgG) sériques ne sont pas une bonne mesure de la régénération des cellules B puisque les plasmocytes sont résistants à la majorité des conditionnements pré-greffe et peuvent produire de grandes quantités d'IgG non-spécifiquement [18]. La seule manière de vérifier une production d'anticorps efficace est donc de stimuler le système humoral du patient par vaccination et de mesurer le taux des différents anticorps spécifiques produits.

Les lymphocytes T sont divisés en deux groupes : les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺. L'expansion homéostatique périphérique (ou HPE – Homeostatic Peripheral Expansion), consiste en une prolifération exagérée des cellules T matures dans les cas de lymphopénie. Dans les cas de greffe, les cellules CD34⁺ contenues dans le greffon régènèrent la population lymphocytaire T mais, dans un premier temps, les cellules T contenues dans le greffon et/ou les lymphocytes T résiduels du receveur peuvent proliférer massivement [49]. La HPE est induite par l'environnement lymphopénique et différents facteurs : niveaux élevés de cytokines homéostatiques telles que l'IL7 ou l'IL15 dus au milieu lymphopénique, présence de cytokines proinflammatoires due aux dommages tissulaires induits par le conditionnement, présence d'antigènes viraux (environnementaux ou thérapeutiquement injectés par vaccination) [18]. La HPE a été rapportée beaucoup plus efficace pour les CD8⁺ que pour les CD4⁺, entraînant un ratio CD4/CD8 inversé chez les patients sur de longues périodes de temps [18, 75, 79-82] et les prédisposant aux infections

opportunistes [83]. De fait, plusieurs études ont montré que la lymphopénie en lymphocytes T CD4⁺ touche surtout les cellules naïves [49] et que les cellules mémoires sont détectables plus rapidement que les naïves et peuvent provenir soit du donneur, soit du receveur, si la greffe a été effectuée à partir d'une moelle sans cellules T [18, 84]. La régénération des CD4⁺ semble également être liée à l'âge puisque les patients qui ont moins de 50 ans ou chez qui une fonction thymique résiduelle demeure régénèrent des lymphocytes T CD4⁺ portant un répertoire diversifié [85], ce qui peut réduire par conséquent leur risque de rechute et d'infections opportunistes. Pourtant, comme pour les lymphocytes B, la régénération des lymphocytes T CD4⁺ peut prendre des mois voire des années à se compléter [80] (Figure 3). De plus, certains défauts fonctionnels sont encore observables même après la reconstitution du système immunitaire, particulièrement au niveau de la production d'immunoglobulines par les B et de la cytotoxicité des T CD8⁺, ce qui pourrait expliquer en partie l'incidence des infections microbiennes observées chez les patients [86-89].

1.2.4 L'importance d'une thymopoïèse efficace

1.2.4.1 La différenciation extra-thymique

Durant plusieurs années, des études dans des modèles murins et en culture *in vitro* montrent l'existence d'une différenciation et maturation extra-thymiques des lymphocytes T. En effet, Rocha *et al.*, montrent qu'un certain sous-type de lymphocytes T présents dans l'épithélium intestinal ne présentent pas le même répertoire V β que les autres lymphocytes T présents dans le thymus [90, 91]. Ceci mène à croire que ces lymphocytes résultent d'une voie de différenciation indépendante du thymus et spécifique à l'intestin [92], permettant potentiellement une ligne de défense efficace contre les superantigènes exogènes retrouvés dans cet organe. D'autres sites de différenciation extra-thymique ont également été décrits principalement dans le foie, mais également dans la moelle osseuse, l'estomac [93], le péritoine [94], l'utérus et les glandes exocrines [95], particulièrement dans des modèles

infectieux [96], malins, autoimmuns ou avec un thymus défectueux ou absent [97]. Les lymphocytes présents dans ces sites diffèrent de ceux observés en périphérie du fait de leur grande réactivité contre les antigènes du Soi et de leur phénotype activé [98-100], ce qui pourrait leur conférer un rôle dans ces pathologies et caractériser un système immunitaire encore immature [101]. Une équipe a, de plus, montré que l'intestin murin possède un sous-type de lymphocytes T particuliers qui se différencient à partir de précurseurs présents dans les cryptopatches, précurseurs dérivant probablement du thymus, ayant quitté l'organe avant les recombinaisons du TCR [102]. Une étude a également suggéré la présence d'une sélection positive des lymphocytes T présents dans des souris euthymiques (dont le thymus a été chirurgicalement enlevé) ou athymiques (qui ne possèdent pas de thymus) et la présence de cercle d'excision du TCR (TRECs) [103].

Chez l'Homme, la présence des enzymes RAG1 et RAG2 a été détectée dans l'épithélium intestinal, favorisant l'hypothèse de l'existence d'un site de différenciation extra-thymique à cet endroit [104]. De plus, des lymphocytes T CD4⁺ capables d'activation et possédant un répertoire varié ont pu être générés à partir de cellules progénitrices CD34⁺ humaines *in vitro* sans aucune influence thymique, dans un milieu contenant des cytokines telles que du Flt3L, de l'IL3, du SCF et de l'IL2 [105]. Plus récemment, une étude a démontré la présence d'une recombinaison du TCR extra-thymique et tissu-spécifique dans la muqueuse du petit intestin chez l'Homme [106]. La même équipe a également montré une corrélation inverse entre la présence de RAG1 dans certains sous-types de lymphocytes T intestinaux intra-épithéliaux et le développement de désordres cœliaques, suggérant un rôle pour ces sous-types cellulaires dans le contrôle de l'inflammation [107].

Néanmoins, même si certaines études démontrent dans des modèles transgéniques que les fibroblastes ou les cellules hématopoïétiques peuvent permettre une sélection positive des thymocytes, plusieurs études ont démontré que cette sélection est obligatoirement dépendante du thymus puisqu'aucun développement lymphocytaire T n'est observé dans des souris athymiques [108, 109]. De plus, une étude a montré que la production des lymphocytes retrouvés dans les sites de différenciation extra-thymique est

en partie dépendante des cellules progénitrices CD34⁺ résidant dans le foie adulte. En effet, le foie est un organe important de l'hématopoïèse mais son rôle s'arrête à la naissance. Toutefois, sous l'effet du stress, d'infections diverses ou de tumorigénèse, les cellules progénitrices encore présentes dans l'organe peuvent s'activer et se différencier en lymphocytes, par conséquent potentiellement auto-réactifs [110].

1.2.4.2 L'importance des sélections positive et négative

La maturation des lymphocytes T se passe dans le thymus, un organe caractérisé par deux régions anatomiquement distinctes : le cortex et la médulla. Les cellules progénitrices des thymocytes – les Early Thymic Progenitors (ETP), sortent de la moelle osseuse par le sang et entrent dans l'organe par les jonctions cortico-médullaires [111] (Figure 4). Sous l'influence du microenvironnement thymique, les ETP se différencient en très grande majorité en lymphocytes T matures simples positifs CD4 ou CD8 exprimant le TCR $\alpha\beta$. Néanmoins, le thymus produit également une minorité de lymphocytes exprimant le TCR $\gamma\delta$ ainsi que des populations plus rares telles que les cellules NKT. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont principalement retrouvés au niveau des muqueuses et ont un rôle important dans l'immunité innée, l'auto-immunité et les réponses allergiques. Ils forment moins de 1 % des lymphocytes T produits par le thymus [112]. Les cellules NKT sont, quant à elles, des cellules qui se développent à partir des mêmes précurseurs que les lymphocytes T CD4⁺ ou T CD8⁺, soit les thymocytes DP. Par contre, contrairement aux lymphocytes T, qui subissent les sélections positive et négative par contact avec les cellules épithéliales thymiques, les cellules NKT sont sélectionnées par des complexes d'antigènes lipidiques présentés par la molécule CD1d, exprimée à la surface des DP [113]. Les lymphocytes T $\alpha\beta$ sont capables, à leur sortie du thymus, de s'activer contre des antigènes extérieurs en restant tolérants aux antigènes du Soi. Les CD4⁺ reconnaissent les antigènes présentés par le CMH de classe II et les CD8⁺ dans le contexte du CMH de classe I [114].

Le microenvironnement thymique se caractérise par des micro-niches distinctes composées d'endothélium, de fibroblastes et de cellules épithéliales corticales (cTEC) ou médullaires (mTEC) [115, 116] qui permettent aux thymocytes à différents stades de maturation de recevoir les signaux appropriés afin de continuer leur développement [117]. Le dysfonctionnement des micro-niches mène au développement de maladies auto-immunes, principalement à cause de la sortie en périphérie de lymphocytes T auto-réactifs. Une étude suggère que le stroma thymique pourrait favoriser la conversion de T auto-réactifs portant un TCR de faible affinité pour les antigènes du Soi en T régulateurs (Tregs), et que lors du dysfonctionnement des micro-niches, les cellules épithéliales ne seraient plus en mesure de favoriser le développement de ces Tregs [116]. De fait, dans de nombreuses maladies auto-immunes, chez l'Homme comme chez la souris, l'architecture thymique, et donc le microenvironnement, sont typiquement endommagés avant l'apparition de la maladie [115, 118-120]. En effet, pendant la différenciation thymique dans le cortex, les cTEC contrôlent la bonne interaction entre le TCR nouvellement produit des thymocytes et le CMH par une sélection positive (sélection d'affinité). Les thymocytes portant un TCR incapable de reconnaître un peptide du Soi couplé aux molécules du CMH (présenté à la surface des cTEC) seront éliminés par apoptose. De même, dans la médulla, les cellules dendritiques et les mTEC sont responsables d'éliminer les thymocytes possédant un TCR interagissant trop fortement avec un peptide du Soi couplé au CMH par une sélection négative (sélection d'avidité) (Figure 4). Plus particulièrement, certaines mTEC bien spécifiques expriment fortement le CMH de classe II et les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 [121-123]. De fait, ces mTECs expriment également le régulateur d'auto-immunité Aire, un facteur de transcription ayant un rôle crucial dans la sélection négative et dans l'induction de la tolérance systémique, puisqu'il induit l'expression d'antigènes du Soi particuliers, retrouvés uniquement dans certains organes [122, 124, 125]. Un dysfonctionnement de Aire, même au niveau d'un seul allèle, mène, par conséquent, à des maladies auto-immunes spécifiques à certains organes chez l'Homme et la souris [124, 126].

La maturation des thymocytes comporte plusieurs phases : le stade double-négatif (DN), pendant lequel aucun des marqueurs CD4 ou CD8 n'est exprimé, le stade double-positif (DP), pendant lequel les deux marqueurs sont exprimés et le stade simple-positif (SP) où l'un des deux marqueurs est exprimé à la surface des thymocytes (Figure 4). Les stades DN et DP sont caractéristiques de thymocytes encore immatures. Le pourcentage de DN, de DP et de SP généralement retrouvés est aux alentours de 3 %, 80 % et 15 % respectivement. On distingue quatre sous-types de DN, suivant leur phénotype : les DN les plus immatures (DN1) sont $CD25^-CD44^+$; les DN2 sont $CD25^+CD44^+$; les DN3 sont $CD25^+CD44^{lo}$ et les DN4 sont $CD25^-CD44^{lo}$. Durant le stade DN, les thymocytes recombinaient d'abord la chaîne α puis β de leur TCR. Si le TCR produit est fonctionnel, les DN3 deviennent DN4 puis DP [127, 128]. C'est pendant la phase DP qu'ont lieu les sélections positive et négative des thymocytes. Les différences d'affinité et d'avidité observées entraînent l'induction de différentes voies de signalisation lors des contacts TCR/CMH. La calcineurine et la voie des MAP kinases sont importantes lors de la sélection positive alors que l'activation de ZAP70 et Lck est importante lors des deux sélections [129]. La force du signal induit par le TCR pourrait déterminer également si un thymocyte va devenir $CD4^+$ ou $CD8^+$; la différenciation en $CD4^+$ sera choisie si la force du signal est forte et en $CD8^+$ si celle-ci est faible [130]. Toutefois, dans les cas de déficience congénitale en lymphocytes T $CD8^+$, la quantité de TREC et le répertoire $V\beta$ sont restreints dans le sous-type DN, indiquant que la sélection positive fonctionne de manière sub-optimale et qu'un nombre limité de cellules matures peut être produit [131].

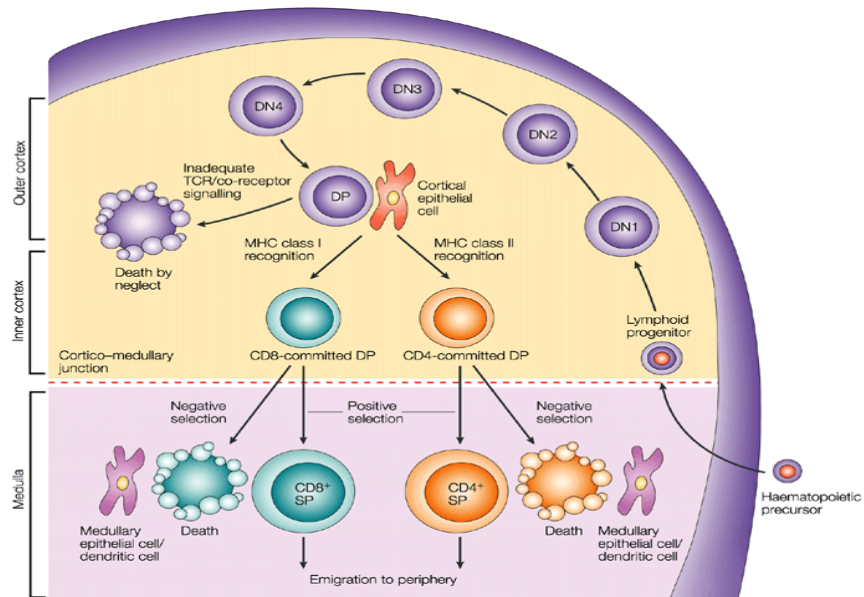


Figure 4. Stades de différenciation lymphocytaire T dans le thymus. DN, double-négatifs; DP, double-positifs; SP, simple-positifs. Adaptée de R.N. Germain. 2002. Nat. Rev. Immunol. 2(5): p. 309-22.

L'IL7 est présente en grande quantité dans le thymus. Par contre, le lien entre la signalisation du TCR et l'IL7 demeure controversé. Une étude a montré que dans certains modèles transgéniques, comme les souris déficientes pour la chaîne α du récepteur à l'interleukine-7 (IL7R α), les lymphocytes T répondaient de manière sous-optimale au TCR [132]. Toutefois, ces souris sont profondément lymphopéniques et leurs lymphocytes affichent un phénotype activé, typique de ce type d'environnement. De fait, une étude a ensuite démontré une activation normale des lymphocytes T CD8⁺ naïfs OT1 transgéniques IL7R α ^{-/-} [133]. Une convergence de signaux induits par l'IL7 et le TCR peut promouvoir la survie [134] et la prolifération homéostatique des lymphocytes T naïfs dans les cas de lymphopénie [135] et une étude a montré que le facteur de transcription pro-apoptotique FOXO3a était commun à la voie de signalisation de l'IL7 et du TCR dans les cellules T CD4⁺ mémoires centrales humaines [136]. De plus, Park *et al.* ont montré que l'IL7 pouvait moduler l'expression du co-récepteur CD8 et par là, directement influencer la

signalisation du TCR [137]. Une étude a également montré que la production d'IL7 par les cellules dendritiques affecte la réponse au CMV des lymphocytes T CD8⁺ *in vitro*. Saini *et al.* [138] ont alors récemment démontré dans un modèle transgénique dans lequel les lymphocytes T expriment l'IL7R α de manière inductible que l'induction ou le blocage de la voie de signalisation de l'IL7 *in vitro* n'affecte pas l'activation cellulaire. Par contre, le blocage *in vivo* de la signalisation de l'IL7, soit par une déficience en IL7R α soit par une déficience en IL7 mène à un défaut dans les réponses prolifératives des lymphocytes T spécifiques au virus de l'influenza ou dans les cas de lymphopénie. En fait, l'étude suggère que l'IL7 agirait au niveau de la capacité des lymphocytes T CD8⁺ à interagir avec les cellules présentatrices d'antigènes. Plus particulièrement, l'IL7 agirait au niveau de l'interaction entre le TCR et le CMH couplé aux peptides du Soi, puisque en absence d'IL7, ces interactions seraient diminuées.

1.3 Les traitements pour accélérer la reconstitution thymique chez l'Homme

Le meilleur moyen d'induire une régénération complète des lymphocytes T est de restaurer une différenciation thymique. Pourtant, l'involution naturelle de l'organe due à l'âge ou induite par le conditionnement pré-greffe retarde grandement la reconstitution lymphocytaire. Il y a deux moyens d'améliorer la reconstitution lymphocytaire T : 1) par une protection efficace de l'épithélium thymique par l'administration de cytokines qui maintiendraient le microenvironnement à l'abri des effets destructeurs du conditionnement et permettrait une régénération plus rapide des fonctions de l'organe; 2) En agissant au niveau de l'expansion homéostatique périphérique (HPE; Homeostatic Peripheral Expansion) des cellules matures résiduelles ainsi qu'au niveau des émigrants thymiques (RTEs; Recent Thymic Emigrants), lymphocytes T tout juste sortis du thymus vers la périphérie, donc ayant subi les sélections positive et négative [49].

1.3.1 L'administration de facteurs de croissance

1.3.1.1 Le facteur de croissance des kératinocytes

Le facteur de croissance des kératinocytes (ou KGF) est un facteur de croissance, membre de la famille des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), qui induit la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales en cellules de divers organes, tels que l'intestin (en cellules épithéliales de l'intestin), la peau (en kératinocytes) et le thymus (en cellules épithéliales thymiques). Le KGF est produit par les cellules mésenchymateuses et a un effet paracrine sur les cellules épithéliales [139]. Par conséquent, le KGF a un effet sur le développement de l'épithélium thymique puisque le microenvironnement de l'organe contient des cTEC et des mTEC ainsi que des cellules mésenchymateuses, parmi lesquelles des fibroblastes [140]. Le KGF contribue donc également à la maturation et à la prolifération des thymocytes, particulièrement dans le cortex [117, 141]. De plus, les thymocytes $\text{TCR}\alpha\beta^+$ présents dans le thymus peuvent produire le KGF, ce qui, à son tour, mène à la prolifération des mTEC. Les lymphocytes $\gamma\delta^-$ activés, présents dans l'épithélium cutané et intestinal, sécrètent également le KGF, à la différence des DN et des lymphocytes T de la périphérie [142]. Le KGF sert à la réparation tissulaire et est surexprimé dans les cas de dommages tissulaires, tels que des blessures cutanées ou chirurgicales. De fait, une étude clinique a montré que le KGF a un effet protecteur dans les cas de mucosites orales (ulcères de la bouche) induites par des chimiothérapies intensives [143].

Dans des modèles animaux, le KGF protège contre les dommages épithéliaux induits par des traitements de chimio- ou radiothérapies, particulièrement au niveau de l'intestin, du poumon, de la vessie et des follicules capillaires [144]. Plusieurs études dans des modèles murins ont également montré que 1) dans les cas de greffe de moelle osseuse allogénique, l'effet GvL est préservé malgré une atténuation de la GvHD chez les receveurs traités au KGF [139, 145]; 2) en absence de KGF, la régénération thymique et la reconstitution périphérique des lymphocytes T sont inefficaces après une greffe de moelle osseuse; 3) une administration *ex vivo* de KGF après la greffe augmente significativement

la fonction thymique et la récupération lymphocytaire T; 4) une administration de KGF avant la greffe augmente la thymopoïèse et les nombres de T périphériques retrouvés après la greffe [139] tout en diminuant significativement les dommages à l'épithélium thymique, favorisant de ce fait la régénération des lymphocytes T [146, 147].

1.3.1.2 L'hormone de croissance et l'Insulin-like Growth Factor 1

L'hormone de croissance (GH) a un rôle important dans la thymopoïèse des mammifères. La GH induit son effet indirectement, en stimulant la production du facteur de croissance ressemblant à l'insuline (IGF-1) mais agit également directement [144]. On retrouve les récepteurs de la GH et de l'IGF-1 à la surface de toutes les cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse ainsi que sur les lymphocytes B et T en périphérie. Dans des modèles animaux, lorsqu'administrée en combinaison avec l'IGF-1, la GH peut renverser l'involution thymique liée à l'âge [148]. De même, au niveau de la reconstitution immune, particulièrement après une greffe allogénique de CSH, la GH agit au niveau de la production et de la prolifération périphérique des cellules B et T [149] en stimulant la production de cellules progénitrices thymiques et de cellules myéloïdes. Elle fait également proliférer les cellules B et T de la périphérie sans exacerber la GvHD [144, 150]. Dans des cas de patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), l'administration de GH reconstitue le tissu thymique et favorise la fonction thymique en augmentant la fréquence des cercles d'excision du TCR (TREC) dans les T circulants. L'administration de GH peut induire une augmentation du nombre de T CD4⁺ naïfs et totaux [148] ainsi qu'un regain de l'immunité humorale [151].

1.3.1.3 La lymphopoïétine stromale thymique

La lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) est une cytokine produite par les cellules épithéliales et stromales, les fibroblastes, les kératinocytes et les basophiles. Elle

est exprimée au niveau des cellules de nombreux tissus tels que la peau, l'intestin, les poumons, le cerveau, le foie et le thymus [152]. Elle n'est pas produite par les cellules endothéliales ou hématopoïétiques. Son récepteur, TSLPR, est un hétérodimère composé de deux chaînes. L'une est la chaîne α du récepteur à l'IL7 (CD127; IL7R α) et l'autre est une chaîne spécifique à la TSLP, semblable à la chaîne commune γ_c , exprimée par de nombreuses cytokines (Figure 5). La TSLP a été étudiée pour son rôle majeur dans la polarisation des cellules dendritiques et dans l'induction d'une production de cytokines Th2 dans le cadre de réponses inflammatoires et allergiques [153, 154]. La TSLP agit au niveau des lymphocytes T et B et contribue à la lymphopoïèse et à l'homéostasie de ces cellules en favorisant leur prolifération et leur survie [152, 155, 156]. Dans des modèles murins, la TSLP est nécessaire à l'ontogénie des lymphocytes B, par contre elle n'est pas requise chez l'Homme [157]. De même, la TSLP joue un rôle important dans la prolifération et la survie des thymocytes CD4 simple-positifs et des lymphocytes T périphériques CD4⁺, puisque l'injection de TSLP dans des modèles murins KO pour la γ_c induit une expansion préférentielle de ces cellules. De plus, la TSLP murine agit préférentiellement sur les lymphocytes CD4⁺ naïfs par rapport aux mémoires [152, 158]. Chez l'Homme, la TSLP exerce son rôle indirectement sur les lymphocytes T, puisqu'elle agit au niveau des cellules dendritiques qui, à leur tour vont activer les lymphocytes [159]. L'expression de son récepteur n'est donc presque pas retrouvée au niveau du sang périphérique. Par contre, la production de TSLP augmente pendant l'activation, elle est exprimée sur les CD4⁺ activés et augmente leur sensibilité à l'interleukine-2 (IL2) [158]. La TSLP agit également au niveau des lymphocytes T CD8⁺ en favorisant leur survie par l'induction du même facteur anti-apoptotique que l'IL7, Bcl-2 [155].

1.3.2 Les cytokines γ c

1.3.2.1 Présentation des cytokines γ c

Les cytokines sont des hormones du système immunitaire qui ont des rôles importants reliés à la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires. Les cytokines de type I incluent de nombreuses interleukines, des facteurs de croissance et des facteurs hématopoïétiques. Une des grandes familles des cytokines de type I est la famille des cytokines γ c, qui regroupe les interleukines 2 (IL2); 4 (IL4); 7 (IL7); 9 (IL9); 15 (IL15) et 21 (IL21) (Figure 5). Il existe également des cytokines de type II, qui diffèrent des cytokines de type I par leur structure tridimensionnelle [160].

Les immunodéficiences combinées sévères (SCID) sont des maladies rares, caractérisées par un arrêt du développement lymphocytaire T [161]. Plusieurs facteurs peuvent causer un SCID, entre autres : 1) un déficit en adénosine désaminase; 2) les mutations dans les enzymes de recombinaison du TCR, soit RAG1 ou RAG2, ou dans les mécanismes de réparation de l'ADN au cours du réarrangement du TCR tel qu'ARTÉMIS; 3) les mutations dans la voie de signalisation du TCR, que ce soit au niveau des chaînes du CD3 [162, 163] ou dans la protéine ZAP70 [164] et 4) les mutations qui impliquent un défaut dans la voie de signalisation de l'IL7, ou les mutations de la chaîne γ c, qui mènent à une absence de toutes les cytokines γ c. En effet, ces dernières sont ainsi nommées parce que leurs récepteurs partagent une chaîne commune, la chaîne γ c [160, 165]. De fait, cette chaîne a d'abord été découverte comme un composant du récepteur de l'IL2 [166] (Figure 5), lorsque l'observation qu'une mutation dans le gène codant pour la chaîne γ c dans l'immunodéficiences combinées sévères reliée au chromosome X (X-SCID; X-linked Severe Combined Immunodeficiency) induisait une absence de lymphocytes T et de cellules NK chez les patients, a démontré le rôle crucial de la chaîne γ c dans l'ontogénie de ces cellules. Pourtant la découverte que les patients possédant un défaut d'IL2 affichent une ontogénie

des T et des NK intacte a mené à l'hypothèse puis à la confirmation que la chaîne γ c est partagée par plusieurs cytokines [160, 167].

L'IL2 fonctionne comme un facteur de croissance pour les T, mais d'autres rôles lui ont également été décrits : elle augmenterait la fonction cytolytique des cellules NK, et influencerait la sécrétion d'immunoglobulines par les B [168]. De plus, elle aurait un rôle immunorégulateur en permettant le développement des Tregs, assurant de ce fait la tolérance périphérique [169]. Elle agit également au niveau des T activés en régulant leur expansion et leur apoptose [170].

L'IL4 a un rôle important dans le développement des cellules T helper 2 (Th2) et un rôle majeur dans l'allergie ainsi que dans la commutation de classe des immunoglobulines [165].

L'IL7 est un facteur de survie majeur et joue un rôle crucial dans l'ontogénie des lymphocytes T chez la souris comme chez l'Homme [171, 172]. En fait, c'est le dommage au niveau de sa voie de signalisation qui est responsable de l'absence des lymphocytes T observée lors du X-SCID [167]. Chez la souris, l'IL7 est également cruciale pour le développement des lymphocytes B, ce qui ne serait pas le cas chez l'Homme, puisque les patients souffrant du X-SCID affichent une ontogénie des cellules B normale [160]. Toutefois, en culture *in vitro*, l'IL7 peut induire la différenciation de CSH provenant de la moelle osseuse d'un adulte en cellules B; elle n'est pas capable d'induire cette différenciation à partir de CSH provenant de sang de cordon [173].

L'IL9 est un facteur d'activation des éosinophiles, des mastocytes, des cellules épithéliales et des cellules B [174]. Elle a un rôle potentiellement activateur dans des désordres d'inflammation chronique tels que l'asthme mais semble avoir un rôle protecteur dans les infections parasitaires comme les nématodes [175, 176]. Son rôle au niveau des lymphocytes T n'est pas très clair, quoique des études montrent, dans des modèles murins, que dans certaines conditions d'inflammation chronique, l'IL4 et le TGF- β favorisent la sécrétion d'IL9 et d'IL10 par les lymphocytes T CD4⁺ naïfs, induisant un nouveau

phénotype Th9. alors que l'IFN- γ réprime cette sécrétion [177-180]. Le rôle exact des Th9 dans l'inflammation n'est pas encore élucidé.

L'IL15 est essentielle à l'ontogénie des cellules NK et c'est le défaut dans sa voie de signalisation qui mène à l'absence des NK observée dans le X-SCID [160]. La cytokine joue également un rôle important dans l'homéostasie des lymphocytes T CD8⁺ mémoires [172]. De plus, l'IL15 peut induire la trans-présentation, ou le mécanisme qui fait que les cellules exprimant la chaîne α du récepteur à l'IL15 (qui se lie à la cytokine avec une haute affinité) puissent induire la réponse à l'IL15 dans les cellules exprimant les chaînes β et γ de l'IL15R [181, 182]. Le mécanisme de la trans-présentation a longtemps été considéré unique à l'IL15, toutefois des travaux récents sur l'IL2 ont dévoilé que les cellules dendritiques pouvaient trans-présenter le CD25 aux lymphocytes T activés afin de favoriser leur réponse à l'IL2 et promouvoir leur expansion et le développement des cellules effectrices [183]. De même, des études ont montré que l'IL6 possède un mécanisme de signalisation analogue par liaison à un récepteur membranaire ou soluble, cependant [184, 185].

Enfin, l'IL21 est une cytokine nouvellement décrite comme faisant partie des cytokines γ [186]. Son champ d'action est large; entre autres, elle promeut la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, régule, conjointement avec l'IL7 et l'IL15, l'homéostasie des CD8⁺ [187] et agit comme facteur pro-apoptotique au niveau des NK et des cellules B n'ayant pas produit un récepteur (BCR; B-cell Receptor) fonctionnel [186]. L'IL21 est également un médiateur important de l'auto-immunité dans les modèles animaux, particulièrement dans le diabète de type I [188] et le lupus érythémateux [189]. Son rôle anti-tumoral serait également important [186]. Au niveau de la GVHD, plusieurs études ont démontré dans des modèles transgéniques d'allogreffe qu'une absence d'IL21 sur les cellules transplantées diminuait les effets néfastes de la GvHD particulièrement au niveau intestinal, en n'affectant pas les effets GvL observés en périphérie [190-193].

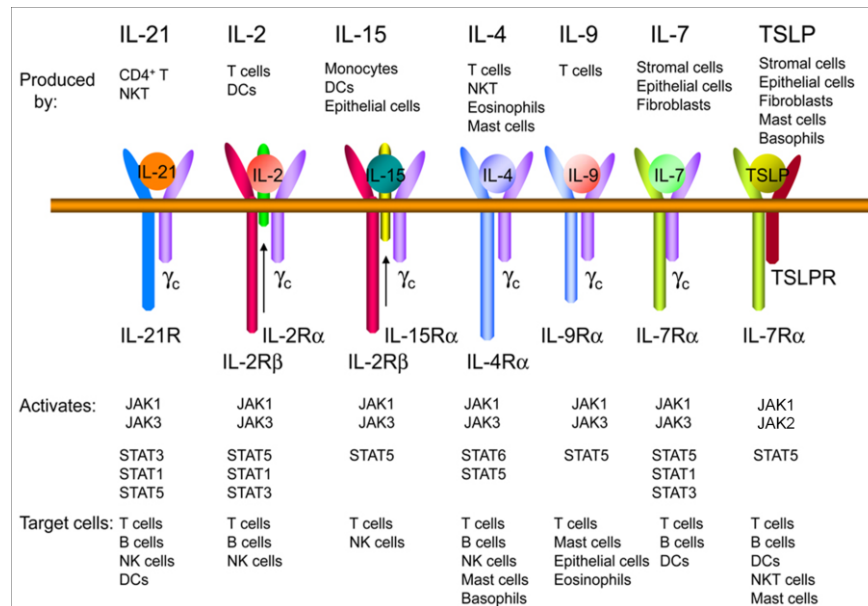


Figure 5. Les récepteurs des cytokines γ c et de la TSLP. L'IL2 et l'IL15 sont les seules cytokines à posséder un récepteur à trois chaînes. Elles partagent la chaîne β du récepteur de l'IL2 (IL2R β) alors que l'IL7 et la TSLP partagent la chaîne α du récepteur de l'IL7 (IL7R α). Toutes les cytokines γ c signalent à travers les kinases JAK1 et JAK3; la TSLP signale à travers JAK1 et JAK2. Les principales protéines STAT phosphorylées sont montrées par ordre d'importance. STAT5 regroupe STAT5a et STAT5b. Adaptée de Y. Rochman *et al.* 2009. Nat Rev Immunol. 9(7): p. 480-90.

1.3.2.2 Les cytokines IL2; IL15; IL21 et IL7 comme agents immunothérapeutiques

Dû au rôle fondamental des cytokines γ c dans la régulation de l'activité cellulaire des cellules immunitaires, quelques études cliniques ont évalué le potentiel immunothérapeutique de l'IL2, de l'IL15, de l'IL21 et de l'IL7.

L'IL2 a fait l'objet de plusieurs études cliniques visant à évaluer sa capacité à promouvoir la régénération des lymphocytes dans les cas de patients infectés au VIH [194-197]. Les études ont montré que l'administration intermittente d'IL2 menait à une expansion significative des CD4⁺ naïves, parfois à des niveaux au dessus de la normale, avec des effets marqués au niveau de la survie cellulaire. De plus, la thérapie est la plus

efficace si le nombre de CD4⁺ est inférieur à 200 cellules/mm³ [198]. Toutefois, les CD8⁺, tout comme les NK, ne bénéficient pas de cet effet. Pourtant, l'IL2 n'agit pas au niveau de la fonction thymique, puisque la quantification des TRECs et la mesure du volume thymique avant et pendant la thérapie ne montrent pas de grandes variations. Kovacs *et al.* [197] démontrent que l'IL2 induit un effet prolifératif au niveau des CD4⁺ périphériques pendant les phases de thérapie et qu'à l'arrêt de la thérapie, la cytokine induit un effet anti-apoptotique majeur au niveau de ces cellules, leur permettant de demeurer en périphérie pendant des années. La thérapie à l'IL2 induit également une augmentation significative des Tregs dans les cas de lymphopénie [199]. L'effet anti-tumoral de la cytokine a également été évalué en clinique avec des effets prometteurs chez des patients présentant des mélanomes et des carcinomes du rein [165]. De plus, une étude a évalué le potentiel anti-tumoral de l'IL2 comme agent de thérapie cellulaire [200] avec des résultats indiquant que l'insertion du gène de l'IL2 dans des lymphocytes T anti-tumoraux promeut la survie de ces cellules après le retrait de l'IL2 exogène, mais les résultats sont non significatifs au niveau de l'efficacité anti-tumorale. Une autre étude a évalué l'effet anti-tumoral de l'IL2 recombinante humaine artificiellement couplée au polyéthylène glycol [201] avec des résultats prometteurs dans un modèle murin.

L'IL15, cytokine très proche de l'IL2 du fait que leurs récepteurs ont deux chaînes en commun, montre des résultats prometteurs dans des études pré-cliniques *in vitro* du fait de son potentiel anti-tumoral, particulièrement lorsqu'elle est en association avec l'IL15R α , en combinaison avec la chimiothérapie ou des vaccins anti-tumoraux. En effet, l'IL15 peut activer les lymphocytes T CD8⁺ et les NK et promouvoir la formation d'anticorps anti-tumoraux. La cytokine a également un rôle protecteur au niveau des T activés contre l'action des Tregs et peut renverser une tolérance induite contre des antigènes tumoraux en périphérie [202].

De même que l'IL15 ou l'IL2, l'IL21 possède un potentiel anti-tumoral important et de nombreuses études de phase I ou II ont montré sa capacité à induire directement l'apoptose et la régression tumorales dans les cas de mélanomes métastatiques et de

carcinomes du rein ainsi que de permettre une activation immunitaire anti-tumorale [203-206]. De plus, lorsqu'utilisée en combinaison avec des anticorps anti-tumoraux monoclonaux, l'IL21 favorise la production de CD8⁺ réactifs contre la tumeur et induit la production d'interféron- γ (IFN- γ) dans des modèles murins portant des tumeurs à un stade avancé [207]. A l'opposé, des études dans des modèles murins ont montré que l'inhibition des effets de l'IL21 mène à des résolutions de maladies auto-immunes telles que le diabète de type I ou le lupus érythémateux [165].

Contrairement à l'IL2, une cytokine immuno-activatrice, qui est produite par les cellules T activées et agit sur ces dernières en induisant une surexpression de son récepteur, l'IL7 est une cytokine homéostatique qui serait régulée au niveau transcriptionnel par une boucle de régulation négative au niveau du stroma [208]. Elle est constitutivement produite par les cellules stromales et les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) [209]. Son récepteur est exprimé sur les cellules quiescentes puis rapidement internalisé suite à l'activation des lymphocytes T ou par l'IL7 elle-même [208, 210]. Sa voie de signalisation active les kinases JAK1 et JAK3 puis mène à la phosphorylation de STAT5 (Figure 5). Dans les cas de lymphopénie, les niveaux de la cytokine augmentent drastiquement dans le sang et dans les tissus [211]. Plusieurs études pré-cliniques dans des modèles murins et primates démontrent l'efficacité de l'IL7 à induire une certaine reconstitution lymphocytaire [212-214], promouvoir des réponses anti-tumorales et, de fait, permettre la survie des animaux lorsque combinée à des vaccins anti-tumoraux. De même, l'IL7 augmente les réponses effectrices et mémoires suite à la vaccination dans des modèles murins [215]. Les niveaux élevés d'IL7 dans les cas de lymphopénie permettent la prolifération des cellules T possédant un TCR de faible affinité antigénique, ce qui permet l'induction de l'expansion homéostatique périphérique (HPE) [216]. Plusieurs études démontrent l'importance de la HPE dans l'effet régénératif de l'IL7 et un rôle de la cytokine dans la reconstitution thymique a été montré [209, 213, 214, 217]. Par contre, cette même HPE prédispose le patient à des maladies auto-immunes en faisant proliférer en grand nombre des T possédant potentiellement une affinité pour des antigènes du Soi.

Contrairement au récepteur de l'IL2, les Tregs n'expriment qu'un faible niveau du récepteur de l'IL7 et une étude clinique a montré que l'IL7 induit l'expansion des CD4⁺ périphériques sans induire une expansion des Tregs [218]. Deux études de phase I ont ensuite évalué le rôle de la thérapie à l'IL7 dans la régénération des lymphocytes T dans le cas de patients atteints du VIH et démontrent l'efficacité de l'IL7 à induire une expansion des cellules T naïves et matures lorsque mise en combinaison avec la thérapie anti-virale [219, 220]. De plus, deux études majeures ont évalué le potentiel anti-tumoral et régénérateur de l'IL7 dans les cas de patients atteints de cancers métastatiques [209, 221] et démontrent que l'IL7 induit une diversification du répertoire en agissant plus particulièrement sur les T naïfs de la périphérie. Finalement, l'impact de la thérapie à l'IL7 a été évalué dans un modèle pré-clinique de greffe de CSH. De fait, l'effet de l'IL7 sur le développement de la GvHD n'est pas clair; une étude démontre que l'IL7 induit une reconstitution immune sans aggraver la GvHD [222], alors qu'une autre semble indiquer que l'IL7 pourrait l'aggraver [223]. De plus, deux études ont montré que les niveaux d'IL7 dans le sang des patients constituent un biomarqueur du développement d'une GvHD aiguë [223, 224].

1.4 La souris comme modèle d'étude

1.4.1 L'IL7 humaine comme thérapie dans des modèles murins

Plusieurs études ont évalué les effets régénératifs de l'administration *ex vivo* d'une IL7 recombinante humaine (rhIL7) sur des modèles murins tumoraux [225], inflammatoires (choc septique) [226] et de greffe de moelle osseuse [227, 228].

Lorsqu'administrée à des souris sauvages (WT), la rhIL7 induit une expansion de la taille de la rate et des ganglions lymphatiques de trois à cinq fois la normale. Les comptes cellulaires des B, T, NK et macrophages sont également significativement augmentés. Par contre, la rhIL7 induit une expansion démesurée des lymphocytes T CD8⁺ ce qui mène à un

ratio CD4/CD8 inversé. Par contre, les lymphocytes dérivant de l'administration de la rhIL7 restent fonctionnels. Les effets de l'administration de la rhIL7 sont dose-dépendants et transitoires et les comptes lymphocytaires retournent à la normale après l'arrêt du traitement [225].

Lorsqu'administrée à des souris porteuses de métastases pulmonaires dérivant d'un carcinome, la rhIL7 induit également une expansion majeure des lymphocytes B et T ainsi qu'une réduction de la taille des métastases [225, 229].

Comme l'IL7 est un facteur anti-apoptotique puissant, l'administration de rhIL7 dans un modèle murin de choc septique dérivé d'une péritonite induit une survie prolongée de l'hôte, une diminution de l'apoptose des T CD4⁺ et CD8⁺ par l'induction de l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2, une réinduction de la production de l'IFN- γ et permet un meilleur recrutement des cellules effectrices au site d'infection. La rhIL7 induit également une surexpression du co-récepteur CD8 à la surface des lymphocytes T CD8⁺ [226].

Dans des modèles de lymphopénie comme dans les cas de greffe de moelle osseuse, la rhIL7 pourrait avoir un effet thymopoïétique et des études ont montré que la cytokine semble, de fait, induire une augmentation du nombre de DN dans le thymus [227, 228]. Deux études ont évalué l'impact d'une administration exogène d'IL7 sur la régénération lymphocytaire [230, 231]. L'une a montré que la cytokine induit l'expansion des émigrants thymiques présents en périphérie sans impact sur la fonction thymique [231], l'autre montre que dans les cas de greffe de moelle osseuse dont les lymphocytes T ont été retirés, l'IL7 induit l'expansion des émigrants thymiques alors que dans les cas de greffe de moelle osseuse qui contient des lymphocytes T, l'IL7 induit préférentiellement l'expansion des lymphocytes T matures [230].

1.4.2 Les émigrants thymiques humains et les émigrants thymiques murins

Les émigrants thymiques (RTEs) sont des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ matures exprimant un récepteur de cellules T (TCR) $\alpha\beta$ fonctionnel, venant de quitter le thymus.

Après une maturation supplémentaire dans les organes lymphoïdes secondaires, ils deviennent des cellules naïves qui circulent continuellement dans le sang et en périphérie [232]. La quantification du nombre de RTEs produits chaque jour par le thymus donne donc une approximation de la fonction thymique et de la contribution de l'organe au «pool» de cellules T périphériques. Il est donc particulièrement important de mesurer cette fonction thymique dans des conditions qui influencent la régénération lymphocytaire T telles que le VIH, les conditionnements pré-greffe ou la période post-greffe [233].

Un des moyens disponibles pour quantifier la fonction thymique (i.e. le nombre de RTEs produits) est la mesure des cercles d'excision du TCR $\alpha\beta$ (TRECs) dans les cellules T de la périphérie. Les TRECs sont des fragments d'ADN excisés durant le réarrangement du gène de la chaîne α du TCR et maintenus dans les cellules sous forme épisomale. Deux sortes de TRECs sont produits suite à la délétion du locus δ du locus α , les signal-joints TRECs (sjTRECs) en premier puis les coding-joints TRECs (cjTRECs) [234]. Il ne peut y avoir au maximum que deux sjTRECs et deux cjTRECs dans une cellule si le réarrangement a eu lieu sur les deux allèles. Les TRECs sont stables et ne sont pas répliqués durant la mitose, ce qui mène à leur dilution progressive puisqu'ils ne sont transmis qu'à une seule cellule-fille.

De fait, les RTEs ont un niveau de TRECs détectable supérieur à celui des cellules naïves et celles-ci ont, de même, un niveau supérieur de TRECs à celui des cellules mémoires [235, 236]. Il y a plusieurs moyens de mesurer les TRECs : par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en temps réel (RT-PCR), par PCR quantitative (q-PCR) et par PCR-ELISA. La sensibilité des techniques de détection voisine les 70 % ce qui fait de la quantification des TRECs en périphérie une bonne approximation de la fonction thymique chez l'Homme. Par contre, comme la fonction thymique diminue due à l'involution thymique liée à l'âge, la concentration de TRECs détectés en périphérie va également diminuer ce qui amène un biais non négligeable dans l'interprétation des résultats [233, 237, 238].

Du fait de leur ressemblance avec les cellules naïves, peu de marqueurs spécifiques aux RTEs ont été identifiés à ce jour. Deux études ont toutefois décrit deux marqueurs spécifiques aux RTEs CD4⁺, le marqueur CD31 [239] et la protéine tyrosine kinase 7 (PTK-7) [240].

Plusieurs techniques sont utilisées afin d'identifier les RTEs murins, parmi lesquelles le marquage intrathymique à la fluoresceine isothiocyanate (FITC) et l'incorporation intracellulaire de bromodeoxyuridine (BrdU) (un analogue de la thymidine). Ces techniques peuvent également être combinées à des marquages extracellulaires et à la greffe congénique de lobes thymiques. La mesure des TRECs peut aussi être appliquée aux modèles murins. De plus, un modèle transgénique, développé il y a quelques années, permet l'identification des RTEs en périphérie suivant l'expression extracellulaire de la protéine fluorescente verte (GFP).

Le marquage intra-thymique au FITC permet une identification efficace des cellules quittant le thymus et permet de déterminer avec précision le temps requis aux RTEs pour se rendre en périphérie. De fait, les études ont permis de démontrer que les RTEs CD4⁺ et CD8⁺ sont matures et fonctionnels dans les vingt-quatre heures après leur sortie du thymus, ce qui suggère qu'à leur sortie immédiate, les RTEs ressemblent phénotypiquement aux thymocytes simple positifs encore présents dans le thymus [241]. Cette technique a également permis d'identifier l'expression de l'intégrine α_E comme marqueur des RTEs CD8⁺. Par contre, le FITC se dilue rapidement, ce qui empêche l'étude phénotypique à long terme des RTEs. De plus, la technique engendre un stress chirurgical non négligeable aux animaux, souvent le jour même de l'analyse [242]. Lorsque combiné au marquage intra-thymique au FITC, le marquage extracellulaire permet une caractérisation plus fine du phénotype des RTEs comparé à celui des thymocytes [243]. Ainsi, les RTEs expriment la L-sélectine CD62 (CD62L) et n'expriment pas le marqueur d'activation CD69, à l'opposé des thymocytes et comme les cellules périphériques matures. De plus, les RTEs CD4⁺ et CD8⁺ diffèrent l'un de l'autre suivant différents marqueurs. En effet, les RTEs CD4⁺

n'expriment pas, ou à faible degré, l'intégrine $\beta 7$ et ont une expression intermédiaire de CD45RB. Par contre, les RTEs CD8⁺ expriment fortement les deux marqueurs.

L'incorporation intracellulaire de BrdU identifie les RTEs comme les cellules n'exprimant pas fortement ce marqueur (BrdU^{lo}), ce qui suggère que les RTEs incorporent, dans leur acide désoxyribonucléique (ADN) nouvellement synthétisé, le BrdU et la thymidine de thymocytes mourants. La technique présente l'avantage de permettre l'étude des RTEs dans des modèles non-manipulés mais induit un problème d'identification de la population BrdU^{lo} dans la périphérie, où elle est contaminée par la population BrdU^{hi}, correspondant aux cellules T périphériques venant de se diviser [244]. De même, la greffe de lobes thymiques congéniques combinée au marquage intra-thymique au FITC ne permet pas l'étude à long terme des cellules en périphérie pour les mêmes raisons [245].

La mesure du nombre de sjTRECs et cjTRECs dans les cellules T périphériques murines est également possible, mais est biaisée par le fait que les cellules naïves peuvent toujours porter les fragments d'ADN correspondants au TRECs. De plus, comme les TRECs ne sont pas transcrits, la moitié des RTEs ne sont plus détectables à chaque division cellulaire [246].

Le dernier moyen d'identification des RTEs en périphérie a été développé il y a quelques années par l'équipe de Fink *et al.* [247]. Le modèle est une souris transgénique qui exprime la GFP sous le promoteur de l'enzyme RAG2 (RAG2). Par conséquent, dans ce modèle, la GFP est exprimée à chaque fois que le TCR est recombiné (au stade DN3 dans le thymus). La protéine reste détectable dans les cellules DP, mais également dans les simple-positifs et dans certaines cellules de la périphérie. Ces cellules GFP⁺ ont donc quitté le thymus peu de temps avant et peuvent être considérées comme des RTEs (Figure 6).

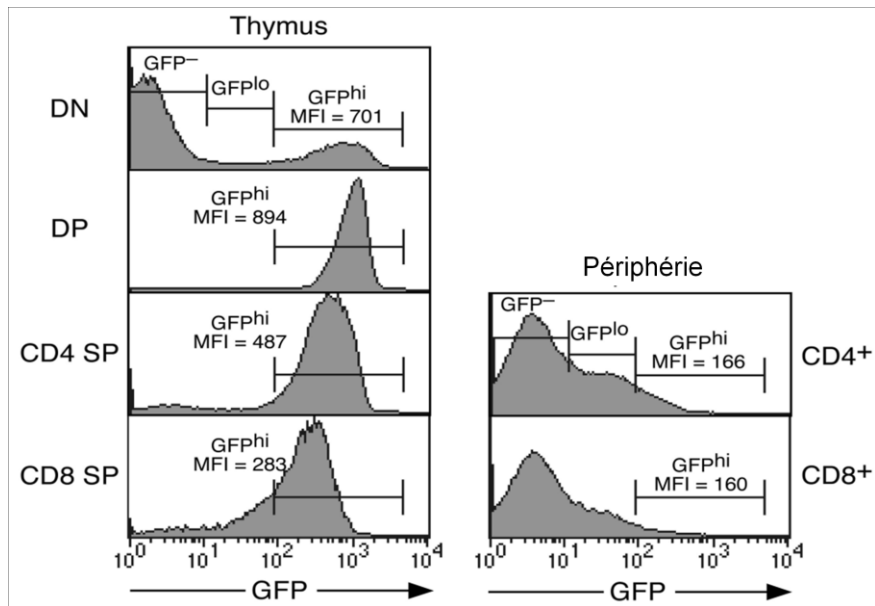


Figure 6. Expression de la GFP dans le thymus et en périphérie (rate, ganglions lymphatiques) d'une souris RAG2p-GFP. DN, double-négatifs; DP, double-positifs; SP, simple-positifs; MFI, intensité de fluorescence moyenne (mean fluorescence intensity). Adaptée de T. Boursalian *et al.* 2004. *Nat Immunol.* 5(4): p. 418-25.

1.5 Justification du projet

L'interleukine-7 (IL7) est une cytokine cruciale dans l'homéostasie des lymphocytes B et T. Pourtant, lorsque ses niveaux sériques augmentent, comme dans les cas de lymphopénie, les lymphocytes T CD8⁺ et les lymphocytes T CD4⁺ ne réagissent pas de la même manière face à la cytokine. En effet, l'IL7 induit une expansion homéostatique périphérique (HPE) efficace des CD8⁺, qui prolifèrent et retournent à leurs niveaux basaux, alors que la majorité des lymphocytes T CD4⁺, exception faite des lymphocytes T CD4⁺ possédant une haute affinité pour le CMHII, ne prolifèrent que très peu, ce qui prédispose les patients aux infections opportunistes et aux rechutes. Dans les cas de lymphopénie, la HPE des lymphocytes T est induite par plusieurs facteurs et principalement par les niveaux d'IL7 sériques élevés. Toutefois, dans un organisme non-lymphopénique, une administration supra-physiologique exogène d'IL7 peut mimer les conditions retrouvées en lymphopénie et de ce fait induire une prolifération des lymphocytes T non observable normalement. De fait, cette prolifération étant dépendante des niveaux élevés d'IL7 induits, le terme «expansion homéostatique» peut donc s'appliquer pour caractériser cette prolifération.

Plusieurs études cliniques ont évalué le potentiel de l'administration exogène d'IL7 à permettre une régénération des lymphocytes T. De fait, la cytokine augmente les nombres absolus de globules blancs et pourrait avoir un effet au niveau de la thymopoïèse, particulièrement au niveau des émigrants thymiques CD4⁺ (CD4⁺_{RTES}), puisque son administration permet une diversité de répertoire, malgré une prolifération faible des cellules naïves. Pourtant, les preuves fonctionnelles que la thérapie à l'IL7 favorise les CD4⁺_{RTES} demeurent très faibles.

1.6 Hypothèse et objectifs

1.6.1 *Hypothèse de recherche*

Nous postulons que dans un environnement non-lymphopénique, la thérapie à l'interleukine-7 (IL7) favorise la prolifération homéostatique des émigrants thymiques $CD4^+$ ($CD4^+_{RTEs}$) par rapport à leurs homologues matures de la périphérie ($CD4^+_{PERI}$).

Nous proposons que le mécanisme responsable soit une plus grande sensibilité à l'IL7 des $CD4^+_{RTEs}$ par rapport aux $CD4^+_{PERI}$. Cette sensibilité serait induite à la fois par les niveaux plus élevés d'IL7 dans le thymus et par le plus grand nombre de contacts TCR/CMHII disponibles dans la médulla thymique par rapport à la périphérie.

1.6.2 *Objectifs*

L'objectif général du projet est d'étudier le mécanisme par lequel l'interleukine-7 induit l'expansion homéostatique des lymphocytes T $CD4^+$.

Les objectifs spécifiques du projet sont :

- 1) D'évaluer, *in vivo*, l'effet de la thérapie à l'IL7 sur la prolifération des $CD4^+_{RTEs}$ par rapport aux $CD4^+_{PERI}$ dans des hôtes sauvages (WT), déficients en molécules de CMHII ($CMHII^{-/-}$) ou dans des hôtes dans lesquels l'accès au contact TCR/CMHII a été artificiellement augmenté.
- 2) D'évaluer, *in vivo*, la sensibilité à l'IL7 des $CD4^+_{RTEs}$ par rapport aux $CD4^+_{PERI}$ dans des hôtes WT.
- 3) D'évaluer, *in vitro*, la sensibilité à l'IL7 et la survie des $CD4^+_{RTEs}$ par rapport aux $CD4^+_{PERI}$.

Chapitre 2

**ARTICLE SCIENTIFIQUE : Le nombre de contacts
TCR/CMHII reçus dans le thymus contrôle la sensibilité
à l'interleukine-7 (IL7) des émigrants thymiques CD4⁺
dans un modèle murin sauvage**

2.1 **Contribution des auteurs**

J'ai effectué la majorité des expériences, analysé les résultats et rédigé le manuscrit.

Dominique Leboeuf a effectué les expériences de stimulation à l'IL7 *in vitro*.

Ryan Murphy, Simon-David Gauthier et Stéphanie Thiant ont contribué à certaines expériences et participé à la relecture du manuscrit.

Dre. Crystal Mackall a participé à la relecture du manuscrit.

Dr. Martin Guimond a élaboré l'hypothèse du projet, supervisé les travaux de recherche, participé à l'analyse des résultats et rédigé le manuscrit.

2.2 Résumé français

L'interleukine-7 (IL7) est actuellement utilisée en clinique afin d'augmenter les comptes lymphocytaires T chez des patients lymphopéniques. Toutefois, la raison de l'expansion préférentielle des lymphocytes T $CD8^+$ par l'IL7 demeure toujours inconnue de nos jours. Nous montrons dans cette étude que l'expansion préférentielle des T $CD8^+$ est due au fait que l'IL7 induit une prolifération efficace des T $CD8^+$ périphériques ($CD8^+_{PERI}$) ainsi que des $CD8^+_{RTEs}$. Par contre, l'effet prolifératif de l'IL7 est restreint presque'uniquelement aux $CD4^+_{RTEs}$ même si les $CD4^+_{PERI}$ survivent mieux en périphérie que les $CD4^+_{RTEs}$. Étonnamment, de plus faibles doses d'IL7 sont nécessaires aux $CD4^+_{RTEs}$ afin de phosphoryler STAT5 ou de proliférer comparativement aux $CD4^+_{PERI}$. De fait, nous démontrons que les contacts TCR/CMHII sont nécessaires à la prolifération induite par l'IL7 des $CD4^+_{RTEs}$ en périphérie. De plus, augmenter au Flt3 ligand le nombre de cellules dendritiques périphériques d'une souris donneuse, avant de transférer ses T_{PERI} dans des souris receveuses traitées à l'IL7 induit une prolifération significative des $CD4^+_{PERI}$. Jusqu'à maintenant, nos résultats indiquent donc que l'abondance des contacts TCR/CMHII reçus dans le thymus contrôle la sensibilité à l'IL7 des $CD4^+_{RTEs}$. Finalement, l'observation que les $CD8^+_{PERI}$ et $CD8^+_{RTEs}$ prolifèrent pareillement pendant la thérapie à l'IL7, alors que la prolifération des T $CD4^+$ est largement restreinte aux RTEs expliquerait pourquoi, dans les cas de lymphopénie, la régénération des T $CD4^+$ est aussi dépendante de la thymopoïèse.

TCR Triggering Received Inside The Thymus Drives IL7 Responsiveness of CD4⁺ Recent Thymic Emigrants (RTEs) in Mice.

Olga Hennion-Tscheltzoff^{1,2}, Dominique Leboeuf¹, Ryan D Murphy³, Simon-David Gauthier^{1,2}, Stephanie Thiant¹, Crystal L Mackall³ and Martin Guimond^{1,2}.

¹Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada

²Department of Microbiology-Immunology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

³Pediatric Oncology Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

Running title: TCR triggering drives IL7 responsiveness of CD4⁺ RTEs

Corresponding author:

Dr. Martin Guimond,

Assistant Professor,

Department of Microbiology-Immunology, Faculty of Medicine, University of Montreal

Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital

5415, Boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada

Key words: Interleukin-7, IL7, IL-7, recent thymic emigrants, RTE, thymus, lymphopenia, lymphocytes, CD4, CD8, homeostasis, TCR triggering, Flt3 ligand, FL, dendritic cells, DCs

ABSTRACT

Interleukin-7 (IL7) is currently used in trials to increase T cells counts in different clinical settings of human lymphopenia. Nowadays, it is still not known why IL7 therapy is more effective toward the expansion of CD8⁺ T cells rather than CD4⁺ T cells. Here we show that CD8⁺ T cells preferential expansion is due to IL7-induced efficient proliferation of peripheral CD8⁺ T cells (CD8⁺_{PERI}) and CD8⁺_{RTEs}. In contrast, the proliferative action of IL7 is largely restricted to CD4⁺_{RTEs} although peripheral CD4⁺ T cells (CD4⁺_{PERI}) survive better in the periphery than CD4⁺_{RTEs}. Interestingly, CD4⁺_{RTEs} require lower concentrations of IL7 in order to phosphorylate STAT5 or proliferate when compared to CD4⁺_{PERI}. In fact, we demonstrate the requirement for TCR/MHCII contacts to support the IL7-induced HPE of CD4⁺_{RTEs} in the periphery. Furthermore, augmenting the number of MHCII expressing cells in the periphery of donor mice by treating them with Flt3 ligand (Flt3L) prior isolating and transferring their T_{PERI} cells in IL7-treated congenic recipients, significantly enhances the IL7-induced proliferation of CD4⁺_{PERI}. Thus far, our results indicate that the abundance of TCR triggering occurring inside the thymus drives IL7 responsiveness of CD4⁺_{RTEs}. Moreover, the observation that CD8⁺_{PERI} and CD8⁺_{RTE} proliferate similarly during IL7 therapy, while proliferation of CD4⁺ T cells is largely restricted to RTEs, may explain why CD4⁺ T cells regeneration in lymphopenic settings is highly dependent on thymopoiesis.

INTRODUCTION

Homeostasis keeps T cell numbers and diversity of repertoire constant in the periphery throughout the entire life of an individual [248-250]. In a T-cell sufficient environment, peripheral T cells divide slowly in a process called homeostatic cycling (HC). In lymphopenic environments or during aging, thymic senescence occurs and peripheral mechanisms insure maintenance of T-cell numbers and TCR diversity [85]. In fact, during lymphopenia, HC becomes exaggerated, which results in a global proliferation of peripheral residual T cells called homeostatic peripheral expansion (HPE) [251]. Several homeostatic factors are found at levels above normal during lymphopenia and are thought to contribute to the brisk proliferation of T cells to cognate antigens, moderate proliferation against low affinity self-peptide/MHC antigens as well as TCR-independent cycling of memory CD8⁺ proliferation [49, 252]. As a result, T-cell regeneration via HPE is providing a fertile ground to the expansion of T cells with a TCR with the highest affinity for cognate or self-peptide-MHC molecules, which essentially leads to poor TCR diversity and even autoimmunity [253, 254].

Pre-clinical mouse models have provided conclusive evidences that homeostatic maintenance of CD4⁺ naïve and memory T cells as well as CD8⁺ naïve T cells rely on TCR signaling through self-peptide/MHC contact and cytokines such as interleukin-7 (IL7) [251, 255-260]. IL7 is a cytokine mainly produced by thymic and bone marrow stromal cells as well as antigen-presenting-cells (APCs), but is not produced by lymphocytes [261, 262]. It is necessary for T-cell production and survival as mice lacking IL7 or the α chain of its receptor are devoid of T cells [263, 264].

Thus, preventing TCR contact with self-peptide/MHC molecules or interfering with IL7 pathway [265-267] accelerates lymphocyte decay. Together, the model put forth to explain maintenance of T cells in the periphery relates to a two signals model; a cell-cell interaction that provides tonic TCR stimulation by self-peptide/MHC class I or II expressing cells and binding of cytokines such as IL7, delivered as soluble factors that promote survival [268].

Post-natal T-cell depletion in humans typically occurs in the setting of high dose chemotherapy. Regeneration of T lymphocytes can follow two distinct pathways; thymic production of new lymphocytes that essentially recapitulates ontogeny and allows a broad TCR diversity, and HPE. In fact, HPE is known to efficiently regenerate CD8⁺ T cells but be highly inefficient for CD4⁺ T lymphocytes, which often leaves patients with long lasting CD4⁺ T-cell lymphopenia that can lead to opportunistic infections and relapses [269].

Because of the central role of IL7 in T lymphocyte homeostasis, several clinical studies [209, 218, 221] were conducted in order to address the role of this cytokine in T-cell regeneration in different settings of lymphopenia. These studies demonstrated that IL7 administration mediated an increase in total cell counts with a preferential impact on naïve CD8⁺ T cells. Moreover, in a murine model, two studies showed a possible effect of IL7 therapy on recent thymic emigrants, one in a lymphopenic setting and the other in a wild-type [230, 231]. Furthermore, another study in a murine wild-type setting showed that IL7 administration induced a T-cell expansion with a preference for CD8⁺ T cells accumulation, which eventually led to an inverted CD4/CD8 ratio [261, 262]. Given that thymopoiesis is typically absent in lymphopenic humans and thymic output was shown to be instrumental to the recovery of CD4⁺ T cells [85], we postulated that the proliferative effect of IL7 therapy was largely restricted to CD4⁺ recent thymic emigrants (CD4⁺_{RTEs}) as, in humans, RTEs were demonstrated to be more sensitive to IL7 than their naïve counterparts [236].

Here we show that CD8⁺ T cells preferential expansion is due to IL7-induced efficient proliferation of peripheral CD8⁺ T cells (CD8⁺_{PERI}) and CD8⁺_{RTEs}. In contrast, the proliferative action of IL7 is largely restricted to CD4⁺_{RTEs} although peripheral CD4⁺ T cells (CD4⁺_{PERI}) survive better in the periphery than CD4⁺_{RTEs}. Interestingly, CD4⁺_{RTEs} require lower concentrations of IL7 in order to phosphorylate STAT5 or proliferate when compared to CD4⁺_{PERI}. In fact, we demonstrate the requirement for TCR/MHCII contacts to support the IL7-induced HPE of CD4⁺_{RTEs} in the periphery. Furthermore, augmenting the number of MHCII expressing cells in the periphery by treating donor mice with Flt3 ligand (Flt3L) prior initiating IL7 therapy in recipients, significantly enhances the IL7-induced proliferation of CD4⁺_{PERI}. Thus far, our results indicate that the abundance of TCR

triggering occurring inside the thymus drives IL7 responsiveness of $CD4^+_{RTEs}$. Moreover, the observation that $CD8^+_{PERI}$ and $CD8^+_{RTE}$ proliferate similarly during IL7 therapy, while proliferation of $CD4^+$ T cells is largely restricted to RTEs, may explain why $CD4^+$ T cells regeneration in lymphopenic settings is highly dependent on thymopoiesis.

MATERIAL AND METHODS

Animals and administration of IL7 and Flt3L. All experiments were approved by the Animal Committee of Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center. C57BL/6Ly5.1 (SJL; CD45.1⁺) and, where indicated, C57BL/6Ly5.2 (B6; CD45.2⁺) mice were purchased from The Jackson Laboratory and bred at the Animal Production Unit of the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal facility. B6 RAG2p-GFP transgenic mice were kindly provided by Dr. Claude Perreault (University of Montreal) and were bred at the Animal Production Unit of the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal facility. B6 Abb (H2-Ab1) transgenic mice were purchased from Taconic Farms. B6 Thy1.1 (B6 PL) mice were purchased from The Jackson Laboratory. Recombinant human IL7 (rhIL7) (10 µg) or vehicle (phosphate buffer saline; PBS) was administered to mice for 7 days as a daily intraperitoneal (i.p.) injection. For the *in vivo* experiment with varying doses of IL7, mice received 0, 1, 2.5, 5 or 10 µg per day of rhIL7 as a daily i.p. injection. Mice were sacrificed on day 7 and transferred lymphocytes were analyzed for proliferation. Recombinant human IL7 was supplied by Cytheris Inc. Recombinant human Flt3 ligand (Flt3L) (10 µg) or vehicle (PBS) was administered, where indicated, to mice for 14 days as a daily i.p. injection. Mice were sacrificed on day 14 and peripheral T cells were isolated for transfer into WT IL7- or PBS-treated congenic recipients. Flt3L was purchased from BioXcell.

CFSE staining and adoptive transfer of lymphocytes. Two axillary and two inguinal lymph nodes (LN) obtained from CD45.1⁺ wild-type, or where indicated, Flt3L-treated mice were homogenized in a single-cell suspension at a concentration of 1×10^8 cells per mL in PBS containing 2% of fetal bovine serum (FBS; Wisent) and 1mM of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and peripheral T lymphocytes (T_{PERI}) were enriched by negative selection as described in the mouse T-cell enrichment kit (StemCell Technologies). For enrichment of recent thymic emigrants (RTEs), negative selection on CD4 and CD8 positive selection kits (StemCell Technologies) was performed on CD45.1⁺ or, where indicated CD90.1⁺ wild-type thymuses. Thymuses were homogenized in a single-cell suspension at a concentration

of 1×10^8 cells per mL in PBS containing 2% of FBS and 1 mM of EDTA. Enriched T_{PERI} or RTEs were then suspended at a density of 1×10^7 cells per mL in PBS and incubated for 15 min at room temperature with 1 μL per 1×10^7 cells of 5 mM carboxyfluorescein diacetate succinimidyl diester (CFSE; Molecular Probes). Cells were washed once in PBS and were suspended at a density of 2×10^6 cells per mL in PBS. Recipient mice received 1×10^6 CFSE-labelled polyclonal T cells (T_{PERI} or RTEs at a CD4/CD8 1:1 ratio) or, where indicated 2×10^6 cells of mixed CD45.1^+ T_{PERI} and CD90.1^+ RTEs at a 1:1 ratio or, where indicated 5×10^3 sorted GFP^+ T cells. After 7 days, mice were sacrificed and CFSE content was analyzed with a four-laser LSR II (Becton Dickinson). FlowJo software (TreeStar) was used for all analyses. Calculation of the absolute number of cells recovered per lymph nodes and spleens used a gate that included lymphoid and myeloid cells according to the forward-scatter and side-scatter profiles. GFP^+ cells were sorted using a FACSAria III (Becton Dickinson) and monoclonal antibodies directed against CD4, CD8 and CD11c.

Flow cytometry. T lymphocytes were suspended at a density of 1×10^7 cells/mL in RPMI medium (Wysent) (containing 2% FBS) and were incubated for 30 min on ice with diluted monoclonal antibodies. Cells were then washed once with PBS and were suspended in PBS containing 1% of formalin (ACP Chemicals Inc.) in PBS. Sorted, CFSE-labeled, and adoptively transferred GFP cells were also fixed in formalin prior to analysis in order to bleach the GFP. The following monoclonal antibodies were used (all from Biolegend): pacific blue–anti-CD4 (RM4.5); phycoerythrin–anti-CD8 (53-6.7); and fluorescein isothiocyanate–anti-CD8 (5H10-1); allophycocyanin-cyanine 7-anti-CD62L (MEL-14); phycoerythrin-anti-CD45RB (C363-16A); phycoerythrin-cyanine 7-anti-CD69 (H1.2F3); allophycocyanine-anti- β 7 integrin (FIB504). Allophycocyanin–conjugated anti-CD45.1 (A20) was from BD Biosciences. Immunofluorescence was determined by automated multiparameter flow cytometry, analyzing at least 1×10^4 cells for purity and up to 1×10^7 cells for CFSE analysis. For cell sorting, up to 1×10^8 lymph nodes cells were labelled with the following antibodies (all from Biolegend): pacific blue-anti-CD4 (RM4.5); allophycocyanine-anti-CD8 (53-6.7); phycoerythrin-cyanine 7-anti-CD11c (N418). For

detection of phosphorylated STAT5, 2×10^6 cells were labelled with the following antibodies (all from BD Biosciences): allophycocyanine-anti-CD4 (RM4.5); peridinin-chlorophyll-cyanine 5.5-anti-CD8 (53-6.7) and phycoerythrin-anti-STAT5 (pY694; 47). For Bcl-2 intracellular staining, 1×10^6 cells were labelled with the following antibodies (all from Biolegend): allophycocyanine-anti CD4 (RM4.5); phycoerythrin anti-CD8 (53-6.7). Fluorescein isothiocyanate-anti Bcl-2 (3F11) was from BD Biosciences.

IL7 stimulation and STAT5 staining. For detection of phosphorylated STAT5, 2×10^6 CD4⁺_{PERI} T cells and CD4⁺_{RTEs} were suspended at 4×10^6 cells per mL in RPMI + HEPES 10 mM and starved for 1 hour at 37°C. Cells were then stimulated for 30 minutes at 37°C with different concentrations of rhIL7 (0; 0.01; 0.1; 1; 10 ng per mL) in RPMI + 10% FBS. After stimulation, cells were fixed in hot (at 37°C) Lyse/Fix Buffer (BD Biosciences), washed twice in FacsWash Buffer (BD Biosciences) and made permeable in iced Perm Buffer III. Cells were then washed twice in FacsWash Buffer and stained for CD4, CD8 and phosphorylated STAT5.

IL7 stimulation and Bcl-2 staining. For Bcl-2 intracellular staining, 1×10^6 CD4⁺_{PERI} T cells and CD4⁺_{RTEs} were suspended at 1×10^6 cells per mL in RPMI + 1% Penicilin/Streptomycin + 0.1% HEPES + 10% FBS and incubated with different concentrations of rhIL7 (0; 0.01; 0.1; 1; 5 ng per mL) at 37°C for 24 hours. Cells were then washed once with 0.1% saponin in FacsWash Buffer (BD Biosciences) and stained for Bcl-2. Cells were then washed once with 0.1% saponin in FacsWash Buffer, twice with FacsWash Buffer only and stained for CD4 and CD8.

Statistical analyses. Prism 5.0 (GraphPad Software) was used for tests. A two-tailed, unpaired Student's t-test with 95% confidence bounds was used for statistical analysis. A p-value less than or equal to 0.05 was considered significant.

RESULTS

IL7 therapy preferentially expands CD8⁺ T lymphocytes. In humans, primates and mice, IL7 therapy has been shown to induce global T cell expansion [209, 217, 218, 231, 270, 271]. However, a careful analysis of how T cells expand during IL7 therapy have highlighted major differences in the way CD8⁺ and CD4⁺ T cells respond to the cytokine. Since IL7 is a homeostatic cytokine that serves to maintain both CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, this work was undertaken to understand the mechanism responsible for the preferential expansion of CD8⁺ T cells by IL7 therapy. Following a 7 days course of IL7 therapy, mice exhibit enlarged spleen associated with an augmented number of splenocytes (PBS = $119.4 \pm 7.4 \times 10^6$ cells *versus* IL7 = $329.5 \pm 12.2 \times 10^6$ cells) and enlarged lymph nodes (LN) with accumulation of LN cells (PBS = $9.9 \pm 1.2 \times 10^6$ cells *versus* IL7 = $51.9 \times \pm 3.1 \times 10^6$ cells) (Figure 1A). Interestingly, we found that IL7 therapy induces a higher fold expansion in T cells numbers in the LN than in the spleen (5.2 *versus* 2.2). Analysis of T-cell subsets confirmed that IL7 therapy induces expansion of both CD8⁺ T cells (LN: PBS = $1.5 \pm 0.2 \times 10^6$ cells *versus* IL7 = $11.4 \pm 0.7 \times 10^6$ cells, $p < 0.0001$; Spleen: PBS = $8.2 \pm 0.6 \times 10^6$ cells *versus* IL7 = $29.5 \pm 1.6 \times 10^6$ cells, $p < 0.0001$) and CD4⁺ T cells (LN: PBS = $2.0 \pm 0.3 \times 10^6$ cells *versus* IL7 = $8.1 \pm 0.4 \times 10^6$ cells, $p < 0.0001$; Spleen: PBS = $12.5 \pm 0.9 \times 10^6$ cells *versus* IL7 = $17.7 \pm 0.9 \times 10^6$ cells, $p > 0.001$). Importantly however, as predicted when based on previous studies [225, 272], a bias toward a preferential expansion of CD8⁺ T cells was seen in IL7-treated mice (fold expansion in LN: CD4⁺ T cells = 4.0 *versus* CD8⁺ T cells = 7.6; in spleen: CD4⁺ T cells = 1.4 *versus* CD8⁺ T cells = 3.6) (Figure 1B-C). These results demonstrate that exogenous administration of IL7 augments both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts in the LNs and spleen of mice but this is accompanied with an important skewing toward the accumulation of CD8⁺ T cells. Because supraphysiological levels of IL7 can potentially affect both thymic output and peripheral T cells, and each pathway may contribute differently to the overall T-cell expansion [208, 209, 218], we used an adoptive transfer strategy to exclude any contribution of thymopoiesis and restricted our focus on mature peripheral T cells (T_{PERI}) (Figure 2A).

Using CFSE-labeled CD45.1⁺ T cells transferred into congenic recipients, we found that IL7 therapy favors the accumulation of CD8⁺_{PERI} lymphocytes in LN (fold expansion of CD4⁺_{PERI} = 3.7 *versus* CD8⁺_{PERI} = 5.6) but not in the spleen where accumulation of CD8⁺_{PERI} and CD4⁺_{PERI} was similar (fold expansion of CD4⁺_{PERI} = 1.4 *versus* CD8⁺_{PERI} = 1.5) (Figure 2B-C). IL7 therapy induced the expansion of CD4⁺_{PERI} T cells in the LN (PBS = $6.0 \pm 1.0 \times 10^3$ cells *versus* IL7 = $22.0 \pm 3.2 \times 10^3$ cells; $p < 0.0005$) and spleen (PBS = $21.5 \pm 1.9 \times 10^4$ cells *versus* IL7 = $30.4 \pm 1.8 \times 10^4$ cells; $p < 0.01$) of IL7-treated animals. Similar data were obtained with CD8⁺_{PERI} T cells with cells counts increased in LN (PBS = $6.2 \pm 0.7 \times 10^3$ cells *versus* IL7 = $34.8 \pm 4.2 \times 10^4$ cells; $p < 0.0001$) and spleen (PBS = $30.3 \pm 3.9 \times 10^4$ cells *versus* IL7 = $45.6 \pm 2.7 \times 10^4$ cells; $p < 0.01$) of IL7-treated animals (Figure 2D-E). Finally, we analyzed the effect of IL7 therapy on lymphocyte proliferation and as expected, CD8⁺_{PERI} CD45.1⁺ T-cell expansion was associated with robust homeostatic proliferation by IL7. Surprisingly however, CD4⁺_{PERI} CD45.1⁺ T cells accumulated quite much despite inefficient homeostatic proliferation induced by IL7 therapy (Figure 2B-C). These results confirm the critical role of IL7 in supporting T cell homeostasis *in vivo* but also provide support to a model wherein IL7 signalling on CD4⁺_{PERI} and CD8⁺_{PERI} T cells triggers different outcomes, favouring survival for CD4⁺_{PERI} lymphocytes and proliferation for CD8⁺_{PERI} T cells, both of the processes leading to T-cell accumulation in this setting.

IL7 therapy induces a stronger HPE of CD4⁺ recent thymic emigrants (RTEs) (CD4⁺_{RTEs}) than CD4⁺_{PERI}. The results reported above and published studies in humans demonstrating IL7-induced expansion of CD4⁺ CD31⁺ cells suggest a role for IL7 in the maintenance of these cells [209, 273]. However, modulation of thymic subsets by IL7 is still controversial and, in fact, we did not find significant changes in the distribution or absolute numbers of thymocytes in IL7-treated animals (data not shown). Since RTEs express IL7R α and are believed to respond vigorously to elevated systemic IL7 [231, 274], we postulated that IL7 therapy might affect these cells to a greater extent when compared to their mature counterparts. Murine RTEs are still phenotypically not well defined, so we

used the RAG2p-GFP transgenic mouse model to isolate circulating RTEs, and evaluate the expression of some markers (CD45RB, CD69, β 7 integrin, CD62L) that have been previously used to estimate RTEs among CD4⁺ T cells [243]. Interestingly, we found that CD4⁺ circulating RTEs exhibit a unique but more mature phenotype than CD4⁺_{RTEs} (Figure S1). We so enriched in RTEs by isolating single positive CD4⁺ and CD8⁺ thymocytes (CD4⁺_{RTEs} and CD8⁺_{RTEs}). In order to measure RTEs responsiveness to IL7 therapy, we transferred highly enriched, CFSE-labeled, CD4⁺_{RTEs} and CD8⁺_{RTEs} into congenic recipients. Mice were then treated with IL7 for 7 days (Figure 3A). We observed that IL7 therapy induced a stronger accumulation of CD4⁺_{RTEs} compared to CD4⁺_{PERI} (ratio CD4/CD8: RTEs = 1.6 ± 0.1 versus PERI = 0.6 ± 0.05) (Figure 3B) and CD4⁺_{RTEs} = 42.4 ± 2.7 % versus CD4⁺_{PERI} = 13.6 ± 0.7 %; $p < 0.0001$) (Figure 3C-D). Furthermore, the magnitude of proliferation of CD4⁺_{RTEs} was similar to that of CD8⁺_{RTEs} (Figure 3E-F), yet CD4⁺_{RTEs} accumulated to a greater extent than CD8⁺_{RTEs} in LN of IL7-treated mice (Figure 3G). In the spleen, accumulation of CD4⁺_{RTEs} was similar to CD8⁺_{RTEs}, with a ratio CD4/CD8 maintained around 1 during the course of the therapy (Figure 3H). Thus, our data demonstrate that IL7 therapy acts differently on CD4⁺ T cells: on one hand it induces survival of CD4⁺_{PERI} T cells, while minimally affecting their proliferation; on the other hand, IL7 induces stronger proliferation of CD4⁺_{RTEs} which favors their accumulation.

Peripheral CD4⁺ GFP⁺ cells rapidly diminish their response to IL7 therapy. Given that IL7 therapy induces stronger HPE in CD4⁺_{RTEs}, we postulated that cells proliferating within the pool of CD4⁺_{PERI} T cells were possibly circulating RTEs. To test this hypothesis, we used the RAG2p-GFP transgenic mouse model. We sorted and CFSE-labeled CD4⁺_{PERI} GFP⁺ T cells (i.e. circulating RTEs), CD4⁺_{PERI} GFP⁻ T cells (i.e. peripheral mature T cells) as well as thymic CD4⁺ GFP⁺ cells (i.e. CD4⁺_{RTEs}) and transferred them into different WT congenic recipients. Mice were then treated with PBS or rhIL7 for 7 days (Figure 4A). As CD4⁺_{PERI} GFP⁺ cells represent circulating RTEs, we predicted that they would proliferate to a greater extent than CD4⁺_{PERI} GFP⁻ cells. Surprisingly however, we neither find enhanced proliferation nor greater accumulation of CD4⁺_{PERI} GFP⁺ cells following IL7 therapy

(Figure 4B-D). Nonetheless, we did observe a weak trend toward a lower proliferation of $CD4^{+}_{PERI} GFP^{-}$ cells, which may indicate that once RTEs have integrated the periphery, they rapidly diminish their sensitivity to IL7. To address this possibility, we parked $CD4^{+}_{RTEs}$ inside congenic recipients for 3 days prior initiating IL7 therapy. In control mice where IL7 therapy was started immediately upon RTEs transfer, approximately 40% of the cells underwent proliferation. In contrast, delaying IL7 therapy for 3 days following the transfer of $CD4^{+}_{RTEs}$ in congenic hosts diminished approximately by 50% their intensity of proliferation (Figure 4E-F). Thus, our data demonstrate that once RTEs reach the periphery, they rapidly reduce their sensitivity to IL7 therapy.

IL7 therapy-induced proliferation is dependent on TCR/MHCII interaction. The current model holds that TCR triggering and IL7 work together to maintain T cell numbers in the periphery [251, 255]. Whether TCR/MHCII interaction is still necessary when supraphysiologic doses of IL7 are provided *in vivo* to $CD4^{+}_{RTEs}$ remains unknown. To investigate the requirement of TCR triggering during IL7 therapy, we adoptively transferred $CD4^{+}_{RTEs} CD45.1^{+}$ into $MHCII^{-/-}$ hosts and treated mice with IL7 for 7 days (Figure 5A). We observed a significant decline in proliferation when $CD4^{+}_{RTEs}$ were transferred into an IL7-treated $MHCII^{-/-}$ host, yet the decrease was only partial (Figure 5B, D, E). Because thymocytes are exposed to the thymic medullar epithelium that is rich in MHC class-II molecules [275, 276], we hypothesized that the TCR triggering received in the thymus may impact the IL7-induced proliferation of $CD4^{+}_{RTEs}$ after the cells exit the thymus. To test this possibility, we parked the cells for 3 days in an $MHCII^{-/-}$ environment before initiating IL7 therapy. As shown in Figure 5C, residual proliferation of $CD4^{+}_{RTEs}$ was completely abolished, raising the prospect that the TCR triggering received inside the thymus drives their IL7 responsiveness. Because MHCII expression is essentially limited to antigen presenting cells (APCs) while MHCI expression is more abundantly expressed, this may explain why naïve $CD8^{+}$ T cells proliferate more in response to IL7 therapy. To test this possibility, we artificially increased the number of MHCII expressing cells in the periphery by treating donor $CD45.1^{+}$ mice with Flt3 ligand (Flt3L) [208, 277]. At day +14

of Flt3L therapy, CD4⁺_{PERI} that have been exposed to a greater number of MHCII⁺ cells were isolated and transferred into WT IL7-treated congenic recipients. At time of sacrifice, mice receiving CD4⁺_{PERI} T cells from Flt3L-treated donors showed a magnitude of proliferation almost increased by 50% when compared to mice receiving CD4⁺_{PERI} T cells from control (PBS-treated) mice (Figure 5F-G). Thus, pre-exposure of CD4⁺_{PERI} to an environment rich in MHCII molecules greatly increases their magnitude of IL7-induced proliferation. Therefore, we conclude that the interaction between the TCR and the MHCII molecules controls, in part, the responsiveness of CD4⁺_{RTEs} to IL7 therapy.

CD4⁺_{RTEs} are more responsive to IL7 than CD4⁺_{PERI} T cells. CD4⁺_{RTEs} undergo more efficient proliferation in response to IL7 therapy than CD4⁺_{PERI} T cells do, so we postulated that the abundance of MHCII molecules expressed by the thymic medulla provides a constant TCR signaling that augments responsiveness of CD4⁺_{RTEs} to IL7 therapy. We first evaluated IL7 signaling by measuring STAT5 phosphorylation in CD4⁺_{PERI} and CD4⁺_{RTEs} exposed to varying concentrations of IL7. We observed phosphorylation of STAT5 in CD4⁺_{RTEs} at doses as little as 0.1 ng per mL of IL7 whereas 1 ng per mL of the cytokine was necessary to induce STAT5 phosphorylation in CD4⁺_{PERI} (Figure 6A-B). Surprisingly, CD4⁺_{PERI} T cells seem to require lower concentrations of IL7 in order to induce the anti-apoptotic factor Bcl-2 (Figure 6C-D). Interestingly, increased responsiveness to IL7 was not due to increased expression of IL7R α nor of the common γ c chain by CD4⁺_{RTEs} since these cells did not express more of these receptors compared to CD4⁺_{PERI} (Figure 6E). Therefore, the data presented here demonstrates that CD4⁺_{RTEs} respond to lower concentrations of IL7 than CD4⁺_{PERI} T cells but CD4⁺_{PERI} T cells survive better in the periphery. This *in vitro* finding supports an *in vivo* model wherein CD4⁺_{RTEs} could use IL7 more efficiently than CD4⁺_{PERI}. To confirm our *in vitro* finding, we transferred CFSE-labeled CD4⁺_{PERI} CD45.1⁺ CD90.2⁺ T cells and CD4⁺_{RTEs} CD45.2⁺ CD90.1⁺ T cells (at a 1:1 ratio) into the same congenic recipients CD45.2⁺ CD90.2⁺ and treated the mice with varying doses of rhIL7 (0; 1; 2.5; 5 or 10 μ g per day) for 7 days (Figure 7A). On day +7, mice were sacrificed and transferred CD4⁺_{PERI} CD45.1⁺ T cells and CD4⁺_{RTEs} CD90.1⁺

were enumerated and analyzed by flow cytometry for evidence of proliferation. Consistent with our *in vitro* data, we found that 1 μg per day of IL7 therapy was sufficient to induce the proliferation of $\text{CD4}^+_{\text{RTEs}}$ but clearly insufficient for $\text{CD4}^+_{\text{PERI}}$. In fact, we only detected proliferation of $\text{CD4}^+_{\text{PERI}}$ at doses of IL7 above 2.5 μg per day (Figure 7B, C). Despite the lack of proliferation of $\text{CD4}^+_{\text{PERI}}$, we did observe a biological effect of IL7 at concentrations of 1 μg per day, as recovery of $\text{CD4}^+_{\text{PERI}}$ was clearly increased, confirming that the lack of proliferation observed was not due to an incapacity of the cells to respond to the cytokine (Figure 7D). We also compared the recovery of $\text{CD4}^+_{\text{RTEs}}$ and $\text{CD4}^+_{\text{PERI}}$ and consistent with our Bcl-2 staining data, we found that RTEs recovery was weak in comparison to the recovery of $\text{CD4}^+_{\text{PERI}}$ (Figure 7E), which confirms previous work showing that RTEs are outcompeted by peripheral T cells in non lymphopenic hosts [278]. Taken together, our data show that IL7 therapy acts at different levels on CD4^+ T cells, promoting survival of $\text{CD4}^+_{\text{PERI}}$ T cells and proliferation of $\text{CD4}^+_{\text{RTEs}}$.

DISCUSSION

During the last decade, important progresses were made in understanding the biology of T-cell depletion, allowing the identification of IL7 as the principal mediator of T-cell homeostasis in humans [250]. IL7 belongs to the γ c cytokine family and signals through JAK1/3-STAT5 pathway to augment survival of IL7R α expressing T cells via the anti-apoptotic protein Bcl-2 [279]. Paradoxically, elevated systemic IL7 levels are associated with low CD4⁺ T-cell counts [261] and this relates, in part, to the cytokine's negative feedback loop that affects APCs and interferes with their capacity to efficiently support CD4⁺ T cells HPE [208]. Interestingly, supplying supraphysiologic levels of IL7 in humans and mice can expand T cells with preferential proliferation of CD8⁺ T cells and the actual model relies on increased T-cell survival and proliferation, both induced by TCR and MHC class I or II triggering. This work was thus undertaken to elucidate the mechanism responsible for these differences. In this study, we confirm the efficiency of IL7 therapy to expand CD8⁺ T cells and further demonstrate that their IL7-induced proliferation was largely restricted to the CD8⁺ subset. Despite the inefficiency of IL7 therapy to induce CD4⁺ T-cell proliferation, we noted a significant rise in CD4⁺ T-cell recovery, confirming that IL7 signalling signals on CD4⁺ T cells and promotes survival. The data obtained with IL7 therapy have strong similarities with other studies using lymphopenic animals wherein elevated systemic IL7 is also accompanied with inefficient HPE of CD4⁺ T cells [280]. Importantly, a population of CD4⁺ T cells with high affinity TCR for self-peptide MHC II molecules can undergo brisk proliferation in lymphopenic settings, but our CFSE studies did not reveal any recruitment of these cells by IL7 therapy. This suggests that either HPE of this subset is IL7 independent [280, 281] and/or the peripheral niche that accommodates these cells is full. Evidence that IL7 therapy preferentially expands low affinity CD4⁺ T cells comes from the observation that CFSE^{lo} CD4⁺ T cells proliferate during IL7 therapy after their subsequent transfer into Rag^{-/-} mice. In contrast, cells that failed to proliferate during IL7 therapy may contain the population of CD4⁺ T cells that undergo brisk proliferation in Rag^{-/-} mice (data not shown). Thus far, we identified 3 new elements of IL7

therapy: 1) we have shown that expansion of CD4⁺ T cells rely mainly on survival; 2) CD8⁺ T cells accumulate more during IL7 therapy, possibly because they proliferate more than CD4⁺ T cells; and 3) the few CD4⁺ T cells undergoing HPE during IL7 treatment are cells with the lowest TCR affinity for self-peptide MHC molecules.

Recent functional data obtained in humans strongly suggest a thymopoietic effect of IL7 therapy [209, 273]. Given that CD4⁺_{PERI} T cells proliferate poorly during IL7 therapy and TCR diversity augments among naïve CD4⁺ T cells, we postulated that CD4⁺_{RTEs} were proliferating in response to the cytokine. Therefore we compared the proliferative effect of IL7 on CD4⁺_{PERI} (obtained from LN) and CD4⁺_{RTEs} (obtained from thymus) and, consistent with studies in humans, we provide conclusive evidence that the proliferative effect of IL7 is largely restricted to CD4⁺_{RTEs}. However, we did not see this difference in proliferation between CD8⁺_{RTEs} and CD8⁺_{PERI}, suggesting that IL7 acts differently on CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Surprisingly, IL7R α and γ c common chain (CD132) expressions were expressed similarly on CD4⁺_{RTE} and CD4⁺_{PERI}. Interestingly, lower concentrations of IL7 are required to induce STAT5 phosphorylation in CD4⁺_{RTEs} compared to CD4⁺_{PERI}, raising the prospect that IL7 responsiveness might be increased in RTEs. These results were confirmed *in vivo* by transferring CD4⁺_{RTEs} and CD4⁺_{PERI} at a 1:1 ratio into WT recipients; we demonstrate that lower doses of IL7 were sufficient to induce HPE of CD4⁺_{RTEs} compared to CD4⁺_{PERI} T cells. Together the data conclusively demonstrate that IL7 signaling induces different outcomes in CD4⁺_{RTEs} and CD4⁺_{PERI}, with RTEs being more sensitive to IL7 therapy.

The thymus is an organ rich in MCHII-expressing cells [282, 283] and TCR triggering is necessary to the HPE of CD4⁺_{PERI} T cells [251, 255-260]. Thus, we postulated that the abundance of TCR signaling provided inside the thymus could explain the increased sensitivity of CD4⁺_{RTEs} to IL7. Interestingly, HPE of CD4⁺_{RTE} was dramatically diminished upon transfer of these cells into IL7-treated MHCII^{-/-} hosts, which demonstrated the requirement of TCR triggering for CD4⁺_{RTEs} to undergo HPE during IL7 therapy. Importantly however, residual proliferation of CD4⁺_{RTEs} could be seen in IL7-treated MHCII^{-/-} hosts, suggesting that some of the RTEs could undergo TCR-independent proliferation. Considering the abundance of class II-expressing cells inside the thymus,

HPE of $CD4^+_{RTEs}$ in absence of TCR stimulus could be related to an overstimulation received inside the organ. To test this possibility, we performed a parking experiment in which $CD4^+_{RTEs}$ were left 3 days in $MHCII^{-/-}$ hosts prior initiation of IL7 therapy. As predicted, HPE of $CD4^+_{RTEs}$ was completely abrogated. Furthermore, the magnitude of proliferation of $CD4^+_{RTEs}$ left 3 days into WT hosts before initiating IL7 therapy also demonstrated diminished IL7-induced HPE. Thus far, our data suggest that MHCII availability in the periphery could serve as a limiting factor for IL7 therapy to induce HPE of $CD4^+_{PERI}$. Consistent with this notion, we found that $CD4^+_{PERI}$ isolated from Flt3L-treated mice proliferated more during IL7 therapy. Therefore the model put forth to explain increased proliferation of $CD4^+$ RTE during IL7 therapy seems to relate to the thymic microenvironment rich in MHCII molecules that conditioned resident $CD4^+_{RTEs}$ to be more responsive to IL7. For $CD8^+_{PERI}$ T cells and $CD8^+_{RTEs}$, we did not observe such difference in their proliferation to IL7 therapy and this likely relates to the abundance of MHCI found in the periphery.

After post-natal T-cell depletion, early immune reconstitution is characterized by accumulation of T cells with high affinity TCR for self-peptide MHC molecules that can be only corrected by thymopoiesis. Unfortunately, in most clinical settings of T-cell depletion, thymopoietic insults often limits T-cell reconstitution via this pathway and promotes long lasting $CD4^+$ T cells lymphopenia. Elevated IL7 promotes survival of residual $CD4^+$ T cells but more importantly, it helps $CD4^+_{RTEs}$ to compete more efficiently in the periphery. Thus, as IL7-induced proliferative effect on $CD8^+$ T cells is observed on peripheral T cells and RTEs but is largely restricted to $CD4^+_{RTEs}$, these fundamental differences provide an explanation to why $CD4^+$ T-cell regeneration is so dependent on thymopoiesis in different clinical setting of lymphopenia.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Martine Dupuis for cell sorting, Catherine Mauger for mice husbandry, Dr. Claude Perreault from University of Montreal for providing B6 RAG2p-GFP mice, and Dr. Michel Morre from Cytheris Inc. for providing rhIL7.

This work was supported by a grant from The Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS AND DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST

Contributions: O.H.T. performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript. D.L., R.D.M., S.D.G., and S.T. performed experiments. C.L.M. provided scientific input and revised the manuscript. M.G. designed the project, analyzed data and wrote the manuscript.

Conflict of interest disclosure: The authors declare no conflicts of interest.

LEGENDS

Figure 1. IL7 therapy induces T-cell expansion in lymph nodes and spleen of wild-type mice. Wild-type (WT) C57BL/6 adult mice (6-8 weeks old) received daily i.p. injections of either PBS or rhIL7 (10 μ g per day per mouse) for 7 days. (A) Graphical summary of mean absolute number \pm SE of lymph node (LNs) cells (2 axillary and 2 inguinal LNs were used for cell counts) and splenocytes of rhIL7- or PBS-treated animals. Inlet is showing the fold expansion of total cell numbers in LNs and spleen of rhIL7- compared to PBS-treated mice. (B-C) Graphical summary of absolute numbers \pm SE of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the LN and spleen of rhIL7- or PBS-treated mice. Inlets are showing the fold expansion of CD4⁺ or CD8⁺ T-cell numbers in rhIL7-treated *versus* PBS-treated mice. Data show 12 mice per group and were pooled from three independent experiments.

Figure 2. IL7 therapy induces preferential proliferation of peripheral CD8⁺ T cells. Peripheral T lymphocytes (CD4⁺_{PERI} and CD8⁺_{PERI}) were enriched from the lymph nodes of WT CD45.1⁺ mice, labeled with CFSE and intravenously transferred into WT CD45.2⁺ congenic recipients. After cell transfer, recipient mice were treated daily for 7 days with PBS or rhIL7. (A) Schematic representation of the experimental design where enriched T_{PERI} cells were administered to congenic recipients. (B) Graphical summary of absolute numbers \pm SE of CD4⁺_{PERI} CD45.1⁺ and CD8⁺_{PERI} CD45.1⁺ T cells in the LN and (C) spleen of PBS- and IL7-treated CD45.2⁺ congenic recipients. (D) Representative flow cytometric analysis of CD4⁺_{PERI} CD45.1⁺ and CD8⁺_{PERI} CD45.1⁺ T cells found in the LN of PBS- and rhIL7-treated congenic recipients. (E) Graphical summary of the percentage \pm SE of CD4⁺_{PERI} CD45.1⁺ and CD8⁺_{PERI} CD45.1⁺ T cells proliferating after 7 days of IL7 therapy based on CFSE dilution. Data show 5 or 9 mice per group and were pooled from two independent experiments.

Figure 3. IL7 therapy induces stronger proliferation of CD4⁺ recent thymic emigrants (CD4⁺_{RTEs}) compared to peripheral CD4⁺ T cells (CD4⁺_{PERI}). (A) Schematic representation of the experimental design where enriched, CFSE-labeled CD4⁺ CD45.1⁺ (CD4⁺_{RTEs}) and CD8⁺ CD45.1⁺ (CD8⁺_{RTEs}) single positive thymocytes from WT CD45.1⁺ mice were mixed at a 1:1 ratio prior to their adoptive transfer into CD45.2⁺ congenic recipients. Recipient mice were treated daily with PBS or rhIL7 for 7 days. (B) Graphical summary of CD4/CD8 ratio of T_{PERI} and T_{RTEs} after 7 days of IL7 treatment. Data show between 6 and 8 mice per group pooled from two or three independent experiments. (C) Representative flow cytometric analysis of transferred CD4⁺_{PERI} and CD4⁺_{RTEs} found in the LN of PBS- or IL7-treated mice after 7 days of treatment. (D) Graphical summary of the percentage \pm SE of CD4⁺_{PERI} and CD4⁺_{RTEs} proliferating after 7 days of IL7 treatment. (E) Representative flow cytometric analysis of transferred CD4⁺_{RTEs} and CD8⁺_{RTEs} found in the LN of PBS- and IL7-treated mice. (F) Graphical summary of the percentage \pm SE of CD4⁺_{RTEs} and CD8⁺_{RTEs} proliferating after 7 days in response to IL7 therapy. (G-H) Graphical summary of the absolute numbers \pm SE of CD4⁺_{RTEs} and CD8⁺_{RTEs} found in LN and spleen of PBS- and IL7-treated recipients. Inlets are showing fold expansion of CD4⁺_{RTEs} and CD8⁺_{RTEs} in LN and spleen of PBS- *versus* IL7-treated animals. Data show 6 mice per group pooled from two independent experiments.

Figure 4. CD4⁺_{PERI} GFP⁺ and thymic CD4⁺ GFP⁺ T cells respond differently to IL7 therapy. (A) Graphical representation of the experimental design where CD45.2⁺ CD4⁺_{PERI} GFP⁺, CD45.2⁺ CD4⁺_{PERI} GFP⁻ and thymic CD45.2⁺ CD4⁺ GFP⁺ T cells were sorted from lymph nodes or thymuses of wild-type RAG2p-GFP mice and stained with CFSE prior to transfer into congenic CD45.1⁺ mice. Recipient mice were treated i.p. with PBS or rhIL7 (10 μ g per day) for 7 days. (B) Representative flow cytometric analysis of transferred CD4⁺_{PERI} GFP⁺ and CD4⁺_{PERI} GFP⁻ and thymic CD4⁺ GFP⁺ T cells recovered from LN of PBS- and IL7-treated animals 7 days post-transfer. (C) Graphical summary of the

percentage \pm SE of CD4⁺_{PERI} GFP⁺, CD4⁺_{PERI} GFP⁻ and thymic CD4⁺ GFP⁺ cells proliferating after 7 days of IL7 therapy. (D) Graphical summary of the absolute numbers \pm SE of CD4⁺_{PERI} GFP⁺, CD4⁺_{PERI} GFP⁻ and thymic CD4⁺ GFP⁺ cells after 7 days of PBS or IL7 therapy. Data show 3 mice per group pooled from three independent experiments. (E) Representative flow cytometric analysis and (F) graphical summary of the percentage \pm SE of transferred WT CD4⁺_{RTEs} into WT congenic recipients proliferating with IL7 therapy started immediately upon or 3 days after transfer. Data show 2 or 3 mice per group pooled from two independent experiments.

Figure 5. CD4⁺_{RTEs} require TCR/MHCII contact to proliferate under IL7. (A) Graphical representation of the experimental design where CD4⁺_{RTEs} CD45.1⁺ were CFSE-labeled and transferred into WT CD45.2⁺ (MHCII^{+/+}) or CD45.2⁺ MHCII^{-/-} mice. Cells were parked for three days into their respective recipients before PBS or IL7 treatment was started. (B-C) Representative flow cytometric analysis of transferred CD4⁺_{RTEs} into MHC^{+/+} or MHC^{-/-} recipients in which IL7 therapy was started immediately upon transfer or after 3 days of parking. (D) Graphical summary of the percentage \pm SE of proliferating CD4⁺_{RTEs} transferred into congenic MHCII^{+/+} or MHCII^{-/-} hosts with IL7 therapy begun immediately after transfer. (E) Graphical summary of the absolute numbers \pm SE of CD4⁺_{RTEs} transferred into congenic WT or MHCII^{-/-} hosts after 7 days of IL7 therapy. (F) Representative flow cytometric analysis and (G) magnitude of proliferation \pm SE of transferred CD4⁺_{PERI} T cells from PBS- or Flt3L-treated mice into WT PBS- or IL7-treated congenic recipient mice. Data show 2 or 3 mice per group pooled from two independent experiments.

Figure 6. CD4⁺_{RTEs} are more sensitive to IL7 therapy than CD4⁺_{PERI} T cells. (A) *In vitro* evaluation of STAT5 phosphorylation in CD4⁺_{RTEs} and CD4⁺_{PERI} T cells stimulated with varying concentration of rhIL7. (B) Graphical summary of Δ mean fluorescence (MFI X - MFI 0) \pm SE of STAT5 phosphorylation in CD4⁺_{RTEs} and CD4⁺_{PERI} T cells exposed to

varying concentration of rhIL7. Results are representative of three independent experiments. (C) *In vitro* evaluation of IL7-induced Bcl-2 expression in CD4⁺_{RTEs} and CD4⁺_{PERI} T cells stimulated with varying concentration of rhIL7 for 24 hours. (D) Graphical summary of Δ mean fluorescence (MFI X – MFI 0) \pm SE of Bcl-2 induction in CD4⁺_{RTEs} and CD4⁺_{PERI} T cells exposed to varying concentration of rhIL7 for 24 hours. Results are representative of two independent experiments. (E) Representative flow cytometric analysis of IL7R α (CD127) and common γ chain (CD132) evaluated on freshly isolated CD4⁺_{RTEs} and CD4⁺_{PERI} T cells.

Figure 7. CD4⁺_{RTEs} are more responsive to IL7 therapy than CD4⁺_{PERI}. (A) Graphical representation of the experimental design where CD4⁺_{PERI} CD90.2⁺ CD45.1⁺ T cells and CD4⁺_{RTEs} CD90.1⁺ CD45.2⁺ were transferred into WT CD90.2⁺ CD45.2⁺ recipients. Mice were treated daily with either PBS or varying doses (1; 2.5; 5 or 10 μ g per day) of rhIL7 for 7 days. (B) Representative flow cytometric analysis of CFSE dilution in CD4⁺_{PERI} CD90.2⁺ CD45.1⁺ T cells and CD4⁺_{RTEs} CD90.1⁺ CD45.2⁺ recovered from lymph nodes of PBS- or IL7-treated mice. (C) Graphical representation of the percentage \pm SE of proliferating CD4⁺_{PERI} CD90.2⁺ CD45.1⁺ T cells and CD4⁺_{RTEs} CD90.1⁺ CD45.2⁺ cells after 7 days of IL7 therapy with varying injection doses. (D) Graphical representation of the mean proportion \pm SE of CD4⁺_{RTEs} CD90.1⁺ CD45.2⁺ recovered from LN of mice treated with indicated concentrations of IL7. (E) Graphical summary of recovered T_{PERI} and T_{RTEs} \pm SE after 7 days of PBS or varying injection doses of IL7. 3 mice per group were analyzed in this experiment.

Figure S1. Phenotypic analysis of CD4⁺_{PERI} GFP⁺ and thymic CD4⁺ GFP⁺ T cells. Phenotypic analysis of the expression levels of CD45RB, CD69, β 7-integrin and CD62L on CD4⁺ peripheral RTEs (CD4⁺_{PERI} GFP⁺); peripheral T lymphocytes (CD4⁺_{PERI} GFP⁻) and RTEs (thymic CD4⁺ GFP⁺) T cells. Results show representative data of three independent experiments.

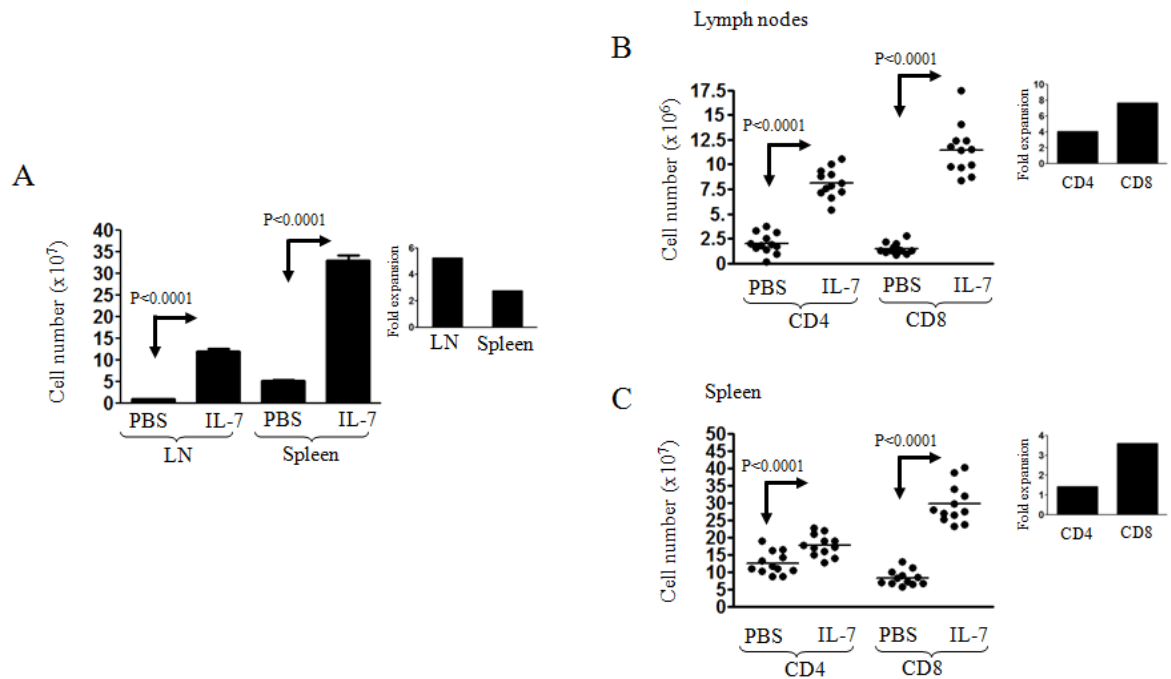


Figure 1. IL7 therapy induces T-cell expansion in lymph nodes and spleen of wild-type mice. Wild-type (WT) C57BL/6 adult mice (6-8 weeks old) received daily i.p. injections of either PBS or rhIL7 (10 μ g per day per mouse) for 7 days. (A) Graphical summary of mean absolute number \pm SE of lymph node (LNs) cells (2 axillary and 2 inguinal LNs were used for cell counts) and splenocytes of rhIL7- or PBS-treated animals. Inlet is showing the fold expansion of total cell numbers in LNs and spleen of rhIL7- compared to PBS-treated mice. (B-C) Graphical summary of absolute numbers \pm SE of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the LN and spleen of rhIL7- or PBS-treated mice. Inlets are showing the fold expansion of CD4⁺ or CD8⁺ T-cell numbers in rhIL7-treated *versus* PBS-treated mice. Data show 12 mice per group and were pooled from three independent experiments.

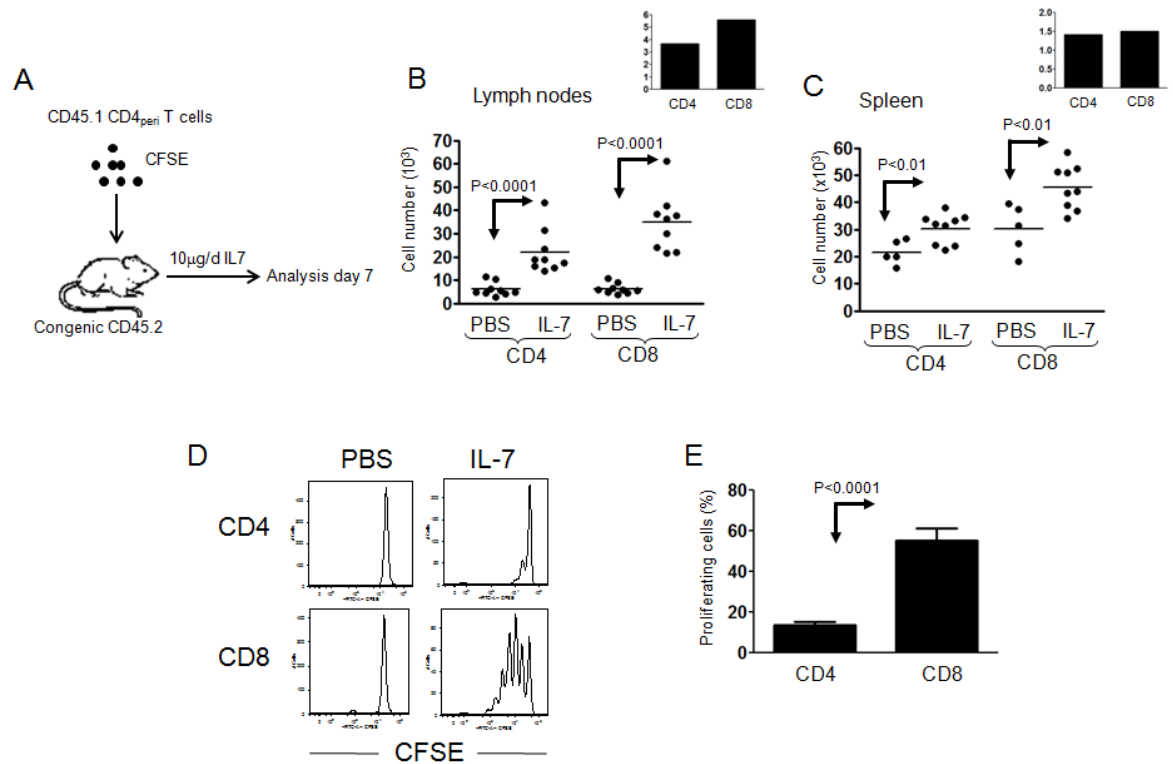


Figure 2. IL7 therapy induces preferential proliferation of peripheral CD8⁺ T cells. Peripheral T lymphocytes (CD4⁺_{PERI} and CD8⁺_{PERI}) were enriched from the lymph nodes of WT CD45.1⁺ mice, labeled with CFSE and intravenously transferred into WT CD45.2⁺ congenic recipients. After cell transfer, recipient mice were treated daily for 7 days with PBS or rhIL7. (A) Schematic representation of the experimental design where enriched T_{PERI} cells were administered to congenic recipients. (B) Graphical summary of absolute numbers \pm SE of CD4⁺_{PERI} CD45.1⁺ and CD8⁺_{PERI} CD45.1⁺ T cells in the LN and (C) spleen of PBS- and IL7-treated CD45.2⁺ congenic recipients. (D) Representative flow cytometric analysis of CD4⁺_{PERI} CD45.1⁺ and CD8⁺_{PERI} CD45.1⁺ T cells found in the LN of PBS- and rhIL7-treated congenic recipients. (E) Graphical summary of the percentage \pm SE of CD4⁺_{PERI} CD45.1⁺ and CD8⁺_{PERI} CD45.1⁺ T cells proliferating after 7 days of IL7 therapy based on CFSE dilution. Data show 5 or 9 mice per group and were pooled from two independent experiments.

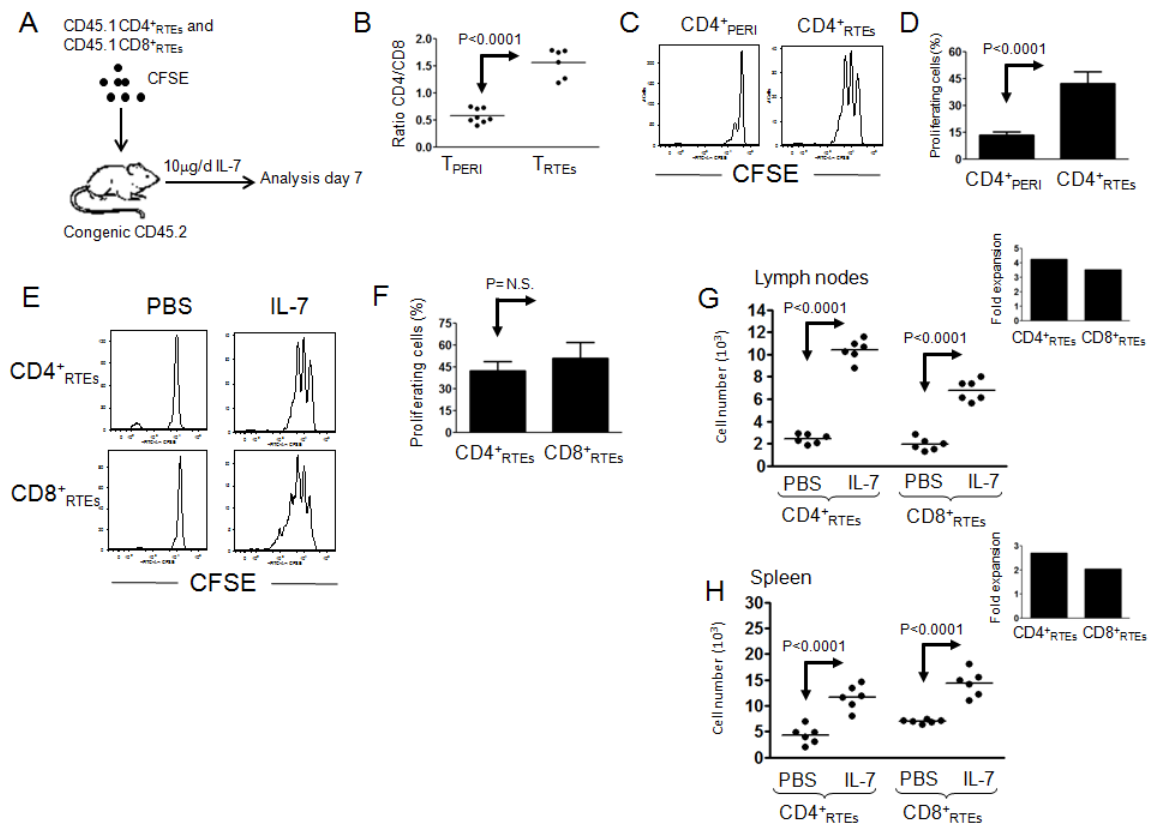


Figure 3. IL7 therapy induces stronger proliferation of CD4⁺ recent thymic emigrants (CD4⁺RTEs) compared to peripheral CD4⁺ T cells (CD4⁺PERI). (A) Schematic representation of the experimental design where enriched, CFSE-labeled CD4⁺CD45.1⁺ (CD4⁺RTEs) and CD8⁺CD45.1⁺ (CD8⁺RTEs) single positive thymocytes from WT CD45.1⁺ mice were mixed at a 1:1 ratio prior to their adoptive transfer into CD45.2⁺ congenic recipients. Recipient mice were treated daily with PBS or rhIL7 for 7 days. (B) Graphical summary of CD4/CD8 ratio of T_{PERI} and T_{RTEs} after 7 days of IL7 treatment. Data show between 6 and 8 mice per group pooled from two or three independent experiments. (C) Representative flow cytometric analysis of transferred CD4⁺PERI and CD4⁺RTEs found in the LN of PBS- or IL7-treated mice after 7 days of treatment. (D) Graphical summary of the percentage \pm SE of CD4⁺PERI and CD4⁺RTEs proliferating after 7 days of IL7 treatment. (E) Representative flow cytometric analysis of transferred CD4⁺RTEs and CD8⁺RTEs found in the LN of PBS- and IL7-treated mice. (F) Graphical summary of the percentage \pm SE of CD4⁺RTEs and CD8⁺RTEs proliferating after 7 days in response to IL7 therapy. (G-H) Graphical summary of the absolute numbers \pm SE of CD4⁺RTEs and CD8⁺RTEs found in LN and spleen of PBS- and IL7-treated recipients. Insets are showing fold expansion of

CD4⁺_{RTEs} and CD8⁺_{RTEs} in LN and spleen of PBS- *versus* IL7-treated animals. Data show 6 mice per group pooled from two independent experiments.

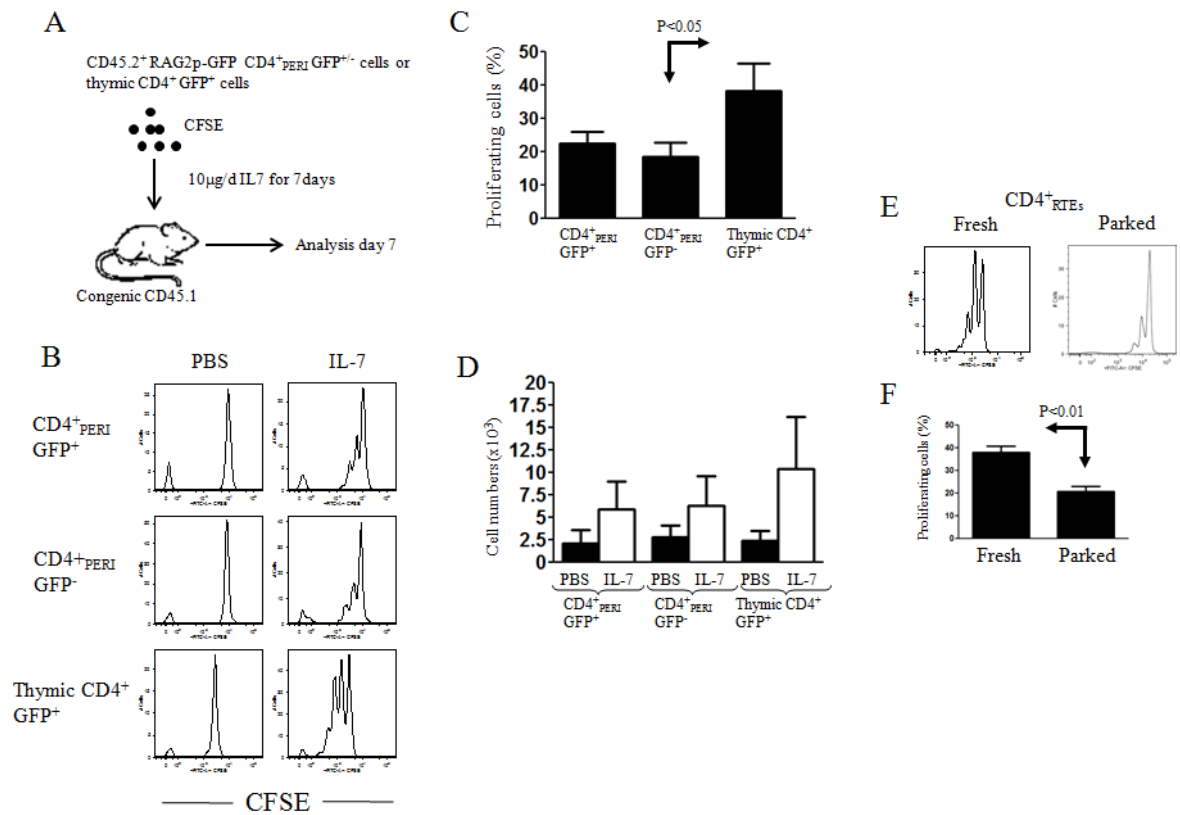


Figure 4. CD4⁺PERI GFP⁺ and thymic CD4⁺ GFP⁺ T cells respond differently to IL7 therapy. (A) Graphical representation of the experimental design where CD45.2⁺ CD4⁺PERI GFP⁺, CD45.2⁺ CD4⁺PERI GFP⁻ and thymic CD45.2⁺ CD4⁺ GFP⁺ T cells were sorted from lymph nodes or thymuses of wild-type RAG2p-GFP mice and stained with CFSE prior to transfer into congenic CD45.1⁺ mice. Recipient mice were treated i.p. with PBS or rhIL7 (10 μg per day) for 7 days. (B) Representative flow cytometric analysis of transferred CD4⁺PERI GFP⁺ and CD4⁺PERI GFP⁻ and thymic CD4⁺ GFP⁺ T cells recovered from LN of PBS- and IL7-treated animals 7 days post-transfer. (C) Graphical summary of the percentage \pm SE of CD4⁺PERI GFP⁺, CD4⁺PERI GFP⁻ and thymic CD4⁺ GFP⁺ cells proliferating after 7 days of IL7 therapy. (D) Graphical summary of the absolute numbers \pm SE of CD4⁺PERI GFP⁺, CD4⁺PERI GFP⁻ and thymic CD4⁺ GFP⁺ cells after 7 days of PBS or IL7 therapy. Data show 3 mice per group pooled from three independent experiments. (E) Representative flow cytometric analysis and (F) graphical summary of the percentage \pm SE of transferred WT CD4⁺RTEs into WT congenic recipients proliferating with IL7 therapy started immediately upon or 3 days after transfer. Data show 2 or 3 mice per group pooled from two independent experiments.

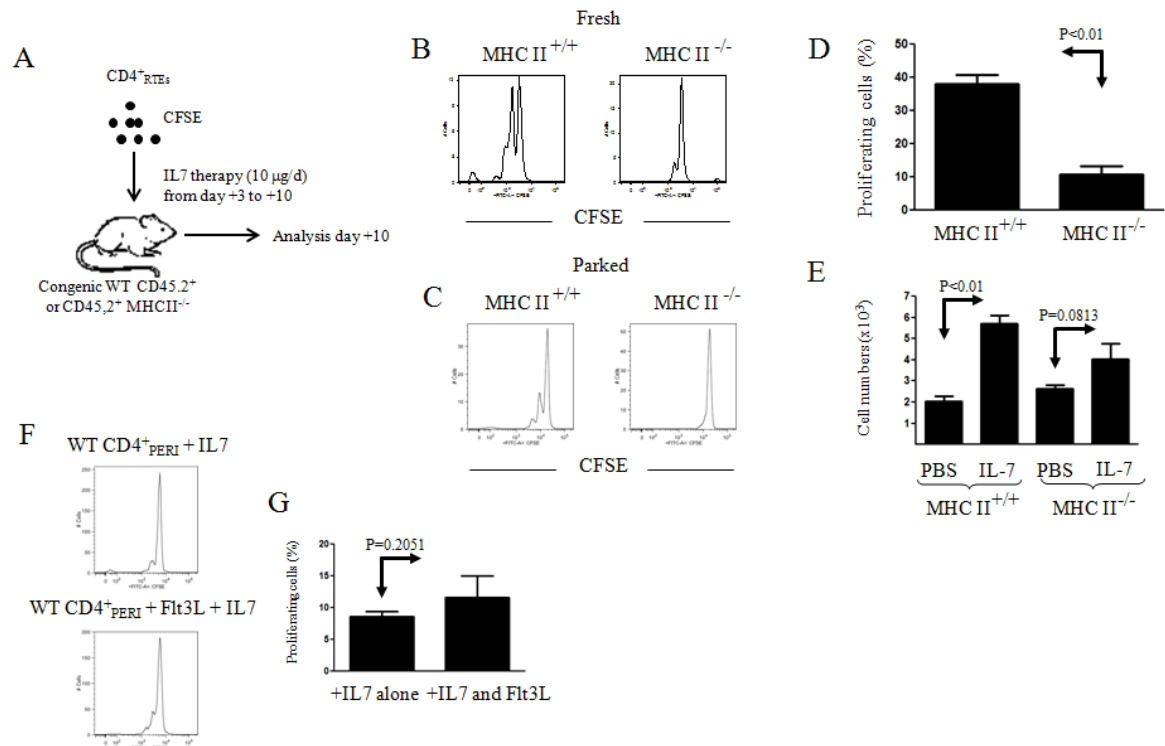


Figure 5. $CD4^+$ RTEs require TCR/MHCII contact to proliferate under IL7. (A) Graphical representation of the experimental design where $CD4^+$ RTEs $CD45.1^+$ were CFSE-labeled and transferred into WT $CD45.2^+$ ($MHCII^{+/+}$) or $CD45.2^+$ $MHCII^{-/-}$ mice. Cells were parked for three days into their respective recipients before PBS or IL7 treatment was started. (B-C) Representative flow cytometric analysis of transferred $CD4^+$ RTEs into $MHC^{+/+}$ or $MHC^{-/-}$ recipients in which IL7 therapy was started immediately upon transfer or after 3 days of parking. (D) Graphical summary of the percentage \pm SE of proliferating $CD4^+$ RTEs transferred into congenic $MHCII^{+/+}$ or $MHCII^{-/-}$ hosts with IL7 therapy begun immediately after transfer. (E) Graphical summary of the absolute numbers \pm SE of $CD4^+$ RTEs transferred into congenic WT or $MHCII^{-/-}$ hosts after 7 days of IL7 therapy. (F) Representative flow cytometric analysis and (G) magnitude of proliferation \pm SE of transferred $CD4^+$ PERI T cells from PBS- or Flt3L-treated mice into WT PBS- or IL7-treated congenic recipient mice. Data show 2 or 3 mice per group pooled from two independent experiments.

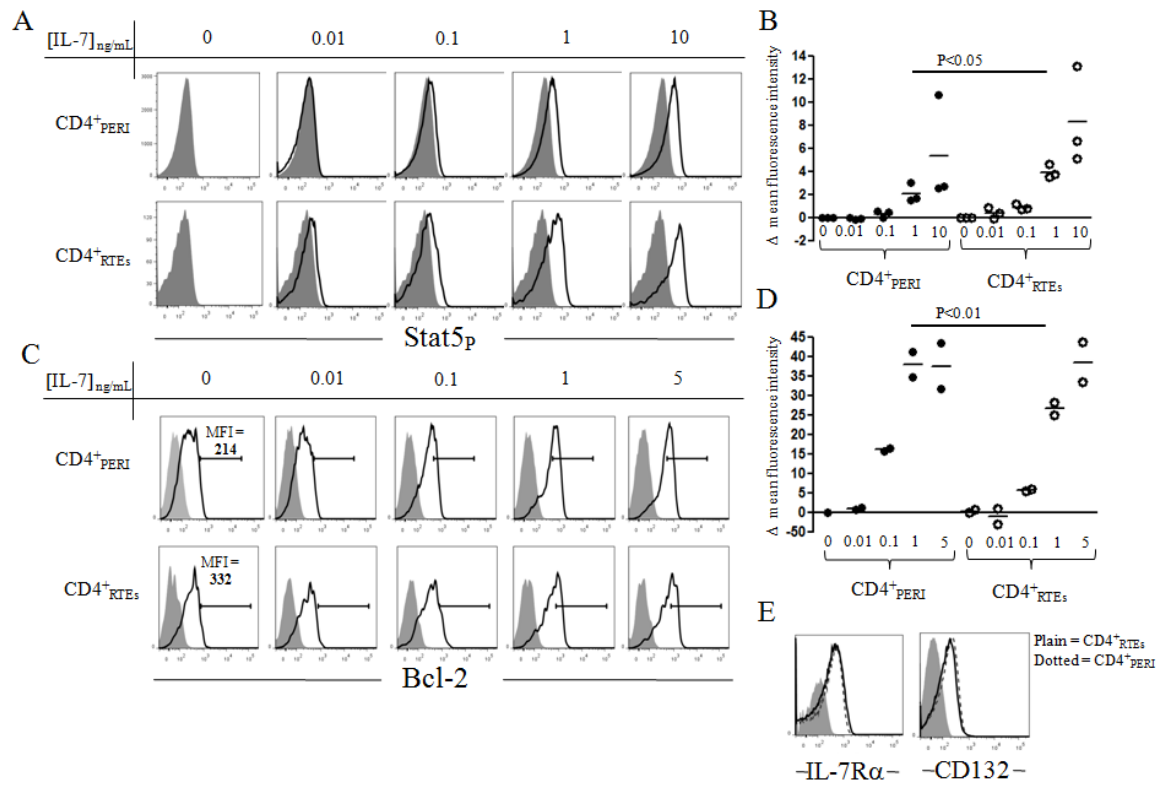


Figure 6. CD4⁺ RTEs are more sensitive to IL7 therapy than CD4⁺ PERI T cells. (A) *In vitro* evaluation of STAT5 phosphorylation in CD4⁺ RTEs and CD4⁺ PERI T cells stimulated with varying concentration of rhIL7. (B) Graphical summary of Δ mean fluorescence (MFI X – MFI 0) \pm SE of STAT5 phosphorylation in CD4⁺ RTEs and CD4⁺ PERI T cells exposed to varying concentration of rhIL7. Results are representative of three independent experiments. (C) *In vitro* evaluation of IL7-induced Bcl-2 expression in CD4⁺ RTEs and CD4⁺ PERI T cells stimulated with varying concentration of rhIL7 for 24 hours. (D) Graphical summary of Δ mean fluorescence (MFI X – MFI 0) \pm SE of Bcl-2 induction in CD4⁺ RTEs and CD4⁺ PERI T cells exposed to varying concentration of rhIL7 for 24 hours. Results are representative of two independent experiments. (E) Representative flow cytometric analysis of IL7R α (CD127) and common γ chain (CD132) evaluated on freshly isolated CD4⁺ RTEs and CD4⁺ PERI T cells.

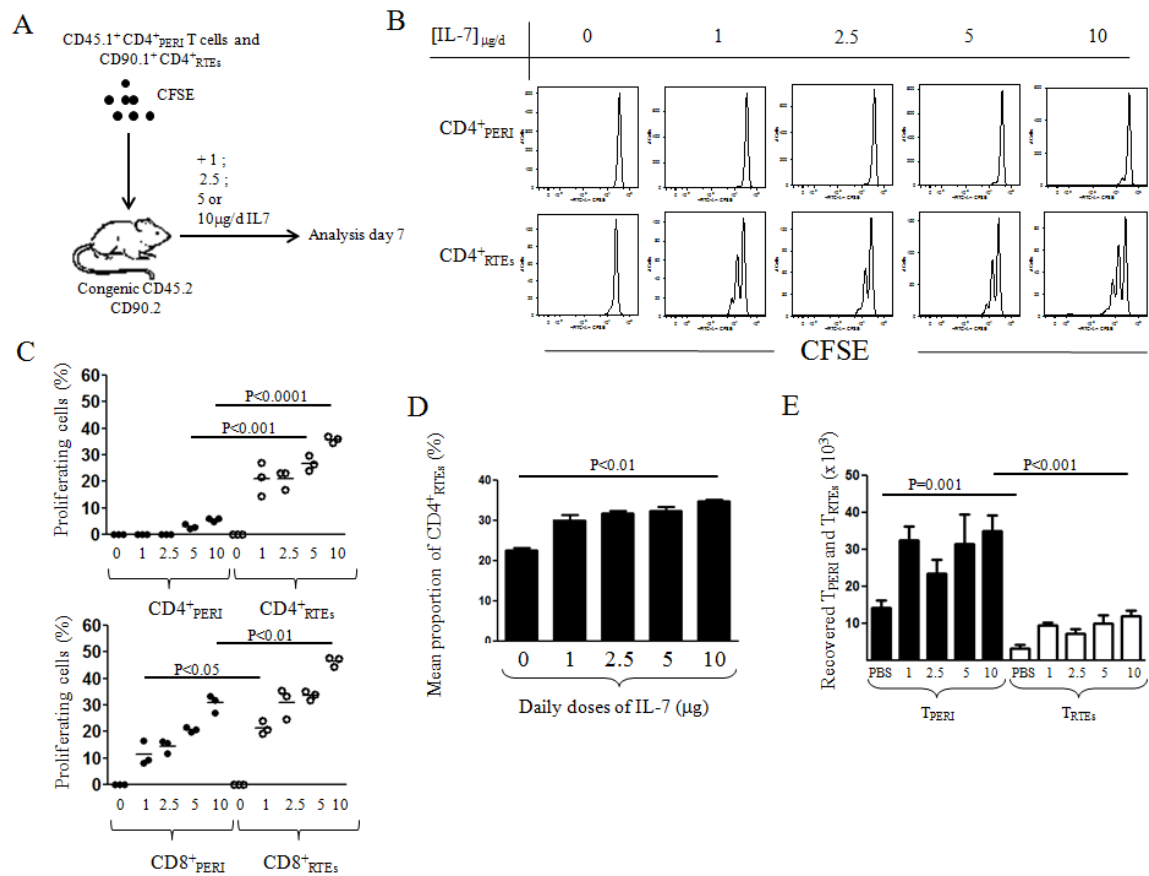


Figure 7. CD4⁺RTEs are more responsive to IL7 therapy than CD4⁺PERI. (A) Graphical representation of the experimental design where CD4⁺PERI CD90.2⁺ CD45.1⁺ T cells and CD4⁺RTEs CD90.1⁺ CD45.2⁺ were transferred into WT CD90.2⁺ CD45.2⁺ recipients. Mice were treated daily with either PBS or varying doses (1; 2.5; 5 or 10 μg per day) of rhIL7 for 7 days. (B) Representative flow cytometric analysis of CFSE dilution in CD4⁺PERI CD90.2⁺ CD45.1⁺ T cells and CD4⁺RTEs CD90.1⁺ CD45.2⁺ recovered from lymph nodes of PBS- or IL7-treated mice. (C) Graphical representation of the percentage ± SE of proliferating CD4⁺PERI CD90.2⁺ CD45.1⁺ T cells and CD4⁺RTEs CD90.1⁺ CD45.2⁺ cells after 7 days of IL7 therapy with varying injection doses. (D) Graphical representation of the mean proportion ± SE of CD4⁺RTEs CD90.1⁺ CD45.2⁺ recovered from LN of mice treated with indicated concentrations of IL7. (E) Graphical summary of recovered T_{PERI} and T_{RTEs} ± SE after 7 days of PBS or varying injection doses of IL7. 3 mice per group were analyzed in this experiment.

S1

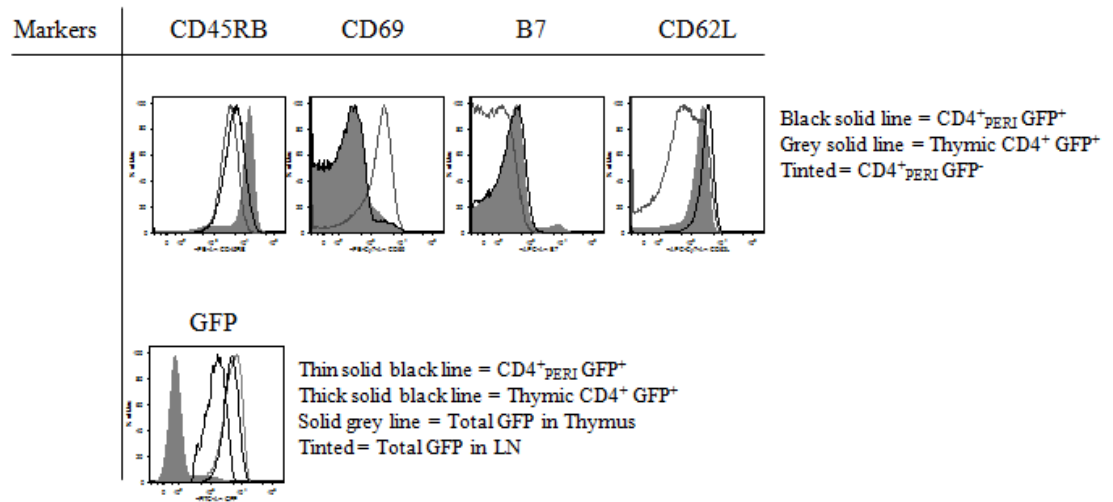


Figure S1. Phenotypic analysis of CD4⁺PERI GFP⁺ and thymic CD4⁺ GFP⁺ T cells. Phenotypic analysis of the expression levels of CD45RB, CD69, β 7-integrin and CD62L on CD4⁺ peripheral RTEs (CD4⁺PERI GFP⁺); peripheral T lymphocytes (CD4⁺PERI GFP⁻) and RTEs (thymic CD4⁺ GFP⁺) T cells. Results show representative data of three independent experiments.

REFERENCES

1. Surh, C.D., et al., *Homeostasis of memory T cells*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 154-63.
2. Stockinger, B., C. Bourgeois, and G. Kassiotis, *CD4+ memory T cells: functional differentiation and homeostasis*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 39-48.
3. Boyman, O., et al., *Cytokines and T-cell homeostasis*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 320-6.
4. Guimond, M., T.J. Fry, and C.L. Mackall, *Cytokine signals in T-cell homeostasis*. J Immunother, 2005. **28**(4): p. 289-94.
5. Goldrath, A.W. and M.J. Bevan, *Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire*. Nature, 1999. **402**(6759): p. 255-62.
6. Murali-Krishna, K., et al., *Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1377-81.
7. Tan, J.T., et al., *IL7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8732-7.
8. Ge, Q., et al., *Homeostatic T cell proliferation in a T cell-dendritic cell coculture system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 2983-8.
9. Surh, C.D. and J. Sprent, *Regulation of naive and memory T-cell homeostasis*. Microbes Infect, 2002. **4**(1): p. 51-6.
10. Surh, C.D., et al., *Factors regulating naive T cell homeostasis*. Adv Exp Med Biol, 2002. **512**: p. 73-80.
11. Fry, T.J., et al., *A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis*. Blood, 2001. **97**(10): p. 2983-90.
12. Fry, T.J. and C.L. Mackall, *Interleukin-7: from bench to clinic*. Blood, 2002. **99**(11): p. 3892-904.
13. Alves, N.L., et al., *Characterization of the thymic IL7 niche in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(5): p. 1512-7.

14. van Lent, A.U., et al., *IL7 enhances thymic human T cell development in "human immune system" Rag2-/-IL2Rgamma-/- mice without affecting peripheral T cell homeostasis*. J Immunol, 2009. **183**(12): p. 7645-55.
15. Mazzucchelli, R.I., et al., *Visualization and identification of IL7 producing cells in reporter mice*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7637.
16. Peschon, J.J., et al., *Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1955-60.
17. von Freeden-Jeffry, U., et al., *Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL7 as a nonredundant cytokine*. J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1519-26.
18. Chu, Y.W., et al., *Exogenous IL7 increases recent thymic emigrants in peripheral lymphoid tissue without enhanced thymic function*. Blood, 2004. **104**(4): p. 1110-9.
19. Rosenberg, S.A., et al., *IL7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells*. J Immunother, 2006. **29**(3): p. 313-9.
20. Sportes, C., et al., *Administration of rhIL7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1701-14.
21. Sportes, C., et al., *Phase I study of recombinant human interleukin-7 administration in subjects with refractory malignancy*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(2): p. 727-35.
22. Hakim, F.T., et al., *Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults*. J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 930-9.
23. Hassan, J. and D.J. Reen, *IL7 and homeostasis of recent thymic emigrants*. Trends Immunol, 2002. **23**(3): p. 126-7.
24. Fry, T.J., et al., *Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts*. Blood, 2001. **97**(6): p. 1525-33.
25. Sinha, M.L., et al., *Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2642-9.
26. Fry, T.J., et al., *IL7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2294-9.

27. Guimond, M., et al., *Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4⁺ T cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 149-57.
28. Gabor, M.J., D.I. Godfrey, and R. Scollay, *Recent thymic emigrants are distinct from most medullary thymocytes*. Eur J Immunol, 1997. **27**(8): p. 2010-5.
29. Yang, S.J., et al., *The quantitative assessment of MHC II on thymic epithelium: implications in cortical thymocyte development*. Int Immunol, 2006. **18**(5): p. 729-39.
30. Gray, D.H., et al., *Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells*. Blood, 2006. **108**(12): p. 3777-85.
31. Guimond, M., et al., *In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis*. J Immunol, 2010. **184**(6): p. 2769-75.
32. Houston, E.G., Jr., L.E. Higdon, and P.J. Fink, *Recent thymic emigrants are preferentially incorporated only into the depleted T-cell pool*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(13): p. 5366-71.

Chapitre 3

DISCUSSION

3.1 Rappel de l'hypothèse du projet et des résultats obtenus

Nous avons postulé que dans un environnement non-lymphopénique, la thérapie à l'interleukine-7 (IL7) favorise la prolifération homéostatique (HPE; Homeostatic Peripheral Expansion) des émigrants thymiques $CD4^+$ ($CD4^+_{RTEs}$) par rapport à leurs homologues matures de la périphérie ($CD4^+_{PERI}$).

L'administration exogène d'IL7 recombinante humaine à des souris de type sauvage (WT) mène à une prolifération efficace des lymphocytes T $CD8^+$ périphériques ($CD8^+_{PERI}$) ainsi que des émigrants thymiques $CD8^+$ ($CD8^+_{RTEs}$). Par contre, son effet prolifératif au niveau des lymphocytes T $CD4^+$ est restreint presque uniquement aux émigrants thymiques ($CD4^+_{RTEs}$).

Étonnamment, de plus faibles doses d'IL7 sont suffisantes aux $CD4^+_{RTEs}$ afin de phosphoryler STAT5 ou de proliférer comparativement aux $CD4^+_{PERI}$, alors que l'expression du récepteur à l'IL7 et de la chaîne commune γc à la surface des $CD4^+_{RTEs}$ et $CD4^+_{PERI}$ est similaire. De même, lorsque stimulés avec différentes doses d'IL7, les $CD4^+_{PERI}$ semblent induire le facteur anti-apoptotique Bcl-2 plus rapidement que les $CD4^+_{RTEs}$. Par contre, lorsque injectés ensemble dans un même hôte WT, les $CD4^+_{RTEs}$ sont désavantagés; leur nombre retrouvé après 7 jours de traitement à l'IL7 étant significativement inférieur à celui des $CD4^+_{PERI}$.

Nous avons utilisé le modèle murin transgénique RAG2p-GFP afin d'effectuer une analyse phénotypique sur l'expression de différents marqueurs précédemment décrits [243], des $CD4^+_{RTEs}$ que nous isolons du thymus ou de la périphérie et des $CD4^+_{PERI}$. Nous montrons que les RTEs périphériques affichent un phénotype plus proche des $CD4^+_{PERI}$ que des $CD4^+_{RTEs}$, ce qui suggère leur intégration prochaine à la niche périphérique. Nous démontrons ensuite que suite à la thérapie à l'IL7, les $CD4^+_{RTEs}$ présents en périphérie ne prolifèrent pas plus que leurs homologues matures, à la différence des $CD4^+_{RTEs}$, ce qui suggère que l'intégration à la niche périphérique est accompagnée d'une diminution de la sensibilité à l'IL7. De fait, lorsque la thérapie à l'IL7 est commencée 3 jours après

l'injection des $CD4^{+}_{RTEs}$ dans un hôte WT, l'intensité de la prolifération observée après 7 jours de thérapie est diminuée de près de la moitié.

Par conséquent, afin de tester si le contact TCR/CMHII est nécessaire aux lymphocytes T $CD4^{+}$ pour proliférer sous la thérapie à l'IL7, nous avons injecté les $CD4^{+}_{RTEs}$ et $CD4^{+}_{PERI}$ dans des hôtes déficients en molécules de CMHII ($CMHII^{-/-}$) et les avons traités ou non à l'IL7 pendant 7 jours. Nous avons alors observé que la prolifération des $CD4^{+}_{PERI}$ n'était plus détectable, par contre, les $CD4^{+}_{RTEs}$ affichaient une prolifération résiduelle. Afin de vérifier si cette prolifération est indépendante du contact TCR/CMHII, les $CD4^{+}_{RTEs}$ ont été injectés dans les mêmes hôtes $CMHII^{-/-}$, mais la thérapie à l'IL7 n'a été commencée que 3 jours après l'injection des cellules. Aucune prolifération des $CD4^{+}_{RTEs}$ n'a alors été observée.

Finalement, nous avons vérifié si le nombre de contacts TCR/CMHII reçus par les lymphocytes T $CD4^{+}$ avait un lien avec la sensibilité des cellules à l'IL7. A cette fin, nous avons traité une souris au Flt3L (Flt3L) afin d'augmenter artificiellement le nombre de cellules dendritiques en périphérie. Les lymphocytes T ont ensuite été isolés et transférés dans une souris receveuse traitée à l'IL7. Nous démontrons qu'une augmentation de l'intensité de la prolifération des $CD4^{+}_{PERI}$ de près de la moitié est alors induite.

3.2 Mise en contexte avec la littérature et discussion des résultats

Le processus des sélections positive et négative au cours de la thymopoïèse permet à un petit pourcentage de thymocytes de survivre et de quitter le thymus. De fait, ces thymocytes sont composés d'une proportion importante de cellules possédant un TCR de faible affinité contre les antigènes du Soi. Les thymocytes nouvellement sortis du thymus, appelés «émigrants thymiques» (RTEs), sont appelés à devenir des cellules T naïves matures dans les organes lymphoïdes secondaires [284]. Les cellules T naïves matures gardent une faible réactivité contre les antigènes du Soi; n'étant pas assez forte pour causer de l'auto-immunité, cette réactivité est néanmoins nécessaire à leur maintien en périphérie

[285]. L'activation cellulaire est induite par la présentation d'antigènes du non-Soi par des pathogènes et mène à une prolifération massive et une différenciation des cellules naïves en cellules effectrices. Une fois la réponse immune terminée, la très grande majorité des cellules effectrices meurt par apoptose. Un petit pourcentage demeure cependant sous la forme de cellules T mémoires [172].

Le mécanisme qui régit la survie, la prolifération et la mort des cellules T matures de la périphérie est appelé «homéostasie». Plusieurs études ont montré que deux signaux sont impliqués dans ce mécanisme, le contact du TCR avec les antigènes du Soi présentés par le CMH et les cytokines de la famille γ_c , particulièrement l'IL7 et l'IL15 [172, 248, 251, 255, 257]. L'homéostasie des lymphocytes T naïfs repose sur le contact TCR/CMH et les signaux transmis par l'IL7 alors que l'homéostasie des lymphocytes T mémoires est majoritairement indépendante du contact TCR/CMH et repose principalement sur les signaux délivrés par l'IL7 et l'IL15 [216, 286, 287].

L'IL7 est une cytokine homéostatique cruciale pour l'ontogénie et l'homéostasie des cellules T chez la souris comme chez l'Homme [171, 172]. De fait, les patients atteints de X-SCID sont déficients en lymphocytes T, principalement à cause du dommage à la voie de signalisation de l'IL7 [167] et les animaux déficients en IL7 ou ne possédant pas la chaîne α de son récepteur n'ont pas de lymphocytes T [263, 264]. Du fait de son rôle fondamental dans l'homéostasie des lymphocytes T, plusieurs études cliniques [209, 218, 221] ont évalué le potentiel régénérateur de l'IL7 dans différents cas de lymphopénie. Ces études ont démontré entre autres que la thérapie à l'IL7 induit une augmentation du nombre absolu de lymphocytes T par l'expansion préférentielle des lymphocytes T naïfs et que cette expansion favorise les lymphocytes T CD8⁺, menant à un ratio CD4/CD8 inversé chez ces patients. De même, une étude a montré que l'administration exogène d'IL7 à des souris WT entraîne une expansion du nombre de cellules des ganglions lymphatiques et de la rate de près de 4 fois ainsi qu'une prolifération démesurée des lymphocytes T CD8⁺ menant à un ratio CD4/CD8 inversé [225].

Après avoir traité des souris WT avec de l'IL7 recombinante humaine (rhIL7), nous obtenons les mêmes effets que ceux observés chez l'Homme et confirmons les résultats de

l'étude de cette étude, à savoir une expansion globale des lymphocytes T périphériques avec un effet plus marqué au niveau des T CD8⁺. De plus, après un transfert adoptif de lymphocytes T périphériques et de RTEs dans des hôtes WT contrôles (recevant de la saline) et WT traités à l'IL7, nous retrouvons un nombre supérieur de cellules injectées dans les hôtes traités à la cytokine, ce qui suggère un effet anti-apoptotique de l'IL7 au niveau des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. En fait, cet effet est visible pour les lymphocytes T_{PERI}; les nombres de CD4⁺_{RTEs} et des CD8⁺_{RTEs} retrouvés étant beaucoup plus faibles. De plus, la thérapie à l'IL7 induit une prolifération massive des CD8⁺_{PERI} et CD8⁺_{RTEs}, alors que cette prolifération n'est visible, pour les CD4⁺, qu'au niveau des RTEs, ce qui suggère un effet différent de la cytokine au niveau de ces deux sous-types. Ces résultats sont en accord avec ce qui est observé dans les cas de régénération lymphocytaire, où les lymphocytes T CD8⁺ reviennent plus rapidement que les lymphocytes T CD4⁺. De plus, une étude a récemment montré dans des modèles murins que, dans des conditions normales, les RTEs sont moins bons compétiteurs par rapport aux cellules T matures de la périphérie. L'étude montre que ce n'est, par contre, pas le cas dans des conditions lymphopéniques, où les RTEs sont alors préférentiellement incorporés en périphérie [278].

L'IL7 induit la survie des lymphocytes en régulant la balance d'expression des facteurs pro- et anti-apoptotiques. En effet, la cytokine induit l'expression des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 et réprime l'expression des facteurs pro-apoptotiques Bad, Bax et Bim [279]. Pendant longtemps, le mécanisme derrière l'effet prolifératif de l'IL7 était inconnu; Li *et al.* ont montré que l'IL7 agit directement au niveau du cycle cellulaire en réprimant la kinase p27^{Kip1} [279].

Nos résultats semblent indiquer que les CD4⁺_{PERI} induisent l'expression de Bcl-2 plus rapidement que les CD4⁺_{RTEs}, malgré le degré d'expression similaire du récepteur à l'IL7 et de la chaîne commune γ c. Ces résultats expliqueraient le faible nombre de CD4⁺_{RTEs} retrouvés après 7 jours de thérapie à l'IL7 par rapport aux CD4⁺_{PERI}. De fait, l'expression de Bcl-2 ne constituant pas directement une mesure de la survie cellulaire, une évaluation des taux d'apoptose cellulaire par une mesure de l'annexine-5 ou de l'activation

de la caspase 3 sur les $CD4^+$ _{PERI} et $CD4^+$ _{RTEs} confirmerait les résultats obtenus et l'effet anti-apoptotique de l'IL7.

L'IL7, comme l'IL2, exerce son effet anti-apoptotique en induisant la phosphorylation du facteur de transcription FOXO3a par l'activation de la voie de la PI3 kinase et du facteur Akt; FOXO3a induisant l'expression du facteur pro-apoptotique Bim [136]. Le TCR peut également promouvoir la survie des cellules par l'engagement du CD3 couplé à la molécule de co-stimulation CD28. En effet, le TCR/CD28 induit la phosphorylation de FOXO3a à un site différent de celui des cytokines IL2 et IL7, mais le facteur Akt est également impliqué [136]. Sachant que la voie PI3 kinase/Akt est nécessaire à l'IL7 pour induire son effet anti-apoptotique [288], Akt apparaît donc comme un facteur crucial de régulation de la survie cellulaire. Dus aux nombreuses cellules exprimant les molécules de CMHII dans le thymus, les contacts TCR/CMHII y sont plus nombreux qu'en périphérie, ce qui expliquerait les niveaux basaux plus élevés de Bcl-2 observés sur les $CD4^+$ _{RTEs} que sur les $CD4^+$ _{PERI}. Lors d'un transfert adoptif, les $CD4^+$ _{RTEs} sont injectés en périphérie; certaines études démontrant que les RTEs ont besoin de maturation supplémentaire à leur sortie du thymus [247, 289], la diminution soudaine de contacts TCR/CMHII disponibles, malgré l'administration d'IL7, expliquerait en partie le nombre diminué de $CD4^+$ _{RTEs} retrouvés après 7 jours de traitement à l'IL7.

Plusieurs études ont évalué la maturité des RTEs par rapport aux lymphocytes T de la périphérie. Certaines ont démontré que les RTEs possèdent une maturité comparable aux lymphocytes T matures, évaluable par leur production d'IL4, d'IFN- γ , d'IL2 et au niveau de leur capacité proliférative [290, 291]. D'autres ont démontré que les RTEs produisent moins d'IL2 et ont une moins grande capacité proliférative que les lymphocytes T de la périphérie [240, 247, 292]. Une étude a également montré que les niveaux de production d'IL2 et d'IFN- γ par les RTEs dépendent des conditions d'activation de ces cellules [293]. Récemment, l'équipe de Fink a démontré que les RTEs subissent une maturation en périphérie [247] et la même équipe a démontré, dans un modèle *in vitro*, que les $CD4^+$ _{RTEs} affichent préférentiellement un phénotype Th2 avec une production d'IL4, IL5 et IL13 plus élevée que leurs homologues de la périphérie, ainsi qu'une expression diminuée de T-bet,

un facteur de transcription majeur du phénotype Th1 [289]. D'après l'équipe de Fink, ce phénotype pourrait être bénéfique dans des conditions lymphopéniques afin d'éviter des réponses immunes inappropriées.

Par conséquent, afin d'évaluer la réponse proliférative induite par l'IL7 des $CD4^+_{RTEs}$ présents en périphérie par rapport aux $CD4^+_{RTEs}$ et aux $CD4^+_{PERI}$, nous avons utilisé le modèle transgénique RAG2p-GFP (permettant l'identification des RTEs en périphérie). Nous démontrons que, suite à la thérapie à l'IL7, les $CD4^+_{RTEs}$ présents en périphérie ne prolifèrent pas beaucoup plus que leurs homologues matures, contrairement aux $CD4^+_{RTEs}$ qui, eux, affichent une prolifération significativement plus importante, ce qui suggère que l'intégration à la niche périphérique implique une diminution de la sensibilité à l'IL7. De plus, lorsque la thérapie à l'IL7 est commencée 3 jours après l'injection des $CD4^+_{RTEs}$ dans un hôte WT, l'intensité de la prolifération observée après 7 jours de thérapie est diminuée de près de la moitié. Sachant que l'IL7 est produite de manière constitutive en état de repos et est possiblement disponible en quantités supérieures dans le microenvironnement thymique qu'en périphérie [282], nous avons testé cette hypothèse en transférant, en quantité égale dans des mêmes hôtes WT, les $CD4^+_{RTEs}$ et les $CD4^+_{PERI}$ et avons traité les receveurs avec différentes doses croissantes d'IL7. Nous démontrons qu'en effet, les $CD4^+_{RTEs}$ ont besoin de plus faibles doses d'IL7 afin de proliférer, par rapport aux $CD4^+_{PERI}$. Nous avons également comparé l'induction de la phosphorylation de STAT5, une protéine dans la voie de signalisation du récepteur de l'IL7, nécessaire à la survie à long terme des lymphocytes T $CD4^+$ [294], par différentes doses d'IL7 *in vitro* et confirmé que les $CD4^+_{RTEs}$ ont besoin de moins grandes quantités d'IL7 que les $CD4^+_{PERI}$ pour phosphoryler STAT5. Ces résultats démontrent donc que les $CD4^+_{RTEs}$ sont plus sensibles à l'IL7 que leurs homologues matures de la périphérie.

Deux études se sont penchées sur le besoin du contact TCR/CMHII des $CD4^+_{RTEs}$ pour proliférer. Hassan et Reen ont d'abord démontré que les $CD4^+_{RTEs}$ humains, provenant de sang de cordon ombilical n'ont pas besoin du contact TCR/CMHII afin de proliférer; que seule l'IL7 suffit [236]. Opiela *et al.* ont ensuite démontré *in vitro* que les seuls RTEs proliférant avec l'IL7 uniquement, sans contact TCR/CMHII, sont les RTEs très immatures,

présents chez les nouveaux-nés et que les RTEs adultes ne peuvent pas proliférer sans les deux signaux transmis, à la fois par l'IL7 et le TCR [293]. Considérant ces résultats, nous avons évalué si, dans un modèle *in vivo* déficient en CMHII (CMHII^{-/-}), les niveaux supra-physiologiques d'IL7 induits par la thérapie pouvaient être suffisants pour permettre la prolifération des CD4⁺_{RTEs} et des CD4⁺_{PERI} de manière indépendante du TCR. Nous démontrons que, de fait, le contact TCR/CMHII est nécessaire aux CD4⁺_{PERI} pour proliférer avec la thérapie. Toutefois, nous avons observé une prolifération résiduelle des CD4⁺_{RTEs}. Afin de vérifier si cette prolifération était bien indépendante du TCR, nous avons effectué un «parking» des cellules en attendant 3 jours après le transfert avant de commencer la thérapie à l'IL7. Nous n'avons alors observé aucune prolifération des CD4⁺_{RTEs}, confirmant le fait que le contact TCR/CMHII reçu dans le thymus était responsable de la prolifération résiduelle observée.

Par conséquent, les observations que 1) les CD4⁺_{RTEs} prolifèrent mieux et plus rapidement à l'IL7 que les CD4⁺_{PERI}; 2) qu'ils induisent la phosphorylation de STAT5 à une dose plus faible que les CD4⁺_{PERI}; 3) que les CD4⁺_{RTEs} présents en périphérie répondent moins bien à la thérapie à l'IL7 que les CD4⁺_{RTEs} isolés du thymus; 4) qu'une prolifération résiduelle est observée dans les hôtes CMHII^{-/-} et que l'intensité de la prolifération des CD4⁺_{RTEs} est diminuée de la moitié lorsque la thérapie à l'IL7 est commencée 3 jours après le transfert dans des hôtes WT, et enfin 5) que cette prolifération est abolie lorsque la thérapie est commencée 3 jours après le transfert dans les CMHII^{-/-}, nous ont mené à poser l'hypothèse que le contact TCR/CMHII contrôle la sensibilité à l'IL7 des CD4⁺_{RTEs}. En effet, le thymus est un organe riche en cellules produisant l'IL7 et exprimant les molécules de CMHII, parmi lesquelles les cellules épithéliales corticales (cTEC) et médullaires (mTEC) ainsi que les cellules dendritiques (DCs) [283]. De fait, une étude a récemment montré que les cellules épithéliales thymiques (TEC) produisant les plus hauts niveaux d'IL7 sont aux jonctions cortico-médullaires [282]. Les DCs du thymus, étant principalement localisées dans la médulla thymique et aux jonctions cortico-médullaires [295, 296], pourraient donc «conditionner» les RTEs à une réponse efficace à l'IL7. Les cellules dendritiques du thymus sont séparées en deux groupes distincts; la très grande

majorité des DCs retrouvées dans le thymus sont produites à partir des précurseurs des thymocytes (ETP; Early Thymic Progenitors) et expriment le marqueur CD8 α . Toutefois, une minorité de cellules dendritiques présentes dans le thymus sont CD8 α ⁻ mais expriment le marqueur Sirp- α et ne dérivent pas des ETP [297]. Bonasio *et al.* ont récemment démontré que les DCs Sirp- α ⁺ sont des DCs circulantes capables de rentrer dans le thymus. Un rôle leur a été attribué dans l'induction de la tolérance centrale et dans la génération des T régulateurs [298]. Étant majoritairement présentes dans la médulla, les cellules dendritiques du thymus jouent donc un rôle essentiel dans la sélection négative des thymocytes [297]; même si une étude récente montre que la sélection négative peut se faire dans le cortex thymique sans aucune implication de la médulla [299]. Les contacts TCR/CMHII reçus dans la médulla contrôleraient donc la sensibilité à l'IL7 des CD4⁺_{RTEs}. Une étude a, de fait, récemment démontré chez des souris nouveau-nées que le traitement au Flt3L augmente l'expression du CMHII à la surface de toutes les DCs périphériques [300].

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons artificiellement augmenté le nombre de cellules dendritiques en périphérie en traitant une souris WT avec du Flt3 ligand (Flt3L), qui est un facteur de croissance essentiel pour les cellules dendritiques et les cellules NK. Le récepteur du Flt3L (CD135) est exprimé à la surface de certains sous-types de cellules hématopoïétiques, en particulier les MPP et les CLP. Il n'est pas exprimé à la surface des lymphocytes matures et aucune étude ne rapporte actuellement un effet direct du Flt3L sur ces cellules [277, 301-303]. Après traitement exogène au Flt3L, nous observons que le pourcentage de DCs conventionnelles en périphérie augmente de près de la moitié, alors que le pourcentage de pDCs augmente de près de 6 fois (Figure annexe 1). Nous avons ensuite isolé les CD4⁺_{RTEs} et les CD4⁺_{PERI} de la souris traitée et les avons transférés dans une autre souris WT que nous avons traitée à l'IL7. Nous démontrons qu'après traitement au Flt3L, l'intensité de prolifération induite par l'IL7 des CD4⁺_{PERI} augmente approximativement de moitié.

3.3 Modèle proposé

Dans des contextes de reconstitution immunitaire, l'expansion homéostatique périphérique est un moyen important pour la régénération lymphocytaire T. Malheureusement, cette HPE n'est véritablement efficace que sur les lymphocytes T CD8⁺, ce qui mène à un ratio CD4/CD8 inversé et souvent à une lymphopénie en T CD4⁺ qui peut durer plusieurs mois voire plusieurs années. Lorsque les niveaux d'IL7 augmentent, les lymphocytes T CD4⁺_{PERI} survivent mieux que les CD4⁺_{RTEs} mais leur HPE est relativement inefficace, ce qui pourrait traduire un mécanisme afin de diminuer leur compétitivité avec les CD4⁺_{RTEs} et favoriser par conséquent la régénération des T CD4⁺ par la voie thymique. Malheureusement, dans la majorité des scénarios cliniques de déplétion lymphocytaire, la thymopoïèse est grandement endommagée, ce qui empêche la production de nouveaux RTEs et favorise de ce fait une lymphopénie chronique en lymphocytes T CD4⁺.

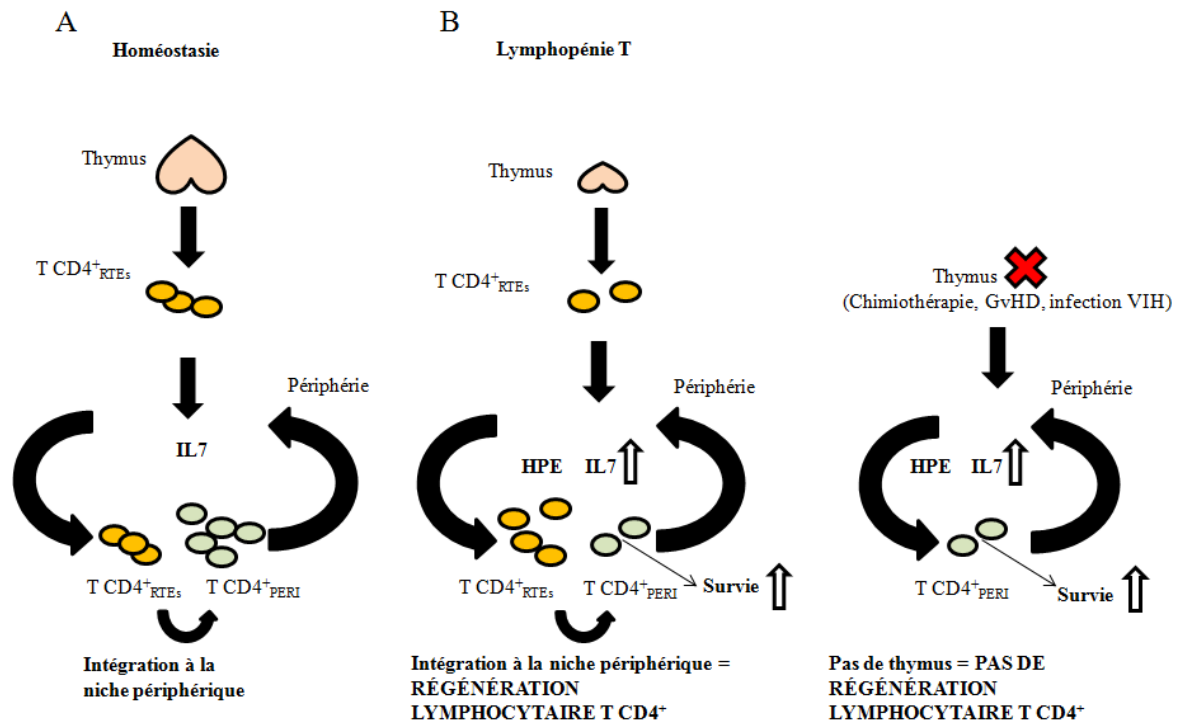


Figure 7. Modèle proposé (A) Dans un contexte homéostatique, les T CD4⁺_{RTEs} intègrent la niche périphérique et se maintiennent grâce à plusieurs facteurs homéostatiques tels que l'IL7. (B; panneau de gauche) Dans un contexte lymphopénique l'IL7 augmente et les CD4⁺_{PERI} survivent alors mieux que les CD4⁺_{RTEs}. Par contre leur HPE est relativement inefficace, potentiellement afin de réduire leur compétitivité avec les CD4⁺_{RTEs}, afin de permettre l'expansion de ces derniers et donc une régénération lymphocytaire avec un répertoire diversifié. Malheureusement, (B; panneau de droite) dans la majorité des cas de déplétion lymphocytaire, la fonction thymique est endommagée et ne permet plus la production de nouveaux RTEs, ce qui favorise une lymphopénie chronique.

Chapitre 4

CONCLUSION

4.1 Rappel de l'hypothèse et des objectifs du projet et Conclusion

Nous avons postulé que dans un environnement non-lymphopénique, la thérapie à l'interleukine-7 (IL7) favorise la prolifération homéostatique des émigrants thymiques $CD4^+$ ($CD4^+_{RTEs}$) par rapport à leurs homologues matures de la périphérie ($CD4^+_{PERI}$).

L'objectif général du projet était d'étudier le mécanisme par lequel l'interleukine-7 induit l'expansion homéostatique des lymphocytes T $CD4^+$. Les objectifs spécifiques du projet étaient : 1) d'évaluer, *in vivo*, l'effet de la thérapie à l'IL7 sur la prolifération des $CD4^+_{RTEs}$ par rapport aux $CD4^+_{PERI}$ dans des hôtes sauvages (WT), déficients en molécules de CMHII ($CMHII^{-/-}$) ou dans des hôtes dans lesquels l'accès au contact TCR/CMHII a été artificiellement augmenté; 2) d'évaluer, *in vivo*, la sensibilité à l'IL7 des $CD4^+_{RTEs}$ par rapport aux $CD4^+_{PERI}$ dans des hôtes WT; 3) d'évaluer, *in vitro*, la sensibilité à l'IL7 et la survie des $CD4^+_{RTEs}$ par rapport aux $CD4^+_{PERI}$.

Les observations cumulées dans ce mémoire suggèrent pour la première fois que les $CD4^+_{RTEs}$ sont plus sensibles à la thérapie à l'IL7 car les contacts TCR/CMHII reçus dans le thymus conditionnent leur sensibilité à la cytokine. Par contre, le mécanisme régulant cette sensibilité n'est pas connu. Il pourrait, toutefois, impliquer le facteur de transcription FOXO3a, régulé par la PI3 kinase/Akt, facteurs communs aux voies de signalisation du TCR et de l'IL7.

Par conséquent, en accord avec notre hypothèse, nous démontrons que les $CD4^+_{RTEs}$ sont plus sensibles à l'IL7 que les $CD4^+_{PERI}$, contrairement aux T $CD8^+$, sur lesquels l'IL7 agit à la fois au niveau des RTEs et des cellules périphériques. Ces différences fondamentales entre les deux types cellulaires pourraient donc expliquer pourquoi la régénération des lymphocytes T $CD8^+$ est moins dépendante de la thymopoïèse que celle des $CD4^+$.

4.2 Limitations de l'étude et Plans futurs

Notre modèle se base sur des résultats obtenus dans un modèle murin sauvage.

Il serait intéressant de tester l'effet de la thérapie à l'IL7 sur les RTEs et T_{PERI} WT transférés dans des modèles de lymphopénie induits (exemple : modèle de greffe de CSH). Ce type de modèle permettrait de disséquer plus finement l'impact de la thérapie à l'IL7 sur la régénération des lymphocytes T CD4⁺ (périphériques et RTEs).

De plus, coupler la thérapie à l'IL7 à d'autres cytokines ayant un potentiel régénérateur, comme le KGF ou la TSLP permettrait peut-être de moduler cet effet et de créer une complémentarité entre les cytokines par la convergence des différentes voies de signalisation induites. En effet, le KGF induit la voie de la PI3 kinase [304], alors que la TSLP partage la chaîne α de l'IL7 et induit la phosphorylation de STAT5 par l'activation des kinases JAK1 et 2 [157].

Finalement, il serait intéressant de tester les marquages pour la phosphorylation de STAT5 et l'induction de Bcl-2 suite à une stimulation à l'IL7 sur des RTEs et T périphériques humains afin de confirmer nos résultats obtenus chez la souris.

Chapitre 5

ANNEXE

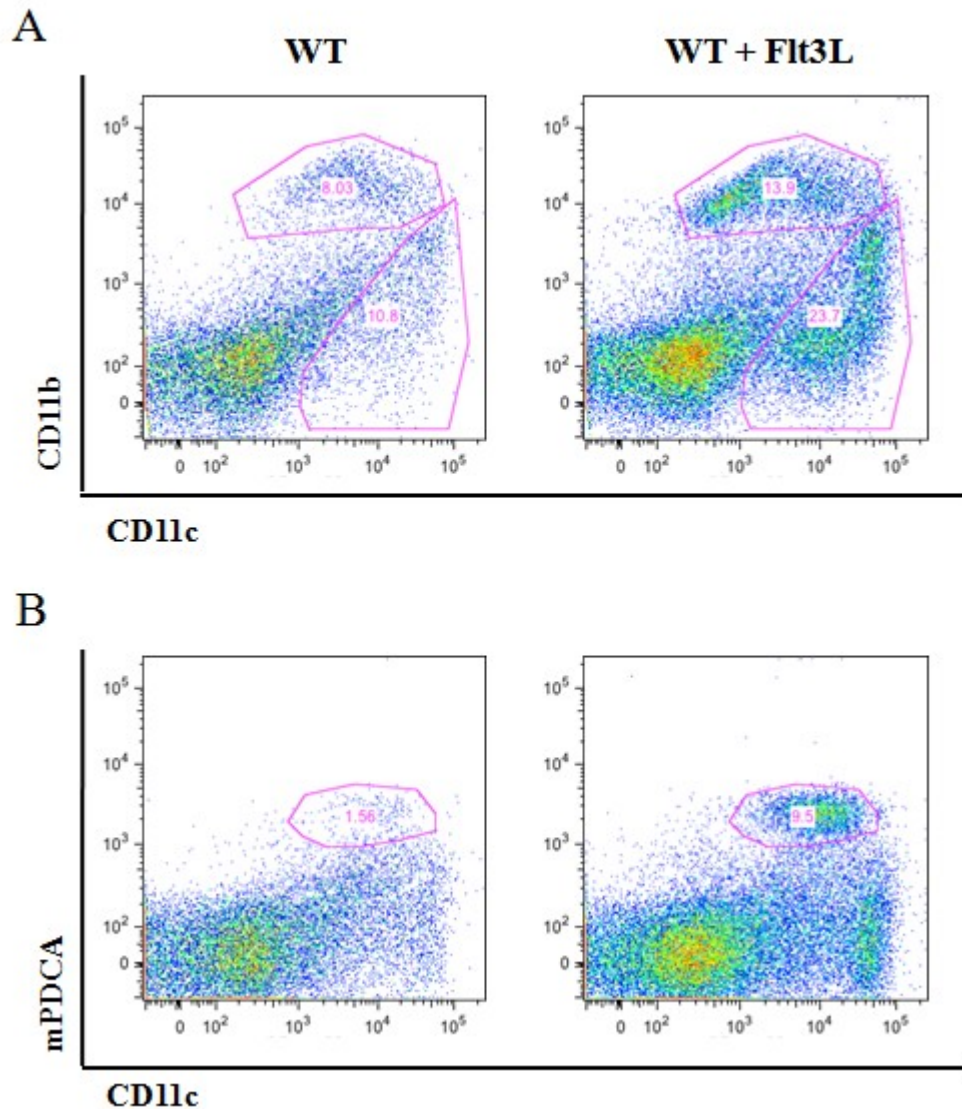


Figure annexe 1. Pourcentage de cellules dendritiques en périphérie d'une souris WT et d'une souris WT traitée au Flt3L. Profils de cytométrie représentatifs d'un traitement intra-péritonéal au Flt3L (10 μ g/j) de souris sauvages (C57Bl/6; WT) pendant 14 jours. A) Pourcentage de cellules dendritiques conventionnelles retrouvées en périphérie (dans les ganglions lymphatiques) d'une souris WT et d'une souris WT traitée au Flt3L. B) Pourcentage de cellules dendritiques plasmacytoïdes retrouvées en périphérie (dans les ganglions lymphatiques) d'une souris WT et d'une souris WT traitée au Flt3L.

Bibliographie

1. Devine, H., et al., *Mobilization of hematopoietic stem cells for use in autologous transplantation*. Clin J Oncol Nurs, 2010. **14**(2): p. 212-22.
2. Ogawa, M., *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells*. Blood, 1993. **81**(11): p. 2844-53.
3. Orkin, S.H., *Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages*. Nat Rev Genet, 2000. **1**(1): p. 57-64.
4. Larsson, J. and S. Karlsson, *The role of Smad signaling in hematopoiesis*. Oncogene, 2005. **24**(37): p. 5676-92.
5. Chumsri, S., W. Matsui, and A.M. Burger, *Therapeutic implications of leukemic stem cell pathways*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(22 Pt 1): p. 6549-54.
6. Ho, A.D., *Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells*. Exp Hematol, 2005. **33**(1): p. 1-8.
7. Jenq, R.R. and M.R. van den Brink, *Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(3): p. 213-21.
8. Dickinson, A.M. and D. Charron, *Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(5): p. 517-25.
9. Giroux, M., et al., *SMAD3 prevents graft-versus-host disease by restraining Th1 differentiation and granulocyte-mediated tissue damage*. Blood, 2011. **117**(5): p. 1734-44.
10. Thomas, E.D., et al., *Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy*. N Engl J Med, 1957. **257**(11): p. 491-6.
11. Thomas, E.D., et al., *Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man*. J Clin Invest, 1959. **38**: p. 1709-16.
12. Mandel, J.L., M. Lathrop, and H.M. Cann, *Jean B Dausset, 19 October 1916-6 June 2009*. Eur J Hum Genet, 2009. **17**(11): p. 1365-6.
13. Bonvalet, M., et al., *Comparison between major histocompatibility complex class II tetramer staining and surface expression of activation markers for the detection of allergen-specific CD4 T cells*. Clin Exp Allergy, 2011. **41**(6): p. 821-9.

14. Nowak, J., *Role of HLA in hematopoietic SCT*. Bone Marrow Transplant, 2008. **42 Suppl 2**: p. S71-6.
15. Petersdorf, E.W., *Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(5): p. 588-93.
16. Kita, K., et al., *Cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells: current challenges in engraftment, infection, and ex vivo expansion*. Stem Cells Int, 2011. **2011**: p. 276193.
17. Gyurkocza, B., A. Rezvani, and R.F. Storb, *Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art*. Expert Rev Hematol, 2010. **3**(3): p. 285-99.
18. Mackall, C., et al., *Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery*. Bone Marrow Transplant, 2009. **44**(8): p. 457-62.
19. Mir, M.A. and M. Battiwalla, *Immune deficits in allogeneic hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients*. Mycopathologia, 2009. **168**(6): p. 271-82.
20. Resnick, I.B., M.Y. Shapira, and S. Slavin, *Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy for malignant and non-malignant diseases*. Transpl Immunol, 2005. **14**(3-4): p. 207-19.
21. Leong, C.F., et al., *Allogeneic haemopoietic stem cell transplantation using non-myeloablative conditioning--a local experience*. Med J Malaysia, 2003. **58**(2): p. 229-35.
22. Spitzer, T.R., *Haploidentical stem cell transplantation: the always present but overlooked donor*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2005: p. 390-5.
23. Symann, M., et al., *Immune reconstitution after bone-marrow transplantation*. Cancer Treat Rev, 1989. **16 Suppl A**: p. 15-9.
24. Morecki, S., et al., *Immune reconstitution following allogeneic stem cell transplantation in recipients conditioned by low intensity vs myeloablative regimen*. Bone Marrow Transplant, 2001. **28**(3): p. 243-9.
25. Moller, J., et al., *Defective T-cell stimulatory pathways in patients after allogeneic bone marrow transplantation (BMT) in man*. APMIS, 1993. **101**(6): p. 480-6.
26. Carella, A.M., et al., *Engraftment of HLA-matched sibling hematopoietic stem cells after immunosuppressive conditioning regimen in patients with hematologic neoplasias*. Haematologica, 1998. **83**(10): p. 904-9.

27. Chen, X., et al., *Rapid immune reconstitution after a reduced-intensity conditioning regimen and a CD3-depleted haploidentical stem cell graft for paediatric refractory haematological malignancies*. Br J Haematol, 2006. **135**(4): p. 524-32.
28. Schulenburg, A., et al., *Immune recovery after conventional and non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation*. Leuk Lymphoma, 2005. **46**(12): p. 1755-60.
29. Nachbaur, D., et al., *Risk for cytomegalovirus infection following reduced intensity allogeneic stem cell transplantation*. Ann Hematol, 2003. **82**(10): p. 621-7.
30. Mohty, M., et al., *Cytomegalovirus-specific immune recovery following allogeneic HLA-identical sibling transplantation with reduced-intensity preparative regimen*. Bone Marrow Transplant, 2004. **33**(8): p. 839-46.
31. Baron, F., et al., *T-cell reconstitution after unmanipulated, CD8-depleted or CD34-selected nonmyeloablative peripheral blood stem-cell transplantation*. Transplantation, 2003. **76**(12): p. 1705-13.
32. Bahceci, E., et al., *Early reconstitution of the T-cell repertoire after non-myeloablative peripheral blood stem cell transplantation is from post-thymic T-cell expansion and is unaffected by graft-versus-host disease or mixed chimaerism*. Br J Haematol, 2003. **122**(6): p. 934-43.
33. Marks, D.I., et al., *Haploidentical stem cell transplantation for children with acute leukaemia*. Br J Haematol, 2006. **134**(2): p. 196-201.
34. Chalmers, I.M., et al., *Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes*. Blood, 1998. **92**(1): p. 11-8.
35. Risdon, G., et al., *Proliferative and cytotoxic responses of human cord blood T lymphocytes following allogeneic stimulation*. Cell Immunol, 1994. **154**(1): p. 14-24.
36. Berthou, C., et al., *Cord blood T lymphocytes lack constitutive perforin expression in contrast to adult peripheral blood T lymphocytes*. Blood, 1995. **85**(6): p. 1540-6.
37. Shlomchik, W.D., *Graft-versus-host disease*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 340-52.
38. Szabolcs, P. and D. Niedzwiecki, *Immune reconstitution after unrelated cord blood transplantation*. Cytotherapy, 2007. **9**(2): p. 111-22.
39. Godfrey, W.R., et al., *Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function*. Blood, 2005. **105**(2): p. 750-8.

40. Laughlin, M.J., et al., *Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia*. N Engl J Med, 2004. **351**(22): p. 2265-75.
41. Rocha, V., et al., *Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling*. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. N Engl J Med, 2000. **342**(25): p. 1846-54.
42. Laughlin, M.J., et al., *Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors*. N Engl J Med, 2001. **344**(24): p. 1815-22.
43. Tabata, M., et al., *Relationships between hematological recovery and overall survival in older adults undergoing allogeneic bone marrow transplantation*. Intern Med, 2005. **44**(1): p. 35-40.
44. Aschan, J. and O. Ringden, *Prognostic factors for long-term survival in leukemic marrow recipients with special emphasis on age and prophylaxis for graft-versus-host disease*. Clin Transplant, 1994. **8**(3 Pt 1): p. 258-70.
45. Horowitz, M.M., et al., *Transplant registries: guiding clinical decisions and improving outcomes*. Oncology (Williston Park), 2001. **15**(5): p. 649-59; discussion 663-4, 666.
46. Small, T.N., et al., *Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions*. Blood, 1999. **93**(2): p. 467-80.
47. Al-Ali, H.K., et al., *The impact of the age of HLA-identical siblings on mobilization and collection of PBSCs for allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2010.
48. Feugier, P., et al., *Hematologic recovery after autologous PBPC transplantation: importance of the number of postthaw CD34+ cells*. Transfusion, 2003. **43**(7): p. 878-84.
49. Fry, T.J. and C.L. Mackall, *Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: challenges for the future*. Bone Marrow Transplant, 2005. **35 Suppl 1**: p. S53-7.
50. Worel, N., et al., *Regeneration of erythropoiesis after related- and unrelated-donor BMT or peripheral blood HPC transplantation: a major ABO mismatch means problems*. Transfusion, 2000. **40**(5): p. 543-50.

51. Ramirez, P., et al., *Delayed platelet recovery after allogeneic transplantation: a predictor of increased treatment-related mortality and poorer survival*. Bone Marrow Transplant, 2011. **46**(7): p. 981-6.
52. Hagglund, H., et al., *Faster neutrophil and platelet engraftment, but no differences in acute GVHD or survival, using peripheral blood stem cells from related and unrelated donors, compared to bone marrow*. Bone Marrow Transplant, 1998. **22**(2): p. 131-6.
53. Weisdorf, D.J., et al., *Thrombopoietic cytokines in relation to platelet recovery after bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2000. **25**(7): p. 711-5.
54. Rommeley, M., et al., *Reconstitution and functional analyses of neutrophils and distinct subsets of monocytes after allogeneic stem cell transplantation*. J Cancer Res Clin Oncol, 2011.
55. Scholl, S., et al., *Distinct reconstitution of neutrophil functions after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation*. J Cancer Res Clin Oncol, 2007. **133**(6): p. 411-5.
56. Zimmerli, W., et al., *Neutrophil function and pyogenic infections in bone marrow transplant recipients*. Blood, 1991. **77**(2): p. 393-9.
57. Koh, A.Y., et al., *Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute Pseudomonas aeruginosa pneumonia*. Infect Immun, 2009. **77**(12): p. 5300-10.
58. Ericson, S.G., et al., *Anti-body-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) function of peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMN) after autologous bone marrow transplantation (ABMT)*. Bone Marrow Transplant, 1995. **16**(6): p. 787-91.
59. Wright, D.G., A.I. Meierovics, and J.M. Foxley, *Assessing the delivery of neutrophils to tissues in neutropenia*. Blood, 1986. **67**(4): p. 1023-30.
60. Cheretakis, C., Y. Dror, and M. Glogauer, *A noninvasive oral rinse assay to monitor engraftment, neutrophil tissue delivery and susceptibility to infection following HSCT in pediatric patients*. Bone Marrow Transplant, 2005. **36**(3): p. 227-32.
61. Lincz, L.F., et al., *Telomere length predicts neutrophil recovery in the absence of G-CSF after autologous peripheral blood stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2004. **34**(5): p. 439-45.
62. Rozman, P., A. Kosir, and M. Bohinjec, *Is the ABO incompatibility a risk factor in bone marrow transplantation?* Transpl Immunol, 2005. **14**(3-4): p. 159-69.

63. Nachbaur, D., et al., *Phenotype, function and chimaerism of monocyte-derived blood dendritic cells after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation*. Br J Haematol, 2003. **123**(1): p. 119-26.
64. Baba, S., et al., *Intra-bone marrow-bone marrow transplantation facilitates hemopoietic recovery including dendritic cells*. Immunobiology, 2005. **210**(1): p. 33-42.
65. Talam, C., et al., *G-CSF increases the number of peripheral blood dendritic cells CD16+ and modifies the expression of the costimulatory molecule CD86+*. Bone Marrow Transplant, 2006. **37**(9): p. 873-9.
66. Giraud, S., et al., *Plasmacytoid dendritic cell reconstitution following bone marrow transplantation: subnormal recovery and functional deficit of IFN-alpha/beta production in response to herpes simplex virus*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(3): p. 135-43.
67. Mohty, M., et al., *Recovery of lymphocyte and dendritic cell subsets following reduced intensity allogeneic bone marrow transplantation*. Hematology, 2002. **7**(3): p. 157-64.
68. Zhao, P., W. Liu, and Y. Cui, *Rapid immune reconstitution and dendritic cell engraftment post-bone marrow transplantation with heterogeneous progenitors and GM-CSF treatment*. Exp Hematol, 2006. **34**(7): p. 951-64.
69. Biron, C.A., et al., *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.
70. Harshan, K.V. and P.R. Gangadharam, *In vivo depletion of natural killer cell activity leads to enhanced multiplication of Mycobacterium avium complex in mice*. Infect Immun, 1991. **59**(8): p. 2818-21.
71. Olson, J.A., et al., *Tissue-specific homing and expansion of donor NK cells in allogeneic bone marrow transplantation*. J Immunol, 2009. **183**(5): p. 3219-28.
72. Scharon, T.M. and P. Scott, *Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 567-77.
73. Murphy, W.J., et al., *Donor-type activated natural killer cells promote marrow engraftment and B cell development during allogeneic bone marrow transplantation*. J Immunol, 1992. **148**(9): p. 2953-60.
74. Carson, W.E., et al., *Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1395-403.

75. Parrado, A., et al., *Repopulation of circulating T, B and NK lymphocytes following bone marrow and blood stem cell transplantation*. *Hematol Cell Ther*, 1997. **39**(6): p. 301-6.
76. Chen, G., et al., *Expanded donor natural killer cell and IL-2, IL-15 treatment efficacy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Eur J Haematol*, 2008. **81**(3): p. 226-35.
77. Olson, J.A., et al., *NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects*. *Blood*, 2010. **115**(21): p. 4293-301.
78. Velardi, A., et al., *Acquisition of Ig isotype diversity after bone marrow transplantation in adults. A recapitulation of normal B cell ontogeny*. *J Immunol*, 1988. **141**(3): p. 815-20.
79. Petersen, S.L., et al., *A comparison of T-, B- and NK-cell reconstitution following conventional or nonmyeloablative conditioning and transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells from human leucocyte antigen identical sibling donors*. *Bone Marrow Transplant*, 2003. **32**(1): p. 65-72.
80. Novitzky, N., et al., *Immune reconstitution at 6 months following T-cell depleted hematopoietic stem cell transplantation is predictive for treatment outcome*. *Transplantation*, 2002. **74**(11): p. 1551-9.
81. Davison, G.M., et al., *Immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation depleted of T cells*. *Transplantation*, 2000. **69**(7): p. 1341-7.
82. Sanchez-Guijo, F.M., et al., *Long-term immune recovery of patients undergoing allogeneic stem cell transplantation: a comparison with their respective sibling donors*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005. **11**(5): p. 354-61.
83. Steingrimsdottir, H., et al., *Immune reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in relation to underlying disease, type of high-dose therapy and infectious complications*. *Haematologica*, 2000. **85**(8): p. 832-8.
84. Busca, A., et al., *Immune reconstitution and early infectious complications following nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation*. *Hematology*, 2003. **8**(5): p. 303-11.
85. Hakim, F.T., et al., *Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(4): p. 930-9.
86. Pignata, C., et al., *Defective activation of mitogen-activated protein kinase after allogeneic bone marrow transplantation*. *Blood*, 1996. **88**(6): p. 2334-41.

87. Ozdemir, E., et al., *Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8⁺ T cells*. *Blood*, 2002. **100**(10): p. 3690-7.
88. Paloczi, K., *Immune reconstitution: an important component of a successful allogeneic transplantation*. *Immunol Lett*, 2000. **74**(3): p. 177-81.
89. Weinberg, K., et al., *The effect of thymic function on immunocompetence following bone marrow transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 1995. **1**(1): p. 18-23.
90. Rocha, B., P. Vassalli, and D. Guy-Grand, *The V beta repertoire of mouse gut homodimeric alpha CD8⁺ intraepithelial T cell receptor alpha/beta + lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation*. *J Exp Med*, 1991. **173**(2): p. 483-6.
91. Rocha, B., *Characterization of V beta-bearing cells in athymic (nu/nu) mice suggests an extrathymic pathway for T cell differentiation*. *Eur J Immunol*, 1990. **20**(4): p. 919-25.
92. Lefrancois, L., *Extrathymic differentiation of intraepithelial lymphocytes: generation of a separate and unequal T-cell repertoire?* *Immunol Today*, 1991. **12**(12): p. 436-8.
93. Hayashi, H., et al., *Analyses of extrathymic T cell differentiation in nu/nu mice by grafting embryonal organs*. *Immunobiology*, 1997. **197**(1): p. 1-15.
94. Seki, S., et al., *Identification of activated T cell receptor gamma delta lymphocytes in the liver of tumor-bearing hosts*. *J Clin Invest*, 1990. **86**(2): p. 409-15.
95. Abo, T., *Extrathymic pathways of T-cell differentiation and immunomodulation*. *Int Immunopharmacol*, 2001. **1**(7): p. 1261-73.
96. Lamontagne, L., E. Massicotte, and C. Page, *Mouse hepatitis viral infection induces an extrathymic differentiation of the specific intrahepatic alpha beta-TCRintermediate LFA-1^{high} T-cell population*. *Immunology*, 1997. **90**(3): p. 402-11.
97. Okuyama, R., et al., *Estrogen administration activates extrathymic T cell differentiation in the liver*. *J Exp Med*, 1992. **175**(3): p. 661-9.
98. Abo, T., *Extrathymic pathways of T-cell differentiation: a primitive and fundamental immune system*. *Microbiol Immunol*, 1993. **37**(4): p. 247-58.
99. Kenai, H., et al., *Appearance of extrathymic early differentiated CD4-CD8- T cells with T cell receptor gamma/delta or alpha/beta after thymus grafting to nude mice:*

- influence of thymus on extrathymic T cell differentiation.* Cell Immunol, 1994. **153**(1): p. 79-93.
100. Rocha, B., D. Guy-Grand, and P. Vassalli, *Extrathymic T cell differentiation.* Curr Opin Immunol, 1995. **7**(2): p. 235-42.
 101. Howie, D., et al., *Extrathymic T cell differentiation in the human intestine early in life.* J Immunol, 1998. **161**(11): p. 5862-72.
 102. Rocha, B., *The extrathymic T-cell differentiation in the murine gut.* Immunol Rev, 2007. **215**: p. 166-77.
 103. Makino, Y., et al., *Extrathymic differentiation of a T cell bearing invariant V alpha 14J alpha 281 TCR.* Int Rev Immunol, 1994. **11**(1): p. 31-46.
 104. Lynch, S., et al., *RAG1 and RAG2 expression in human intestinal epithelium: evidence of extrathymic T cell differentiation.* Eur J Immunol, 1995. **25**(5): p. 1143-7.
 105. Pawelec, G., et al., *Extrathymic T cell differentiation in vitro from human CD34+ stem cells.* J Leukoc Biol, 1998. **64**(6): p. 733-9.
 106. Bas, A., S.G. Hammarstrom, and M.L. Hammarstrom, *Extrathymic TCR gene rearrangement in human small intestine: identification of new splice forms of recombination activating gene-1 mRNA with selective tissue expression.* J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3359-71.
 107. Bas, A., et al., *Aberrant extrathymic T cell receptor gene rearrangement in the small intestinal mucosa: a risk factor for coeliac disease?* Gut, 2009. **58**(2): p. 189-95.
 108. Terra, R., N. Labrecque, and C. Perreault, *Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules.* J Immunol, 2002. **169**(2): p. 684-92.
 109. Guy-Grand, D., et al., *Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice.* J Exp Med, 2003. **197**(3): p. 333-41.
 110. Abo, T., *Extrathymic pathways of T cell differentiation.* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2001. **49**(2): p. 81-90.
 111. Elgbratt, K., et al., *Aberrant T-cell ontogeny and defective thymocyte and colonic T-cell chemotactic migration in colitis-prone Galphai2-deficient mice.* Immunology, 2007. **122**(2): p. 199-209.

112. Jabeen, R., et al., *The transcription factor PU.1 regulates gammadelta T cell homeostasis*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22189.
113. Hu, T., I. Gimferrer, and J. Alberola-Illa, *Control of early stages in invariant natural killer T-cell development*. Immunology, 2011. **134**(1): p. 1-7.
114. Fletcher, A.L., et al., *The contribution of thymic stromal abnormalities to autoimmune disease*. Crit Rev Immunol, 2011. **31**(3): p. 171-87.
115. Taguchi, N., et al., *Abnormal thymic expression of epithelial cell adhesion molecule (EP-CAM) in New Zealand Black (NZB) mice*. J Autoimmun, 1999. **13**(4): p. 393-404.
116. Fletcher, A.L., et al., *Reduced thymic Aire expression and abnormal NF-kappa B2 signaling in a model of systemic autoimmunity*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 2690-9.
117. Anderson, G. and E.J. Jenkinson, *Lymphostromal interactions in thymic development and function*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 31-40.
118. Takeoka, Y., et al., *Thymic epithelial cell abnormalities in (NZB x H-2u)F1 mice*. Clin Immunol Immunopathol, 1995. **76**(3 Pt 1): p. 297-307.
119. Watanabe, Y., et al., *Thymic microenvironmental abnormalities and thymic selection in NZB.H-2bm12 mice*. J Immunol, 1993. **150**(10): p. 4702-12.
120. Strobel, P., et al., *Deficiency of the autoimmune regulator AIRE in thymomas is insufficient to elicit autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS-1)*. J Pathol, 2007. **211**(5): p. 563-71.
121. Gabler, J., J. Arnold, and B. Kyewski, *Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(12): p. 3363-72.
122. Gray, D.H., et al., *Danger-free autoimmune disease in Aire-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(46): p. 18193-8.
123. Rossi, S.W., et al., *RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1267-72.
124. Anderson, M.S., et al., *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein*. Science, 2002. **298**(5597): p. 1395-401.
125. Liston, A., et al., *Gene dosage--limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity*. J Exp Med, 2004. **200**(8): p. 1015-26.

126. Aaltonen, J., et al., *An autosomal locus causing autoimmune disease: autoimmune polyglandular disease type I assigned to chromosome 21*. Nat Genet, 1994. **8**(1): p. 83-7.
127. Tourigny, M.R., et al., *T cell receptor (TCR)-beta gene recombination: dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny*. J Exp Med, 1997. **185**(9): p. 1549-56.
128. Mombaerts, P., et al., *Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages*. Nature, 1992. **360**(6401): p. 225-31.
129. Saito, T. and N. Watanabe, *Positive and negative thymocyte selection*. Crit Rev Immunol, 1998. **18**(4): p. 359-70.
130. Watanabe, N., et al., *The quantity of TCR signal determines positive selection and lineage commitment of T cells*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6252-61.
131. Bernardo, I., et al., *Phenotypic and functional evaluation of CD3+ CD4- CD8- T cells in human CD8 immunodeficiency*. Haematologica, 2011.
132. Maraskovsky, E., et al., *Impaired survival and proliferation in IL-7 receptor-deficient peripheral T cells*. J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5315-23.
133. Schluns, K.S., et al., *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 426-32.
134. Seddon, B. and R. Zamoyska, *TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 2997-3005.
135. Seddon, B. and R. Zamoyska, *TCR and IL-7 receptor signals can operate independently or synergize to promote lymphopenia-induced expansion of naive T cells*. J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3752-9.
136. Riou, C., et al., *Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4+ central memory T cells*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 79-91.
137. Park, J.H., et al., *'Coreceptor tuning': cytokine signals transcriptionally tailor CD8 coreceptor expression to the self-specificity of the TCR*. Nat Immunol, 2007. **8**(10): p. 1049-59.
138. Saini, M., C. Pearson, and B. Seddon, *Regulation of T cell-dendritic cell interactions by IL-7 governs T-cell activation and homeostasis*. Blood, 2009. **113**(23): p. 5793-800.

139. Alpdogan, O., et al., *Keratinocyte growth factor (KGF) is required for postnatal thymic regeneration*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2453-60.
140. Erickson, M., et al., *Regulation of thymic epithelium by keratinocyte growth factor*. Blood, 2002. **100**(9): p. 3269-78.
141. Jenkinson, W.E., E.J. Jenkinson, and G. Anderson, *Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors*. J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 325-32.
142. Boismenu, R. and W.L. Havran, *Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells*. Science, 1994. **266**(5188): p. 1253-5.
143. Spielberger, R., et al., *Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers*. N Engl J Med, 2004. **351**(25): p. 2590-8.
144. Zakrzewski, J.L., et al., *Enhancing T cell reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: a brief update of the latest trends*. Blood Cells Mol Dis, 2008. **40**(1): p. 44-7.
145. Krijanovski, O.I., et al., *Keratinocyte growth factor separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease*. Blood, 1999. **94**(2): p. 825-31.
146. Min, D., et al., *Protection from thymic epithelial cell injury by keratinocyte growth factor: a new approach to improve thymic and peripheral T-cell reconstitution after bone marrow transplantation*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4592-600.
147. Kelly, R.M., et al., *Short-term inhibition of p53 combined with keratinocyte growth factor improves thymic epithelial cell recovery and enhances T-cell reconstitution after murine bone marrow transplantation*. Blood, 2010. **115**(5): p. 1088-97.
148. Napolitano, L.A., et al., *Growth hormone enhances thymic function in HIV-1-infected adults*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 1085-98.
149. Chen, B.J., et al., *Growth hormone accelerates immune recovery following allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation in mice*. Exp Hematol, 2003. **31**(10): p. 953-8.
150. Alpdogan, O., et al., *Insulin-like growth factor-I enhances lymphoid and myeloid reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation*. Transplantation, 2003. **75**(12): p. 1977-83.
151. Plana, M., et al., *The reconstitution of the thymus in immunosuppressed individuals restores CD4-specific cellular and humoral immune responses*. Immunology, 2011. **133**(3): p. 318-28.

152. Al-Shami, A., et al., *A role for thymic stromal lymphopoietin in CD4(+) T cell development*. J Exp Med, 2004. **200**(2): p. 159-68.
153. He, R. and R.S. Geha, *Thymic stromal lymphopoietin*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1183**: p. 13-24.
154. Bogiatzi, S.I., et al., *Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3373-7.
155. Rochman, Y. and W.J. Leonard, *The role of thymic stromal lymphopoietin in CD8+ T cell homeostasis*. J Immunol, 2008. **181**(11): p. 7699-705.
156. Chappaz, S., et al., *Increased TSLP availability restores T- and B-cell compartments in adult IL-7 deficient mice*. Blood, 2007. **110**(12): p. 3862-70.
157. Rochman, Y., et al., *Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(45): p. 19455-60.
158. Rochman, I., et al., *Cutting edge: direct action of thymic stromal lymphopoietin on activated human CD4+ T cells*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6720-4.
159. Lu, N., et al., *TSLP and IL-7 use two different mechanisms to regulate human CD4+ T cell homeostasis*. J Exp Med, 2009. **206**(10): p. 2111-9.
160. Leonard, W.J., *Cytokines and immunodeficiency diseases*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(3): p. 200-8.
161. Le Deist, F., et al., [*Expression anomalies of the CD3-TCR complex expression and immunodeficiencies*]. Med Sci (Paris), 2007. **23**(2): p. 161-6.
162. Rieux-Laucat, F., et al., *Inherited and somatic CD3zeta mutations in a patient with T-cell deficiency*. N Engl J Med, 2006. **354**(18): p. 1913-21.
163. Roberts, J.L., et al., *T-B+NK+ severe combined immunodeficiency caused by complete deficiency of the CD3zeta subunit of the T-cell antigen receptor complex*. Blood, 2007. **109**(8): p. 3198-206.
164. Picard, C., et al., *Hypomorphic mutation of ZAP70 in human results in a late onset immunodeficiency and no autoimmunity*. Eur J Immunol, 2009. **39**(7): p. 1966-76.
165. Rochman, Y., R. Spolski, and W.J. Leonard, *New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 480-90.

166. Takeshita, T., et al., *Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor*. Science, 1992. **257**(5068): p. 379-82.
167. Noguchi, M., et al., *Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans*. Cell, 1993. **73**(1): p. 147-57.
168. Kim, H.P., J. Imbert, and W.J. Leonard, *Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(5): p. 349-66.
169. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
170. D'Souza, W.N. and L. Lefrancois, *IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 5727-35.
171. Mazzucchelli, R. and S.K. Durum, *Interleukin-7 receptor expression: intelligent design*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 144-54.
172. Surh, C.D. and J. Sprent, *Homeostasis of naive and memory T cells*. Immunity, 2008. **29**(6): p. 848-62.
173. Parrish, Y.K., et al., *IL-7 Dependence in human B lymphopoiesis increases during progression of ontogeny from cord blood to bone marrow*. J Immunol, 2009. **182**(7): p. 4255-66.
174. Hauber, H.P., C. Bergeron, and Q. Hamid, *IL-9 in allergic inflammation*. Int Arch Allergy Immunol, 2004. **134**(1): p. 79-87.
175. Erpenbeck, V.J., et al., *Increased expression of interleukin-9 messenger RNA after segmental allergen challenge in allergic asthmatics*. Chest, 2003. **123**(3 Suppl): p. 370S.
176. Fallon, P.G., et al., *Expression of interleukin-9 leads to Th2 cytokine-dominated responses and fatal enteropathy in mice with chronic Schistosoma mansoni infections*. Infect Immun, 2000. **68**(10): p. 6005-11.
177. Schmitt, E., et al., *IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma*. J Immunol, 1994. **153**(9): p. 3989-96.
178. Tan, C., et al., *Antigen-specific Th9 cells exhibit uniqueness in their kinetics of cytokine production and short retention at the inflammatory site*. J Immunol, 2010. **185**(11): p. 6795-801.

179. Veldhoen, M., et al., *Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset.* Nat Immunol, 2008. **9**(12): p. 1341-6.
180. Dardalhon, V., et al., *IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells.* Nat Immunol, 2008. **9**(12): p. 1347-55.
181. Sandau, M.M., et al., *Cutting edge: transpresentation of IL-15 by bone marrow-derived cells necessitates expression of IL-15 and IL-15R alpha by the same cells.* J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6537-41.
182. Dubois, S., et al., *IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells.* Immunity, 2002. **17**(5): p. 537-47.
183. Wuest, S.C., et al., *A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy.* Nat Med, 2011. **17**(5): p. 604-9.
184. Jones, G.W., et al., *Loss of CD4+ T cell IL-6R expression during inflammation underlines a role for IL-6 trans signaling in the local maintenance of Th17 cells.* J Immunol, 2010. **184**(4): p. 2130-9.
185. Matsumoto, S., et al., *Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model.* J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1543-51.
186. Spolski, R. and W.J. Leonard, *Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity.* Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 57-79.
187. Allard, E.L., et al., *Overexpression of IL-21 promotes massive CD8+ memory T cell accumulation.* Eur J Immunol, 2007. **37**(11): p. 3069-77.
188. Spolski, R., et al., *IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(37): p. 14028-33.
189. Bubier, J.A., et al., *A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSb-Yaa mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(5): p. 1518-23.
190. Bucher, C., et al., *IL-21 blockade reduces graft-versus-host disease mortality by supporting inducible T regulatory cell generation.* Blood, 2009. **114**(26): p. 5375-84.

191. Meguro, A., et al., *IL-21 is critical for GVHD in a mouse model*. Bone Marrow Transplant, 2010. **45**(4): p. 723-9.
192. Meguro, A., et al., *Lack of IL-21 signal attenuates graft-versus-leukemia effect in the absence of CD8 T-cells*. Bone Marrow Transplant, 2011.
193. Hanash, A.M., et al., *Abrogation of donor T-cell IL-21 signaling leads to tissue-specific modulation of immunity and separation of GVHD from GVL*. Blood, 2011. **118**(2): p. 446-55.
194. Kovacs, J.A., et al., *Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients infected with the human immunodeficiency virus*. N Engl J Med, 1996. **335**(18): p. 1350-6.
195. Levy, Y., et al., *Comparison of subcutaneous and intravenous interleukin-2 in asymptomatic HIV-1 infection: a randomised controlled trial*. ANRS 048 study group. Lancet, 1999. **353**(9168): p. 1923-9.
196. Davey, R.T., Jr., et al., *Immunologic and virologic effects of subcutaneous interleukin 2 in combination with antiretroviral therapy: A randomized controlled trial*. JAMA, 2000. **284**(2): p. 183-9.
197. Kovacs, J.A., et al., *Induction of prolonged survival of CD4+ T lymphocytes by intermittent IL-2 therapy in HIV-infected patients*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2139-48.
198. Fontas, E., et al., *IL-2 therapy: potential impact of the CD4 cell count at initiation on clinical efficacy--results from the ANRS CO4 cohort*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(10): p. 2215-23.
199. Zhang, H., et al., *Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1238-43.
200. Heemskerk, B., et al., *Adoptive cell therapy for patients with melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2*. Hum Gene Ther, 2008. **19**(5): p. 496-510.
201. Yang, J.C., et al., *Murine studies using polyethylene glycol-modified recombinant human interleukin 2 (PEG-IL-2): antitumor effects of PEG-IL2 alone and in combination with adoptive cellular transfer*. Lymphokine Cytokine Res, 1991. **10**(6): p. 475-80.
202. Jakobisiak, M., J. Golab, and W. Lasek, *Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy*. Cytokine Growth Factor Rev, 2011. **22**(2): p. 99-108.

203. Schmidt, H., et al., *Safety and clinical effect of subcutaneous human interleukin-21 in patients with metastatic melanoma or renal cell carcinoma: a phase I trial*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(21): p. 5312-9.
204. Rasmussen, M.A., et al., *Multivariate evaluation of pharmacological responses in early clinical trials - a study of rIL-21 in the treatment of patients with metastatic melanoma*. Br J Clin Pharmacol, 2010. **69**(4): p. 379-90.
205. Davis, I.D., et al., *Clinical and biological efficacy of recombinant human interleukin-21 in patients with stage IV malignant melanoma without prior treatment: a phase IIa trial*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(6): p. 2123-9.
206. Dodds, M.G., et al., *Immune activation in advanced cancer patients treated with recombinant IL-21: multianalyte profiling of serum proteins*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(6): p. 843-54.
207. Smyth, M.J., et al., *Interleukin 21 enhances antibody-mediated tumor rejection*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 3019-25.
208. Guimond, M., et al., *Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 149-57.
209. Sportes, C., et al., *Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1701-14.
210. Park, J.H., et al., *Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 289-302.
211. Napolitano, L.A., et al., *Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis*. Nat Med, 2001. **7**(1): p. 73-9.
212. Mackall, C.L., et al., *IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1491-7.
213. Beq, S., et al., *IL-7 induces immunological improvement in SIV-infected rhesus macaques under antiviral therapy*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 914-22.
214. Storek, J., et al., *Interleukin-7 improves CD4 T-cell reconstitution after autologous CD34 cell transplantation in monkeys*. Blood, 2003. **101**(10): p. 4209-18.

215. Li, B., M.J. VanRoey, and K. Jooss, *Recombinant IL-7 enhances the potency of GM-CSF-secreting tumor cell immunotherapy*. Clin Immunol, 2007. **123**(2): p. 155-65.
216. Goldrath, A.W. and M.J. Bevan, *Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 183-90.
217. Fry, T.J., et al., *IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2294-9.
218. Rosenberg, S.A., et al., *IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells*. J Immunother, 2006. **29**(3): p. 313-9.
219. Levy, Y., et al., *Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment*. J Clin Invest, 2009. **119**(4): p. 997-1007.
220. Camargo, J.F., et al., *Responsiveness of T cells to interleukin-7 is associated with higher CD4+ T cell counts in HIV-1-positive individuals with highly active antiretroviral therapy-induced viral load suppression*. J Infect Dis, 2009. **199**(12): p. 1872-82.
221. Sportes, C., et al., *Phase I study of recombinant human interleukin-7 administration in subjects with refractory malignancy*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(2): p. 727-35.
222. Alpdogan, O., et al., *Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease*. Blood, 2001. **98**(7): p. 2256-65.
223. Dean, R.M., et al., *Association of serum interleukin-7 levels with the development of acute graft-versus-host disease*. J Clin Oncol, 2008. **26**(35): p. 5735-41.
224. Thiant, S., et al., *Plasma levels of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative BMT are predictive biomarkers of both acute GVHD and relapse*. Bone Marrow Transplant, 2010. **45**(10): p. 1546-52.
225. Komschlies, K.L., et al., *Administration of recombinant human IL-7 to mice alters the composition of B-lineage cells and T cell subsets, enhances T cell function, and induces regression of established metastases*. J Immunol, 1994. **152**(12): p. 5776-84.
226. Unsinger, J., et al., *IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3768-79.

227. Bolotin, E., et al., *Enhancement of thymopoiesis after bone marrow transplant by in vivo interleukin-7*. Blood, 1996. **88**(5): p. 1887-94.
228. Boerman, O.C., et al., *Recombinant human IL-7 administration in mice affects colony-forming units-spleen and lymphoid precursor cell localization and accelerates engraftment of bone marrow transplants*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(2): p. 151-8.
229. Geiselhart, L.A., et al., *IL-7 administration alters the CD4:CD8 ratio, increases T cell numbers, and increases T cell function in the absence of activation*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3019-27.
230. Broers, A.E., et al., *Interleukin-7 improves T-cell recovery after experimental T-cell-depleted bone marrow transplantation in T-cell-deficient mice by strong expansion of recent thymic emigrants*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1534-40.
231. Chu, Y.W., et al., *Exogenous IL-7 increases recent thymic emigrants in peripheral lymphoid tissue without enhanced thymic function*. Blood, 2004. **104**(4): p. 1110-9.
232. Fink, P.J. and D.W. Hendricks, *Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality*. Nat Rev Immunol, 2011.
233. Ye, P. and D.E. Kirschner, *Reevaluation of T cell receptor excision circles as a measure of human recent thymic emigrants*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 4968-79.
234. Douek, D.C., et al., *Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 690-5.
235. Zhang, L., et al., *Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy*. J Exp Med, 1999. **190**(5): p. 725-32.
236. Hassan, J. and D.J. Reen, *Human recent thymic emigrants--identification, expansion, and survival characteristics*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 1970-6.
237. Hazenberg, M.D., et al., *Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection*. Nat Med, 2000. **6**(9): p. 1036-42.
238. van den Dool, C. and R.J. de Boer, *The effects of age, thymectomy, and HIV Infection on alpha and beta TCR excision circles in naive T cells*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4391-401.
239. Tanaskovic, S., et al., *CD31 (PECAM-1) is a marker of recent thymic emigrants among CD4+ T-cells, but not CD8+ T-cells or gammadelta T-cells, in HIV patients responding to ART*. Immunol Cell Biol, 2010. **88**(3): p. 321-7.

240. Haines, C.J., et al., *Human CD4⁺ T cell recent thymic emigrants are identified by protein tyrosine kinase 7 and have reduced immune function*. J Exp Med, 2009. **206**(2): p. 275-85.
241. Lee, C.K., et al., *Thymic emigrants isolated by a new method possess unique phenotypic and functional properties*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1360-9.
242. Scollay, R., *Thymus cell migration: cells migrating from thymus to peripheral lymphoid organs have a "mature" phenotype*. J Immunol, 1982. **128**(4): p. 1566-70.
243. Gabor, M.J., D.I. Godfrey, and R. Scollay, *Recent thymic emigrants are distinct from most medullary thymocytes*. Eur J Immunol, 1997. **27**(8): p. 2010-5.
244. Tough, D.F. and J. Sprent, *Turnover of naive- and memory-phenotype T cells*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1127-35.
245. Berzins, S.P., et al., *A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9787-91.
246. Hazenberg, M.D., et al., *Thymic output: a bad TREC record*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 97-9.
247. Boursalian, T.E., et al., *Continued maturation of thymic emigrants in the periphery*. Nat Immunol, 2004. **5**(4): p. 418-25.
248. Surh, C.D., et al., *Homeostasis of memory T cells*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 154-63.
249. Stockinger, B., C. Bourgeois, and G. Kassiotis, *CD4⁺ memory T cells: functional differentiation and homeostasis*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 39-48.
250. Boyman, O., et al., *Cytokines and T-cell homeostasis*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 320-6.
251. Guimond, M., T.J. Fry, and C.L. Mackall, *Cytokine signals in T-cell homeostasis*. J Immunother, 2005. **28**(4): p. 289-94.
252. Zaft, T., et al., *CD11c^{high} dendritic cell ablation impairs lymphopenia-driven proliferation of naive and memory CD8⁺ T cells*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6428-35.
253. Calzascia, T., et al., *CD4 T cells, lymphopenia, and IL-7 in a multistep pathway to autoimmunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 2999-3004.
254. Le Campion, A., et al., *Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development*. Blood, 2009. **114**(9): p. 1784-93.

255. Goldrath, A.W. and M.J. Bevan, *Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire*. Nature, 1999. **402**(6759): p. 255-62.
256. Murali-Krishna, K., et al., *Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1377-81.
257. Tan, J.T., et al., *IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8732-7.
258. Ge, Q., et al., *Homeostatic T cell proliferation in a T cell-dendritic cell coculture system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 2983-8.
259. Surh, C.D. and J. Sprent, *Regulation of naive and memory T-cell homeostasis*. Microbes Infect, 2002. **4**(1): p. 51-6.
260. Surh, C.D., et al., *Factors regulating naive T cell homeostasis*. Adv Exp Med Biol, 2002. **512**: p. 73-80.
261. Fry, T.J., et al., *A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis*. Blood, 2001. **97**(10): p. 2983-90.
262. Fry, T.J. and C.L. Mackall, *Interleukin-7: from bench to clinic*. Blood, 2002. **99**(11): p. 3892-904.
263. Peschon, J.J., et al., *Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1955-60.
264. von Freeden-Jeffry, U., et al., *Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine*. J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1519-26.
265. Tanchot, C., et al., *Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2057-62.
266. Labrecque, N., et al., *How much TCR does a T cell need?* Immunity, 2001. **15**(1): p. 71-82.
267. Takeda, S., et al., *MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span*. Immunity, 1996. **5**(3): p. 217-28.
268. Sprent, J., et al., *T cell homeostasis*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(4): p. 312-9.
269. Snyder, K.M., C.L. Mackall, and T.J. Fry, *IL-7 in allogeneic transplant: clinical promise and potential pitfalls*. Leuk Lymphoma, 2006. **47**(7): p. 1222-8.

270. Fry, T.J., et al., *Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts*. Blood, 2001. **97**(6): p. 1525-33.
271. Sinha, M.L., et al., *Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2642-9.
272. Komschlies, K.L., et al., *Effects of rhIL-7 on leukocyte subsets in mice: implications for antitumor activity*. Immunol Ser, 1994. **61**: p. 95-104.
273. Azevedo, R.I., et al., *IL-7 sustains CD31 expression in human naive CD4+ T cells and preferentially expands the CD31+ subset in a PI3K-dependent manner*. Blood, 2009. **113**(13): p. 2999-3007.
274. Hassan, J. and D.J. Reen, *IL-7 and homeostasis of recent thymic emigrants*. Trends Immunol, 2002. **23**(3): p. 126-7.
275. Yang, S.J., et al., *The quantitative assessment of MHC II on thymic epithelium: implications in cortical thymocyte development*. Int Immunol, 2006. **18**(5): p. 729-39.
276. Gray, D.H., et al., *Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells*. Blood, 2006. **108**(12): p. 3777-85.
277. Guimond, M., et al., *In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis*. J Immunol, 2010. **184**(6): p. 2769-75.
278. Houston, E.G., Jr., L.E. Higdon, and P.J. Fink, *Recent thymic emigrants are preferentially incorporated only into the depleted T-cell pool*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(13): p. 5366-71.
279. Li, W.Q., et al., *IL-7 promotes T cell proliferation through destabilization of p27Kip1*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 573-82.
280. Do, J.S. and B. Min, *Differential requirements of MHC and of DCs for endogenous proliferation of different T-cell subsets in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(48): p. 20394-8.
281. Kieper, W.C., et al., *Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3158-63.
282. Alves, N.L., et al., *Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(5): p. 1512-7.
283. Alves, N.L., et al., *Cutting Edge: a thymocyte-thymic epithelial cell cross-talk dynamically regulates intrathymic IL-7 expression in vivo*. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 5949-53.

284. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 139-76.
285. Krogsgaard, M., J. Juang, and M.M. Davis, *A role for "self" in T-cell activation*. *Semin Immunol*, 2007. **19**(4): p. 236-44.
286. Viret, C., F.S. Wong, and C.A. Janeway, Jr., *Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition*. *Immunity*, 1999. **10**(5): p. 559-68.
287. Ernst, B., et al., *The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery*. *Immunity*, 1999. **11**(2): p. 173-81.
288. Barata, J.T., et al., *Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells*. *J Exp Med*, 2004. **200**(5): p. 659-69.
289. Hendricks, D.W. and P.J. Fink, *Recent thymic emigrants are biased against the T-helper type 1 and toward the T-helper type 2 effector lineage*. *Blood*, 2011. **117**(4): p. 1239-49.
290. Bendelac, A., et al., *Activation events during thymic selection*. *J Exp Med*, 1992. **175**(3): p. 731-42.
291. Clise-Dwyer, K., et al., *Environmental and intrinsic factors lead to antigen unresponsiveness in CD4(+) recent thymic emigrants from aged mice*. *J Immunol*, 2007. **178**(3): p. 1321-31.
292. Chang, J.F., C.A. Thomas, 3rd, and J.T. Kung, *Induction of high level IL-2 production in CD4+8- T helper lymphocytes requires post-thymic development*. *J Immunol*, 1991. **147**(3): p. 851-9.
293. Opiela, S.J., T. Koru-Sengul, and B. Adkins, *Murine neonatal recent thymic emigrants are phenotypically and functionally distinct from adult recent thymic emigrants*. *Blood*, 2009. **113**(22): p. 5635-43.
294. Seki, Y., et al., *IL-7/STAT5 cytokine signaling pathway is essential but insufficient for maintenance of naive CD4 T cell survival in peripheral lymphoid organs*. *J Immunol*, 2007. **178**(1): p. 262-70.
295. Wu, L. and K. Shortman, *Heterogeneity of thymic dendritic cells*. *Semin Immunol*, 2005. **17**(4): p. 304-12.
296. Merad, M. and M.G. Manz, *Dendritic cell homeostasis*. *Blood*, 2009. **113**(15): p. 3418-27.

297. Brocker, T., M. Riedinger, and K. Karjalainen, *Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo*. *J Exp Med*, 1997. **185**(3): p. 541-50.
298. Bonasio, R., et al., *Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(10): p. 1092-100.
299. McCaughy, T.M., et al., *Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla*. *J Exp Med*, 2008. **205**(11): p. 2575-84.
300. Vollstedt, S., et al., *Treatment of neonatal mice with Flt3 ligand leads to changes in dendritic cell subpopulations associated with enhanced IL-12 and IFN-alpha production*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(7): p. 1849-60.
301. Satwani, P., et al., *Interleukin (IL)-15 in combination with IL-2, fms-like tyrosine kinase-3 ligand and anti-CD3 significantly enhances umbilical cord blood natural killer (NK) cell and NK-cell subset expansion and NK function*. *Cytotherapy*, 2011. **13**(6): p. 730-8.
302. Smith, J.R., A.M. Thackray, and R. Bujdoso, *Reduced herpes simplex virus type 1 latency in Flt-3 ligand-treated mice is associated with enhanced numbers of natural killer and dendritic cells*. *Immunology*, 2001. **102**(3): p. 352-8.
303. Kingham, T.P., et al., *Murine liver plasmacytoid dendritic cells become potent immunostimulatory cells after Flt-3 ligand expansion*. *Hepatology*, 2007. **45**(2): p. 445-54.
304. Braun, S., et al., *Keratinocyte growth factor protects epidermis and hair follicles from cell death induced by UV irradiation, chemotherapeutic or cytotoxic agents*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 23): p. 4841-9.

