

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

Le rôle de Wnt4 dans l'hématopoïèse et la thymopoïèse

Par

Isabelle Louis

Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie
(IRIC)

Département de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D) en Sciences Biomédicales
Option Immunologie

Juin 2008

©Isabelle Louis, 2008



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

Le rôle de Wnt4 dans l'hématopoïèse et la thymopoïèse

Présentée par

Isabelle Louis

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Nathalie Labrecque

Dr. Claude Perreault

Dr. Tarik Möröy

Dr. Georg Holländer

Dr. Daniel Lajeunesse

***“The important thing in science
is not so much to obtain new facts
as to discover new ways
of thinking about them”***

Sir William Bragg
British physicist (1862 - 1942)

Sommaire

Deux types de progéniteurs sont présents dans le thymus et ont la capacité de générer des lymphocytes T : les $c\text{-Kit}^{\text{hi}}\text{IL-7R}\alpha^{-}$ and $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^{+}$. Quoiqu'inaptes à supporter le développement T dans les conditions physiologiques normales, les ganglions lymphatiques contiennent un de ces deux types de progéniteurs, les $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^{+}$. De plus, le stroma ganglionnaire produit des transcrits de protéines-clés pour la thymopoïèse, dont IL-7, Kit-ligand et Delta-like 1. Dans les ganglions, les progéniteurs $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^{+}$ initient leur différenciation T, mais celle-ci est arrêtée à une étape précoce, l'étape pré-DN2. Nos résultats montrent que ce blocage est dû, au moins partiellement, à une absence de signaux Wnt. En effet, ces progéniteurs ganglionnaires peuvent générer des lymphocytes T matures lorsqu'ils sont placés en co-culture *in vitro* sur des cellules stromales, mais seulement si ces dernières produisent des niveaux élevés de Wnt4 dans le milieu. Ceci nous a mené à nous demander quel serait le phénotype induit par une surexpression systémique de Wnt4 dans le compartiment hématopoïétique. Malgré de nombreuses études basées sur la délétion ou l'activation de molécules intracellulaires impliquées dans la signalisation Wnt, le rôle de ce groupe de protéines dans l'hémato-lymphopoïèse demeure fort controversé. Nous montrons que la surexpression *in vivo* de Wnt4 dans les cellules hématopoïétiques affecte différemment divers sous-types de cellules souches et progénitrices. Le principal phénotype induit par Wnt4 est l'augmentation de la survie et de la fréquence de progéniteurs multipotents « *lymphoid-primed* ». L'expansion de ces progéniteurs corrèle avec une augmentation marquée de la thymopoïèse, dont des sous-populations thymocytaires très précoces, en amont de la β -sélection. Nous démontrons aussi que Wnt4, dans notre contexte expérimental, active la signalisation via la voie non-canonique. Ainsi, nos travaux établissent que Wnt4 a un potentiel unique d'accroître la population de progéniteurs multipotents dans la moelle et suggèrent, pour la première fois, que la signalisation Wnt via la voie non-canonique peut réguler la thymopoïèse.

Mots Clés: Wnt, thymus, hématopoïèse, progéniteurs multipotents, progéniteurs thymocytaires, Wnt4.

Abstract

In the thymus, two types of Lin⁻Sca-1⁺ lymphoid progenitors can generate T lineage cells: c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ and c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺. Although c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ progenitors are absent, c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ progenitors are abundant in the lymph node (LN). Furthermore, LN stroma can provide key signals for T cell development including IL-7, Kit-ligand, and Delta-like 1. In the LN, c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ progenitors undergo abortive T cell commitment. Our results show that this block in T cell differentiation is due, at least partially, to lack of Wnt signals. Indeed, LN c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ progenitors can generate mature T cells when cultured *in vitro* with stromal cells producing Wnt4. This led us to ask what phenotype would be induced following a systemic overexpression of Wnt4 in the hematopoietic compartment. Despite important studies based on deletion or activation of intracellular components of the canonical Wnt pathway, the role of Wnts in hematolymphopoiesis remains controversial. We report that *in vivo* overexpression of Wnt4 in hematopoietic cells differentially affected diverse subsets of stem/progenitor cells. The main effect of Wnt4 was to increase the survival and frequency of lymphoid-primed multipotent progenitors. Expansion of multipotent progenitors correlated with a major increase in thymopoiesis and a sizeable accumulation of the most immature thymocyte subsets (upstream of β -selection). We provide compelling evidence that Wnt4 activates non-canonical signaling. Thus, our work shows that Wnt4 has a unique ability to expand lymphoid-primed multipotent progenitors and offers a first demonstration that noncanonical Wnt signaling may regulate thymopoiesis.

Key Words: Wnt, thymus, hematopoiesis, lymphoid-primed multipotent progenitors, early T cell progenitors, Wnt4.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	I
ABSTRACT.....	II
TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES PUBLICATIONS	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VI
REMERCIEMENTS	IX
INTRODUCTION	10
1. HÉMATOPOÏÈSE	10
1.1 INTRODUCTION.....	10
1.1.1 LE SYSTÈME HÉMATOPOÏÉTIQUE.....	10
1.1.2 LES CELLULES IMMUNITAIRES : LIGNÉES ET FONCTIONS.....	11
1.1.3 DIFFÉRENCIATION DES CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES.....	12
1.2 LES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES	14
1.2.1 INTRODUCTION.....	14
1.2.2 DÉFINITION.....	14
1.2.3 CARACTÉRISTIQUES DES CSH.....	15
a) Auto-renouvellement.....	15
b) Multipotence.....	15
c) Destin cellulaire ou « Fate decision ».....	16
1.2.4 RÉGULATION DES CSH	17
2. WNT.....	18
2.1 INTRODUCTION.....	18
2.1.1 LA FAMILLE DES WNTS : DÉCOUVERTE.....	18
2.1.2 WNTS : STRUCTURE.....	19
2.1.3 MODIFICATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES	19
2.1.4 MÉCANISMES DE SÉCRÉTION.....	20
2.1.5 WNT : RÉCEPTEURS ET CO-RÉCEPTEURS	21
2.2 SIGNALISATION VIA WNT	22
2.2.1 VOIE DE SIGNALISATION WNT.....	23
1) La voie canonique, β-caténine dépendante	23
2) Les voies non-canoniques, β-caténine indépendantes	24
2.3 WNT ET L'HÉMATOPOÏÈSE	27
2.3.1 WNT4.....	29

2.3.2 WNT4 ET L'HÉMATOPOÏÈSE.....	30
2.3.3 SIGNALISATION WNT4-DÉPENDANTE.....	30
3. LE THYMUS	31
3.1 ÉVOLUTION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE	31
3.2 ORGANOGÈNE THYMIQUE.....	32
3.3 ORIGINE DES PROGÉNITEURS THYMIQUES	33
3.3.1 NATURE DES PROGÉNITEURS IMMIGRANT DANS LE THYMUS.....	34
3.3.2 ÉTAPES INTRA-THYMIQUES DE LA DIFFÉRENCIATION T	35
3.4 WNT ET LA THYMOPOÏÈSE.....	37
4. UTILITÉ DE CES TRAVAUX : CURIOSITÉ SCIENTIFIQUE OU INTÉRÊT THÉRAPEUTIQUE?	41
5. DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE : QUESTIONS DE DÉPART	43
5.1. ARTICLE I:	45
5.2. ARTICLE II:.....	89
ANNEXE 1 : FIGURES SUPPLÉMENTAIRES.....	135
6. DISCUSSION.....	138
6.1 DÉVELOPPEMENT T EXTRA-THYMIQUE.....	138
6.1.1 INTRODUCTION.....	138
6.1.2 DICHOTOMIE DES RÉSULTATS <i>IN VIVO</i> ET <i>IN VITRO</i>	138
6.1.3 HYPOTHÈSES ET DISCUSSION.....	140
6.2 EFFETS D'UNE SUREXPRESSIION DE WNT4 <i>IN VIVO</i>	146
6.2.1 INTRODUCTION.....	146
6.2.2 RÉSULTATS <i>IN VIVO</i>	146
6.2.3 HYPOTHÈSES ET DISCUSSION.....	147
6.2.3.1 Wnt4, cycle cellulaire et survie : gènes FoxO.....	148
6.2.3.1 Wnt4, cycle cellulaire et survie : Flt3.....	150
6.2.3.2 Wnt4 et vieillissement.....	151
1) Wnt4 et stroma.....	152
2) Wnt4 et cellules hématopoïétiques.....	154
6.3 PERSPECTIVES FUTURES	157
6.4 PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES.....	161
7. CONCLUSION	162

Liste des publications

Les publications présentées dans cette thèse sont les suivantes :

ARTICLE I:

Terra R.*, **Louis I.***, Le Blanc R., Ouellet S., Zúñiga-Pflücker JC., Perreault C.,
T cell generation by lymph node resident progenitor cells, *Blood*, 2005,
106(1):193-200.

(*RT et IL ont contribué de façon équivalente à ce projet)

ARTICLE II:

Louis I., Heinonen K.H., Chagraoui J., Sauvageau G., Perreault C., Wnt4 is a
survival factor for multipotent hematopoietic progenitors and enhances
thymopoiesis. *Revised by Immunity, additional experiments are required and
currently underway.*

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
APC : Adenomatous Polyposis Coli (APC)
ARNm : Acide ribonucléique messenger
Bcl-2 : B Cell Lymphoma-2
Bcl-x_L : B Cell Lymphoma-x_L
BMP : Bone Morphogenic Protein
BrdU : Bromodeoxyuridine (5-bromo-2-deoxyuridine)
BRG1 : Brahma-Related Gene 1
CaMKII : Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II
CBP : CREB-Binding Protein
Cellules DN : Thymocytes Double-Négatifs
Cellules DP : Thymocytes Double-Positifs
Cellules SP : Thymocytes Simple-Positifs (CD4+ ou CD8+)
CFU-S : Colony Forming Units of Spleen
CK1 γ : Casein Kinase 1- γ
CK1 ϵ : Casein Kinase 1- ϵ
CLP : Common Lymphoid Progenitors
CLP-2 : Common Lymphoid Progenitors-2
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMP : Common Myeloid Progenitors
CN : Calcineurine
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes
CRD : Cysteine-Rich Domain.
CREB : Cyclic AMP-Responsive-Element-Binding Protein
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
CTP : Circulating T Cell Progenitors
Dkk : Dickkopf
DL-1 : Delta-like 1
Dsh : Dishevelled
EGF : Epidermal Growth Factor
ETP : Early T-Cell Progenitor
FGF : Fibroblast Growth Factor
Flt3 : Fms-Related Tyrosine Kinase 3
Flt3L : Fms-Related Tyrosine Kinase 3 Ligand
FoxN1 : Forkhead Box N1
FRL1/Cripto : FGF receptor ligands 1/Cripto (aussi appelé Teratoma-Derived Growth Factor 1, ou Tdgfl)
FTOC : Fetal Thymic Organ Culture
Fzd : Frizzled
GFP : Green Fluorescent Protein
GMP : Granulocyte Macrophage Progenitors
GMPP : Granulocyte-Monocyte-Lymphoid Progenitors
GPCR : G Protein-Coupled Receptors
GSK3- β : Glycogen-Synthase Kinase 3- β
HDL : High-Density Lipoprotein
Hg : Hedgehog
HGM : High Mobility Group

Hoxa-3: Homeobox A3
ICAT: inhibitor of β -catenin and TCF
IL-1 : Interleukin 1
IL-2 : Interleukin 2
IL-4 : Interleukin 4
IL-6 : Interleukin 6
IL-7 : Interleukin 7
IL-9 : Interleukin 9
IL-15 : Interleukin 15
IL-21 : Interleukin 21
IL-7R : Interleukin 7 Receptor
IL-7R α : Interleukin 7 Receptor, α -chain
ISP: Immature Single Positive
Jak1: Janus Kinase 1
Jak3 : Janus Kinase 3
JE : Jour Embryonnaire
JNK: C-Jun N-terminal kinases
KitL : C-kit Ligand
LCMV : Virus de la Chorioméningite Lymphocytaire
LDL: Low-Density Lipoprotein
LEF1: Lymphocyte Enhancer Binding Factor 1
LIF: Leukemia Inhibitory Factor
LMPP: Lymphoid Primed Multipotents progenitors
LPS: Lipopolysaccharide
LRP5: Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5
LRP6: Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 6
LT-HSC: Long-Term Hematopoietic Stem Cells
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases
MDCK cells: Madin-Darby Canine Kidney Cells
MEP: Megakaryocyte/Erythrocyte Progenitor
ME : Megakaryocyte-Erythroid
MMTV: Mouse Mammary Tumor Virus
MO: Moelle Osseuse
MPP: Multipotent Progenitors
NFAT: Nuclear Factor of Activated T Cells
NK cells : Natural Killer Cells
NOD/SCID mice: Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency mice
NotchIC: truncated form of Notch, consisting only of the Intracellular domain
OM: oncostatin M
p.c.: Post-Coïtum
Pax-1: Paired-Box 1
Pax-2: Paired-Box 2
Pax-5: Paired-Box5
PCP: Planar Cell Polarity
PDGF/CSF1: platelet-derived growth factor/colony stimulating factor/Colony Stimulating Factor 1
PKC: Protéine Kinase C
Poly I:C : Polyinosinic: Polycytidylic Acid
PSGL-1: P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
RAG1: Recombination-Activating Gene 1
RAG2: Recombination-Activating Gene 2

Ror2: Receptor Tyrosine Kinase-Like Orphan Receptor 2
RT-PCR: Real-Time PCR
RU-CSH: Reconstituting Units of CSH
RYK: Receptor-Like Tyrosine kinase
SCF: Stem Cell Factor
sFRP: Secreted Frizzled-Related Protein
Solfzd : Soluble Frizzled
Stat5: Signal Transducer and Activator of Transcription 5
ST-HSC: Short-Term Hematopoietic Stem Cells
TCF-1: T-Cell-Specific Transcription Factor 1
TCR α : T-Cell Receptor, α -chain
TCR β : T-Cell Receptor, β -chain
TCR: T-Cell Receptor
TEC: Cortical Thymic Epithelial Cells
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
TUNEL Assay: Terminal Uridine Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling Assay
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VSV : Virus de la Stomatite Vésiculaire
WIF-1: Wnt Inhibitory Factor 1

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur de cette thèse, Dr Claude Perreault, de m'avoir fait confiance, de m'avoir guidée, encouragée et conseillée à travers toutes ces années. Notre curiosité mutuelle a été à peine rassasiée par les nombreuses découvertes inattendues et les chemins imprévus que nous avons rencontrés au gré de ces projets. Grâce à son dévouement et sa passion pour la recherche ainsi qu'à son aptitude à me motiver à lui prouver qu'il avait tort (ou pas tout à fait raison), il a fait de moi une scientifique (finalement !!) et je l'en remercie de tout cœur.

Mes remerciements les plus sincères vont également aux membres de mon jury, Dr Möröy, Dr Holländer et Dr Labrecque, qui ont acceptés de participer à mon jury de soutenance. Je vous en suis très reconnaissante.

Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, par leurs suggestions ou leur contribution. Je pense ici en particulier à Dr. Nathalie Labrecque, qui de plus me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Rafik Terra, pour son humour, son enthousiasme et son appui, qui a fait de notre projet commun un des plus agréables. Une dédicace spéciale à tous les membres du laboratoire, passé et présent, que j'ai eu le plaisir de côtoyer et qui ont eu la patience de me supporter toutes ces années : Catherine, Marie-Christine, Guillaume, Renée, Marie-Ève, Etienne, Martin, Krista (merci pour les Westerns !...), mon très cher Dr. Delisle, Diana, Danielle, Billy, Marie-Pierre, Caroline et Sylvie... Merci !

Je tiens finalement à exprimer mes remerciements ainsi que mon affection à tous mes proches, famille et amis, qui de près ou de loin, m'ont épaulée, encouragée et soutenue dans mon cheminement.

INTRODUCTION

1. Hématopoïèse

1.1 Introduction

L'hématopoïèse, la genèse et le développement des cellules du sang, vient du grec ancien *Haima* (sang) et *Poiesis* (créer). Chez tous les vertébrés et quelques invertébrés, les cellules hématopoïétiques agissent en synergie pour permettre d'assurer le transport d'oxygène, l'hémostase primaire et la génération d'une défense contre l'infection. Chacune des cellules de ce système a des propriétés et des fonctions propres. Par contre, c'est uniquement lorsqu'elles agissent en collaboration les unes avec les autres qu'elles constituent un système de défense hautement spécifique et efficace, apte à empêcher ou à éliminer l'infection causée par la présence de pathogènes. Chez le mammifère adulte, les précurseurs qui donnent naissance à toutes les cellules hématopoïétiques se trouvent dans la moelle osseuse (MO) et sont appelés les cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Figure 1). La différenciation de ces précurseurs en cellules matures est un processus complexe, hautement organisé et implique de nombreuses interactions avec d'autres cellules ainsi qu'avec des facteurs solubles présents dans le microenvironnement de la MO¹.

1.1.1 Le système hématopoïétique

Chez l'humain adulte, les CSH doivent générer pas moins de 2.4×10^8 nouvelles cellules tous les jours^{1,2} pour répondre aux besoins du système immunitaire. La différenciation de CSH en précurseurs et la génération de cellules matures et fonctionnelles sont des processus impliquant des signaux intrinsèques et extrinsèques. Ce système est conservé dans l'évolution et similaire entre les vertébrés inférieurs et les mammifères³⁻⁵. Les CSH se différencient en neuf types de cellules, chacune ayant des fonctions précises (Figure 1).

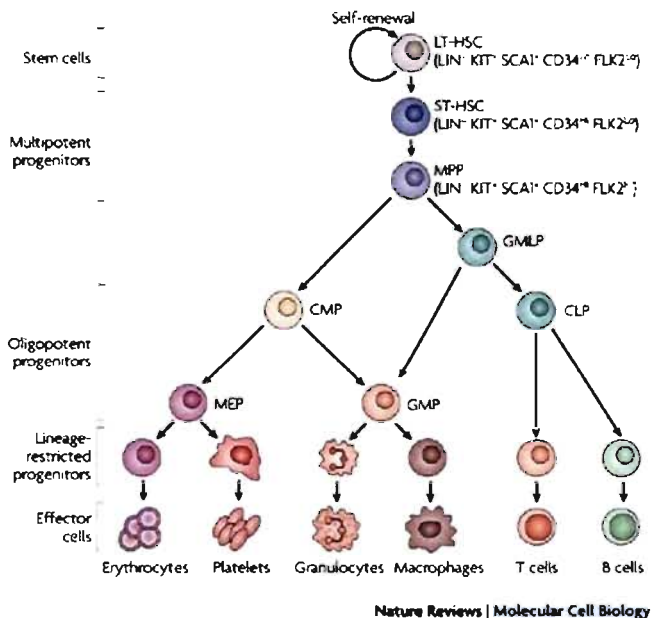


Figure 1: Modèle de différenciation hiérarchique des CSH en cellules matures et spécialisées. Adapté de ^{6,7}

1.1.2 Les cellules immunitaires : lignées et fonctions

Les précurseurs hématopoïétiques génèrent deux lignées cellulaires principales : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde. Dans la lignée myéloïde, on retrouve les granulocytes, les macrophages, les érythrocytes ainsi que les plaquettes. La lignée lymphoïde, quant à elle, est constituée des lymphocytes B et T ainsi que des « natural killer cells » (NK). La complexité de ce système réside dans le fait que plusieurs de ces lignées regroupent diverses sous-populations et qu'un même type cellulaire peut avoir une origine myéloïde ou lymphoïde, comme les cellules dendritiques (DC)⁸.

Les cellules hématopoïétiques peuvent aussi être caractérisées selon leur fonction et être subdivisées en deux catégories : celles qui participent soit à l'immunité innée, soit à l'immunité acquise ou adaptative.

L'immunité innée est évolutivement très ancienne. Les mécanismes moléculaires qu'elle utilise sont retrouvés tant chez les animaux que chez les plantes. Ceci suggère qu'elle s'est développée avant la division entre ces deux règnes⁹. Elle génère une réponse non-spécifique et rapide grâce à des mécanismes phylogéniquement primitifs contre l'infection, comme les défenses de surface, la génération de cytokines, l'activation du complément et les réponses phagocytaires¹⁰.

L'immunité adaptative n'existe ni chez les plantes, ni chez les invertébrés. Elle n'apparaît qu'à partir des vertébrés. C'est une réponse plus raffinée et spécifique contre des antigènes précis, qui se développe plus lentement et fournit à l'hôte une protection à long-terme. Pour ce faire, elle implique des contacts cellulaires directs qui génèrent une gamme extrêmement diversifiée de réponses hautement spécifiques^{11,12}. Par contre, elle est aussi responsable des allergies, de l'auto-immunité et du rejet d'organes. Les composants de l'immunité innée et acquise s'engagent dans des interactions diversifiées et complexes.

Parmi les cellules matures qui participent à l'immunité innée et portent des récepteurs codés par l'ADN germlinal à leur surface, on retrouve : les macrophages, les DC, les mastocytes, les neutrophiles et les éosinophiles. Lors d'une réponse immunitaire, ces cellules s'activent et se différencient en cellules effectrices ayant une durée de vie très courte. Elles tentent d'éliminer l'agent infectieux et réussissent souvent sans l'aide du système immunitaire adaptatif. Par contre, dans certains cas, ceci n'est pas possible et le déclenchement d'une réponse plus spécifique est requis. Le système inné fait part au système adaptatif de la nature de l'agent pathogène. Ceci s'effectue par l'induction de l'expression de molécules de co-stimulation comme CD80 et CD86 à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), dont la plus importante est la DC^{10,13}. L'immunité adaptative dépend des lymphocytes T ainsi que des lymphocytes B. Ces cellules possèdent des récepteurs de surface, générés par un processus de recombinaison somatique, ce qui permet une vaste gamme de reconnaissance antigénique¹⁰.

1.1.3 Différenciation des cellules hématopoïétiques

Même dans un contexte exempt de pathogènes, chaque sous-type cellulaire a une durée de vie limitée: 8 à 11 jours pour les plaquettes¹⁴, près de 120 jours pour les érythrocytes¹⁵ et 1 à 2 jours pour les granulocytes¹⁶, plusieurs mois pour les macrophages présents dans les tissus¹⁷. Les neutrophiles sont produits à un rythme de $\pm 10^{11}$ cellules par jour pour maintenir leur niveau constant¹⁸, tandis que les lymphocytes au repos survivent quelques mois^{19,20}. Les cellules de cette hiérarchie possèdent un potentiel d'auto-renouvellement de plus en plus restreint, forçant ainsi les CSH à générer des cellules plus différenciées pour maintenir l'homéostasie du système.

Les étapes par lesquelles doivent passer les CSH lors de leur engagement dans la différenciation cellulaire ont fait l'objet de percées significatives au cours de la dernière

décennie. Ce sont Weissman et son équipe qui ont initialement proposé une ébauche de la hiérarchie de différenciation des CSH. En effet, ils ont identifié deux sous-populations distinctes de progéniteurs communs, l'un menant à la myélopoïèse (*common myeloid progenitors*, CMP) et l'autre à la lymphopoïèse (*common lymphoid progenitors*, CLP), les deux n'ayant aucun potentiel d'auto-renouvellement détectable^{21,22}. Selon eux, les CLP seraient les précurseurs de quatre types cellulaires : les lymphocytes B et T, les NK et les DC. Les CMP donneraient naissance à des progéniteurs moins différenciés comme les GMP (progéniteurs granulo-monocytaires) et les MEP (progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires et les plaquettes) pour finalement se différencier en leurs progénies (Figure 2a). C'est ce que l'on croyait être la première bifurcation dans la différenciation des CSH²³⁻²⁵.

Depuis, le portrait de différenciation est devenu un peu plus complexe, et actuellement, plusieurs étapes ne sont pas ou très peu définies. Grâce à diverses stratégies expérimentales, évaluant le potentiel de différenciation, il est maintenant possible d'ajouter certains intermédiaires à l'hématopoïèse. Les CSH, appelées LT-HSC (*long-term hematopoietic stem cells*), sont aptes à s'auto-renouveler indéfiniment, et à fournir ainsi une reconstitution hématopoïétique à long-terme. La première étape de différenciation se ferait lorsque ces LT-HSC se différencient en MPP (*multipotent progenitors*, aussi parfois appelés ST-HSC)²⁶. À cette étape, ces deux types cellulaires sont phénotypiquement très semblables, mais les MPP expriment CD34 à leur surface. Leur potentiel d'auto-renouvellement décroît à 6-8 semaines²⁵, et ils ne sont aptes à fournir qu'une reconstitution à court terme, ou transitoire, d'un hôte. Par la suite, il a été rapporté qu'une fraction des MPP est biaisée vers une différenciation lymphoïde. Chez des souris où la GFP a été placée sous le contrôle transcriptionnel de Rag-1, il a été montré qu'une fraction des LSK ($\text{Lin}^{\text{c}}\text{-Kit}^{\text{hi}}\text{Sca-1}^{\text{+}}$) exprime la GFP. Cette sous-population GFP⁺ a été caractérisée comme ayant un potentiel granulo/monocytaire et lymphocytaire B/T avec très peu ou aucun potentiel mégakaryocytaire/érythrocytaire (MkE)²⁷⁻³¹. Ces LSK expriment Flt3 à leur surface. Supportant le potentiel de différenciation myélo/lymphocytaire de ces cellules, les souris Flt3^{-/-} ont une diminution au niveau des cellules B, T, NK et DC³²⁻³⁴ et les souris Flt3L^{-/-} n'ont pas de CLP mais possèdent un compartiment GMP normal³⁵. Ces cellules, phénotypiquement définies comme $\text{Lin}^{\text{c}}\text{Flt3}^{\text{+}}\text{CD34}^{\text{+}}\text{C-kit}^{\text{hi}}\text{Sca-1}^{\text{+}}$, ont été appelées LMPP (*progéniteurs multipotents « lymphoid-primed »*), et montrent une capacité d'auto-renouvellement d'à peine deux semaines²⁵, quoique ceci fasse encore l'objet de

controverse³⁶. Contrairement à des progéniteurs restreints à une lignée spécifique, il a été démontré que les HSC amorcent leur différenciation vers les LMPP par la régulation à la baisse de gènes spécifiques aux M_{KE}³⁷⁻³⁹ (dont *Gata1*, *Vwf*, et/ou *Epor*⁴⁰), et la régulation à la hausse de gènes associés à la différenciation lymphocytaire⁴¹⁻⁴³ (dont *IL-7R*, *Rag1* et *IgH*⁴⁴). De plus, dans ces essais, les transcrits de gènes spécifiques à la lignée myéloïde ne sont modifiés dans aucune des populations immatures analysées⁴⁵. L'ancien modèle ainsi que celui qui est proposé à ce jour sont illustrés à la figure 2.

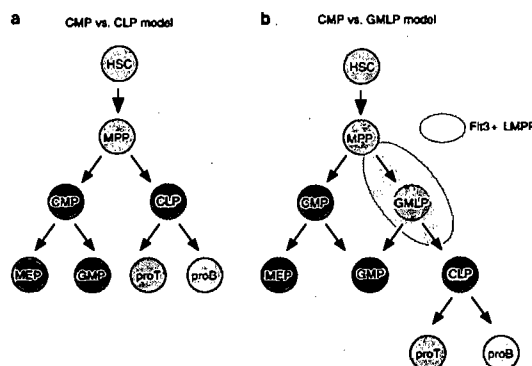


Figure 2. Ancien (a) et nouveau (b) modèles proposés de différenciation des CSH. Tiré de⁴⁶

1.2 Les cellules souches hématopoïétiques

1.2.1 Introduction

Alexander A. Maximow, un embryologiste et histologiste russe, fut le premier, en 1906, à énoncer le concept des CSH et l'hypothèse que toutes les cellules sanguines proviennent de ces cellules. Il a aussi postulé que la différenciation était attribuable à des signaux ou stimuli environnementaux du stroma médullaire sur les CSH, ce qui créerait un environnement propice à l'apparition des divers précurseurs hématopoïétiques. Ses hypothèses, révolutionnaires à son époque, ont été accueillies avec beaucoup de scepticisme par la communauté scientifique⁴⁷.

1.2.2 Définition

Les cellules souches, dont les CSH, doivent, pour mériter cette dénomination, remplir trois critères bien précis, ce qui les distingue de toutes les autres cellules de l'organisme⁴⁸ :

- 1) elles doivent pouvoir se répliquer et donner naissance à des cellules-filles ayant un potentiel de différenciation aussi élevé que le leur, i.e. : *l'auto-renouvellement*
- 2) elles doivent avoir la capacité de se différencier en cellules progénitrices qui, suite à des processus de prolifération et de différenciation, donnent naissance à un grand nombre de

cellules matures et fonctionnelles, qui pourront remplir toutes les fonctions qui leurs sont propres dans les divers tissus, i.e. *multipotentes*

3) elles doivent être capables de répondre aux signaux environnementaux pour satisfaire les besoins plus ou moins grands en cellules différenciées. Ceci est possible grâce à la flexibilité inhérente que doivent avoir ces cellules de choisir entre l'auto-renouvellement, la différenciation ou la quiescence, i.e « *fate decision* »,

Ces caractéristiques, encore utilisées de nos jours pour identifier les cellules souches, ont été établies grâce à des travaux datant, pour certains, de près de cinquante ans.

1.2.3 Caractéristiques des CSH

a) Auto-renouvellement

Il a fallu attendre plusieurs années pour que la capacité d'auto-renouvellement des CSH soit prouvée hors de tout doute. Dans les années 1980, des études ont été effectuées avec une nouvelle technologie utilisant des vecteurs rétroviraux. Cette technique tire avantage du fait que les vecteurs rétroviraux s'intègrent aléatoirement dans le génome de l'hôte, permettant ainsi d'identifier et de suivre une cellule spécifique ainsi que toute sa progénie (qui présente le même insert). En transduisant avec un vecteur rétroviral des cellules de MO et en les injectant à des receveuses irradiées, il a été démontré que des cellules d'origine myéloïde et lymphoïde contenaient des sites d'intégration rétrovirale communs chez une même receveuse⁴⁹⁻⁵². De plus, lorsque ces cellules médullaires, prélevées d'une receveuse primaire, étaient transplantées dans des receveuses secondaires, on observait que les mêmes clones contribuaient à l'hématopoïèse des receveuses primaires et secondaires⁵³. Ces essais constituent la première évidence expérimentale directe de l'existence d'auto-renouvellement à long terme des CSH *in vivo*, et ont été menés par Snodgrass et son équipe en 1990⁵⁴.

b) Multipotence

La multipotence des CSH a été découverte grâce aux expériences révolutionnaires de James E. Till et Ernest A. McCulloch, en 1961⁵⁵, pour lesquelles ils ont mérité le prix Lasker (America's Nobel) pour leur contribution en recherche⁵⁶. Ces études ont démontré que les cellules médullaires donnaient naissance en 7 à 14 jours, dans la rate de receveurs irradiés, à des nodules macroscopiques (colonies de cellules qu'ils ont appelées *colony forming units of spleen*, CFU-S). Grâce à une méthode de translocation chromosomale induite par l'irradiation, qui permet d'identifier spécifiquement la progénie d'une CSH, Tills et McCulloch ont pu démontrer que les CFU-S générées étaient clonales, donc provenaient

d'une seule cellule⁵⁷. Des essais de transplantations en série avec ces CFU-S ont démontré que ces cellules pouvaient générer de nouvelles CFU-S chez un hôte secondaire^{58,59}. Il a été rapporté, *a posteriori*, que la majorité des cellules présentes dans les CFU-S ne permettaient pas la reconstitution de multiples lignées et étaient exclusivement d'origine myéloérythroïde. De plus, ces CFU-S montrent un déclin de leur capacité proliférative suite aux transplantations sérielles⁶⁰⁻⁶³. Ainsi, les CFU-S de Till et McCulloch ne sont finalement que des progéniteurs plus différenciés, et non des CSH comme ils le croyaient. Néanmoins, leurs travaux ont établi le concept de « cellules souches hématopoïétiques ».

c) Destin cellulaire ou « Fate decision »

Dans un environnement normal, les CSH sont majoritairement quiescentes, avec une activité proliférative très réduite. Par contre, s'il y a un élément perturbateur à cet équilibre, comme une infection, une hémorragie ou un traitement myéloablatif, les CSH sont rapidement activées et prolifèrent pour remplir la demande accrue en CSH ou en cellules sanguines. Ainsi, suite à la division cellulaire d'une CSH, l'interaction des cellules-filles avec leur environnement résulte en une décision qui détermine le destin de chacune de ces cellules-filles (voir Figure 3). Il a été suggéré que le choix de destinée se fait lors de la phase G₁ du cycle cellulaire⁶⁴. Les cellules-filles nouvellement générées ont cinq possibilités :

- 1) retourner à l'état de quiescence
- 2) s'auto-renouveler, par soit :
 - a. une division symétrique, où les 2 cellules-filles conservent les propriétés de la CSH qui les a générées. Ceci résulte en une expansion nette des CSH de l'hôte⁶⁵
 - b. une division asymétrique, où une des 2 cellules-filles va conserver les propriétés de la CSH qui l'a générée tandis que l'autre va initier un programme de différenciation. Ceci résulte en un maintien du nombre de CSH chez l'hôte⁶⁶⁻⁶⁹

Dans un contexte normal, les CSH se divisent de façon asymétrique, générant une cellule souche et un progéniteur plus différencié. Ceci permet le maintien du nombre de cellules souches disponibles et de cellules matures dans le sang. Les divisions symétriques, qui génèrent soit deux cellules souches soit deux cellules plus différenciées, ne se produisent que dans des contextes très spécifiques, comme lors du développement embryonnaire ou dans certaines conditions non-physiologiques, comme suite à une chimiothérapie⁷⁰.

- 3) s'engager dans un programme de différenciation vers une des lignées cellulaires⁷¹.

- 4) migrer vers un site qui offre un environnement propice à l'un ou l'autre des destins mentionnés ci-dessus^{72,73}.
- 5) Déclencher un processus de mort programmée, ou apoptose. C'est la dernière option et elle ne se produit que si l'environnement dans lequel se trouve la cellule n'est propice à aucune des quatre premières possibilités⁷⁴.

Ces 5 options assurent une étroite régulation des CSH pour le maintien de l'homéostasie, permettant ainsi de conserver le nombre de CSH constant chez l'adulte dans des conditions physiologiques normales⁷⁵.

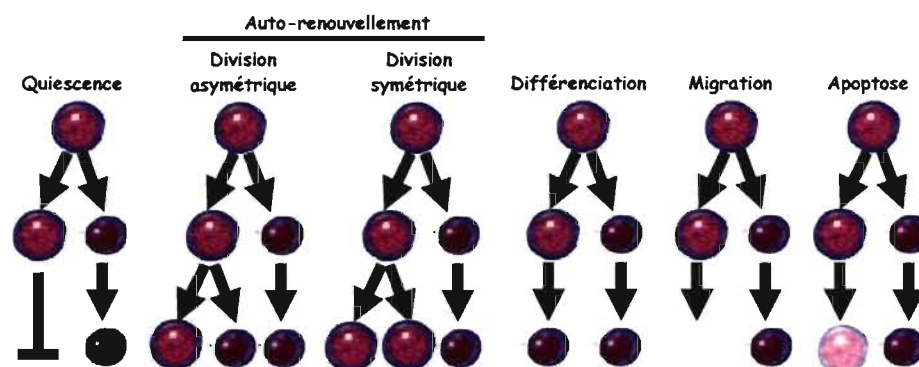


Figure 3. Destins cellulaires potentiels d'une CSH. Adapté de ⁷⁶

1.2.4 Régulation des CSH

La nature des mécanismes qui régulent le choix vers l'une ou l'autre de ces décisions est encore très controversée. En effet, deux théories principales sur la régulation du réservoir de CSH existent. La première, appelée « stochastique », stipule que le destin d'une cellule souche est un événement aléatoire selon une combinaison de paramètres intrinsèques à la cellule au moment de sa division⁷⁷. L'hétérogénéité des destinées obtenues dans les expériences où tous les paramètres étaient maintenus identiques, suggère la nature arbitraire des processus qui régulent l'engagement des cellules-filles vers leur destinée. L'autre théorie, appelée « déterministe », stipule que c'est plutôt une combinaison de facteurs présents dans la niche, donc extrinsèques à la cellule, qui serait permissive à la destinée que doivent prendre les cellules-filles⁷⁸. Selon ce modèle, les progéniteurs donnent, de façon constante, les mêmes nombres et sous-types de cellules-filles dans des conditions environnementales identiques. L'élimination d'un ou de plusieurs facteurs de croissance ou cascades de signalisation, via l'utilisation de souris génétiquement modifiées, permet de déterminer l'action qu'un facteur donné impose sur les CSH. Certains facteurs ont une action redondante sur les CSH, empêchant ainsi de voir un phénotype chez les souris

analysées. Ce type de signaux illustre une régulation permissive, permettant aux cellules de se différencier selon une voie prédestinée. Par contre, d'autres facteurs sont indispensables à certaines destinées. Ces signaux montrent une régulation instructive, forçant la cellule vers un destin donné⁷⁹. Il devient de plus en plus clair que la régulation de la destinée des CSH se décide selon la somme de multiples signaux, groupés en deux types:

- a) *Les signaux intrinsèques* : selon le patron d'expression génique de facteurs de transcription, de régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose, de régulateurs post-transcriptionnels et les niveaux d'expression de chacun de ces régulateurs.
- b) *Les signaux extrinsèques* : l'expression dans l'environnement de cytokines, de facteurs de croissance, de matrice extracellulaire et des contacts entre les cellules.

2. Wnt

2.1 Introduction

Plusieurs cascades de signalisation sont hautement conservées dans l'évolution. Lors du développement d'organismes multicellulaires, celles-ci sont activées, régulées et coordonnées de façon précise, pour assurer le développement adéquat de l'embryon. Via la sécrétion de molécules telles la bone morphogenic protein (*Bmp*), Hedgehog (*Hh*) et Wnt, des populations cellulaires spécifiques génèrent des signaux intracellulaires dans les cellules avoisinantes et guident leur différenciation ou leur migration dans l'embryon en développement. Les mécanismes moléculaires qui régulent ces signaux lors de l'embryogenèse et à l'âge adulte, pour le maintien de l'homéostasie et pour le retour à cet équilibre, sont encore mal caractérisés.

2.1.1 La famille des Wnts : découverte

Avec le recul, il est maintenant possible de conclure que plusieurs phénotypes étudiés depuis nombre d'années sont la conséquence directe d'une mutation dans les gènes Wnts. Il a été rapporté, dans les années 1930, que des mutations induites par des insertions virales formaient régulièrement des tumeurs mammaires chez les souris de laboratoire^{80,81}. Dans les années 1960 à 1990, on a démontré qu'une mutation spontanée entraînait un défaut dans la structure et la fonction cérébelleuse provoquant un phénotype de « swaying », ou titubement, chez les souris⁸². Ces phénotypes ont ensuite été décrits comme étant attribuables à une mutation de Wnt1^{83,84}. Les Wnts font partie d'une famille de ligands de 19 membres⁸⁵. La classification des protéines dans cette famille est faite selon une homologie de séquence avec le premier membre identifié, soit Wnt1. Ces ligands affectent divers processus tels que

l'induction embryonnaire, la génération de la polarité cellulaire et la spécification de la destinée cellulaire. Leur nom provient d'une contraction du nom initial « *int* » donné par Nusse lors de sa découverte chez la souris, et Wingless (*Wg*), découvert chez la drosophile quelques années plus tard et qui s'est avérée être l'homologue de « *int* ». En effet, *Wg* a été découverte pour son rôle dans la formation de jonctions para-segments et le maintien de l'expression d'une protéine, *enrailed*, par les cellules adjacentes. *Int*, pour sa part, a initialement été découvert comme un proto-oncogène activé par l'intégration du *mouse mammary tumor virus* (MMTV), dans des tumeurs de glandes mammaires⁸⁶⁻⁹⁰.

2.1.2 Wnts : structure

Les Wnts sont des glycoprotéines sécrétées, riches en cystéines. De plus en plus de gènes homologues ont été trouvés chez de multiples organismes, des mammifères au nématode *C. elegans*. Des analyses phylogéniques ont démontré que plusieurs Wnts ont des gènes orthologues parmi plusieurs espèces, surtout au niveau des vertébrés⁹¹. En effet, chez les vertébrés, les orthologues de différentes espèces montrent une grande similitude au niveau de leur séquence. Wnt1 humain versus murin a une homologie de 98% et Wnt3a humain est identique à 84% avec Wnt5a du *Xenopus* au niveau de la séquence en acides aminés. Les Wnts ont une homologie de séquence en acides aminés d'à peu près 35% intra-espèce, et certains sous-groupes (ex : Wnt3 et Wnt3a) montrent une homologie supérieure (58 à 83%)⁹². Ils sont composés de 349 (Wnt7a/Wnt7b) à 417 (Wnt10a) acides aminés et leur poids moléculaire varie très peu, de 39 kDa à 47 kDa (référence Genebank). Ils contiennent plusieurs résidus chargés et ont une séquence signal hydrophobe à leur extrémité N-terminale qui permet leur localisation au niveau du réticulum endoplasmique. Cette séquence est suivie de 23 à 26 résidus de cystéines dont certains sont extrêmement conservés entre les diverses espèces. Plusieurs de ces cystéines sont impliquées dans le repliement, via la formation de liens disulfures intracellulaires, et dans la multimérisation des Wnts^{92,93}.

2.1.3 Modifications post-transcriptionnelles

Quoique non détectées lors de l'analyse de la séquence primaire des Wnts, des modifications lipidiques sont présentes sur ces protéines, dont la S-palmitoylation (l'addition réversible d'acide gras sur les résidus de cystéines via des liens thioester), et la N-palmitoylation (initialement décrite sur les protéines Hedgehog, et qui est une modification au niveau de résidus présents à la portion N-terminale de certaines protéines)^{94,95}. Les Wnts, dont Wnt5a et Wnt3a, sont acylées via une S-palmitoylation⁹⁶. On remarque aussi que la N-

palmitoylation semble très conservée chez les Wnts. En effet, la même cystéine a été rapportée comme étant N-palmitoylée à la fois sur Wg chez la drosophile⁹⁷ et sur Wnt8 murin⁹⁸. Ces modifications rendent les Wnts extrêmement hydrophobes, leur confèrent une très forte affinité pour la membrane cellulaire et semblent être spécifiquement requises à l'accomplissement de deux fonctions cruciales : i) l'activation de la cascade de signalisation de Wnt et ii) la sécrétion de Wnt dans le milieu. La palmitoylation du résidu C77 servirait à l'activation de la signalisation Wnt β -caténine dépendante. Une forme mutante de Wnt3a, où le résidu C77 a été remplacé par une alanine, montre une diminution de sa capacité à stabiliser *in vitro* la β -caténine et à activer sa signalisation dans les cellules cibles, sans pour autant modifier sa sécrétion dans le milieu extracellulaire⁹⁹. Cette palmitoylation serait requise pour accroître la concentration locale de Wnt3a à la membrane. Ceci est contraire à d'autres cystéines chez Wnt qui jouent un rôle au niveau intracellulaire, pour leur repliement adéquat¹⁰⁰. Le résidu Ser209 participerait à la relocalisation intracellulaire et à la sécrétion de Wnt. Une mutation ponctuelle de Ser209 en alanine entraîne une rétention de Wnt3a au niveau du réticulum endoplasmique, suggérant un rôle dans le transport intracellulaire adéquat des Wnts¹⁰¹.

2.1.4 Mécanismes de sécrétion

Les Wnts sont distribuées dans le milieu extracellulaire selon un gradient de concentration qui est à son plus haut niveau dans la cellule productrice et qui décroît progressivement, fournissant aux cellules environnantes une concentration spécifique et prévisible à un temps donné. Ceci a pour effet d'activer la signalisation Wnt à divers degrés selon la distance entre les cellules productrices et cibles, à la fois au niveau du répertoire et de l'expression des gènes cibles de Wnt. Ceci a pour conséquence directe d'influencer la localisation, la différenciation et la destinée des cellules avoisinantes, et peut avoir un effet jusqu'à un diamètre de 30 cellules autour de la source¹⁰². Ces propriétés indiquent que les Wnts font partie des protéines que l'on dit morphogènes, tout comme « bone morphogenetic protein », « transforming growth factor- β », Hedgehog, « epidermal growth factor » et « fibroblast growth factor »^{103,104}. L'effet morphogénique des Wnts s'illustre par leur action sur les ailes de drosophile^{102,105}, le tube neuronal embryonnaire¹⁰⁶ et au niveau des cryptes de vili dans le colon¹⁰⁷. Plusieurs équipes tentent d'élucider les mécanismes qui régulent la sécrétion de Wnt, pour permettre de mieux comprendre les diverses réponses induites par un même morphogène.

2.1.5 Wnt : récepteurs et co-récepteurs

Une fois Wnt sécrétée dans le milieu extracellulaire, la réception et la transduction de sa signalisation sur la cellule cible impliquent des interactions avec plusieurs molécules. Ceci augmente d'autant plus la complexité des signaux médiés par Wnt. Les mieux caractérisés à ce jour sont les récepteurs Frizzled (Fzd) et les co-récepteurs LRP5/LRP6. Les Fzds ont initialement été découverts pour leur implication dans l'organisation spatiale des poils sur la carapace de la drosophile adulte. En effet, les drosophiles, qui ont les poils normalement organisés et dirigés unidirectionnellement sur le thorax et les ailes, ont les poils désorganisés et épars suite à une mutation de ce récepteur^{108,109}. Les Fzds ont par la suite été identifiés comme des récepteurs de Wnt. Ainsi, le phénotype observé chez ces drosophiles était dû à un blocage de la signalisation Wnt, plus spécifiquement un défaut au niveau de la polarité cellulaire (PCP, *planar cell polarity*)¹¹⁰, une des 3 voies de signalisation connues de Wnt.

Chez les vertébrés, il y a dix Fzds, divisés en quatre groupes selon l'homologie de leur séquence : Fzd-1/-2/-7, Fzd-4/-9/-10, Fzd-5/-8 et Fzd-3/-6¹¹¹. Ces dix protéines montrent une redondance et une pléiotropie pour les diverses protéines Wnts¹¹². Les Fzds font partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). En plus de leur sept domaines transmembranaires, ils possèdent une portion extracellulaire, en position N-terminale, qui participe, avec ou sans les co-récepteurs LRP5/LRP6, à la liaison d'agonistes (les Wnts), ou d'antagonistes. Ces antagonistes sont des protéines sécrétées Frizzled-related, (*sFRP*), Wnt inhibitory factor 1 (*WIF-1*), Cerberus et la famille des ligands Dickkopf (*DKK*) et sont impliqués dans l'inhibition de la signalisation Wnt par divers mécanismes, comme le mimétisme moléculaire de Fzd ou la séquestration de Wnt. Au niveau du domaine extracellulaire, tous les Fzds possèdent un motif conservé de dix résidus cystéines, appelé le CRD, pour *cysteine-rich domain*. Ce CRD lierait plusieurs Wnts différents avec une très haute affinité^{113,114}. Par contre, de nouvelles expériences démontrent que le CDR n'est pas absolument requis et, dans certains cas, une liaison CRD-indépendante, de faible affinité entre Wnt et Fzd est possible^{115,116}. La signalisation se fait par trois boucles intracellulaires et l'extrémité C-terminale achemine le signal intracellulaire approprié, via les protéines cytoplasmiques responsables¹¹⁷.

Les co-récepteurs LRP5 et LRP6 font partie de la famille des lipoprotéines à faible densité et possèdent un seul domaine transmembranaire. Ces protéines, homologues entre elles à 73%

dans leur domaine extracellulaire et à 64% dans leur domaine intracellulaire, montrent une homologie de 40% avec Arrow, le co-récepteur chez la drosophile¹¹⁸. LRP5/LRP6 sont requis pour la transmission des signaux canoniques de Wnt, via la formation d'un complexe avec Fzd¹¹⁹. L'inhibition de LRP6 chez le *Xenopus* n'affecte pas les mouvements de gastrulation activés par la voie non-canonique de Wnt¹²⁰. Une forme tronquée de LRP contenant les domaines transmembranaire et intracellulaire, entraîne l'activation constitutive de la voie canonique¹²¹. Inversement, une forme tronquée sans domaine intracellulaire, constitue un dominant négatif pour la signalisation¹²². Des souris LRP6^{-/-} ont un phénotype qui montre quelques ressemblances avec la délétion de Wnt1, Wnt3a et Wnt7a, mais moins sévère. Ces souris ont une troncature caudale de l'axe du corps avec un rétrécissement de la queue, un défaut de formation du mésencéphale et un problème du développement de l'axe antéropostérieur et dorsoventral, phénotypes retrouvés chez les souris Wnt1^{-/-}, Wnt3a^{-/-} et Wnt7a^{-/-} respectivement¹²³. La délétion de LRP5 et LRP6 entraîne, chez les embryons murins, un défaut de formation de la ligne primitive et une absence de mésoderme¹²⁴. LRP5 et LRP6 ont des fonctions qui se chevauchent, LRP6 jouant un rôle plus important, du moins lors de l'embryogenèse¹²⁵.

Pour transmettre le signal, la liaison Wnt/Fzd et LRP5/LRP6 entrainerait la phosphorylation, par la glycogène-synthase kinase 3 (*GSK3-β*) et la sérine/thréonine kinases casein kinase 1 (*CK1γ*), de LRP sur certains résidus de sérines et thréonines^{126,127}. Outre Fzd et LRP, d'autres récepteurs peuvent lier et transmettre les signaux Wnt, dont Ror2, RYK/Derailed et FRL1/Cripto. Chez le *Xenopus*, l'interaction entre Ror2 et Fzd a été rapportée dans la littérature. Ror2 agirait comme co-récepteur de Fzd2 et Fzd5 (pas Fzd8) suite à la liaison avec Wnt5a pour l'activation d'une voie non-canonique¹²⁸. La transmission des signaux Wnt peut aussi se faire via le récepteur *receptor-like tyrosine kinase* (RYK), qui possède un domaine tyrosine kinase et un domaine de liaison à WIF-1. Les événements de signalisation en aval de ce récepteur sont peu connus. Il a été suggéré que, chez les mammifères, RYK jouerait le rôle d'un co-récepteur de Fzd et permettrait la liaison avec Dsh pour activer la voie canonique de Wnt¹²⁹. Les souris Ror2^{-/-} ou RYK^{-/-} présentent un phénotype semblable à celui des souris Wnt5a^{-/-128,130-132}.

2.2 Signalisation via Wnt

C'est vers le milieu des années 90 que les premières évidences suggérant qu'il y aurait de multiples voies de signalisation pour Wnt ont été rapportées. Selon le type d'activité

biologique observée chez les vertébrés, les Wnts ont été subdivisées en deux groupes fonctionnels. L'expression ectopique de Wnt-1, -3a, -8 ou -8b (appelé le groupe Wnt-1) induit soit la formation d'un axe secondaire (ou ectopique) chez le *Xenopus* embryonnaire¹³³, soit la transformation des cellules épithéliales mammaires C57MG¹³⁴. L'expression ectopique de Wnt-4, -5a et -11 (appelé le groupe Wnt5a) n'induit ni la formation d'un axe secondaire chez le *Xenopus* embryonnaire, ni la transformation des cellules C57MG. Par contre, ces Wnts possèdent une activité biologique car ces protéines modifient les mouvements cellulaires et amenuisent l'adhésion cellulaire lorsque surexprimées chez le *Xenopus*¹³⁵⁻¹³⁸. La ségrégation des Wnts dans l'un ou l'autre de ces groupes n'est pas absolue et des essais suggèrent que certains Wnts pourraient même s'antagoniser¹³⁹. De plus, les mécanismes qui régulent la spécificité des signaux Wnts sont encore peu compris. Par exemple, Wnt5a peut induire la formation d'un axe secondaire^{140,141}, inhiber la formation Wnt-8-dépendante d'un axe secondaire lorsque co-injectée avec Wnt8¹⁴², mais peut aussi stabiliser la β -caténine¹⁴³, le tout selon le patron d'expression (i.e. : la présence ou l'absence) de certains Fzds.

2.2.1 Voie de signalisation Wnt

La signalisation via Wnt requiert la coordination d'un nombre important de molécules intracellulaires et peut se faire par trois voies :

1) La voie canonique, β -caténine dépendante

C'est, des trois voies, la plus étudiée dans la signalisation Wnt. C'est une voie hautement conservée des cnidaires aux humains¹⁴⁴. Sa dérégulation a été impliquée comme un facteur-clé dans l'initiation de plusieurs cancers, notamment celui du colon¹⁴⁵. Dans cette voie, le médiateur principal est la β -caténine. Cette protéine a initialement été découverte pour son rôle dans les jonctions adhérentes, où la β -caténine fait le pont entre les cadhérines et l' α -caténine pour la liaison au cytosquelette¹⁴⁶. La surexpression de la β -caténine chez des embryons de *Xenopus* et de *Zebrafish* provoque l'induction du mésoderme dorsal au détriment du mésoderme ventral, comme ce que l'on observe lors de la surexpression de Wnt8 chez ces animaux^{147,148}. Inversement, son inhibition empêche la formation du mésoderme dorsal chez le *Xenopus* et la souris^{149,150}. L'identification de la β -caténine comme l'orthologue de Armadillo, un régulateur important de la voie Wg chez la drosophile, a permis de faire le rapprochement entre la β -caténine et Wnt chez les vertébrés^{151,152}. Il a été rapporté qu'un deuxième pool de β -caténine existait ailleurs dans la cellule¹⁵³. Ce pool

est présent à l'état libre dans le cytosol (pas lié au cytosquelette), possède une demi-vie extrêmement courte et sa dégradation est causée par un complexe de destruction. Ce complexe est composé de l'axine (un gène suppresseur de tumeur), de l'adenomatous polyposis coli (*APC*), de la $CK1\gamma$ et de la $GSK-3\beta$ ¹⁵⁴.

En l'absence de Wnt, la β -caténine libre dans le cytosol se lie à l'axine et l'*APC*. La β -caténine devient phosphorylée successivement, sur quatre résidus sérines et thréonines présents en N-terminal, par $CK1\gamma$ (sur Ser45) puis par $GSK-3\beta$ (sur Thr41, Ser37 et Ser33). Ceci forme un motif de reconnaissance pour la F box/WD repeat protein β -TrCP, une sous-unité du complexe E3-ubiquitine-ligase, qui va permettre de cibler la β -caténine pour sa dégradation rapide via le protéasome¹⁵⁵. Dans le noyau, un facteur de transcription spécifique à Wnt appelé TCF est lié à un répresseur de la famille des *Groucho-related genes*, et ne peut donc initier la transcription de ses gènes cibles¹⁵⁶.

Si Wnt est présent, il se lie à Fzd et au co-récepteur LRP. La formation de ce complexe trimérique active la $CK1\gamma$, ce qui va permettre la phosphorylation du médiateur cytoplasmique Dsh^{157,158}. Il y a ensuite recrutement de la β -arrestine, pour former un complexe avec Dsh et l'axine¹⁵⁹. Cette dissociation de l'axine du complexe de destruction en inhibe l'activité. Ainsi, la β -caténine n'est plus phosphorylée, s'accumule dans le cytosol et est transloquée au noyau. Les mécanismes qui régulent cette translocation ne sont pas encore bien définis. Il a été suggéré que deux protéines, TCF et Pygopus, permettraient l'ancrage de la β -caténine au noyau, mais ne seraient pas absolument requises¹⁶⁰. Dans le noyau, la β -caténine déloge les répresseurs de transcription, liés aux facteurs de transcription TCF et LEF. La portion c-terminale de la β -caténine possède un domaine de transactivation qui lie l'ADN via un groupe HGM (*high mobility group*), présent sur TCF et LEF¹⁶¹. La β -caténine recrute ensuite la cyclic AMP-responsive-element-binding protein (CREB)-binding protein (*CBP*) et/ou p300 histone déacétylase et brahma-related gene 1 (*BRG1*), un composant important du complexe de remodelage de la chromatine^{162,163}. Tout ce complexe de co-activation se lie aux promoteurs de TCF et LEF et induit la transcription des gènes spécifiques à cette voie de signalisation¹⁶⁴.

2) Les voies non-canoniques, β -caténine indépendantes

Les voies non-canoniques sont décrites comme activant un réseau complexe de signalisation intracellulaire, entraînant des effets très variés. L'activation de ces voies, chez les vertébrés

et les invertébrés, montre deux fonctions : la modulation des mouvements/polarités cellulaires ainsi que l'antagonisation des signaux induits par la voie canonique. Ces voies n'utilisent ni la β -caténine ni GSK-3 β comme médiateurs pour la transmission des signaux. Par contre, elles partagent, avec la voie canonique, les protéines Fzd et Dsh. Les signaux en aval diffèrent selon la voie activée. Ceci est possible grâce à divers domaines présents chez Dsh, soit les domaines PDX, DIX et DEP. Des essais de délétions montrent que PDZ, permettant la liaison de Dsh à Fzd, est requis pour la signalisation canonique et non-canonique. DIX, présent aussi sur l'axine, n'est nécessaire que lors de la signalisation canonique, et DEP est requis pour les signaux non-canoniques¹⁶⁵⁻¹⁶⁹. Les voies non-canoniques sont initiées soit par la modulation des concentrations intracellulaires de calcium dans la voie calcique (Wnt/Ca²⁺) ou par des mouvements cellulaires polarisés, dans la *planar cell polarity* (PCP). Toutefois, il a été suggéré que les signaux induits par ces deux voies non-classiques se chevaucheraient et feraient peut-être même partie d'une même cascade de signalisation. En effet, un composant spécifique de la voie PCP, appelé *Prickle*, a été rapporté comme induisant à la fois la modulation des mouvements cellulaires (voie PCP) et l'augmentation des niveaux intracellulaires de calcium chez le *Zebrafish*. De plus, une forme spécifique à la voie PCP de Dsh pourrait activer la voie Wnt/Ca²⁺ chez le *Xenopus* et le *Zebrafish*¹⁷⁰.

a) La voie calcique

La voie calcique (Wnt/Ca²⁺) a été suggérée comme second messager dans la voie Wnt suite aux observations faites par imagerie *in vivo* sur des oocytes de *Zebrafish*. Dans ce modèle, la surexpression de Wnt5a et Wnt11 montre des défauts de développement, notamment dans la formation de l'axe dorso-ventral. Ces phénotypes sont similaires à ceux induits par des agents qui stimulent l'activité phosphatidylinositol et augmentent la concentration intracellulaire de Ca²⁺^{171,172}. Suite à la liaison de Wnt à Fzd, il y a libération de calcium intracellulaire et activation des protéines « *calcium-responsive* », dont la protéine kinase C (PKC). La PKC, via la *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinases* (CaMKII), active la calcineurine (CN) ce qui mène à l'activation de la fonction transcriptionnelle de la *calcineurin-dependent nuclear factor of activated T cells* (NFAT). Cette voie peut être antagoniste à la voie β -caténine. En effet, la co-injection d'ARNm de Wnt8 et Wnt5a chez le *Zebrafish* inhibe la dorsalisation observée suite à la surexpression de Wnt8 seulement¹⁷³. Le même effet est obtenu en remplaçant Wnt5a par une augmentation indépendante des niveaux intracellulaires de calcium¹⁷⁴. De plus, un mutant montrant Wnt5a présente une augmentation de la

stabilisation de la β -caténine. Les auteurs suggèrent que ce phénotype pourrait être causé par l'inhibition de la régulation négative de la voie canonique par un facteur encore inconnu¹⁷⁵.

b) La voie de la polarité cellulaire (PCP)

Cette voie, aussi appelée Wnt/JNK, est associée à plusieurs processus de polarisation et mène à l'orientation uniforme de cellules dans un même plan. L'exemple classique de l'existence de cette voie implique l'orientation proximale-distale des poils sur l'aile de la drosophile, qui, dans un contexte normal, ont tous la même orientation et sont tous situés à l'extrémité distale de chacune des cellules. Une demi-douzaine de protéines impliquées dans cette voie chez la drosophile ont été rapportées, dont Fzd, dsh, *diego*, *strabismus*, *prickle* et *flamingo*, appelées « *planar cell polarity core genes* »¹⁷⁶. C'est la présence de Fzd et dsh dans la voie PCP chez la drosophile et la très haute conservation de ces voies dans l'évolution qui a permis de suggérer un lien entre cette voie et la signalisation Wnt chez les vertébrés. Suivant des études sur le *Zebrafish*, il a été rapporté que le phénotype du mutant appelé *silberblick*, qui montre l'inhibition de la voie PCP entraînant un défaut d'élongation de ces animaux, est attribuable à une mutation au niveau de Wnt11¹⁷⁷.

La signalisation par la sous-famille de MAPK appelée JNK a été impliquée dans plusieurs fonctions biologiques, dont la réponse au stress et l'apoptose dans les cellules de mammifères ainsi que la fermeture dorsale chez la drosophile¹⁷⁸. JNK peut être activée par plusieurs signaux extracellulaires, comme le LPS ou l'IL-1¹⁷⁹. L'initiation de cette cascade de signalisation, en amont de JNK, se fait soit par l'activation de GTPases (Rho, Rac et Cdc42), soit par MEKK, soit par des facteurs impliqués dans la signalisation via l'apoptose comme DAXX ou Fas¹⁸⁰⁻¹⁸². Boutros et son équipe ont été les premiers à faire le lien entre les voies PCP, JNK et Wnt, grâce à des essais sur la drosophile et sur des cellules de mammifères *in vitro*¹⁸³. Ils ont démontré que 1) des mutations dans certaines composantes de la voie JNK (RhoA, JNKK et JNK) montrent une inhibition de l'induction de la voie PCP via Dsh et Fzd, 2) la surexpression de ces mêmes composantes permet de retrouver un phénotype quasi-normal suite à la délétion partielle de l'activité biologique de dsh, 3) Dsh active la signalisation JNK en culture et 4) le domaine DEP de Dsh, essentiel pour la signalisation PCP, est aussi nécessaire pour l'activation de JNK *in vitro*¹⁸⁴. Les mécanismes intracellulaires précis qui régulent cette voie de signalisation sont encore très peu définis et font l'objet de nombreuses recherches.

La distinction entre la voie canonique et les voies non-canoniques semble ne pas être précise. En effet, plusieurs études montrent un chevauchement entre les divers composants intracellulaires de ces voies¹⁸⁵⁻¹⁸⁹. La caractérisation des mécanismes de signalisation Wnt est d'une importance capitale, non seulement pour mieux comprendre les processus de développement et d'homéostasie cellulaire, mais aussi pour l'implication de ces signaux dans diverses maladies, notamment les cancers¹⁹⁰.

2.3 Wnt et l'hématopoïèse

Grâce au perfectionnement des outils technologiques à notre disposition, de plus en plus d'évidences portant sur le rôle de Wnt dans l'hématopoïèse, au niveau des cellules souches et plus différenciées, sont rapportées dans la littérature. Cette section n'abordera pas les rôles connus de la voie Wnt sur la lymphopoïèse T, discutés dans une section subséquente. La signalisation Wnt peut induire la prolifération, la différenciation, la survie de cellules hématopoïétiques ainsi que l'induction de l'auto-renouvellement des CSH.

Les études portant sur le rôle de Wnt dans l'hématopoïèse ont été amorcées suite aux observations montrant la production de Wnt dans les organes hématopoïétiques et l'expression de Fzd sur les cellules hématopoïétiques¹⁹¹⁻¹⁹⁵. De plus, les CSH répondent normalement à une signalisation Wnt dans leur environnement médullaire¹⁹⁶. En effet, des essais ont été effectués avec des CSH transduites avec un vecteur rétroviral, où l'expression de la GFP est mise sous le contrôle transcriptionnel de TCF/LEF et réinjectées à des receveuses irradiées. Ces expériences montrent que, 14 semaines post-reconstitution, les CSH maintiennent l'expression de la GFP *in vivo*¹⁹⁷. Une autre évidence liant Wnt à l'hématopoïèse a été apportée par Austin et son équipe en 1997. Ils ont montré que, *in vitro*, Wnt induit l'expansion d'une population enrichie en CSH, dans le foie fœtal murin, lorsque placé en présence de surnageant de culture riche en Wnt1, Wnt5a ou Wnt10b. Ils ont rapporté que plus de cellules conservaient une morphologie immature par rapport aux contrôles, suggérant que Wnt permet le maintien de l'état non-différencié des CSH dans ce contexte¹⁹⁸. Dans un modèle semblable, on rapporte que la fréquence de cellules humaines Lin⁻CD34⁺, enrichies en CSH, augmente *in vitro* sous l'effet de Wnt2b, Wnt5a et Wnt10b. Ces essais ont montré, via des analyses morphologiques, que les cultures riches en Wnt résultaient en plus de cellules immatures (moins différenciées) et moins de cellules matures¹⁹⁹. L'équipe de Willert a suggéré un rôle pour Wnt3a dans l'auto-renouvellement des HSC *in vitro* et *in vivo*. Ils rapportent que l'incubation de CSH avec du Wnt3a purifié entraîne

une augmentation de la capacité proliférative des CSH et le maintien de leur état non-différencié, analysé phénotypiquement et fonctionnellement par leur capacité à reconstituer à long terme un hôte irradié²⁰⁰. L'induction de l'auto-renouvellement des CSH par Wnt dépend de l'activation de la voie Notch²⁰¹. Ainsi, Wnt (notamment Wnt3a) régule l'hématopoïèse via un effet direct sur les cellules hématopoïétiques. Lors d'études *in vitro*, il a été suggéré que Wnt pourrait aussi agir sur l'hématopoïèse par un effet indirect sur le stroma²⁰².

Une nouvelle étude pourrait ajouter un niveau de complexité au rôle des Wnts dans l'hématopoïèse. En effet, Bodine et son équipe ont rapporté qu'*in vitro* et *in vivo*, les Wnts peuvent s'antagoniser. Ils montrent que Wnt5a inhibe, chez les CSH, la signalisation de la voie canonique induite par Wnt3a, ce qui augmente leur capacité de reconstitution. Les auteurs suggèrent que ce phénomène s'effectue via le maintien en phase G₀ des CSH par Wnt5a, indépendamment de la présence de Wnt3a²⁰³. La phase G₀, phase de quiescence du cycle cellulaire, est connue comme augmentant la capacité de reconstitution des CSH^{204,205}. Brandon et son équipe, quant à eux, ont rapporté un rôle à Wnt5a et à Wnt11 dans la différenciation *in vitro* de cellules hématopoïétiques médullaires aviaires, confirmant ainsi la haute conservation des fonctions de ce groupe de molécules dans l'évolution. Ils ont démontré que la surexpression de Wnt5a et Wnt11 induit une augmentation des globules rouges et des monocytes et une diminution des macrophages. Inversement, l'inhibition de Wnt11 génère un plus grand nombre de macrophages, une diminution de la génération des monocytes et l'absence de globules rouges²⁰⁶. Murdoch et son équipe ont rapporté que la surexpression de Wnt5a n'affecte ni la prolifération ni la différenciation de progéniteurs immatures humains *in vitro*, mais que l'injection d'un milieu riche en Wnt5a augmente de plus de 3 fois la reconstitution multi-lignée chez des souris NOD/SCID²⁰⁷.

Les difficultés techniques rencontrées pour la production et la détection des Wnts²⁰⁸, ont mené plusieurs chercheurs à se tourner vers la modulation de facteurs en aval de Wnt, soit des Fzds ou des molécules intracellulaires connues pour la transmission des signaux (surtout de la voie canonique). Des souris Fzd9^{-/-} montrent un phénotype hématologique, soit une diminution des lymphocytes B, à l'étape pré/pro-B²⁰⁹. Les souris LEF-1^{-/-} montrent aussi un phénotype B, avec une réduction de la prolifération et de la survie du pool de pro-B et pré-B en l'absence de LEF-1, mais aucun changement au niveau de la cinétique de différenciation des progéniteurs B²¹⁰. La surexpression de l'axine, inhibiteur de la voie canonique de Wnt,

inhibe la prolifération et la survie des CSH *in vitro*. La transduction de CSH avec l'axine et la reconstitution d'un hôte irradié montre que l'inhibition de la signalisation Wnt empêche la reconstitution immunitaire *in vivo*²¹¹.

Des études avec la β -caténine montrent des résultats un peu contradictoires. Les premières études montrent que la transduction d'une forme constitutivement active de la β -caténine dans des CSH, transgéniques pour Bcl-2, augmente leur prolifération *in vitro* et leur permet de conserver un phénotype immature suite à des cultures à long-terme. De plus, ces CSH sont plus efficaces pour la reconstitution multi-lignées que les contrôles, lorsque co-injectées²¹². Deux articles récents montrent plutôt qu'une activation constitutive de la β -caténine entraîne un blocage multi-lignée de l'hématopoïèse, avec un défaut de la reconstitution érythroïde, une diminution des progéniteurs myéloïdes et mégakaryocytaires, une inhibition de la lymphopoïèse B (étape pré/pro-B) et T (DN1), et une accumulation de CSH non-fonctionnelles^{213,214}. Des expériences de reconstitution compétitives montrent que ces CSH ont un désavantage de repopulation par rapport aux contrôles, attribuable à un taux de prolifération trop élevé qui empêche leur auto-renouvellement à long-terme²¹⁵. Des études additionnelles seront requises pour concilier les résultats obtenus et définir le rôle précis de la β -caténine dans l'hématopoïèse.

2.3.1 Wnt4

Wnt4 est un membre de la famille des Wnt, découvert en 1990, par McMahon²¹⁶. C'est une protéine hautement conservée chez tous les vertébrés qui a initialement été étudiée chez le *Zebrafish*, le poulet et le *Xenopus*. Les études chez ces animaux montrent que Wnt4 est exprimée au niveau du cerveau et joue un rôle important dans l'inhibition des mouvements cellulaires lors de l'embryogenèse^{217,218}. Il a été rapporté que chez *Xenopus*, les transcrits Wnt4 sont détectables à des étapes précoces de l'embryogenèse, de l'étape de la neurula (où l'ébauche du système nerveux se forme dans la région dorsale de l'embryon) à celle du têtard²¹⁹. Chez la souris, le premier rôle spécifique attribué à Wnt4 est au niveau de la transformation épithéliale de mésenchyme métanéphrique embryonnaire, une étape cruciale lors de la formation des tubules rénaux^{220,221}. L'analyse de souris Wnt4^{-/-} montre que cette protéine est essentielle pour la morphogenèse rénale et qu'en son absence, les souris meurent en 24 heures, d'une agénésie rénale²²². Wnt4 joue aussi un rôle dans la détermination sexuelle, où elle est essentielle pour la formation ovarienne et signale l'arrêt de la production

des cellules de Leydig. L'absence de Wnt4 entraîne une masculinisation de l'embryon XX, par l'absence de structures mullérienne et la présence du canal de Wolf²²³.

2.3.2 Wnt4 et l'hématopoïèse

Au niveau du système immunitaire, quelques articles permettent de lier Wnt4 à l'hématopoïèse, plus spécifiquement au niveau de la lymphopoïèse T et du thymus. De tous les membres de cette famille, Wnt4 est le plus exprimé au niveau de l'épithélium cortical thymique adulte et du stroma thymique embryonnaire (E15)^{224,225}. La transduction de thymocytes fœtaux avec Wnt4 augmente de 8 fois le nombre de cellules récoltées en 6 jours de culture. Ceci montre qu'*in vitro*, Wnt4 permet l'expansion ou la survie de ces cellules²²⁶. Sen et son équipe ont démontré que les souris Wnt4^{-/-} ont une réduction de 20 à 30% du nombre de thymocytes embryonnaires et néonataux malgré une différenciation thymocytaire normale, suggérant un rôle physiologique à Wnt4 dans la thymopoïèse *in vivo*²²⁷. Ces études, comme les études *in vitro* de Staal, ne permettent pas de discriminer entre un rôle de Wnt4 dans l'expansion et/ou dans la survie des progéniteurs T. Le développement d'un microenvironnement épithélial thymique est capital pour la génération de lymphocytes T. FoxN1 est un facteur de transcription dont l'expression est essentielle dans le développement du microenvironnement thymique, et sa délétion provoque le phénotype athymique (nude) chez les souris²²⁸. Holländer et son équipe ont montré que l'expression de FoxN1 est médiée par Wnt4, où la transduction de Wnt4 dans une lignée de cellules épithéliales thymiques entraîne l'expression de FoxN1 dans le noyau²²⁹.

2.3.3 Signalisation Wnt4-dépendante

Des modèles *in vivo* et *in vitro* ont montré que Wnt4 active la voie non-canonique pour médier ses effets. *In vitro*, lorsque transfectée dans des cellules HEK293, Wnt4 active JNK, qui phosphoryle Pax2 (*paired-box 2*) et induit la transcription de gènes spécifiques à Pax-2²³⁰. Cette voie de signalisation est aussi activée par Wnt4 dans un modèle *in vitro* de transformation épithéliale à partir de progéniteurs mésenchymateux présents dans le rein²³¹. *In vivo*, à la suite d'études faites sur le *Xenopus* où Wnt4 est requis pour le développement des yeux, la signalisation de Wnt4 s'effectue par l'activation de la cascade de signalisation de JNK²³². Une autre évidence, mais indirecte, de l'activation par une voie non-canonique est la capacité de Wnt4 à se lier au domaine CDR de Fzd6, dans des fibroblastes embryonnaires murins²³³. Fzd6 a été rapporté, dans une lignée de cellules embryonnaires rénales humaines, comme activant une voie β -caténine indépendante²³⁴. Fzd6 inhiberait,

dans ce contexte, la transmission des signaux de la voie canonique en empêchant la liaison du complexe β -caténine/TCF à son site de liaison sur l'ADN²³⁵.

Par contre, dans certains modèles, Wnt4 active la voie canonique. En effet, dans la lignée MDCK (*Madin-Darby Canine kidney cells*), Wnt4 induit l'expression du gène rapporteur de la luciférase lorsque mis sous le contrôle des facteurs de transcription TCF/LEF-1²³⁶. La transfection de Wnt4 dans des cellules rénales porcines induit l'expression de la cycline D1, une cible transcriptionnelle typique de la voie canonique²³⁷. Une autre évidence de l'activation de la voie β -caténine dépendante par Wnt4 a été rapportée par l'équipe de Holländer grâce à des études faites sur une lignée de cellules épithéliales corticales thymiques appelées TEC1-2. Cette équipe a montré que lorsque transduites avec Wnt4, les cellules TEC1-2 expriment la luciférase, lorsque ce gène rapporteur est mis sous le contrôle transcriptionnel de TCF/LEF1²³⁸. Ainsi, Wnt4 est apte à activer la voie canonique, β -caténine dépendante.

Le fait que Wnt4 puisse induire différentes voies de signalisation dans divers types cellulaires illustre le consensus général pour ces protéines : la réponse à un stimulus donné dépend à la fois des Wnts présentes, de la combinaison de récepteurs spécifiques exprimés à la surface de la cellule cible ainsi que de la nature de cette cellule cible. Cette combinaison dicte si la résultante est l'activation de l'une des 3 voies de signalisation, l'inhibition de la transmission des signaux canoniques au profit de la voie non canonique ou inversement. Tout ceci fait l'objet de recherches, mais encore très peu de données sont connues à ce jour.

3. Le thymus

3.1 Évolution du système immunitaire

La formation du thymus est probablement un des événements les plus importants dans l'évolution du système immunitaire. Il est apparu, phylogéniquement, entre la lamproie et le poisson à mâchoire (gnathostome)²³⁹. Cet événement aurait suivi le développement de la rate, premier organe immunitaire à se développer après l'évolution en un système circulatoire fermé²⁴⁰. Cette transformation en organes laisse supposer que le développement en régions organisées et spécifiques, et non plus systémiques, a permis d'améliorer l'efficacité des interactions entre les cellules lors des processus immunitaires.

De tous les organes du système, le thymus est certainement celui est le plus énigmatique aux yeux des immunologistes. C'est l'organe majeur du corps humain dont la fonction a été la

dernière à être élucidée. Le thymus est un organe bilobé situé au dessus du cœur, derrière le sternum. L'origine de son nom, selon certains, viendrait de sa ressemblance à la feuille de la plante appelé *Thymus vulgaris* (nom commun : thym) tandis que d'autres affirment qu'il tire son nom du grec ancien *θυμος*, qui veut dire âme, courage, esprit, volonté ou but²⁴¹. Lors de sa découverte, le thymus était surtout considéré comme un organe régulant des fonctions non-immunologiques. Les chercheurs croyaient en un rôle d'épuration, à cause du nombre élevé de leucocytes, à durée de vie très courte, qui étaient éliminés dans le thymus²⁴². Ceci s'illustre par un énoncé de Dr. Medawar, lauréat du prix Nobel de médecine, qui a déclaré:

*"We shall come to regard the presence of lymphocytes in the thymus as an evolutionary accident of no very great significance"*²⁴³

La fonction réelle du thymus fut élucidée par Miller. Il publia dans *The Lancet* en 1961²⁴⁴, des résultats montrant que des souris thymectomisées 24 heures après leur naissance étaient plus sensibles aux infections, avaient moins de lymphocytes et étaient incapables d'élaborer une réaction de rejet de greffe de peau. Il postula alors que :

«Pendant l'embryogenèse, le thymus doit produire les précurseurs de cellules immunitaires compétentes, plusieurs d'entre elles migrant à d'autres sites au moment de la naissance. Ceci suggérerait que les lymphocytes qui sortent du thymus sont des cellules spécialement sélectionnées.»

Cette affirmation était révolutionnaire à l'époque et n'a été considérée comme véridique qu'après plusieurs années. De nos jours, la fonction thymique est relativement bien caractérisée mais la majorité des mécanismes cellulaires et intracellulaires sous-jacents dans l'exécution de ces fonctions par le thymus, ne sont pas encore élucidés.

3.2 Organogenèse thymique

Le primordium thymique prend naissance, chez la souris, au jour 10-11, et, chez l'homme, à quatre semaines^{245,246}. Sa genèse se fait à partir des bourgeonnements épithéliaux d'origine endodermale, nés de la troisième poche pharyngée, et ectodermale, issus de la troisième fente brachiale. Ces derniers se différencieraient respectivement en médulla et en cortex²⁴⁷. Ce bourgeon s'entoure de tissu conjonctif primitif, le mésenchyme, provenant de la région céphalique de la crête neuronale dérivée des troisièmes et quatrièmes arcs pharyngés. Ces cellules mésenchymateuses pénètrent l'épithélium thymique et établissent un réseau de fibroblastes associés à de la matrice extracellulaire²⁴⁸. L'importance de la composante épithéliale du stroma thymique a été démontrée par des études chez des souris dont les gènes *Hoxa-3*, *pax-1* ou *FoxN1* ont été supprimés. La suppression des deux premiers gènes,

fonctionnellement reliés²⁴⁹, montre l'absence du compartiment épithélial d'origine endodermique. Il en découle une diminution de la taille du thymus ainsi que du nombre de lymphocytes T matures produits²⁵⁰. Les souris *nude*, chez lesquelles il y a délétion du facteur de transcription FoxN1²⁵¹, sont dépourvues de cellules épithéliales d'origine ectodermique. Leur thymus n'est plus capable de recruter les précurseurs T ni de supporter leur différenciation²⁵². Au jour 12-13, les précurseurs hématopoïétiques entrent dans le rudiment thymique et se différencient en DC, en macrophages ainsi qu'en précurseurs thymocytaires. Les DC et les macrophages sont distribués à travers le cortex et la médulla tandis que les précurseurs T migrent à la région sous-capsulaire pour entamer leur processus de maturation et de sélection. Le thymus migre vers le bas du cou où il s'étend jusque dans le médiastin, sous-jacent au sternum. Cet organe ainsi formé est composé d'un réseau de fibroblastes, de macrophages, de cellules épithéliales et dendritiques ainsi que de matrice extracellulaire, organisé en région corticale et médullaire.

Le thymus atteint près de 25cm³ vers l'âge de 12 mois chez l'humain. Par la suite, la fraction fonctionnelle (lymphoépithéliale) du thymus involue progressivement et est remplacée par du tissu adipeux, conjonctif et de l'espace périvasculaire, altérant ainsi l'architecture thymique. Cette involution commence à l'âge d'un an et continue à un taux de 3% par an jusqu'à la trentaine pour décliner, les années suivantes, à un taux de 1% par an²⁵³. Si on extrapole, la perte totale de la région lymphoépithéliale se produirait vers l'âge de 120 ans chez l'humain. Chez la souris âgée (+/- 24 mois), l'involution thymique entraîne une diminution drastique du nombre de lymphocytes produits, soit 0.7% de ce qui est produit chez un nouveau-né²⁵⁴.

3.3 Origine des progéniteurs thymiques

L'entrée des précurseurs hématopoïétiques dans le thymus est régulée différemment lors de l'embryogenèse et à l'âge adulte. Lors de l'embryogenèse, les progéniteurs T sont produits par les précurseurs hématopoïétiques se trouvant initialement dans la zone splanchopleurale para-aortique aux jours 8-9, dans le foie fœtal aux jours 11-13 puis dans la MO pour pénétrer le rudiment thymique aux jours 13-14. Le rudiment thymique est, à ce point du développement, encore non-vascularisé. Les progéniteurs T entrent dans le thymus embryonnaire par le tissu mésenchymateux, à travers la capsule épithéliale. À maturité, l'entrée dans le thymus des progéniteurs provenant de la MO est régulée par des ouvertures microvasculaires, au niveau des veinules post-capillaires à la région cortico-médullaire^{255,256}.

3.3.1 Nature des progéniteurs immigrant dans le thymus

Comme toutes les cellules du système immunitaire, les lymphocytes T sont générés à partir d'une petite population de CSH pluripotentes. Leur entrée dans le thymus adulte se fait au niveau des jonctions corticomédullaires^{257,258}. Dans le thymus, ces cellules restent dans cette zone péri-médullaire un certain temps avant de migrer vers la zone sous-capsulaire puis vers la médulla thymique²⁵⁹. Lors de chacune de ces étapes de migration, pendant lesquelles les progéniteurs évoluent dans leur maturation, les thymocytes sont en contact étroit avec les cellules stromales thymiques qui leur fournissent les signaux spécifiques requis pour leur différenciation. L'identité des progéniteurs qui migrent de la MO au thymus pour donner naissance aux lymphocytes T est encore mal caractérisée. Grâce aux travaux de l'équipe de Goldschneider, on sait maintenant que l'entrée dans le thymus est un phénomène hautement régulé où le thymus permet, via la disponibilité des niches à la jonction cortico-médullaire, l'entrée d'une centaine de précurseurs lymphoïdes toutes les trois à quatre semaines seulement²⁶⁰. Ces progéniteurs seraient présents dans le sang pendant environ 1 semaine, la moelle régulant aussi la sortie de ces cellules dans le sang²⁶¹. Temporellement coordonnée à la disponibilité des niches dans le thymus, l'exportation des progéniteurs de la moelle au sang se ferait en vagues distinctes plutôt qu'en continu. Le tout serait régulé par l'expression de facteurs chimiotactiques, produits soit par le thymus pour le recrutement de ces progéniteurs, soit par la moelle pour forcer leur émigration vers le sang²⁶². Plusieurs cellules médullaires et sanguines ont été suggérées comme étant les précurseurs lymphocytaires, avec comme caractéristiques d'être des cellules dépourvues de la capacité d'auto-renouvellement et ayant entamé des processus de différenciation, à divers degrés, vers la lignée T. Parmi les cellules proposées, on retrouve les *Multipotent progenitors* (MPP²⁶³: Lin⁻Ckit^{hi}Sca-1^{hi}Flt3⁺), les *Lymphoid-primed multipotent progenitors* (LMPP²⁶⁴, aussi appelés ELP²⁶⁵: Lin⁻Ckit^{hi}Sca-1^{hi}Flt3^{hi}, exprimant le gène Rag dans la MO), les *Common lymphoid progenitors* (CLP²⁶⁶: Lin⁻Ckit^{lo}Sca-1^{lo}IL-7R α ⁺), les *Common lymphoid progenitors-2* (CLP-2²⁶⁷: Lin⁻Ckit^{lo}Sca-1^{-/lo}B220⁺IL-7R α ⁺) et les *Circulating T cell progenitors* (CTP^{268,269}: Lin⁻CD4^{lo}CD25⁻Thy1⁺huCD25⁺, retrouvés dans le sang de souris où le gène CD25 humain a été placé sous le contrôle du gène pré-T α).

Tous ces progéniteurs ont démontré un potentiel élevé à générer des lymphocytes T lorsque mis dans des conditions favorables à la thymopoïèse comme, entre autres, un environnement exprimant des ligands de Notch²⁷⁰, facteur essentiel à la différenciation thymocytaire. Tout

progéniteur T doit exprimer Notch1 et être apte à répondre au signal induit par les ligands spécifiques à cette voie de signalisation. L'ARNm de Notch1 a été rapporté dans plusieurs progéniteurs hématopoïétiques comme les CSH, MPP, ELP et CLP^{271,272,273}. Avoir le potentiel de se différencier en lymphocyte T n'implique pas automatiquement la capacité de le faire. Par exemple, chez des souris non-irradiées, si des CSH sont directement injectées dans le thymus, elles se différencient rapidement en lymphocytes T. Par contre, si on les injecte par voie intraveineuse, on ne voit l'apparition de lymphocytes dans le thymus que plusieurs semaines plus tard. Ceci implique qu'une certaine différenciation doit s'effectuer avant que les CSH n'acquière la capacité à migrer vers le thymus et à y pénétrer²⁷⁴. Cela se ferait via l'acquisition de CCR9 et d'autres mécanismes CCR9-indépendants²⁷⁵. Le nombre restreint de précurseurs T générés par la moelle, et leur faible nombre dans le sang et à la jonction cortico-médullaire thymique rendent difficile l'identification précise des « vrais » précurseurs T. Le consensus actuel propose que les précurseurs physiologiques de la lignée T, présents à l'état basal chez la souris, se trouvent dans la population MPP (Lin⁻ Ckit^{hi} Sca-1^{hi} Flt3⁺)²⁷⁶.

3.3.2 Étapes intra-thymiques de la différenciation T

L'organogenèse complexe du thymus, rassemblant les compartiments stromaux et lymphocytaires, constitue l'échafaudage optimal pour supporter toutes les étapes complexes menant à la maturation des lymphocytes T²⁷⁷. Quels que soient l'identité et le phénotype précis des progéniteurs qui entrent dans le thymus, leur différenciation implique une série d'étapes de migration, en corrélation avec différentes étapes de maturation, identifiables grâce à l'expression successive de diverses molécules de surface, dont CD4, CD8, CD25, CD44 et CD117. Chaque compartiment thymique contient des cellules spécialisées assurant l'intégrité de chaque étape de différenciation. Chez la souris, la différenciation thymocytaire s'effectue via les étapes DN (double-négatif), DP (double-positif) et SP (simple-positif).

Les cellules, au stade DN, n'expriment ni CD4, ni CD8 à leur surface membranaire. Elles se retrouvent à l'entrée du thymus, à la jonction cortico-médullaire, et sont les thymocytes les plus immatures. Chez la souris, cette étape phénotypique se subdivise en quatre sous-populations qui se différencient de concert avec leur migration vers la région sous-capsulaire.

La population la plus immature, DN1, est hétérogène. On y retrouve les ETP, phénotypiquement Lin⁻c-kit^{hi}CD44⁺CD25⁻. Ce sont les progéniteurs thymocytaires les plus précoces dans le thymus et ils ne montrent qu'une expansion limitée. Les ETP se différencient ensuite en DN2. À cette étape, ils expriment RAG1 et RAG2, initient le réarrangement de la chaîne β du TCR et entreprennent un processus de prolifération impliquant des cytokines, dont SCF²⁷⁸ et IL-7²⁷⁹. Ces deux premières sous-populations dans la différenciation T (ETP et DN2) sont réversibles et conservent le potentiel à générer des cellules NK, DC et myéloïdes. Les ETP ont, en plus, un potentiel à générer des lymphocytes B²⁸⁰⁻²⁸³. Ensuite, ils se différencient en DN3, où le réarrangement fonctionnel d'une chaîne β du TCR coïncide avec une contrainte à une restriction vers la différenciation T. Par contre, cet engagement n'est peut-être pas absolu. En effet, Rolink et son équipe ont rapporté que des lymphocytes B Pax-5⁻ sont aptes à se différencier et à reconstituer le thymus pour générer des cellules T, montrant ainsi la plasticité étonnante des cellules hématopoïétiques. Au stade DN3-DN4, elles expriment la chaîne pré-T α pour former un pré-TCR, un complexe qui médie la β -sélection, la survie, la prolifération et l'arrêt de la recombinaison au locus TCR β (exclusion allélique)²⁸⁴. Ces cellules se différencient ensuite en DP, exprimant à la fois les co-récepteurs CD4 et CD8 à leur surface²⁸⁵. À cette étape, la chaîne pré-T α est remplacée par la chaîne α , formant un TCR $\alpha\beta$ fonctionnel à la surface de ces cellules²⁸⁶. Ces DP, qui composent 75 à 88% des thymocytes, migrent dans le cortex et y restent 2-4 jours. Les chaînes TCR α et β s'assemblent pour former un TCR mature, exprimé à la surface des lymphocytes en combinaison avec CD3, un complexe de transduction de signaux.

C'est à ce moment qu'est amorcé le processus de sélection positive. À cette étape ne sont sélectionnés, pour la poursuite de leur développement, que les lymphocytes ayant la capacité d'interagir avec un complexe CMH-peptide du soi à la surface des cellules épithéliales thymiques. Ceux qui ne reconnaissent pas ce complexe meurent par un processus appelé «mort par négligence». Les thymocytes migrent à travers la région cortico-médullaire et la médulla où s'effectue le processus de sélection négative. À cette étape, les lymphocytes ayant une affinité trop forte pour les complexes CMH-peptide, situés à la surface des DC, sont éliminés. Ce processus est nécessaire pour la production de lymphocytes T non-réactifs au soi, permettant ainsi de réduire les risques de maladies auto-immunes²⁸⁷. À cette étape, les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ ne sont pas encore prêts à quitter le thymus. Ils y restent encore une semaine. Pendant cette période, ils entament des processus de maturation fonctionnelle où ils acquièrent leurs fonctions effectrices soit «helper» pour les CD4⁺ et

cytolytiques pour les CD8+. Finalement, les lymphocytes T ayant survécu sont exportés en périphérie, via les vaisseaux à la région cortico-médullaire, où ils patrouillent les organes lymphoïdes secondaires à l'affût d'agents étrangers à éliminer²⁸⁸⁻²⁹¹.

Les mouvements cellulaires intrathymiques, de l'entrée des progéniteurs T à leur émigration, sont médiés par des chémokines produites par l'épithélium thymique et par les molécules d'adhésion qu'il exprime. Par exemple, CCR7 et CCR9, les récepteurs des chémokines CCL19, CCL21 et CCL25, ont été rapportés comme médiant la migration des progéniteurs T de la région corticomédullaire à la région sous-capsulaire du thymus^{292,293}. CCR7 est impliqué dans la migration des progéniteurs au thymus^{294,295} et de la migration des SP vers la médulla^{296,297}. L'expression de CCR9, comme mentionné ci-haut, corrèle avec l'entrée des progéniteurs dans le thymus²⁹⁸. CXCL12 est aussi exprimé au niveau du cortex thymique²⁹⁹. Son seul récepteur connu à ce jour, CXCR4, est exprimé fortement sur les DN. On a suggéré un rôle à l'interaction CXCR4/CXCL12 pour promouvoir l'association des progéniteurs avec les cellules stromales sous-capsulaires³⁰⁰. Certaines molécules d'adhésion telles que CD44³⁰¹, VCAM1³⁰², les intégrines α_4 ³⁰³, α_6 ³⁰⁴ et β_2 ³⁰⁵ et PSGL-1³⁰⁶ ont été rapportées comme participant à la migration des précurseurs T au thymus.

3.4 Wnt et la thymopoïèse

L'une des premières observations du rôle de Wnt sur le développement T est indirecte. En 1993, Oosterwegel et son équipe analysent le patron d'expression de TCF-1 et LEF1, deux facteurs de transcription avec un niveau d'homologie très élevé³⁰⁷. Ils rapportent que leur expression est ubiquitaire pendant l'embryogenèse puis restreinte aux lymphocytes T, ainsi qu'aux lymphocytes B pour LEF1, à la naissance³⁰⁸. L'expression protéique de TCF1/LEF1 est détectée dans toutes des populations thymocytaires avec un pic d'expression à l'étape ISP (*immature simple positive*), une population CD8+ transitoire entre les DN4 et les DP. Deux souris déficientes en TCF-1 ont été générées, soit TCF-1 ^{$\Delta V/\Delta V$ -/-}, avec une délétion dans l'exon 5, et TCF-1 ^{$\Delta VII/\Delta VII$ -/-}, avec une délétion dans l'exon 7 contenant une partie essentielle de la HMG box³⁰⁹. À cette époque, le lien entre TCF et Wnt n'a pas encore été fait. Ce lien ne fût fait qu'en 1997, où des travaux sur la drosophile ont montré l'activation de la transcription de TCF suite à sa multimérisation avec le complexe Armadillo³¹⁰.

Le phénotype de souris TCF-1^{-/-} montre clairement un rôle de TCF-1 dans les étapes précoces du développement T : une diminution majeure de la cellularité thymique (10-100 fois) et une absence quasi-totale de cortex thymique. Le thymus est dépourvu de DN2 et

montre une diminution des DN4 qui sont hypoprolifératifs. Ces souris ont 100 fois moins de DP et une diminution du nombre de lymphocytes T périphériques. Cette délétion n'affecte ni la génération de lymphocytes B, ni la capacité proliférative et cytotoxique des lymphocytes T produits. Les auteurs en ont conclu que le rôle de TCF1 est restreint aux thymocytes^{311,312}. Le rétablissement du phénotype normal est possible si l'on réintroduit p45TCF-1, un des isoformes de TCF-1 qui contient le domaine de liaison à la β -caténine³¹³. TCF-1 jouerait un rôle dans la survie des thymocytes^{314,315}. En effet, les DP TCF-1^{-/-} n'expriment que très faiblement Bcl-x_L, une molécule anti-apoptotique clé à cette étape de la thymopoïèse, et leur survie est partiellement rétablie avec la surexpression de Bcl-2. Il a été suggéré que TCF-1 régule l'expression de Bcl-2 *in vivo*³¹⁶. Ce sont les premières évidences d'un rôle de la voie Wnt dans le développement T. Des souris déficientes à la fois pour LEF1 et TCF-1 ont été générées. L'analyse *in vitro* de leur thymopoïèse révèle un défaut dans la thymopoïèse avec une diminution de la cellularité ainsi qu'un arrêt complet de la différenciation à l'étape ISP. Les compartiments DN sont sévèrement affectés avec une absence quasi-totale de DN1, DN2 et DN4 et une accumulation de DN3³¹⁷.

Depuis, plusieurs équipes se sont consacrées à élucider l'expression et le rôle des divers composants de la voie Wnt dans les processus de différenciation/survie/prolifération des progéniteurs T. Staal et son équipe ont rapporté la présence de Wnt1, Wnt4, Fzd5, Fzd7 et Fzd8 dans des thymus néonataux. Par la transfection de foies fœtaux avec Wnt1 et Wnt4, ils montrent l'augmentation de la cellularité dans ces cultures par rapport aux contrôles. Inversement, l'infection de thymocytes fœtaux avec des effecteurs dominant-négatifs de Wnt, appelés solfzd (la forme soluble de Fzd), montre un arrêt de la différenciation au stade DN avec solfzd7, et un arrêt à ISP avec solfzd5 et 8³¹⁸. Ils ont aussi évalué l'activation de cette voie chez les thymocytes humains et murins. Ils rapportent que l'expression de la β -caténine stabilisée est la plus élevée dans les cellules DN CD34+ humaines (l'équivalent humain des étapes DN1 à DN3 chez la souris), dans les thymocytes embryonnaires murins DN1 et DN2 ainsi que dans les DN et ISP chez les thymocytes murins adultes. Ils rapportent aussi l'activation de TCF-1 dans les DN humains *in vitro*, suite au transfert dans des FTOC. Ils ont effectué la transduction de foie fœtal et de cellules médullaires murines avec DKK1, un inhibiteur de la signalisation Wnt. Ils montrent qu'*in vitro*, le développement de ces cellules est bloqué, de façon dose dépendante de DKK1, jusqu'au blocage complet à l'étape de DN1 lorsque l'expression de DKK1 est forte³¹⁹. De plus, il a été rapporté que les cellules épithéliales thymiques sont les principales productrices de Wnt dans le thymus, surtout de

Wnt4 mais aussi de Wnt7a, 7b, 10a et 10b³²⁰. Les souris Wnt4^{-/-}, Wnt1^{-/-} et déficientes pour ces deux gènes ont été générées. Ces souris meurent à la naissance, empêchant ainsi l'analyse du rôle de ces Wnts dans la thymopoïèse adulte. L'analyse de leurs thymocytes fœtaux (E18/E19) montre une diminution de la cellularité de 20 à 30% et jusqu'à 50-70% chez les souris Wnt4^{-/-}Wnt1^{-/-}. Par contre, la proportion relative de chacune des sous-populations thymocytaires est équivalente aux contrôles³²¹. Une évidence supplémentaire du rôle de Wnt dans la thymopoïèse vient d'expériences effectuées sur les souris transgéniques pour l'axine, un régulateur négatif de la β -caténine. Ces souris présentent une désorganisation de l'architecture thymique, avec une absence de ségrégation cortico-médullaire induite par une quasi-absence de cortex. Des essais TUNEL montrent l'apoptose massive de ces thymocytes par rapport aux contrôles³²².

Le rôle de la β -caténine dans la thymopoïèse a fait l'objet de plusieurs études et soulevé plus de contradictions que de réponses claires. L'équipe de Von Boehmer a généré une souris où la β -caténine est constitutivement active dans les thymocytes, dès l'étape DN3. Ces souris ont une cellularité thymique réduite de 90%, une diminution du pourcentage de SP, une diminution de l'expression de la chaîne β du TCR à la fois chez les DP et les SP et une augmentation de l'apoptose chez les sous-populations DN4 à SP. Le croisement avec des souris RAG^{-/-} montre un rétablissement partiel du développement T. Ils suggèrent ainsi que l'expression forcée de la β -caténine permettrait la différenciation en SP en l'absence de signal via le pré-TCR ou du TCR $\alpha\beta$ ³²³. Un phénotype équivalent est obtenu suite à la délétion conditionnelle de l'APC, à l'étape DN3-DN4 de la différenciation T³²⁴. Ce phénotype est une diminution encore plus marquée de la cellularité thymique, indiquant un rôle β -caténine-indépendant à l'APC, et un blocage encore plus marqué de la transition DN4 à DP, causant une accumulation majeure de DN4. Ces DN4 montrent un niveau d'apoptose et un pourcentage de cellules en cycle semblables aux souris β -caténine mutantes mentionnées ci-haut, mais un délai dans l'initiation du cycle cellulaire. Les auteurs rapportent aussi que la stabilisation de la β -caténine diminue l'expression de Notch et de ses cibles transcriptionnelles. Ils démontrent que la stabilisation de la β -caténine antagonise la signalisation Notch, et entraîne le phénotype de différenciation TCR-indépendante. En effet, lorsque ces thymocytes sont transfectés avec NotchIC, l'expression de leur TCR- β se trouve partiellement rétablie, que ce soit chez les souris exprimant la β -caténine constitutivement active ou chez celles où l'APC est délétée³²⁵. De plus, lorsque la β -caténine stabilisée est surexprimée soit à l'étape DN3 soit plus tardivement à l'étape de DP, les souris développent

des thymomes. Ces cellules, phénotypiquement DP, requièrent l'expression de la recombinaison RAG et de c-myc pour leur transformation et ne dépendent, ni ne bénéficient de l'activation de la cascade de signalisation de Notch³²⁶.

Sen et son équipe ont aussi généré une souris où la β -caténine est constitutivement active et rapportent que la surexpression de β -caténine ne modifie pas la cellularité thymique mais accroît la génération de thymocytes matures CD8⁺ au détriment des DP dans le thymus³²⁷. Cette augmentation des CD8 ne se reflète pas en périphérie, où les décomptes cellulaires en lymphocytes T sont normaux, sans augmentation de leur survie ni de leur prolifération *in vitro*. Leur maturation s'effectue de façon TCR-dépendante, avec une génération de lymphocytes T CD8⁺ équivalente aux contrôles lorsque transférés dans des souris CMH-1^{-/-}³²⁸. La différence entre les résultats générés par ces modèles serait possiblement due au niveau d'expression variable de la β -caténine. En effet, l'équipe de Sen suggère que le niveau plus faible de β -caténine obtenu chez leur souris contournerait l'effet néfaste de la β -caténine sur la signalisation via le pré-TCR, leur permettant ainsi d'évaluer l'effet de la stabilisation de la β -caténine à des étapes plus tardives de la thymopoïèse³²⁹. En revanche, un article de l'équipe de Jenkinson montre un résultat similaire en ce qui a trait à la génération de thymocytes CD8⁺, mais dans un modèle opposé³³⁰. En effet, ils ont procédé à la transduction de la protéine ICAT (*inhibitor of β -catenin and TCF*), qui empêche la liaison de la β - et γ - caténines à leurs sites de liaison sur TCF-1. Les résultats montrent que la liaison caténine/TCF1 est requise pour la différenciation des thymocytes de DN à DP, où la transduction d'ICAT à cette étape précoce inhibe la génération de DP, mais pas de DP à SP. En effet, si on transduit ICAT à l'étape de DP, ces derniers génèrent des SP aussi efficacement que les contrôles. Par contre, lors de la transduction des DN avec ICAT, en plus de voir un défaut dans la transition de DN à DP, les auteurs montrent une génération de SP CD8⁺, exprimant TCR- β , à des niveaux plus faibles que les contrôles³³¹.

Ainsi, si on compare ces résultats à ceux de Sen, on voit que deux modèles, un surexprimant la β -caténine et l'autre inhibant sa liaison à TCF-1, donnent tous deux la génération de SP CD8⁺. Ces résultats suggèrent que la génération de SP CD8⁺ s'effectue soit grâce à une transcription dépendante de TCF-1 mais indépendante de sa liaison à la β -caténine, soit par la liaison de la β -caténine à un facteur de transcription autre que TCF-1. Cette première hypothèse est d'autant plus plausible qu'il a été rapporté que l'activation de TCF-1 peut se faire en absence de la β - et γ - caténines dans les cellules hématopoïétiques³³². Deux nouveaux articles rapportent aussi une altération de la thymopoïèse suite à l'activation

constitutive de la β -caténine de façon systémique dans l'hématopoïèse^{333,334}. La première équipe rapporte une diminution de 25% de la cellularité thymique, moins de leucocytes sanguins, un blocage de la thymopoïèse à la transition DN1 à DN2, moins de ETP mais un pourcentage de DP et SP normal³³⁵. La deuxième équipe rapporte un phénotype plus sévère, soit une cellularité thymique de 10% par rapport aux contrôles, une accumulation de DN, notamment des DN1 et DN2, avec une presque totale absence de DP et de SP³³⁶.

La délétion germinale complète de la β -caténine n'est pas possible, car elle entraîne la mort à l'état embryonnaire due à une déficience dans la formation de l'axe antéropostérieur, ainsi qu'à l'absence de mésoderme et de tête³³⁷. Plusieurs équipes ont élaboré des stratégies pour tenter d'analyser le rôle de la voie canonique de Wnt dans le développement T en induisant la délétion conditionnelle de la β -caténine. Les résultats obtenus sont contradictoires. L'équipe de Sen montre que la délétion conditionnelle de la β -caténine, à l'étape DN3 de la thymopoïèse entraîne un blocage de la transition DN3 à DN4 et une diminution de la capacité proliférative des DN4. Ils rapportent une diminution drastique des T en périphérie et leur déficit de prolifération, *in vitro*, suite à une stimulation TCR-dépendante avec un anticorps anti-CD3³³⁸. Par contre, Radtke montre que la délétion conditionnelle de la β -caténine dès l'initiation de l'hématopoïèse n'a aucun impact sur l'hématopoïèse et la thymopoïèse³³⁹, suggérant l'existence de mécanismes compensatoires, comme la γ -caténine³⁴⁰. Par contre, des souris γ -caténine^{-/-} ne montrent aucun phénotype thymique majeur³⁴¹. Récemment, l'équipe de Radtke a généré des souris β -/ γ -caténine^{-/-} et rapporte que l'absence simultanée de ces deux gènes n'altère ni l'hématopoïèse, ni la lymphopoïèse³⁴².

4. Utilité de ces travaux : curiosité scientifique ou intérêt thérapeutique?

La transplantation de CSH s'est beaucoup développée avec les années. Elle a débuté comme une intervention expérimentale effectuée sur un groupe restreint de patients et est devenue un traitement médical bien établi, effectué à grande échelle sur des patients ayant des troubles hématologiques³⁴³. Développer de nouvelles méthodes pour modeler les CSH, au niveau cellulaire ou génétique, permettrait d'accroître les applications potentielles de telles transplantations. Un exemple d'une telle intervention serait l'expansion *ex vivo* des CSH. Cette technique pourrait permettre d'augmenter le nombre de cellules à partir d'un greffon contenant peu de CSH ou même de favoriser les transplantations autologues. L'expansion *ex vivo* de CSH a été tentée, via un traitement avec des combinaisons de cytokines^{344,345} ou

suivant l'analyse de modèles animaux chez lesquels on a surexprimé diverses molécules dans des cascades de signalisation comme Notch³⁴⁶, FGF³⁴⁷, la voie canonique de Wnt^{348,349} et HoxB4³⁵⁰⁻³⁵². Ces essais n'ont cependant pas encore mené à l'établissement de protocoles d'expansion *ex vivo* efficaces.

Notre modèle de surexpression de Wnt4 laisse entrevoir un potentiel thérapeutique intéressant dans cette optique, ainsi que pour le rétablissement immunitaire suivant une immunodéplétion importante ou induite par le vieillissement. En effet, outre nous permettre de mieux comprendre les mécanismes nécessaires et/ou essentiels qui régissent le développement immunitaire (surtout le développement de l'axe LMPP), ce modèle pourrait permettre de pallier à, voire même contrer, l'immunodéficience ou la sénescence thymique grâce au prétraitement ou à la transduction rétrovirale *ex vivo* des CSH avec Wnt4. Ceci pourrait permettre de moduler la génération de LMPP à long terme et favoriser un rétablissement des lignées cellulaires générées à partir des LMPP. Ceci mènerait au rétablissement permanent du système myélo-lymphoïde chez ces patients. Nos expériences laisseraient entrevoir de nouvelles avenues passionnantes pour le traitement d'immunodéficiences qui pourrait s'avérer d'un intérêt thérapeutique crucial.

5. Description du projet de recherche : questions de départ

Article 1: *T-cell generation by lymph node resident progenitor cells*

Ce premier projet tentait de répondre à deux questions fondamentales :

1. Quels signaux moléculaires, produits par le stroma thymique, sont nécessaires et suffisants au recrutement/différenciation des progéniteurs T ?
2. Que manque-t-il au stroma des ganglions mésentériques pour pouvoir supporter la différenciation des progéniteurs T ?

Ce projet part de l'idée que les ganglions lymphatiques, dans certaines situations, acquièrent la capacité de supporter la différenciation T. Ceci se produit, par exemple, sous l'effet d'une surexpression d'Oncostatin M (OM), chez une souris athymique ou suite à une lymphopénie sévère. Ceci implique-t-il 1) que les ganglions sont aptes à recruter les mêmes progéniteurs que le thymus mais inaptes à supporter les étapes précoces de leur différenciation, ou 2) que les ganglions sont incapables de recruter de tels progéniteurs dans des conditions physiologiques normales?

Pour évaluer cette question, nous avons analysé les ganglions du point de vue hématopoïétique (contiennent-ils des progéniteurs T ?), et du point de vu stromal (manque-t-il certains transcrits importants à la thymopoïèse ?).

Article 2: *Wnt4 is a survival factor for multipotent hematopoietic progenitors and enhances thymopoiesis*

Grâce aux résultats que nous avons obtenus suite au premier article suggérant que la déficience en Wnt4 empêchait les ganglions lymphatiques de fournir un environnement adéquat à la différenciation T, nous avons poursuivi nos recherches dans ce sens en posant les questions suivantes :

1. Peut-on induire la différenciation extra-thymique dans des ganglions mésentériques chez des souris grâce à la surexpression de Wnt4 ? Est-ce que l'expression de Wnt4 est la seule chose qui distingue un ganglion d'un thymus ?
2. Quel serait le phénotype induit par une surexpression systémique de Wnt4 dans le compartiment hématopoïétique chez la souris?

Pour permettre de répondre à ces questions, nous avons décidé de tirer profit de la surexpression protéique par l'utilisation de vecteurs rétroviraux. Pour ce faire, nous avons transduit du foie fœtal de souris avec un vecteur rétroviral exprimant ou pas Wnt4. Nous avons ensuite reconstitué des souris irradiées avec ces cellules et avons évalué le phénotype après 16 semaines pour nous assurer d'une reconstitution à long-terme.

Grâce à ces expériences, nous espérons être en mesure de mieux comprendre les caractéristiques requises à un organe, tant au niveau des compartiments hématopoïétiques que stromaux, qui lui permettent de supporter les diverses étapes de la différenciation des lymphocytes T. De plus, outre plusieurs fonctions non-hématopoïétiques, ce projet nous a permis aussi de mieux caractériser le rôle de Wnt4 dans le système immunitaire. Cette molécule, en plus d'être le membre de la famille des Wnts le plus exprimé dans le thymus, est aussi responsable de l'induction de FoxN1, le gène absent chez les souris athymiques. Quelle est sa fonction réelle dans la thymopoïèse ?

5.1. ARTICLE I:

Terra R.*, Louis I.*, Le Blanc R., Ouellet S., Zúñiga-Pflücker JC., Perreault C.,
T cell generation by lymph node resident progenitor cells, *Blood*, 2005,
106(1):193-200.

T cell generation by lymph node resident progenitor cells

Short title: T cell development in the lymph node

Scientific heading: Immunobiology

Rafik Terra^{1,2,3}, Isabelle Louis^{1,2,3}, Richard LeBlanc⁴, Sophie Ouellet², Juan Carlos
Zúñiga-Pflücker⁵ & Claude Perreault^{1,2,6}

¹Institute of Research in Immunology and Cancer, University of Montreal, Montreal,
Quebec, Canada H3C 3J7

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

⁴Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Fleurimont, Quebec, Canada J1H 5N4

⁵Department of Immunology, Sunnybrook and Women's College Health Sciences Centre,
University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada M4N 3M5

³R.T. and I.L. contributed equally to this work

RT, IL and CP designed research; RT, IL and SO performed research; RL and JCZP contributed vital new reagents or analytical tools; RT, IL, RL, JCZP and CP analyzed data; RT, IL and CP wrote the paper.

IL is supported by a training grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). JCZP is supported by an Investigator Award from the CIHR. CP holds a Canada Research Chair in Immunobiology. This work was supported by CIHR grant MOP-42384 and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

Word counts: 199 in the abstract, 4945 words of text.

⁶Corresponding author: Claude Perreault

Guy-Bernier Research Center
Maisonneuve-Rosemont Hospital
5415 de l'Assomption Blvd.
Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4
Telephone: (514) 252-3557, Fax: (514) 252-3430
e-mail: [REDACTED]

Abstract

In the thymus, two types of Lin⁻Sca-1⁺ (lineage-negative stem cell antigen-1-positive) progenitors can generate T lineage cells: c-Kit^{hi} interleukin-7 receptor α -negative (c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻) and c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺. While c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ progenitors are absent, c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ progenitors are abundant in the lymph nodes (LNs). c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ progenitors undergo abortive T cell commitment in the LN and become arrested in G₁ phase of the cell cycle because they fail both to upregulate *c-myb*, *c-myc*, and *cyclin D2* and to repress *junB*, *p16^{INK4a}* and *p21^{Cip1/WAF}*. As a result, development of LN c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ progenitors is blocked at an intermediate CD44⁺CD25^{lo} development stage *in vivo*, and LN derived progenitors fail to generate mature T cells when cultured with OP9-DL1 stromal cells. LN stroma can provide key signals for T cell development including IL-7, Kit-ligand, and Delta-like1, but lacks *Wnt4* and *Wnt7b* transcripts. LN c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ progenitors are able to generate mature T cells when cultured with stromal cells producing wingless-related MMTV integration site 4 (Wnt4), or upon *in vivo* exposure to oncostatin M whose signaling pathway intersects with Wnt. Thus, supplying Wnt signals to c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ progenitors may be sufficient to transform the LN into a primary T-lymphoid organ. These data provide unique insights into the essence of a primary T lymphoid organ, and into how a cryptic extrathymic T cell development pathway can be amplified.

Introduction

In all animals with an adaptive immune system, the thymus is the primary lymphoid organ for T cell development and no other organ can compensate for defective thymic function.¹ This is problematic considering that progressive thymus atrophy ultimately affects all ageing subjects and can even impinge on younger subjects affected by several serious illnesses.²⁻⁴ A key question that has baffled immunologists for forty years is the nature of the signals provided by thymic stromal cells that are necessary and sufficient for T cell development.⁵

Strikingly, recent studies have shown that a bone marrow stromal cell line ectopically expressing the Notch ligand Delta-like-1 (OP9-DL1) acquired the capacity to induce the differentiation of hematopoietic progenitors into functional T cells *in vitro*.^{6,7} A startling and important implication is that the three-dimensional thymic microenvironment and the presence of thymic epithelial cells are not essential for T cell development.⁶ Thymus-independent T cell development can also take place *in vivo*.⁸⁻¹⁰ Thus, using transgenic mice bearing a green fluorescent protein (GFP) gene placed under the control of the RAG2 promoter, Guy-Grand *et al.*⁹ showed that T lymphopoiesis occurred in lymph nodes (LNs) and less in the Peyer's patches of athymic mice. This cryptic T cell development pathway however generates only limited numbers of mature T cells.⁹ Unexpectedly, signals transmitted by the leukemia inhibitory factor (LIF) receptor following prolonged exposure to mouse LIF or bovine oncostatin M (OM), amplify the cryptic LN T-lymphopoietic pathway and transform the mouse LNs into primary T-

lymphoid organs.¹¹⁻¹⁶ Thus, about 215×10^6 Thy1⁺CD4⁺CD8⁺ cells are present in the mesenteric LNs of 12-week-old lckOM transgenic mice that express the OM transgene under the control of the proximal lymphocyte protein tyrosine kinase (lck) promoter.¹⁵ Studies of OM-transgenic mice showed that this extrathymic pathway is thymus independent, generates functional T lymphocytes and is regulated by a cyclooxygenase-2-dependent proliferation of high endothelial venules.¹⁶⁻¹⁹ The goal of our work was to determine why LNs are normally unable to support T cell development and how OM can alleviate this defect. We surmised that such knowledge would provide invaluable information on the essence of a primary T-lymphoid organ, that is, how stromal cells regulate crucial early steps in T cell development.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6J (B6) mice were purchased from The Jackson laboratory (Bar Harbor, ME). LckOM transgenic mice on a C57BL/6J background have been previously described.^{14,15}

Flow cytometry analysis and cell sorting

The following antibodies were used: biotin and PE-Cy7 anti-CD8 α (53-6.7), biotin anti-CD8 β (53-5.8), APC-Cy7 anti-CD4, biotin anti-NK1.1 (PK136), biotin, APC and FITC anti-TCR β (H57), biotin anti-TCR $\gamma\delta$ (GL-3), FITC and PE anti-CD44 (IM7), biotin, APC-Cy7, PE and APC anti-CD25 (PC61), biotin mouse lineage panel [CD3 ϵ , CD11b, CD45R/B220, Ly6C, Ly6G (GR-1), TER-119/erythroid cells (Ly-76)], purified anti-CD127 (IL-7R α , A7R34) detected with goat anti-rat FITC, APC anti-CD117 (c-Kit, 2B8), FITC anti-CD24 (HSA), Pe-Cy5 and PE anti-Sca-1 (E13-161.7), FITC anti-BrdU (3D4) with its isotype control (MOPC-21), FITC anti-Bcl-2 (3F11) with its isotype control (A19-3). Biotinylated antibodies were detected with streptavidin PerCP or PE-Cy7. Anti-CD127 was purchased from eBioscience (San Diego, CA) and other antibodies mentioned above as well as Annexin V-FITC were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA) and Cedarlane Laboratories (Hornby, ON, Canada). Polyclonal purified anti Phospho-Stat3 (Tyr705) (Signaling Technology; Beverly, MA) was detected with FITC goat anti-rabbit IgG F(ab)2 (Abcam; Cambridge, MA). Intracellular staining was done as previously described for BrdU²⁰, TCR β and Bcl-2²¹, and Phospho-Stat3²². Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software and sorted on a

FACSVantage SE system with FACSDiVa option (BD Biosciences, San Jose, CA). To preserve cell integrity and avoid loss of rare cell subsets, electronic sorting was done without preliminary cell depletion. The purity of sorted cell populations was above 98%.

RT-PCR analysis

RNA was prepared from cells sorted in trizol reagent (Invitrogen; Burlington, ON, Canada) followed by chloroform extraction and RNA precipitation following the manufacturer's instructions. We performed RT-PCR with Qiagen OneStep RT-PCR Kit. Previously described RT-PCR conditions and primers were used for *Hprt*, *Rag-1*, γ_c , *preT α* , and *CD3 ϵ* .²³ Primers and annealing temperatures were for *HES-1*: (forward) 5'-GCCAGTGTCAACACGACACCGG-3', (reverse) 5'-TCACCTCGTTCATGCACTCG3' (66°C); and for *Deltex1*: (forward) 5'-CACTGGCCCTGTCCACCCAGCCTTGGCAGG-3', (reverse) 5'-GGGAAGGCGGGCAACTCAGGCCTCAGG-3' (55°C). Negative controls were performed in all assays (water and no RT).

Quantitative RT-PCR

Lymphoid cells were separated from stromal cells by mechanical mashing of lymphoid organs through a cell strainer as described.^{18,24} mRNA was extracted in trizol reagent and reverse transcription was carried out using SuperScript II RNaseH Reverse Transcriptase (Invitrogen). Real-Time RT-PCR was performed with an ABI Prism Sequence Detection System 7700 (Applied Biosystems; Foster City, CA), using TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Triplicate wells were averaged and the target gene

values were normalized for *Hprt* content. We used specific primers and probes (TaqMan gene expression assays) from Applied Biosystems.

T cell progenitors and OP9 cell cocultures

DN1 and DN4 Lin⁻ progenitors were sorted according to surface expression of CD44, c-kit and Sca-1. Unless stated otherwise, sorted cells were seeded at 4×10^4 cells/well onto 24-well tissue plates containing a confluent monolayer of OP9 cells transfected with constructs encoding (i) GFP alone; (ii) GFP and DL-1; or (iii) GFP, DL1 and Wnt4. Wnt4 plasmid (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) transfection of OP9 DL-1 cells was carried out using FuGene 6 (Roche Biochemicals, Rotkreuz, Switzerland) according to manufacturer's instructions. All co-cultures were performed in the presence of IL-7 and Flt3L (Peprotech, Rocky Hill, NJ).⁶ Cocultures were harvested by forceful pipetting at the indicated time points and stained for flow cytometry analysis.

Results

Lymphoid progenitors committed to the T lineage are present in the LNs

The least mature thymocytes are termed DN1 cells and express a $\text{Lin}^- \text{CD44}^+ \text{CD25}^-$ surface phenotype. Two subsets of DN1 thymocytes can generate T lymphocytes: $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^-$ early thymic progenitors (ETPs) and $\text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$ common lymphoid progenitors (CLPs).²⁵⁻³⁰ Thymocytes subsequently go through DN2 ($\text{CD44}^+ \text{CD25}^+$), DN3 ($\text{CD44}^- \text{CD25}^+$), and DN4 ($\text{CD44}^- \text{CD25}^-$) stages before giving rise to $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ double-positive T cells.

LNs can support *in situ* generation of mature single-positive (SP) T cells following intravenous injection of DN thymocytes but not of hematopoietic stem cells into athymic hosts.³¹ This means that the lack of T cell development in the LNs under normal conditions is due to the failure of LNs to attract T cell progenitors or to support some early event at the DN stage. To discover the early step in T cell development that occurs in the thymus and the OM-transgenic LN but not the wild-type (wt) LNs, we first analyzed populations of lineage-negative (Lin^-) cells in these organs. All analyses of LN cells in this work were performed on mesenteric LNs. We discriminated three subsets of DN1 phenotype cells according to the level of c-Kit expression (negative, low or high) because previous reports showed that this marker identifies cell subsets with different T cell progenitor potential.^{26-28,32} Overall, DN1 phenotype cells were present in similar numbers in the thymus and wt LN and were more abundant in the OM^+ LN (Figure 1A-B). However, notable discrepancies were found among DN1 cell subsets in the three organs. Strikingly, c-Kit^{hi} DN1 cells were present exclusively in the thymus (Figure 1C-

D). In contrast, c-Kit⁻ and c-Kit^{lo} DN1 phenotype cells were more abundant in the wt LN than the thymus, and even more so in the OM⁺ LN (Figure 1C). Furthermore, among c-Kit^{lo} DN1 cells, the percentage of Sca-1⁺ elements was lower in the wt and OM⁺ LN (~19%) than in the thymus (~38%) (Figure 1D). The vast majority of c-Kit⁻ and c-Kit^{lo} thymic and LN DN1 cells were IL-7R α ⁺ whereas thymic c-Kit^{hi} cells were IL-7R α ⁻ (data not shown).

Relative to the thymus, wt and OM⁺ LN showed an increased proportion of cells bearing a pre-DN2 phenotype (CD44⁺CD25^{lo}) (Figure 1A). Detection of *HES-1*, *Deltex1*, *Rag-1* and *CD3e* transcripts indicates that DN1 and pre-DN2 subsets in wt and OM⁺ LN contain cells committed to the T lineage (Figure 2A-B). DN2 and DN3 cells were practically undetectable in wt LNs, yet cells with a DN4 phenotype were present (Figure 1A-B). At the population level, the transcriptome of “illegitimate” wt LN DN4 phenotype cells was not identical to that of genuine thymic DN4 cells, as shown by differences in levels of *Rag-1*, *Ptcra*, and *HES-1* transcripts (Figure 2E). However, at least some of the “illegitimate” DN4 phenotype cells in the wt LN were committed to the T lineage: i) they contained *CD3e* transcripts (Figure 2E), ii) about 19% expressed intracytoplasmic TCR β chains (Figure 2F), and iii) when cultured for 7 days in the presence of OP9-DL1 stromal cells, which can support all stages of T cell development, wt LN-derived DN4 cells generated CD4⁺CD8⁺ and single-positive TCR β ⁺ T cells (Figure 2G). In contrast to the wt LN, the numbers of cells with DN2, DN3, and DN4 phenotype were similar in OM⁺ LN and thymus (Figure 1B). Furthermore, DN2, DN3, and DN4 cells in the OM⁺ LN were similar to those in the thymus with regard to the levels of several transcripts and

expression of the c-Kit protein (Figure 2C-E). The sole difference between thymic and OM⁺ LN DN cells was the lower proportion of DN4 cells with rearranged TCR β chains in the the OM⁺ LN (Figure 2F).

Two major points can be made from these data. First, Lin⁻c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ DN1 cells, whose phenotype corresponds to that of ETPs²⁶, are present exclusively in the thymus. A corollary is that, at least in the OM⁺ LN, mature T cells can be produced in the absence of c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ DN1 cells. This extrathymic pathway is truly thymus independent as shown in athymic mice reconstituted with OM transgenic fetal liver or injected with OM.^{14,15,18} Second, accumulation of pre-DN2 cells in wt and OM⁺ LNs, and emergence of DN2 and DN3 cells in OM⁺ but not wt LNs suggest that failure of wt LN to support T cell development is due to a blockade of the DN1 to DN2 transition that is alleviated in the OM⁺ LN.

Proliferation of DN cells

In the thymus, DN cells proliferate extensively, particularly at the DN2 and DN4 stages.²⁰ To analyze the proliferation of DN cell subsets in the thymus and LNs, BrdU was injected intraperitoneally, mice sacrificed 40 min later, and cell cycle status was determined by staining with anti-BrdU antibody and 7AAD.³³ In addition, the proportion of apoptotic cells was estimated by annexin V labeling. As opposed to their thymic counterparts, all DN phenotype cells in the wt LN were arrested at the G₁ phase of the cell cycle with virtually no cells in S phase (Figure 3A). In the OM⁺ LN, the percentage of cells in S phase was similar to thymocytes for DN1, DN2, and DN3 cells, but

significantly lower for the pre-DN2 and DN4 subsets (Figure 3A). Among DN cells in the wt LN, lack of proliferation was correlated with higher proportion of apoptotic cells compared to the thymus and the OM⁺ LN (Figure 3C).

Since DN1 cells found in lymphoid organs are heterogeneous (Figure 1D), we sought to provide a more accurate estimation of their mitotic behavior by assessing BrdU incorporation in cell subsets expressing different levels of c-Kit (Figure 3B). In the thymus, BrdU⁺ DN1 cells were mainly found in the c-Kit^{lo} and c-Kit^{hi} cell subsets (Figure 3B). In contrast, BrdU incorporation by DN1 cells in LNs was independent of c-Kit level, being of similar and relatively modest magnitude among c-Kit^{neg} and c-Kit^{lo} cells, and increased about two-fold in OM⁺ relative to wt LN (Figure 3B). Thus, cell cycle status of DN1 cells was correlated with c-Kit expression in the thymus but not wt or OM⁺ LN. The low level of BrdU incorporation among c-Kit^{lo} DN1 cells in the LNs relative to the thymus suggests that the LN stroma fails to provide either Kit ligand or another signal that promotes proliferation of c-Kit^{lo} DN1 cells in the thymus.

Key differences between thymus and LN stroma involve Wnt proteins

The data in Figure 1 show that failure of wt LN to support T cell development is due to an inability to complete the DN1-to-DN2 transition. This defect is largely alleviated in OM⁺ LN. T cell development is however not entirely thymus-like in the OM⁺ LN where accumulation of pre-DN2 cells and relatively low proliferation of DN4 phenotype cells were found. Signals required for the development of thymocytes at the DN1-DN2 stage are initiated by key ligands that control proliferation and survival (IL-7, kit ligand, and

possibly Wnt proteins)³⁴⁻³⁹ and T cell lineage commitment (Delta-like Notch-1 ligands)^{40,41}. Expansion of the DN4 cell subset depends on expression of the pre-TCR (at the DN3 stage), which has no ligand, and is probably enhanced by Wnt signals.^{33,39,42-45} We therefore performed quantitative real-time RT-PCR on the stroma of lymphoid organs to evaluate the expression profile of IL7, Kit ligand, Delta-like proteins, and 6 Wnt proteins which are normally present in the thymus.^{46,47} We also assessed expression of the fms-like tyrosine kinase-3 ligand (*flt3L*) cytokine gene, because, although it is not essential for T cell development, it may influence the proliferation and survival of lymphoid progenitors.^{48,49}

We found no deficit of the following transcripts in the wt LN relative to the thymus: *IL-7*, *Kit ligand*, *flt3L*, *Delta-like-1* and *-4*, *Wnt1*, *Wnt7a*, *Wnt10a* and *Wnt10b* (Figure 4). Furthermore, none of these transcripts was more abundant in the OM⁺ compared to wt LN. However, two salient differences were observed between the thymus and LNs: *Wnt4* and *Wnt7b* transcripts were present in the thymus [as previously reported^{46,47}] but absent in the LNs ($P < 0.001$ and $P < 0.005$, respectively) (Figure 4). Although we cannot formally exclude that lack of *Wnt7b* in the LN may be biologically relevant, we elected to focus our attention (and culture experiments described in the last paragraph of “Results”) on *Wnt4* for the following reasons: i) *Wnt4*, which regulates *FoxN1* expression, is the most abundantly expressed Wnt family member in both embryonic thymic epithelium as well as mature thymic cortical epithelium^{46,47}; ii) aside from *Wnt1*, *Wnt4* is the only Wnt protein for which a role in thymopoiesis is supported by experimental evidence^{36,50}, and iii) OP9-DL1 stromal cells which can support all steps

of T cell development express Wnt4 but not Wnt7b (Figure 4). Stromal fractions may be contaminated by a few adherent lymphoid cells.^{18,24} Evaluation by quantitative RT-PCR of *Wnt4* transcripts in thymus lymphoid and stromal fractions confirmed that stromal cells were the main if not the sole site of *Wnt4* transcription in the thymus (data not shown). Lack of Wnt4 in the LN could be pivotal since T cell development in the LNs (Figure 1A and 3A) is impaired at two stages where Wnt signals have been proposed to influence thymocyte development^{39,42,43}: expansion of the DN2 and of the DN4 compartments. Lack of Wnt4 protein in the LNs could provide a parsimonious explanation for both defects.

Wnt and LIF/OM signaling pathways in DN phenotype cells.

Wnt signaling is complex: there are 18 Wnt proteins in the mouse, and their target genes differ among various cell types.^{51,52} The transcriptional response specifically elicited by discrete Wnt proteins, particularly Wnt4, has not been fully characterized in immature T cells. To discover whether and how lack of Wnt signals could hamper T cell development, we used quantitative PCR to study the expression of genes that have been both implicated in thymocyte development^{37,53-55} and shown to be regulated by Wnt signals in various cell types^{37,56-58}. We performed these studies in the two subsets of DN phenotype cells that are present in significant numbers in both the thymus and wt LNs, that is, DN1 and DN4 cells (Figure 1A-B). Wnt signaling promotes cell proliferation by increasing transcription of *c-myb*, *c-myc*, and *c-fos*, and decreasing that of *junB*. Key downstream events include induction of *cyclin D2* by *c-myc*⁵⁹, and repression of two cyclin-dependent kinase inhibitors (*p16^{INK4a}* and *p21^{Cip1/WAF1}*) that are induced by *junB*

and repressed by *c-fos*^{60,61}. In line with this, transcript levels of *c-myb*, *c-myc*, and *cyclin D2* were lower whereas those of *junB*, *p16^{INK4a}* and *p21^{Cip1/WAF1}* were higher in wt LNs compared to thymus DN cells (Figure 5A,E). However, *c-fos* levels were not deficient in the wt LN relative to thymus DN1 cells (Figure 5A). Thus, aside from *c-fos* levels, transcript profiles provide consistent albeit indirect evidence for a dearth of Wnt signals in DN cells from the wt LNs relative to the thymus. This suggests that in DN cells, Wnt4 (and possibly Wnt7b; Figure 4) signals may have a nonredundant effect on genes such as *c-myb*, *c-myc*, and *junB*, but are not essential for induction of *c-fos*.

Bovine OM binds only to the LIF receptor in mouse.¹¹⁻¹³ While extrathymic T cell development in OM-transgenic mice must therefore be induced by OM binding to the LIF receptor, it has not been determined whether this interaction occurs specifically in immature T cells. To address this, we studied the three subsets of DN phenotype cells present in both the wt and OM⁺ LNs (DN1, pre-DN2, and DN4; cf. Figure 1A-B). Signals from the LIF receptor partially overlap with those induced by Wnt signaling⁶² and have a similar impact on transcription of *c-fos*, *junB*, *p16^{INK4a}*, *p21^{Cip1/WAF1}* and *c-myc*⁶³⁻⁶⁵. Comparison of transcript levels in the OM⁺ relative to wt LNs supports the idea that OM signals in DN cells from the OM⁺ LN compensate for the lack of Wnt signaling: levels of *c-fos* and *c-myc* were higher while those of *junB*, *p16^{INK4a}*, and *p21^{Cip1/WAF1}* were decreased in DN cells from the OM⁺ relative to the wt LNs (Figure 5A,C,E). Supplementary evidence for OM signaling^{66,67} in DN cells from the OM⁺ LN included up-regulation of Bcl-2 in DN1 and pre-DN2 cells (Figure 5B,D), of Bcl-x_L in pre-DN2 cells (Figure 5C), and of phosphor-STAT3 in pre-DN2 and DN4 cells (Figure 5D,F).

***In vitro* differentiation of c-Kit^{lo} and c-Kit^{hi} progenitors**

We next asked whether culture with stromal cells expressing *Wnt4* could allow DN1 phenotype cells from the LNs to undergo T lineage differentiation. OP9-DL1 express *Wnt4*, albeit at lower levels than thymic stromal cells (Figure 4). Thus, we cultured the following subsets of DN1 phenotype cells in the presence of OP9-DL1 stromal cells: c-Kit^{hi} (Sca-1⁺) cells from the thymus, as well as the Sca-1⁻ and Sca-1⁺ subsets of c-Kit⁻ and c-Kit^{lo} cells from the thymus, wt LNs, and OM⁺ LNs. As expected, for all cell subsets tested no development toward the T lineage was observed in presence of OP9 cells, that is, in the absence of the Notch ligand Delta-like 1 (data not shown). In presence of OP9-DL1 cells, T cell differentiation was observed with thymic c-Kit^{hi} cells, and c-Kit^{lo}Sca-1⁺ cells from the three lymphoid organs (Figure 6B). In contrast, no T cell differentiation (appearance of DN2 phenotype cells) was observed with c-Kit⁻Sca-1⁻, c-Kit⁻Sca-1⁺, and c-Kit^{lo}Sca-1⁻ subsets (data not shown). Interestingly, the behavior in culture of c-Kit⁻ and c-Kit^{lo} cell subsets was not influenced by their site of origin (thymus, wt LNs or OM⁺LNs; Figure 6). Consistent with previous studies²⁸, c-Kit^{hi} (thymic) DN1 cells cultured with OP9-DL1 cells proliferated extensively, generated DN4 cells after 12 days (Figure 6B) and CD4⁺CD8⁺ as well as SP T cells after 18 days (data not shown). In comparison with c-Kit^{hi} DN1 cells, c-Kit^{lo}Sca-1⁺DN1 cells (from the thymus or LNs) showed two deficits: i) in terms of absolute numbers, they accumulated to lower levels on day 7 and 12 (Figure 6C); and ii) their progeny showed a very low proportion of DN4 cells on day 12 (Figure 6B). Furthermore, c-Kit^{lo}Sca-1⁺ differed from c-Kit^{hi} DN1 thymic cells in that only the former generated substantial numbers of CD19⁺ B cells when cultured on OP9 cells (Figure 6A). Thus, when cultured with OP9-DL1 cells, c-Kit^{lo}Sca-

1^+ DN1 cells from the thymus and LNs progress well up to the DN3 stage, but expansion of their DN4 cell progeny is limited.

The OM transgene is under the control of the *lck* proximal promoter in *lckOM* mice. Expression of the *lck* proximal promoter is up-regulated in DN3 cells and remains substantial in DN4, $CD4^+CD8^+$ and SP T cells.⁶⁸ Thus, a plethora of T-lineage cells produce OM in the *lckOM* LN.^{15,17} In contrast, when $c\text{-Kit}^{lo}Sca\text{-1}^+$ DN1 cells from *lckOM* LNs were plated on OP9-DL1 cells, their initial development took place in the absence of OM-producing cells. Thus, they did not fare better than $c\text{-Kit}^{lo}Sca\text{-1}^+$ DN1 cells derived from wt LNs (Figure 6B).

OP9-DL1 stromal cells express only low levels of *Wnt4*, about 15% those of the thymus stroma (Figure 4). We therefore engineered OP9-DL1 cells expressing levels of *Wnt4* transcripts similar to the thymus (data not shown), and tested their ability to support the development of $c\text{-Kit}^{lo}Sca\text{-1}^+$ LN DN1 phenotype cells. Provision of thymus-like amounts of *Wnt4* by OP9-DL1 stromal cells (OP9-DL1-W4 cells) increased by three-fold the percentage of DN4 cells generated from $c\text{-Kit}^{lo}Sca\text{-1}^+$ LN DN1 cells on day 12 (Figure 7A). Moreover, overexpression of *Wnt4* on stromal cells allowed $c\text{-Kit}^{lo}Sca\text{-1}^+$ LN DN1 cells to generate $TCR\alpha\beta$ single-positive T cells as early as day 12 of culture (Figure 7A). By contrast, no SP T cells were produced when $c\text{-Kit}^{lo}Sca\text{-1}^+$ LN DN1 cells were cultured for up to 25 days with OP9-DL1 stromal cells (data not shown). In addition to enhancement of DN4 cells expansion, *Wnt4* may regulate differentiation events downstream of the DN4 stage since it induced a modest but reproducible shortening of

the time required for transition from the DN4 to single-positive phenotype (Figure 7B). Thus, increased expression of *Wnt4* on OP9-DL1-W4 cells was sufficient to allow LN c-Kit^{lo}Sca-1⁺ cells to generate mature T cells. DN1 cells plated on OP9-DL1-W4 cells generated more CD8 than CD4 T cells (Figure 7A) because OP9 cells express MHC class I but do not express MHC class II.⁶ That CD8 T cells were not favored when DN4 cells were cultured with stromal cells (Figure 7B) probably reflects the fact that some DN4 cells had initiated positive selection on MHC class II *in vivo*.⁶⁹

Discussion

It has previously been shown that two types of Lin⁻Sca-1⁺ progenitors can generate T cells in the thymus: c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ and c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺.²⁵⁻²⁷ We report herein that these progenitors fail to generate T cells in the wt LN for different reasons: c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ are absent in the LNs, while c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ are present but cell cycle arrested (Figure 1C). Considering that the relation between c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ and c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ DN1 cells is unclear^{26,27}, the absence of c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ DN1 cells in the wt and OM⁺ LNs means that LNs either fail to attract these progenitors or fail to support their *in situ* generation from c-Kit⁻ or c-Kit^{lo} cells. On the contrary, c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ are more abundant in the wt LNs than the thymus and even more so in the OM⁺ LNs (Figure 1C). Nevertheless, full differentiation of c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ progenitors cannot take place in the wt LN because of the absence of signals that may be provided by Wnt4 (and possibly Wnt7b) in the thymus and by OM in the OM-transgenic LN. Accumulation of Lin⁻c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ cells in OM⁺ LNs appears to be a local phenomenon because we found no increase of Lin⁻c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ cell numbers in the bone marrow of OM⁺ mice (data not shown). It is tempting to speculate that accumulation of Lin⁻c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ cells may be related to the proliferation of high endothelial venules found in OM⁺ LNs.¹⁸ A corollary warranting further investigation is that LN high endothelial venules might express a unique ligand important for homing of Lin⁻c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ progenitors. All analyses of LN cells in this work were performed on mesenteric LNs. However, our data can probably be generalized to other LNs inasmuch as extrathymic T cell development in OM-transgenic mice was found not only in mesenteric but also in cervical and axillary LNs.¹⁵

This work strongly suggests that in the wt LN the T lineage differentiative potential of $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$ cells is thwarted by the absence of Wnt signaling. First, Lin^- DN cell subsets in the wt LN are characterized by three features reported in the thymus of mutant mice with disruption of the Wnt signaling pathway: blockade of DN1→DN2 transition with accumulation of pre-DN2 cells (Figure 1), presence of "illegitimate" DN4 cells in absence of DN2 and DN3 cells (Figure 1), and cell cycle arrest of DN4 cells (Figure 3). Indeed, transcription factor Tcf-1 is essential for DN1 thymocyte to reach the DN2 stage, and accumulation of pre-DN2 cells has been reported in the thymus of mice with impaired GTPase Rho or c-Kit signaling ($\text{Gfi1}^{-/-}$).^{70,71} Moreover, illegitimate DN4 cells were found in the thymus of c-Kit deficient (Vickid) and FoxN1-mutant mice, and non cycling DN4 cells were reported in Brg-deficient mice.^{23,33,72} The common link among Tcf-1, GTPase Rho, c-Kit, Brg, and FoxN1 is that they are involved in Wnt signaling.^{46,52,57,73} Second, among key ligands that are produced by stromal cells and that can regulate early steps of T cell development, *Wnt4* and *Wnt7b* were the sole transcripts that were deficient in the LNs relative to the thymus (Figure 4). Third, expression profiling (Figure 5) incriminates deficient Wnt signaling as a plausible explanation for the proliferative defect of wt LN relative to thymus DN cells (Figure 3). Fourth, when cultured with OP9-DL1 stromal cells expressing thymus-like levels of *Wnt4*, wt LN $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{Sca-1}^+ \text{IL-7R}\alpha^+$ progenitors generate SP T cells (Figure 7). Nevertheless, generation of Wnt transgenic mice will be essential to directly evaluate whether T-cell development in the LN is normally hampered solely by the lack of Wnt signals.

In wt mice, LNs fail to support T cell development primarily because they are unable to sustain the DN1 to DN2 transition. This defect is largely but not completely alleviated in OM⁺ LNs (Fig. 1A, 3A). Additional studies are therefore needed to define more precisely events downstream of Wnt and OM/LIF signaling that influence the development of early lymphoid progenitors. Studies in other cell types suggest that OM/LIF signals partially overlap with Wnt signals and have a similar impact on transcription of *c-fos*, *junB*, *p16^{INK4a}*, *p21^{Cip1/WAF1}* and *c-myc*.⁶³⁻⁶⁵ However, only Wnt may sustain expression of the transcription factors Oct-3/4, Rex-1 and Nanog.⁶²

In contrast to c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ cells, thymic c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ cells did not require high levels of Wnt4 to generate T cells *in vitro* (Figure 6). Two possibilities could explain this unexpected discrepancy between the two types of progenitors: c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ cells do not require Wnt signals or they can use Wnt ligands other than Wnt4. Considering the great controversy over the involvement of Wnt signaling in T cell development^{38,39,50,52}, both scenarios must be considered perfectly plausible. Notably, our *in vitro* culture data support the growing consensus that the proliferation rate and T cell generation potential of thymic c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ are unmatched by other DN1 cell subsets.^{26,28} Major questions are why c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ cells are found only in the thymus and whether these cells could generate T cells as efficiently in the LN as in the thymus. Nonetheless, one concept emerging from our work is that, in stark contrast with what is seen in the thymus, T-cells production in the LNs occurs in the absence of c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ cells. This raises the

interesting question of whether progenitor type (c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ vs. c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺) influences the behaviour and function of their T cell progeny.

Whether they were from the thymus or LNs, c-Kit^{lo}Sca-1⁺IL-7R α ⁺ populations had the same behavior when cultured *in vitro* (Figure 6). Their phenotype and their ability to generate T and B cells suggest that they are closely related to bone marrow CLPs^{25,27}, though clonogenic assays would be required to formally demonstrate that these populations contain bipotent precursors of T and B cells. Of note, CLPs injected to athymic hosts were recently shown to rapidly generate functional CD8 T in elusive extrathymic sites.⁷⁴ The present study suggests that the LN is a primary (if not the sole) site where CLPs can generate T cells. Furthermore, coupled to the present work, demonstration that high numbers of extrathymic CD4 SP cells are produced in the OM⁺ LNs¹⁴⁻¹⁶ indicates that CLP-phenotype cells can generate not only CD8, but also CD4 T cells in a thymus-independent fashion. Demonstration that the T-cell generation potential of CLP-phenotype cells is dramatically amplified by Wnt4 could be relevant for treatment of subjects with T cell lymphopenia, considering the recent demonstration that CLP-derived T cells can protect against lethal murine cytomegalovirus infection.⁷⁴ Caution is always warranted when extrapolating data on mouse hematolymphoid precursors to human.⁷⁵ Nevertheless, the high level of conservation of the Wnt pathway and the 98% amino acid identity between mouse and human Wnt4 suggest that our data on Wnt4 may apply to human. The use of Wnt4 protein could therefore have a valuable role in developing *ex vivo* culture systems for generating therapeutically relevant numbers of T lymphocytes from extrathymic lymphoid progenitors.

Acknowledgements

We are grateful to PRO-DNA Diagnostic for help with quantitative PCR and J.A. Kashul for editorial assistance.

References

1. Zapata A, Amemiya CT. Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;248:67-107.
2. Dulude G, Brochu S, Fontaine P et al. Thymic and extrathymic differentiation and expansion of T lymphocytes following bone marrow transplantation in irradiated recipients. *Exp Hematol*. 1997;25:992-1004.
3. Dulude G, Roy DC, Perreault C. The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J Exp Med*. 1999;189:1329-1342.
4. Mackall CL, Gress RE. Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol Rev*. 1997;157:61-72.
5. Gill J, Malin M, Sutherland J et al. Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev*. 2003;195:28-50.
6. Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by Delta-like-1 *in vitro*. *Immunity*. 2002;17:749-756.
7. Schmitt TM, de Pooter RF, Gronski MA et al. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated *in vitro*. *Nat Immunol*. 2004;5:410-417.

8. Dejbakhsh-Jones S, Garcia-Ojeda ME, Chatterjea-Matthes D, Zeng D, Strober S. Clonable progenitors committed to the T lymphocyte lineage in the mouse bone marrow; use of an extrathymic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:7455-7460.
9. Guy-Grand D, Azogui O, Celli S et al. Extrathymic T cell lymphopoiesis: Ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J Exp Med*. 2003;197:333-341.
10. Blais ME, Louis I, Corneau S et al. Extrathymic T cell development. *Exp Hematol*. 2003;31:349-354.
11. Lindberg RA, Juan TS, Welcher AA et al. Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M. *Mol Cell Biol*. 1998;18:3357-3367.
12. Malik N, Haugen HS, Modrell B, Shoyab M, Clegg CH. Developmental abnormalities in mice transgenic for bovine oncostatin M. *Mol Cell Biol*. 1995;15:2349-2358.
13. Shen MM, Skoda RC, Cardiff RD et al. Expression of LIF in transgenic mice results in altered thymic epithelium and apparent interconversion of thymic and lymph node morphologies. *EMBO J*. 1994;13:1375-1385.
14. Clegg CH, Rulffes JT, Wallace PM, Haugen HS. Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature*. 1996;384:261-263.

15. Boileau C, Houde M, Dulude G, Clegg CH, Perreault C. Regulation of extrathymic T cell development and turnover by Oncostatin M. *J Immunol.* 2000;164:5713-5720.
16. Terra R, Labrecque N, Perreault C. Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules. *J Immunol.* 2002;169:684-692.
17. Clegg CH, Haugen HS, Rulffes JT, Friend SL, Farr AG. Oncostatin M transforms lymphoid tissue function in transgenic mice by stimulating lymph node T-cell development and thymus autoantibody production. *Exp Hematol.* 1999;27:712-725.
18. Louis I, Dulude G, Corneau S et al. Changes in the lymph node microenvironment induced by Oncostatin M. *Blood.* 2003;102:1397-1404.
19. Blais ME, Gérard G, Martinic MM et al. Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses? *Blood.* 2004;103:3102-3110.
20. Pénit C, Lucas B, Vasseur F. Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4⁸) to immature (CD4⁸⁺) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J Immunol.* 1995;154:5103-5113.
21. Labrecque N, Whitfield LS, Obst R et al. How much TCR does a T cell need? *Immunity.* 2001;15:71-82.

22. Cavallo F, Quaglino E, Cifaldi L et al. Interleukin 12-activated lymphocytes influence tumor genetic programs. *Cancer Res.* 2001;61:3518-3523.
23. Waskow C, Paul S, Haller C, Gassmann M, Rodewald HR. Viable c-Kit^{w/w} mutants reveal pivotal role for c-Kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity.* 2002;17:277-288.
24. Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, Cyster JG. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:12694-12699.
25. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 1997;91:661-672.
26. Allman D, Sambandam A, Kim S et al. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol.* 2003;4:168-174.
27. Martin CH, Aifantis I, Scimone ML et al. Efficient thymic immigration of B220⁺ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. *Nat Immunol.* 2003;4:866-873.
28. Porritt HE, Rumfelt LL, Tabrizifard S et al. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity.* 2004;20:735-745.
29. Akashi K, Reya T, Dalma-Weiszhausz D, Weissman IL. Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:144-150.

30. Schwarz BA, Bhandoola A. Circulating hematopoietic progenitors with T lineage potential. *Nat Immunol.* 2004;5:953-960.
31. Antica M, Scollay R. Development of T lymphocytes at extrathymic sites. *J Immunol.* 1999;163:206-211.
32. Ceredig R, Rolink T. A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:888-897.
33. Chi TH, Wan M, Lee PP et al. Sequential roles of Brg, the ATPase subunit of BAF chromatin remodeling complexes, in thymocyte development. *Immunity.* 2003;19:169-182.
34. Akashi K, Kondo M, Weissman IL. Role of interleukin-7 in T-cell development from hematopoietic stem cells. *Immunol Rev.* 1998;165:13-28.
35. Agosti V, Corbacioglu S, Ehlers I et al. Critical role for Kit-mediated Src kinase but not PI 3-kinase signaling in pro T and pro B cell development. *J Exp Med.* 2004;199:867-878.
36. Staal FJ, Meeldijk J, Moerer P et al. Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur J Immunol.* 2001;31:285-293.
37. Staal FJT, Weerkamp F, Baert MRM et al. Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34⁺ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion. *J Immunol.* 2004;172:1099-1108.

38. Cobas M, Wilson A, Ernst B et al. β -catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J Exp Med*. 2004;199:221-229.
39. Xu Y, Banerjee D, Huelsken J, Birchmeier W, Sen JM. Deletion of β -catenin impairs T cell development. *Nat Immunol*. 2003;4:1177-1182.
40. Harman BC, Jenkinson EJ, Anderson G. Microenvironmental regulation of Notch signalling in T cell development. *Semin Immunol*. 2003;15:91-97.
41. Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol*. 2004;5:247-253.
42. Schilham MW, Wilson A, Moerer P et al. Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. *J Immunol*. 1998;161:3984-3991.
43. Ioannidis V, Beermann F, Clevers H, Held W. The β -catenin-TCF-1 pathway ensures CD4⁺CD8⁺ thymocyte survival. *Nat Immunol*. 2001;2:691-697.
44. Michie AM, Zuniga-Pflucker JC. Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and b-selection. *Semin Immunol*. 2002;14:311-323.
45. Borowski C, Li X, Aifantis I, Gounari F, Von Boehmer H. Pre-TCR α and TCR α are not interchangeable partners of TCR β during T lymphocyte development. *J Exp Med*. 2004;199:607-615.
46. Balciunaite G, Keller MP, Balciunaite E et al. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol*. 2002;3:1102-1108.

47. Pongracz J, Hare K, Harman B, Anderson G, Jenkinson EJ. Thymic epithelial cells provide Wnt signals to developing thymocytes. *Eur J Immunol.* 2003;33:1949-1956.
48. Sitnicka E, Bryder D, Theilgaard-Monch K et al. Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity.* 2002;17:463.
49. Fry TJ, Sinha M, Milliron M et al. Flt3 ligand enhances thymic-dependent and thymic-independent immune reconstitution. *Blood.* 2004;104:2794-2800.
50. Mulroy T, McMahon JA, Burakoff SJ, McMahon AP, Sen J. Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur J Immunol.* 2002;32:967-971.
51. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways. *Science.* 2004;303:1483-1487.
52. Staal FJ, Clevers HC. Wnt signaling in the thymus. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:204-208.
53. Douglas NC, Jacobs H, Bothwell AL, Hayday AC. Defining the specific physiological requirements for c-Myc in T cell development. *Nat Immunol.* 2001;2:307-315.
54. Nunomura S, Sato T, Habu S. Molecular basis for functional maturation of thymocytes: increase in c-fos translation with positive selection. *J Immunol.* 2000;164:5590-5595.

55. Allen RD, Bender TP, Siu G. c-Myb is essential for early T cell development. *Genes Dev.* 1999;13:1073-1078.
56. Tice DA, Soloviev I, Polakis P. Activation of the Wnt pathway interferes with serum response element-driven transcription of immediate early genes. *J Biol Chem.* 2002;277:6118-6123.
57. Barker N, Hurlstone A, Musisi H et al. The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with β -catenin to promote target gene activation. *EMBO J.* 2001;20:4935-4943.
58. Willert J, Epping M, Pollack JR, Brown PO, Nusse R. A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev Biol.* 2002;2:8.
59. Haggerty TJ, Zeller KI, Osthus RC, Wonsey DR, Dang CV. A strategy for identifying transcription factor binding sites reveals two classes of genomic c-Myc target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:5313-5318.
60. Passegué E, Wagner EF. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J.* 2000;19:2969-2979.
61. Crowe DL, Brown TN, Kim R, Smith SM, Lee MK. A c-fos/Estrogen receptor fusion protein promotes cell cycle progression and proliferation of human cancer cell lines. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2000;3:243-248.
62. Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt

- signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med.* 2004;10:55-63.
63. Duval D, Reinhardt B, Kedinger C, Boeuf H. Role of suppressors of cytokine signaling (Socs) in leukemia inhibitory factor (LIF) -dependent embryonic stem cell survival. *FASEB J.* 2000;14:1577-1584.
64. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* 2003;115:281-292.
65. Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M et al. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med.* 1999;189:63-73.
66. Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y et al. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity.* 1996;5:449-460.
67. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene.* 2000;19:2548-2556.
68. Shimizu C, Kawamoto H, Yamashita M et al. Progression of T cell lineage restriction in the earliest subpopulation of murine adult thymus visualized by the expression of Ick proximal promoter activity. *Int Immunol.* 2001;13:105-117.

69. Tabrizifard S, Oлару A, Plotkin J et al. Analysis of transcription factor expression during discrete stages of postnatal thymocyte differentiation. *J Immunol.* 2004;173:1094-1102.
70. Costello PS, Cleverley SC, Galandrini R, Henning SW, Cantrell DA. The GTPase rho controls a p53-dependent survival checkpoint during thymopoiesis. *J Exp Med.* 2000;192:77-85.
71. Yucel R, Karsunky H, Klein-Hitpass L, Moroy T. The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit⁺ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *J Exp Med.* 2003;197:831-844.
72. Su DM, Navarre S, Oh WJ, Condie BG, Manley NR. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat Immunol.* 2003;4:1128-1135.
73. Habas R, Kato Y, He X. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell.* 2001;107:843-854.
74. Arber C, BitMansour A, Sparer TE et al. Common lymphoid progenitors rapidly engraft and protect against lethal murine cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2003;102:421-428.
75. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for clinical application. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:759-806.

Figure Legends

Figure 1. LNs contain heterogeneous subsets of Lin⁻ DN cells. (A) To estimate the proportion of cells with DN1-DN4 phenotype, lymphoid cells from the thymus, wt LN and OM⁺ LN were stained for CD25, CD44, and lineage markers (CD3 ϵ , CD8 α , CD8 β , CD11b, CD45R/B220, Ly6C, Ly6G, NK1.1, TER-119, TCR β , and TCR γ). Numbers in the various quadrants correspond to percentage of Lin⁻ cells stained with CD25 and CD44. (B) Number of cells with DN1-DN4 phenotype in the three lymphoid organs (mean \pm SD; n = 3). (C) Number of c-Kit⁻, c-Kit^{lo}, and c-Kit^{hi} DN1 phenotype cells per 10⁶ lymphoid cells. Gated Lin⁻CD44⁺CD25⁻ cells were stained for c-Kit (mean \pm SD; n = 3). No DN1 phenotype c-Kit^{hi} cells were detected in the wt and OM⁺ LNs (*). (D) Expression of c-Kit on DN1 phenotype cells (Lin⁻CD44⁺CD25⁻), and of Sca-1 on both c-Kit^{lo} and c-Kit^{hi} subsets are shown for each organ. Numbers correspond to percentages of cells in each quadrant. Data panels A and D are representative of one experiment out of three.

Figure 2. LNs contain lymphoid progenitors committed to the T lineage. RT-PCR analysis of DN1 (A), pre-DN2 (B), and DN4 (E) cells sorted from wt thymus, wt LNs and OM⁺ LNs. One step RT-PCR was done on the same mRNA samples for transcripts of interest and *Hprt*. (C) c-Kit expression on DN2 and DN3 subsets from wt thymus (dotted line) and OM⁺ LN (solid line). Intracellular TCR β (icTCR β) chain expression in DN3 (D) and DN4 (F) subsets. (G) Sorted DN4 cells (10⁵; Lin⁻CD8⁻CD44⁺CD25⁻) harvested from wt LNs were co-cultured on OP9-DL1 cells and analyzed for T-cell development

after 7 days of *in vitro* culture. Numbers indicate cell population percentages. In panels F and G, dotted lines represent staining with isotype control antibodies.

Figure 3. Survival and proliferation of DN cells are impaired in wt LN. (A) Analysis of cell cycle status of DN phenotype cells. Forty min after injection of 1 mg BrdU intraperitoneally, mice were killed, and cells were stained with 7AAD and antibodies against BrdU, CD25, CD44 and lineage markers. Numbers correspond to the percentages of cells in the G_{1/0}, S, and G₂+M phase of the cell cycle. One representative experiment out of three. (B) Lin⁻ CD44⁺c-Kit subsets in cycling thymocytes. Mice received two injections (1mg each) of BrdU at 2-hour intervals. Twenty-four hours later, prepared cells were stained with antibodies against BrdU, CD44, c-Kit and lineage markers (which included CD25). Numbers indicate the percentage of BrdU⁺ cells. One representative experiment out of three. (C) Percentage of annexinV⁺ cells in wt thymus, wt LNs, and OM⁺ LNs are indicated in the graphs.

Figure 4. LN stroma lacks *Wnt4* and *Wnt7b* transcripts. mRNA expression profile of selected genes in the stroma of wt thymus and LNs, OM⁺ LN, and OP9 DL-1 cells. mRNA values were normalized according to *Hprt* and thymic stroma mRNA levels were set as 1. Data are mean ± SD from three or four independent experiments (* indicates no detectable mRNA after 50 amplification cycles). Differences between groups were evaluated with Student *t* test. Levels of statistical significance for comparison of wt thymus vs. wt LNs are ¥ *P* < .04, § *P* < .005, and ‡ *P* < .0001. † Levels of DL-1 transcripts for OP9 DL1 cells (715 ± 55) are not shown on the graph.

Figure 5. LN DN cells show distinct gene expression profiles. Real-time RT-PCR assays and FACS analysis measuring gene and protein expression in DN1 (A-B), pre-DN2 (C-D), and DN4 (E-F) cells sorted from lymphoid organs. The mRNA levels of the wt thymus for DN1 (A) and DN4 (E) cells, and of wt LN for pre-DN2 (C) cells were set as 1. *Hprt* mRNA levels were used to normalize cDNA content among subpopulations (A,C,E). Data are mean \pm SD from three independent experiments. Differences between groups were evaluated with Student *t* test. Levels of statistical significance for comparison of wt thymus vs. wt LNs are $*P < .02$ and $**P < .003$, and for comparison of wt LNs vs. OM^+ LNs, $\dagger P < .04$, $\dagger\dagger P < .008$, and $\dagger\dagger\dagger P < 0.001$. Intracellular staining for Bcl-2 and phospho-Stat3 (P-Stat3) proteins was done (B, D, F) on wt thymus (solid black line), wt LNs (gray shaded histograms) and OM^+ LNs (solid grey line) DN cells. Secondary antibody was used as a negative control for P-Stat3 staining (dotted line).

Figure 6. c-Kit^{lo} and c-Kit^{hi} progenitors display different differentiation potential when grown on OP9 and OP9-DL1 cells. The following subsets of $Lin^-CD44^+CD25^-$ DN1 cells were sorted: c-Kit^{lo}Sca-1⁺ cells from the thymus, wt LNs and OM^+ LNs, and c-Kit^{hi}Sca-1⁺ cells from the thymus. These DN1 cell populations were plated on confluent monolayer of (A) OP9 cells or (B) OP9-DL1 cells, and analyzed by flow cytometry at the indicated time points. Fold expansion was measured by dividing the number of cells harvested by the number of cells initially plated. The analysis is of one representative experiment out of three.

Figure 7. LN c-Kit^{lo} progenitors can complete T cell development when grown on stromal cells transfected with Wnt4 (OP9-DL1-W4). (A) Sorted DN1 cells (4×10^3 ; Lin⁻CD44⁺CD25⁻Sca1⁺c-kit^{lo}) from wt LNs were plated on 6-well tissue culture plates containing a confluent monolayer of OP9-DL1 cells transfected or not with Wnt4, and analyzed by flow cytometry after 12 days in culture. (B) Sorted DN4 cells (10^5 ; Lin⁻CD44⁻CD25⁻) harvested from wt LNs were co-cultured on OP9-DL1 or OP9-DL1-W4 cells and analyzed on day 7. Numbers indicate cell population percentages. The analysis is of one representative experiment out of two.

Figure 1

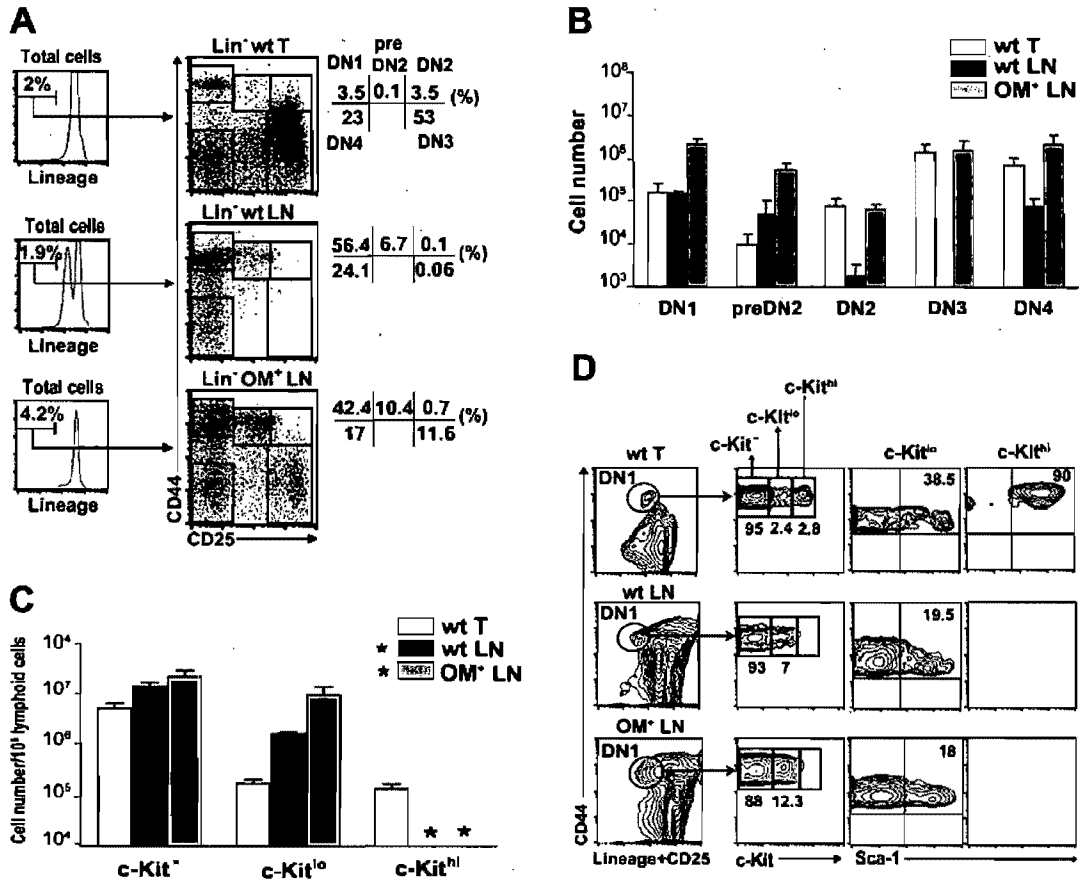


Figure 2

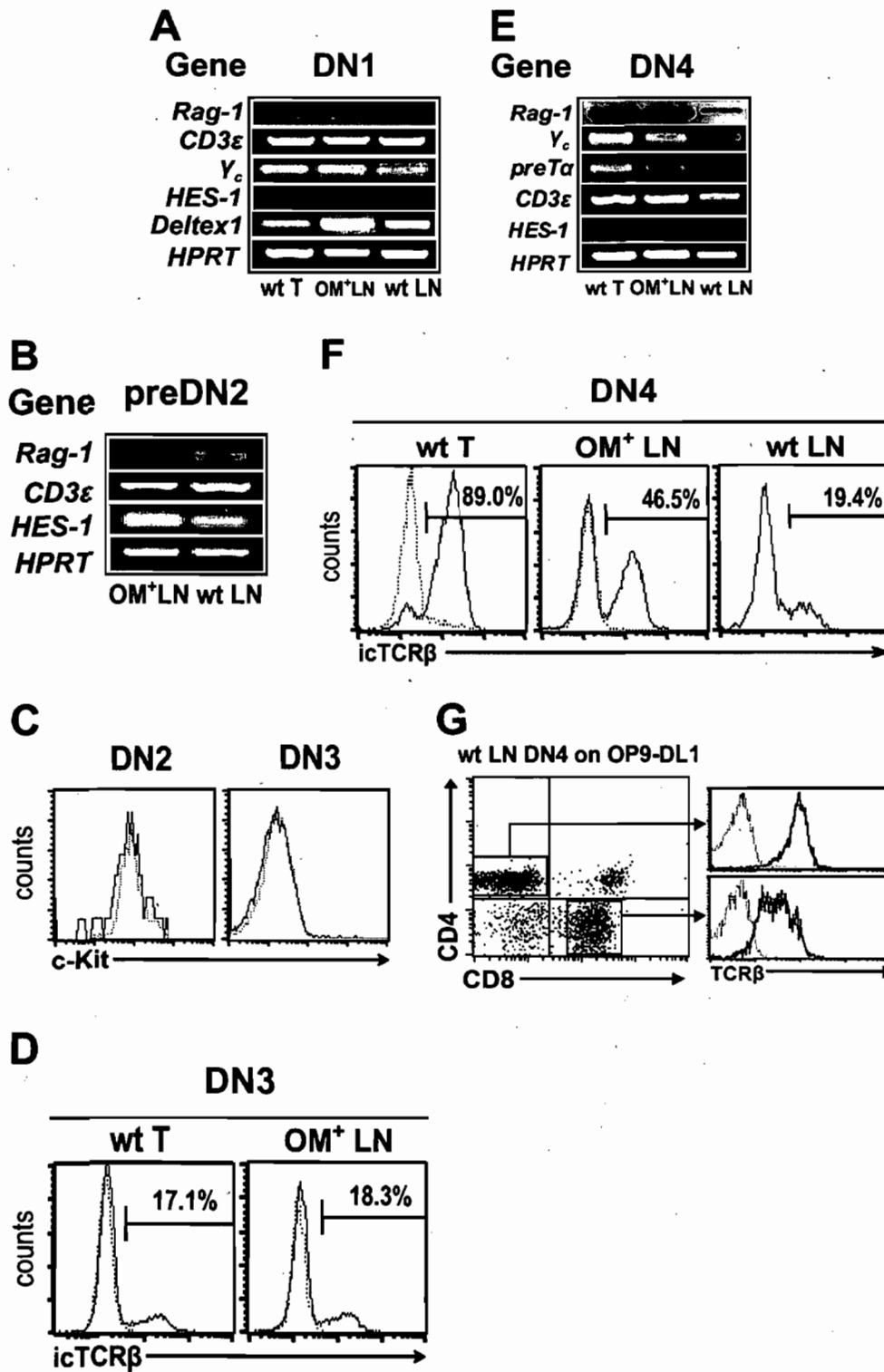


Figure 3

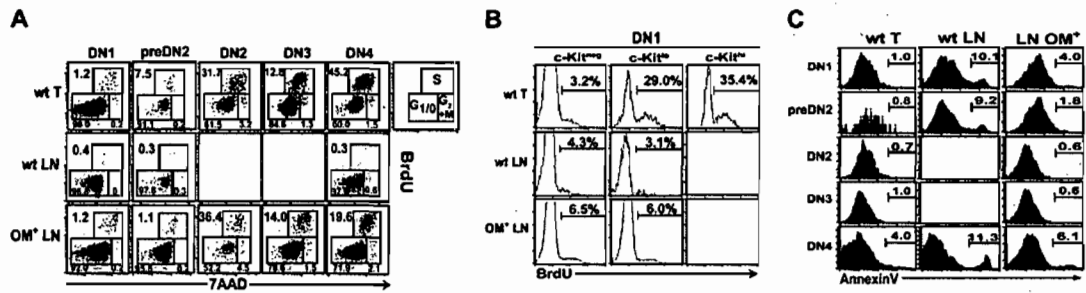


Figure 4

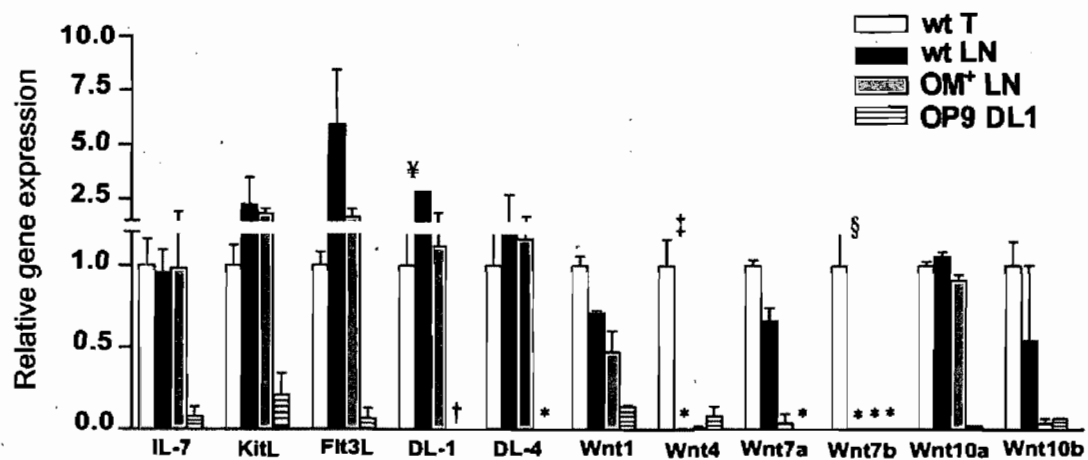


Figure 5

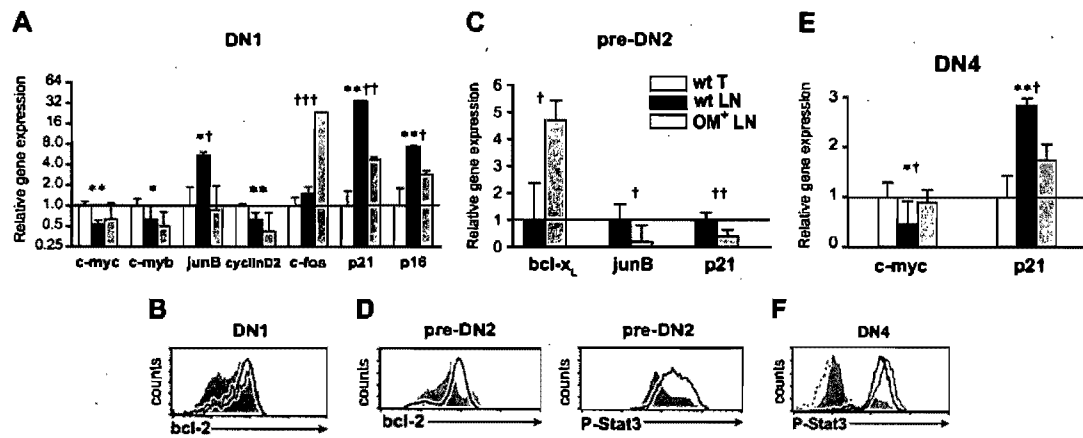


Figure 6

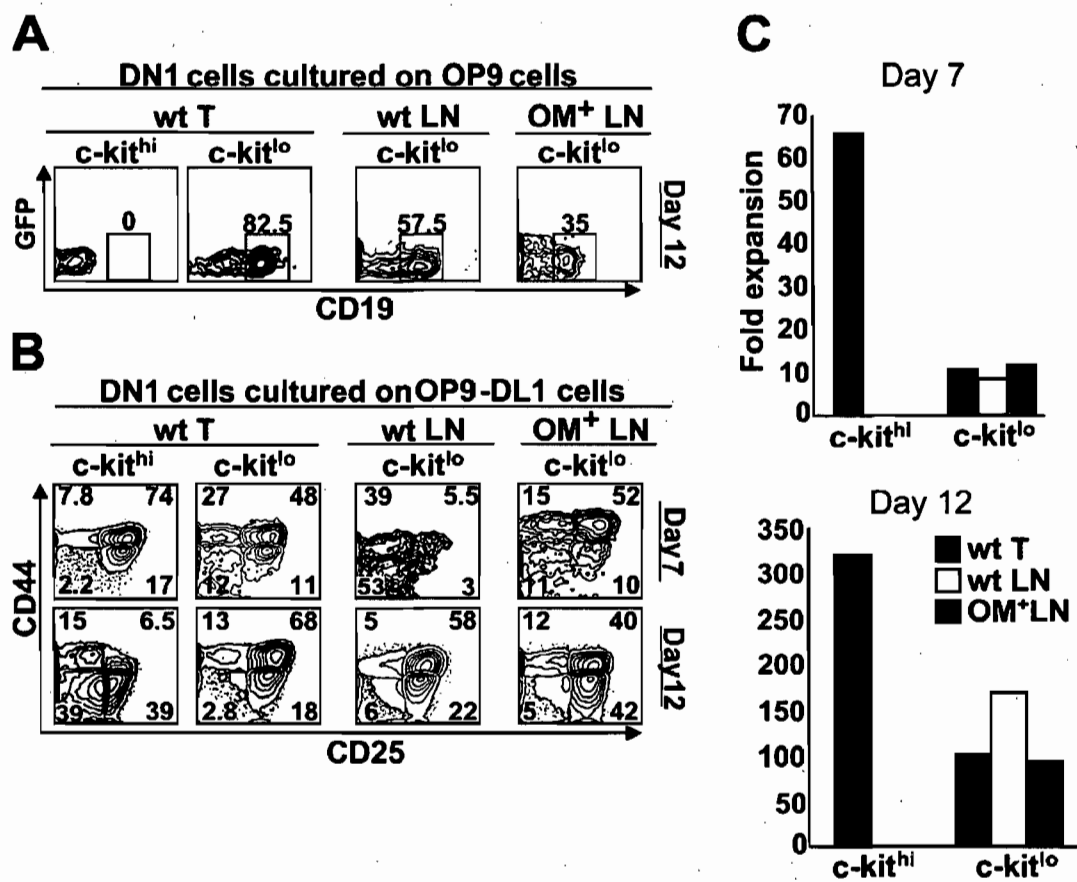
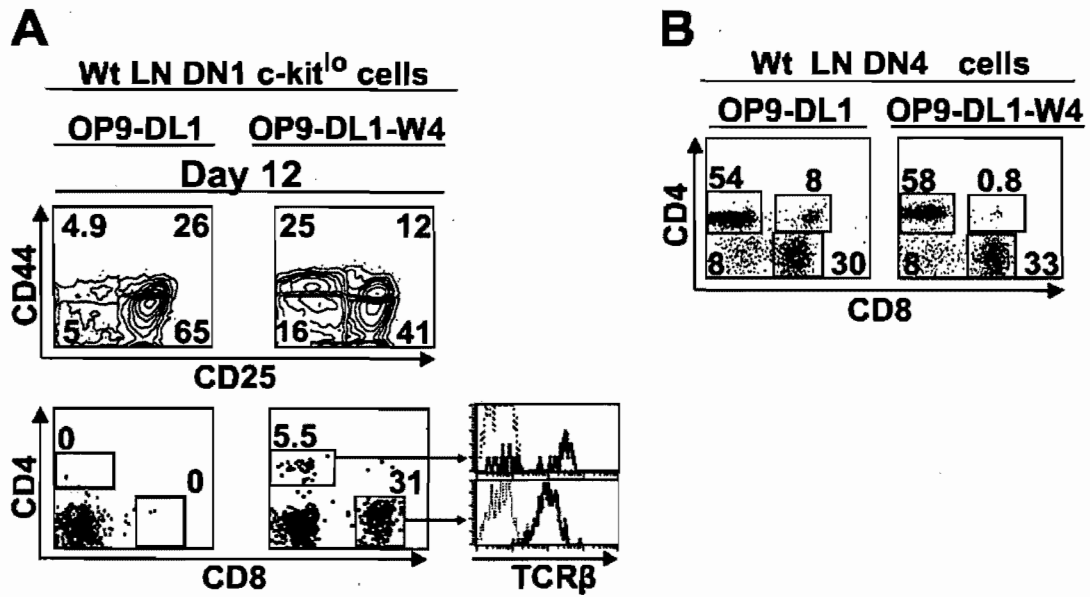


Figure 7



5.2. ARTICLE II:

Louis I., Heinonen K.H., Chagraoui J., Sauvageau G., Perreault C., Wnt4 is a survival factor for multipotent hematopoietic progenitors and enhances thymopoiesis. *Revised by Immunity, additional experiments are required and currently underway.*

**Wnt4 is a survival factor for multipotent hematopoietic progenitors
and enhances thymopoiesis**

Running title: Wnt4 enhances thymopoiesis

Isabelle Louis^{1,2}, Krista M. Heinonen^{1,2}, Jalila Chagraoui^{1,2}, Guy Sauvageau^{1,2,3}
& Claude Perreault^{1,2,3}

¹Institute of Research in Immunology and Cancer and ²Department of Medicine,
Université de Montréal, Montreal, QC, Canada H3C 3J7

³Division of Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, QC,
Canada H1T 2M4

Correspondence to:
Claude Perreault
Institute of Research in Immunology and Cancer
University of Montreal
P.O. Box 6128, Station Centre-ville
Montréal, QC, Canada H3C 3J7
Telephone: (514) 343-6126, Fax: (514) 343-5839
e-mail: [REDACTED]

SUMMARY

Wnts are highly conserved proteins involved in cell fate specification, proliferation and survival during embryonic development. Despite important studies based on deletion or activation of intracellular components of the canonical Wnt pathway, the role of Wnts in hematolymphopoiesis remains controversial. We report that overexpression of Wnt4 in hematopoietic cells differentially affected diverse subsets of stem/progenitor cells. The main effect of Wnt4 was to increase the quiescence, survival and frequency of lymphoid-primed multipotent progenitors. Expansion of multipotent progenitors was correlated with a major increase in thymopoiesis and a sizeable accumulation of the most immature thymocyte subsets (upstream of β -selection). We provide compelling evidence that Wnt4 activates noncanonical (β -catenin-independent) signaling and that its effects on hematopoietic cells are mainly non cell autonomous. Our work shows that Wnt4 has a unique ability to expand lymphoid-primed multipotent progenitors and offers a first demonstration that noncanonical Wnt signaling may regulate thymopoiesis.

INTRODUCTION

Wnts are highly conserved secreted proteins that play a crucial role in organismal patterning throughout the animal kingdom (Clevers, 2006). Mammals have 19 Wnt genes that, through phylogenetic analysis, can be placed in 12 subfamilies (Nusse, 2001; Prud'homme et al., 2002). The emergence of the Wnt subfamilies occurred very early in metazoan evolution (Kusserow et al., 2005). The reason for the early expansion of the Wnt family and its maintenance along multiple disparate lineages over 650 million years remains an enigma (Gordon and Nusse, 2006). A substantial body of evidence implicates Wnt signaling in the postembryonic regulation of mammalian stem cell number and differentiation (Reya and Clevers, 2005). Nevertheless, despite remarkable efforts, the role of Wnt signaling in hematopoiesis and lymphopoiesis remains a most contentious issue (Cobas et al., 2004; Gounari et al., 2005; Staal and Clevers, 2005; Trowbridge et al., 2006).

There is incontrovertible evidence that ablation or induction of several components of the Wnt pathway can affect the behavior of hematolymphoid progenitors (Verbeek et al., 1995; Gounari et al., 2001; Reya et al., 2003; Willert et al., 2003; Duncan et al., 2005; Gounari et al., 2005; Baba et al., 2005; Trowbridge et al., 2005; Kirstetter et al., 2006; Scheller et al., 2006). However, the biological relevance of these observations and the precise role of specific Wnt proteins are debatable (Wilson and Trumpp, 2006). Practically all studies on the role of Wnt signaling in hematolymphopoiesis have focused on intracellular components of the canonical Wnt pathway such as β -catenin and Tcf-1, rather than on Wnt proteins and their cell surface receptors. That approach provides a

biased perspective on the role of Wnt signaling, mainly for two reasons. Firstly, intracellular components of the Wnt pathway (e.g., Dishevelled-1, glycogen synthase kinase 3 β and β -catenin) interact with other signaling pathways including bone morphogenetic protein (BMP), extracellular signal-regulated kinase (ERK), GTPase cell division cycle 42 (CDC42) and transforming growth factor β (TGF β) (Ding et al., 2005; Wu et al., 2006; Liu et al., 2006). Secondly, Wnt signaling can also occur through three different, although not necessarily exclusive, β -catenin independent pathways. These signals are mediated by factors as diverse as calcium/calmodulin-dependent kinase II and protein kinase C; TGF β -activated kinase and Nemo-like kinase; and lastly the small GTP-binding proteins RhoA and Rac as well as the Jun-N-terminal kinase (JNK) (Altschul et al., 1990; Veeman et al., 2003; Seifert and Mlodzik, 2007). Furthermore, Wnt proteins are not intrinsically canonical or noncanonical, and Wnt signaling output ultimately depends on the receptor context (Mikels and Nusse, 2006; Pukrop et al., 2006; Fathke et al., 2006). Thus, Wnt5a can activate or inhibit the canonical β -catenin/TCF pathway following binding to Frizzled 4 and Ror2 receptors, respectively (Mikels and Nusse, 2006). To compound the complexity of Wnt-induced responses, studies based on deletion or stabilisation of β -catenin have yielded seemingly irredeemable discrepancies (Gounari et al., 2001; Ioannidis et al., 2001; Xu et al., 2003; Cobas et al., 2004; Kirstetter et al., 2006; Scheller et al., 2006).

Our goal was to evaluate the role of one specific Wnt protein, Wnt4, on adult hematopoiesis and lymphopoiesis. We were particularly interested in T-cell development because all ageing mammals develop thymic involution that is due at least in part to

quantitative and qualitative defects in hematolymphoid progenitors (Linton and Dorshkind, 2004; Rossi et al., 2005a; Zediak and Bhandoola, 2005). We focused on Wnt4 for several reasons. Wnt4 is one of the most abundant Wnts in the thymus where it is produced by thymocytes and stromal cells (Balciunaite et al., 2002). Study of *Wnt4*^{-/-} mice (that die of renal failure shortly after birth) suggests that Wnt4 may have a nonredundant role in fetal thymopoiesis (Mulroy et al., 2002). Furthermore, we found that lymph node resident hematolymphoid progenitors were able to generate mature T cells when cultured in the presence but not in the absence of Wnt4 (Terra et al., 2005; Blais et al., 2006). We now report that Wnt4 overexpression differentially affects discrete populations of hematopoietic stem/progenitor cells *in vivo*. Wnt4 had minimal influence on hematopoietic stem cells (HSCs). The key effect of Wnt4 was to expand nonrenewing lymphoid-primed multipotent progenitors (LMPPs), downstream of HSCs. Expansion of LMPPs was associated with a commensurate accumulation of Lin^{lo/-}CD117^{hi} thymocytes and a major increase in thymic cellularity. Notably, we show that Wnt4 induces noncanonical Wnt signaling in hematopoietic cells.

RESULTS

Wnt4 Increases Thymic Cellularity

To assess the effect of Wnt4 on hematolymphoid cells, we reconstituted irradiated recipient mice with fetal liver (FL) cells transduced with retroviral vectors encoding *Wnt4-GFP* or *GFP* (Figure S1 in the Supplemental Data available online) as previously described (Chagraoui et al., 2006). We evaluated multilineage repopulation by long-term HSCs by analysis of thymus, mesenteric lymph nodes (LN), spleen and bone marrow (BM) of primary recipients 16 weeks following injection (Zhao et al., 2000). Wnt4 protein expression in reconstituted chimeras was confirmed by Western Blot (Figure S2). *Wnt4* overexpression did not affect the cellularity of secondary lymphoid organs or the BM but induced a major (3.3-fold) increase in thymic cellularity (Figure 1A). In recipients of Wnt4+ FL cells, the proportions of double-negative (DN), double-positive and single-positive thymocyte subsets were normal (Figure 1C). Accordingly, absolute cell numbers of all these cell subsets were increased relative to controls (Figure 1C). However, further analysis revealed that in the DN compartment, the proportion of early thymocyte progenitors (ETP; Lin^{lo/-}CD117^{hi}CD25⁻) and DN2 (Lin^{lo/-}CD117^{hi}CD25⁺) cells was increased by 3 to 3.5-fold in recipients of Wnt4+ FL cells relative to controls (Figure 1D). Thus, the absolute numbers of ETPs and DN2 cells in the thymus was increased by 9 to 10-fold. Downstream of ETPs and DN2 thymocytes, the proportion of DN3 thymocytes was similar in recipients of *Wnt4*- and *GFP*-transduced FL cells (Figure 1D). Thus, overexpression of *Wnt4* in donor FL cells led to a selective increase in thymic cellularity of primary recipients with a disproportionate accumulation of the most immature thymocyte subsets, ETPs and DN2 cells. The major increase in thymic

cellularity of Wnt4+ relative to control recipients was not due to selective expansion of transduced (GFP+) relative to nontransduced cells. Indeed, the proportion of GFP+ cells was similar in both groups and was below 20% at week 16 (Figure 1B). We conclude that, in agreement with the fact that it is a secreted protein, Wnt4 had paracrine effects on nontransduced cells.

Wnt4 Induces An Accumulation of Two Subsets of Lin⁻ BM Cells

Two types of BM Lin⁻ cells can seed the thymus and thereby sustain thymopoiesis: LSKs (Lin⁻Sca1⁺Kit^{hi}CD127⁻) and the more differentiated common lymphoid progenitors (CLPs; Lin⁻Sca1⁺Kit^{lo}CD127⁺) (Kondo et al., 2003; Martin et al., 2003; Allman et al., 2003; Bhandoola and Sambandam, 2006; Bhandoola et al., 2007). We therefore asked whether expansion of these progenitor subsets in the BM could be responsible for the accumulation of ETPs and DN2 cells in the thymus of mice reconstituted with Wnt4+ FL cells. We found that the numbers of LSKs and CLPs were increased 2.8- and 2.3-fold, respectively, in the BM of mice transplanted with Wnt4+ FL cells (Figure 2). Thus, although overexpression of Wnt4 did not affect global BM cellularity (Figure 1A), it induced a conspicuous increase in small BM cell subsets (LSKs and CLPs) which are precursors of thymic ETPs and DN2 cells.

Wnt4 Has A Threshold Effect on Discrete Stages of B Lymphopoiesis

Since CLPs give also rise to B-lineage cells, we next asked whether the accumulation of CLPs induced by Wnt4 would translate into enhanced B lymphopoiesis. The various stages of B-lymphocyte differentiation were identified using surface markers B220,

CD43, CD24, IgM and IgD as previously described (Hardy and Hayakawa, 2001) and depicted in Figure 3A. The mean percentage and absolute number of B220⁺ cells were not higher in recipients of Wnt4⁺ FL cells than in controls (Figure 3B). Thus, Wnt4 overexpression did not have a major overall impact on the size of the B-lineage compartment. To determine whether Wnt4 might have a more subtle or threshold effect on B-cell development, we concentrated on the mice with the strongest Wnt4 expression based on the percentage of GFP⁺ BM cells. Wnt4^{hi} mice had a larger proportion of their B220⁺ cells in pre B II and immature B fractions (Hardy fractions D and E, respectively) than control chimeras (Figure 3A,C) or mice expressing low levels of exogenous Wnt4 (Figure 3A and data not shown). However, Wnt4^{hi} mice did not show significant changes in subcompartments upstream or downstream of fractions D-E. We conclude that Wnt4 has a threshold effect on discrete stages of B lymphopoiesis that does not impinge on the size of the mature B-cell compartment in the BM (Figure 3) or in secondary lymphoid organs (Figure S3).

The Effect of Wnt4 Is Not Lymphoid-Restricted

Since LSKs can generate all hematopoietic lineages, we next sought to determine whether Wnt4-induced expansion of BM LSKs influenced non-lymphoid cell lineages. Myeloid progenitor cells are found within the Lin⁻CD127⁻Sca1⁻CD117(Kit)⁺ fraction of the BM, and can be further differentiated based on their expression of CD34 and CD16/CD32 (Akashi et al., 2000; Sitnicka et al., 2002). Recipients of Wnt4⁺ FL cells had more Lin⁻CD127⁻Sca1⁻CD117⁺ cells and in particular, more CD34⁺CD16/CD32^{hi} granulocyte-monocyte progenitors than control mice (GMPs; Figure 4A). This translated

into an increase in both CD11b⁺Gr-1^{-/lo} monocytic and CD11b⁺Gr-1^{hi} granulocytic fractions (Figure 4B). Interestingly, although the size of the megakaryocyte-erythrocyte progenitor (MEP) population was not affected (Figure 4A), we found a significant decrease in the immature CD71⁺ erythroblasts (Socolovsky et al., 2001) (fractions I-III; Figure 4C), indicating that erythroid development was impaired by overexpression of Wnt4. Moreover, the percentage of Wnt4-expressing cells (GFP+) within the erythroid lineage was significantly decreased as compared to the total BM population (data not shown), suggesting that autocrine Wnt4 specifically interfered with erythropoiesis.

It is important to note that the hematopoietic overexpression of Wnt4 had little impact on mature cells in secondary lymphoid organs (Figure S3) and peripheral blood (data not shown). Overall, Wnt4 exerted its effects in the primary hematopoietic organ (BM) and the primary T-lymphoid organ (thymus) where it increased the size of discrete populations of myeloid and lymphoid progenitors. By far, the most dramatic effect of Wnt4 was to increase thymopoiesis.

Wnt4 Decreases The Proportion of Cycling LSKs and Is A Survival Factor for Flt3⁺ LSKs

The LSK compartment contains three hierarchically related subpopulations: CD34⁻Flt3⁻ cells enriched for long-term reconstituting HSCs, CD34⁺Flt3⁻ cells which are collectively defined as short-term reconstituting HSCs, and Flt3⁺ lymphoid-primed multipotent progenitors (LMPP) (Christensen and Weissman, 2001; Lai and Kondo, 2006; Månsson et al., 2007). Progression from CD34⁻Flt3⁻ HSCs to Flt3⁺ LMPPs is accompanied by

gradual downregulation of megakaryocyte/erythrocyte associated transcripts, sustained granulocyte/macrophage priming, and a distinct upregulation of common lymphoid genes (Månsson et al., 2007). The fact that Wnt4 induced a relative expansion of myeloid and lymphoid lineages over erythroid cells (Figures 1-4) suggested that Wnt4 preferentially influenced the Flt3⁺ fraction of LSKs (LMPPs) (Adolfsson et al., 2005; Lai and Kondo, 2006; Månsson et al., 2007). To test this hypothesis, Flt3 staining was performed on BM LSKs. We found that the proportion of LSKs expressing Flt3 was 26% in recipients of Wnt4+ FL cells relative to 13% in controls (Figure 5A). Accordingly, while the number of Flt3⁻ LSKs was increased 3-fold, that of Flt3⁺ LSKs was increased 8-fold in recipients of Wnt4+ FL cells relative to controls (Figure 5A).

Wnts have been reported to regulate proliferation and survival of the responding cells (Reya et al., 2000; Gounari et al., 2001; Ioannidis et al., 2001; Willert et al., 2003). To decipher how Wnt4 augmented the size of the LSK compartment, we therefore analyzed the cell cycle status and apoptotic rate of BM Flt3⁺ and Flt3⁻ LSKs. We observed, as others have (Yang et al., 2005), that the proportion of cycling cells (S+G₂/M) was greater in Flt3⁺ than Flt3⁻ LSKs (Figure 5B). Nevertheless, the salient finding was that Wnt4 decreased the proportion of cycling cells (S+G₂/M) among both Flt3⁺ and Flt3⁻ LSKs (Figure 5B). Furthermore, we found a 4-fold reduction in the proportion of apoptotic (Annexin-V⁺) Flt3⁺ LSKs in recipients of Wnt4+ FL cells compared to controls (Figure 5C). By contrast, no difference was seen in the relatively low apoptotic rate of Flt3⁻ LSK populations (Figure 5C). Thus, Flt3⁺ and Flt3⁻ subsets shared one feature: their proportion in cell cycle was decreased by Wnt4. In addition,

Wnt4 specifically enhanced the survival of Flt3⁺ LSKs. We expand in the Discussion on the fact that enhancement of quiescence and survival in Flt3⁺ LSKs are probably linked, and that together they explain well the expansion of Flt3⁺ LSKs induced by Wnt4.

The Flt3⁻ LSK compartment contains short-term and long-term HSCs. However, *bona fide* evaluation of HSC frequency must be based on *in vivo* reconstitution assays. To address whether the increased frequency of Flt3⁻ LSKs in the BM of Wnt4⁺ primary recipients (Figure 5A) translated into an increased frequency of genuine long-term HSCs, we transplanted Ly5.2⁺ BM cells from primary recipients under limiting dilution conditions into irradiated secondary recipients in conjunction with 2×10^5 helper cells (both recipients and helper cells were Ly5.1⁺, Figure S1) (Thorsteinsdottir et al., 2002). The contribution of Ly5.2⁺ cells to lymphoid and myeloid reconstitution was then assessed by flow cytometry in the peripheral blood of secondary recipients 16 weeks post-transplant (Figure 5E). The frequency of HSCs was determined using Poisson probabilities and revealed a modest increase in the BM of Wnt4⁺ primary recipients (1/72,000 cells) when compared to control primary recipients (1/200,000). Notably, expansion of long-term reconstituting HSCs induced by Wnt4 (Figure 5E) was commensurate with increased numbers of Flt3⁻ LSKs (Figure 5A).

Thymic Cellularity Correlates with Numbers of Flt3⁺ BM LSKs

The dominant paradigm is that two populations of BM-resident hematopoietic progenitor cells contribute to the T-cell lineage physiologically: LSKs and CLPs (Allman et al., 2003; Bhandoola et al., 2003; Bhandoola and Sambandam, 2006; Bhandoola et al., 2007).

In line with that, Wnt4 overexpression expanded BM LSKs and CLPs (Figure 2) and increased thymic cellularity (Figure 1A). Of note, expansion of ETPs and DN2 thymocytes (9 to 10-fold; Figure 1D) in recipients of Wnt4⁺ FL cells was commensurate with that of BM Flt3⁺ LSKs (8-fold; Figure 5A), while expansion of BM Flt3⁻ LSKs and CLPs was more modest (3-fold; Figure 2 and Figure 5A). When we pooled together recipients of Wnt4⁺ and control FL cells, thymic cellularity in individual mice varied over a 10-fold range (Figure 5D). We found that thymic cellularity strongly correlated with the frequency of BM Flt3⁺ LSKs but not that of BM Flt3⁻ LSKs (Figure 5D) or of CLPs ($R = 0.25$; data not shown). These data suggest that expansion of BM Flt3⁺ LSKs is responsible for enhancement of thymopoiesis by Wnt4.

Transcriptional Targets of Wnt4 in BM LSKs

To identify transcripts that were regulated by Wnt4, we performed quantitative real-time RT-PCR on GFP-negative BM LSKs sorted from Wnt4⁺ or control chimeras. We focused on GFP-negative (nontransduced) LSKs because they were more abundant than GFP⁺ LSKs and the effects of Wnt4 in our model were largely if not exclusively paracrine (non cell autonomous) (Figure 1B). We have shown that Wnt4 induced quiescence and expansion of Flt3⁻ and Flt3⁺ BM LSKs, and enhanced the survival of Flt3⁺ LSKs (Figure 5A-C). We therefore tested 62 genes that are related to the Wnt pathway and/or that regulate cell cycling, maintenance, survival, or early myeloid and lymphoid differentiation of LSKs (Staal et al., 2004; Sauvageau et al., 2004; Månsson et al., 2007) (Table S1). Flow cytometry analysis of cell samples used in RT-PCR analyses showed that the proportion of Flt3⁺ LSKs was greater in Wnt4⁺ than control recipients,

as previously shown in Figure 5A. However, we detected no upregulation of *Flt3* transcripts in Wnt4+ LSKs (data not shown). One possibility is that modulation of Flt3 protein by Wnt4 occurred at the post-transcriptional level. Overall, 24 out of 62 genes were differentially expressed in LSKs harvested from recipients of Wnt4+ versus control FL cells (Figure 6). When compared with LSKs from controls, LSKs from Wnt4+ mice exhibited four major attributes. First, they displayed an upregulation of 9 genes supporting cell maintenance (Figure 6): *Ccnd2*, *Cxcr4*, *Foxo1*, *Foxo4*, *Hoxa9*, *Hoxa10*, *Hoxb4*, *Meis-1*, and *Bmi-1*. Of note, upregulation of *Hoxa10* is a plausible explanation for the impairment of erythroid development by Wnt4 (Figure 4C) (Magnusson et al., 2007). Second, they showed an induction of 5 cell cycle inhibitors (Figure 6): *Cdkn1b*, *Cdkn1c*, *Cdkn2d*, *Mxd1* and *Rbl2*. Induction of *Foxo1* and *Foxo4* genes may be responsible for the observed upregulation of *Cdkn1b* and *Rbl2* (Nakae et al., 2003). The third feature was an upregulation of the anti-apoptotic gene *Bcl2l1* (Figure 6); a nearly significant 2.4-fold upregulation of *Bcl2* was also observed ($p = 0.06$, data not shown). The fourth key finding was that out of the four classic transcriptional targets of the canonical Wnt pathway tested (*Ccnd1*, *Fos*, *Jun*, *Myc*), none were upregulated by Wnt4 in LSKs (Figure 7A).

Wnt4-dependent upregulation of several additional genes in LSKs raises other attractive but more speculative possibilities (Figure 6). Upregulation of three components of the Wnt pathway (*Fzd4*, *Fzd6* and *Tcf4*) suggests that Wnt4 signals may regulate signaling by other Wnts, whereas induction of *Hes1* and *Dll1* suggests that Wnt4 may amplify Notch signaling in LSKs. Increased levels of *Kit*, *Flt3l* and *Il2ra* might support

cell expansion from the LSK to the DN2 thymocyte development stage, while induction of *Cxcr4* and *Selp* may support interactions between LSKs and the thymic microenvironment (Rossi et al., 2005b; Dar et al., 2005).

Wnt4 Activates JNK but Does Not Stabilize β -catenin in FL Cells

Although targets of the Wnt canonical pathway are often cell and context-dependent, some classical target genes, like *Ccnd1*, *Fos* and *Jun*, behave in the same fashion in various cell types, including hematopoietic cells (Staal et al., 2004; Scheller et al., 2006; Kirstetter et al., 2006). Lack of upregulation of these classical canonical pathway target genes *Ccnd1*, *Fos*, *Jun*, as well as *Myc* in LSKs strongly argued against induction of the canonical pathway by Wnt4 (Figure 7A). To see whether Wnt4 activated noncanonical signaling in hematopoietic progenitor cells, we co-cultured FL cells on Wnt4-producing and control fibroblasts for 15 min to 2 hours. As JNK has been shown to be activated by Wnt4 in renal epithelial cells (Osafune et al., 2006) and can be activated via multiple branches of noncanonical Wnt signaling (Liang et al., 2003; Osafune et al., 2006; Park et al., 2006), we used it as a surrogate marker for the activation of noncanonical pathways. We detected a strong activation of JNK as shown by increased phosphorylation at early time points in the presence of Wnt4 as compared to control (Figure 7B). In contrast, the amount of β -catenin did not increase even after 2 hours of co-culture (Figure 7B). These results strongly suggest that, in immature hematopoietic cells, Wnt4 acts via a JNK-dependent noncanonical pathway.

DISCUSSION

We report that overexpression of Wnt4 in hematopoietic cells had two major and related consequences: expansion of BM Flt3⁺ LSKs (LMPPs) and enhancement of thymopoiesis. Besides, Wnt4 had other effects of lesser magnitude: an increase in the frequency of long-term HSCs, positive effects on discrete stages of B lymphopoiesis and myelopoiesis and a negative impact on erythropoiesis. Its primary effect on Flt3⁺ LSKs makes Wnt4 unique. In particular, the impact of Wnt4 on hematopoiesis is drastically different from that of β -catenin. Indeed, β -catenin regulates two processes: renewal of HSCs and thymocyte development downstream of DN3 thymocytes (Gounari et al., 2001; Ioannidis et al., 2001; Reya et al., 2003; Willert et al., 2003; Xu et al., 2003; Duncan et al., 2005; Kirstetter et al., 2006; Scheller et al., 2006; Guo et al., 2007; Yu and Sen, 2007). In contrast, Wnt4 had only a modest impact on HSCs, and had no specific effect on thymocyte subsets downstream of the DN2 development stage. Thus, Wnt4 primarily expanded BM Flt3⁺ LSKs, ETPs and DN2 thymocytes whereas β -catenin regulates processes upstream of Flt3⁺ LSKs and downstream of DN2 thymocytes. To put into perspective the differential impact of Wnt4 on HSCs and Flt3⁺ LSKs, it is important to consider that HSCs but not Flt3⁺ LSKs have self-renewal potential. Thus, the 3-fold increase in the number of HSCs observed in recipients of Wnt4 FL cells could result from as little as 1.5 additional mitosis over a 16 week period. In contrast, since the half-life of Flt3⁺ LSKs is a matter of days [less than a week (Yang et al., 2005)], a conservative estimate would be that the 8-fold expansion of BM Flt3⁺ LSKs induced by Wnt4 roughly corresponds to doubling of the Flt3⁺ LSK compartment size every 48 h.

How did Wnt4 expand Flt3⁺ LSKs? Wnt4 enhanced the quiescence and survival of Flt3⁺ LSKs. Accordingly, gene expression profiling in LSKs revealed that Wnt4 induced 9 genes that promote cell maintenance, 5 cell cycle inhibitors, and upregulated *Bcl2l1* (*Bcl-xL*). We surmise that Wnt4-induced enhancement of quiescence and survival are mechanistically linked. Indeed, hematopoietic stem/progenitor cells accumulate DNA damage over time that impinges more rapidly and extensively on Flt3⁺ LSKs than HSCs (Rossi et al., 2007; Nijnik et al., 2007). Depletion of Flt3⁺ LSKs with relative preservation of Flt3⁻ LSKs is a hallmark of hematopoietic senescence, explained by the fact that the proportion of cycling cells is greater in Flt3⁺ LSKs than HSCs (Passegue et al., 2005). Cells that cycle more rapidly are more susceptible to DNA damage responses (growth arrest or apoptosis) which are activated in cycling cells at the G₁/S and G₂/M checkpoints (Ishikawa et al., 2006; Rossi et al., 2007). It therefore makes sense that by supporting quiescence and survival, Wnt4 predominantly affected Flt3⁺ rather than Flt3⁻ LSKs, because the former cycle more rapidly and undergo more apoptosis than the latter. It will be interesting to analyze interactions between signals induced by Wnt4 and Flt3 ligand in Flt3⁺ LSKs. Current data suggest that they are not redundant. Thus, Flt3 ligand induces proliferation via an AKT-dependent reduction of Foxo3-mediated transcription (Gilliland and Griffin, 2002; Brandts et al., 2005), while we report that Wnt4 induced Foxo1 and Foxo4 transcription and supported cell quiescence.

The most biologically relevant effect of Wnt4 overexpression *in vivo* was to increase thymic cellularity in adult recipient mice. Though fetal and adult thymopoiesis

are not identical, our data are nonetheless consistent with the thymic hypocellularity observed in newborn *Wnt4*^{-/-} mice (Mulroy et al., 2002). How did Wnt4 regulate thymopoiesis? Thymi of recipients injected with Wnt4+ FL cells showed a disproportionate increase in the percentage of ETPs and DN2 thymocytes. Thus, the primary effect of Wnt4 was to expand the most immature thymocyte subsets prior to β -selection (DN3 stage). Since thymic cellularity strongly and specifically correlated with the frequency of BM Flt3⁺ LSKs, we conclude that the effect of Wnt4 on thymopoiesis is primarily contingent upon expansion of Flt3⁺ LSKs. That conclusion is consistent with the fact that Flt3⁺ LSKs display better thymus homing efficiency than other progenitor subsets (Schwarz et al., 2007; Lai and Kondo, 2007), and that Flt3 ligand-deficiency decreases thymic cellularity and the frequency of ETPs and DN2 cells (Sambandam et al., 2005), whereas injection of Flt3 ligand enhances thymopoiesis (Fry et al., 2004; Wils et al., 2007). Further studies are required to determine to what extent the key effects of Wnt4 on Flt3⁺ LSKs are pre-thymic (increased frequency of thymic settlers) and intra-thymic (increased survival). Wnt4 also increased the frequency of BM CLPs but to a lesser extent than for Flt3⁺ LSKs. Moreover, BM CLP frequency did not correlate with thymic cellularity. Thus, though it is formally possible that CLPs may contribute to enhancement of thymopoiesis in recipients of Wnt4+ cells, their case is less compelling than that of Flt3⁺ LSKs.

Though there is some evidence that Wnt4 may signal through the canonical (β -catenin/Tcf) Wnt pathway (Guo et al., 2004; Lyons et al., 2004), it has been primarily associated with noncanonical signaling (Du et al., 1995; Veeman et al., 2003; Kohn and

Moon, 2005; Steelman et al., 2006). Thus ectopic Wnt4 expression in *Xenopus* does not cause the β -catenin-dependent duplication of anterior-posterior axis, but rather results in defective convergence-extension movements (Du et al., 1995; Veeman et al., 2003). Moreover, Wnt4 has been demonstrated to regulate colony formation by renal progenitor cells in a Rac and JNK-dependent manner reminiscent of the noncanonical planar cell polarity pathway (Osafune et al., 2006). In our model, Wnt4 activated JNK but neither stabilized β -catenin nor induced classic targets of the canonical pathway. Furthermore, as mentioned above, the effects of Wnt4 on hematopoiesis and thymopoiesis were totally different from those of β -catenin. These data provide compelling evidence that the influence of Wnt4 on hematolymphoid progenitors is mediated by the noncanonical pathway. The notion that noncanonical Wnt signals may determine the fate of hematopoietic stem/progenitor cells reinforces the need to develop new tools for analysis of noncanonical Wnt signaling.

HSC aging is characterized by down-regulation of genes mediating lymphoid specification and up-regulation of genes mediating myeloid specification in a concerted program to skew the lineage potential of HSCs from lymphopoiesis toward myelopoiesis with age (Rossi et al., 2005a). Accordingly, compared to young mice, old mice show normal or even increased numbers of Flt3⁻ LSKs, but decreased numbers of BM Flt3⁺ LSKs and CLPs and of thymic ETPs (Sudo et al., 2000; Linton and Dorshkind, 2004; Min et al., 2005; Rossi et al., 2005a; Zediak et al., 2007). Substantial evidence suggests that changes associated with HSC aging are responsible, at least in part, for thymic senescence and decline of B-lymphopoiesis (Zediak and Bhandoola, 2005; Montecino-

Rodriguez and Dorshkind, 2006). The present work demonstrates that Wnt4 expands Flt3⁺ LSKs, CLPs and ETPs, increases thymopoiesis and activates a noncanonical pathway. It will therefore be of considerable interest to determine whether impairment of noncanonical Wnt signaling may underlie HSC senescence and thymic involution and whether these processes can be reverted by provision of Wnt4.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

C57BL/6 (B6) and B6.SJL-*Ptprc^aPep3^b*/BoyJ (Ly5^a) (B6.SJL; Ly 5.1⁺) were purchased from The Jackson laboratory (Bar Harbor, ME). Mice were bred and housed under specific pathogen-free conditions in sterile ventilated racks at the Institute for Research in Immunology and Cancer according to the standards of the Canadian Council on Animal Care.

Flow Cytometry Analysis and Cell Sorting

The following antibodies were used: PE-Cy7 and Pe-Cy5 anti-CD8 α (53-6.7), APC-Cy7 anti-CD4 (GK1.5), APC anti-TCR β (H57), PE anti-CD44 (IM7), PE anti-CD19 (1D3), APC-Cy7 anti-CD25 (PC61.5), PE and biotin anti-CD127 (IL-7R α , A7R34), PE-Cy7 and APC anti-CD117 (c-Kit, 2B8), Pe-Cy5.5 anti-Sca-1 (E13-161.7), PE anti-CD135 (Flt3, A2F10.1), Alexa Fluor 647 anti-CD34 (MEC14.7), PE anti-CD16/32 (2.4G2), APC anti-CD11b (M1/70), APC-Cy7 anti-Ly6G (Gr1), PE anti-CD71 (C2), biotin anti-Ter-119 (Ly-76), PE Texas-Red anti-B220 (RA3-6B2), PE-Cy5 anti-CD24 (M1/69), PE-Cy7 anti-IgM (R6-60.2), PE anti-IgD (11-26C.2a), Biotin anti-CD43 (S7), Alexa Fluor 350 Annexin-V. For cell cycle analysis, Hoechst 33342 was used following the manufacturer's instructions (Invitrogen; Burlington, ON, Canada). Biotin-labeled antibodies used in the lineage 'cocktail' included (for thymocytes, CLP and LSK): anti-CD8 α (53-6.7), anti-CD8 β (53-5.8), anti-NK1.1 (PK136), anti-TCR β (H57), anti-CD11c (HL3), anti-TCR $\gamma\delta$ (GL-3), mouse lineage panel [CD3 ϵ , CD11b, CD45R/B220, Ly6C, Ly6G (Gr-1), TER-119/erythroid cells (Ly-76)]. Biotinylated antibodies were detected

with streptavidin PE-Cy7, PE-Cy5 and APC-Cy7. All antibodies mentioned above were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA), Invitrogen, Cedarlane Laboratories (Hornby, ON, Canada) or Biolegend (San Diego, CA). Cells were analyzed on an LSRII flow cytometer using DiVa software and sorted on a three laser FACSaria (BD Biosciences, Mountain View, CA).

Retroviral Infection and Transplantation of E14.5 Fetal Liver Cells

We subcloned mouse *Wnt4* gene (pUSEamp-Wnt4 (Upstate biotechnology, Lake Placid, NY) within the multiple cloning site of pMSLV-IRES-GFP retroviral vector. Production of vesicular stomatitis virus-pseudotyped (VSV) retroviruses and infection of hematopoietic cells were done as previously described (Chagraoui et al., 2006). E14.5 FL cells harvested from pregnant C57BL/6 mice were prestimulated for 24 hours in Dulbecco modified Eagle medium containing 15% fetal bovine serum, 6 ng/mL murine interleukin (IL)-3, 100 ng/mL murine Steel factor, and 10 ng/mL human IL-6. FL cells were then transferred on irradiated GP+E-86 cells transduced with pMSLV-IRES-GFP or pMSLV-Wnt4-IRES-GFP with 6 µg/mL of polybrene for 48h. For transplantation, lethally irradiated 7 to 10 week-old B6.SJL-*Ptprc^aPep3^b*/BoyJ (Ly5.1) recipient mice were injected intravenously with 2×10^6 C57BL/6 (Ly5.2) E14.5 FL cells harvested from coculture with viral producer cells. Mice were left for 16 weeks to ensure long-term reconstitution.

Quantitative RT-PCR

mRNA was prepared from BM LSK cells (from Wnt4+ and control chimeras) sorted in Trizol reagent (Invitrogen) followed by chloroform extraction and RNA precipitation following the manufacturer's instructions. Total mRNA was reverse transcribed in a final volume of 100 μ L using the High Capacity cDNA Archive Kit with random primers (Applied Biosystems, Foster City, CA) as described by the manufacturer. Reverse transcribed samples were stored at -20°C. A reference RNA (Human reference total RNA, Stratagene, Ca) was also transcribed in cDNA. A multiplex preamplification step was used to increase the quantity of specific cDNA target (TaqMan Pre-Amp Master mix Kit, Applied Biosystems) following manufacturer's instructions. Gene expression level was determined using primer and probe sets from Applied Biosystems (TaqMan Gene expression assay, <http://www.appliedbiosystems.com/>), Universal ProbeLibrary (Array design Center was used for probes and primer design, <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp>) or Custom primer and TaqMan probes from IDT were designed using the online version of software PrimerQuest (<http://scitools.idtdna.com/Primerquest/>). Each primer and probe set was used following manufacturer's instructions. The ABI PRISM[®] 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed to an initial step of 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C. All reactions were run in triplicate and the average values were used for quantification. HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) was used as endogenous control. The relative quantification of target genes was determined by using the $\Delta\Delta$ CT method (Baron et al., 2007).

Western Blots

FL cells were resuspended in pre-stimulation medium and layered on irradiated GP+E-86-Wnt4-GFP or GP+E-86-GFP control cells. Aliquots were taken after 15 minutes, 60 minutes and 120 minutes co-culture. Cells were pelleted and lysed for 10 minutes on ice in cold radio-immunoprecipitation buffer (50mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150mM NaCl) supplemented with Complete protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada) and phosphatase inhibitors (1mM Na₃VO₄ and 5mM NaF). The lysates were cleared by centrifugation and the protein content was measured by the Bradford method (Biorad, Mississauga, ON, Canada). Samples were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies. Quantification of band intensities was done using Image J Software.

Statistical analysis. Student's t-test was used to determine significant differences ($p \leq 0.05$).

ACKNOWLEDGMENTS

Grant #MOP42384 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) supported this work. IL and KMH are supported by training grant from the CIHR and the National Cancer Institute of Canada, respectively. GS is a scholar of the Leukemia Lymphoma Society of America. GS and CP hold Canada Research Chairs in Molecular Genetics of Stem Cells and Immunobiology, respectively. We are grateful to Danièle Gagné for advice on flow cytometry and cell sorting, Pierre Chagnon and IRIC's Genomics Core Facility for valuable advice and help with qPCR, and to the staff of IRIC animal care facility for superb assistance. We acknowledge Fotini Gounari, Georg Hollander and Jana Krosi for discussions and thoughtful comments.

REFERENCES

- Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A., Anderson, K., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Sigvardsson, M., and Jacobsen, S.E. (2005). Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121, 295-306.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J.P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., and Bhandoola, A. (2003). Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat. Immunol.* 4, 168-174.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Baba, Y., Garrett, K.P., and Kincade, P.W. (2005). Constitutively active β -catenin confers multilineage differentiation potential on lymphoid and myeloid progenitors. *Immunity* 23, 599-609.
- Balciunaite, G., Keller, M.P., Balciunaite, E., Piali, L., Zuklys, S., Mathieu, Y.D., Gill, J., Boyd, R., Sussman, D.J., and Hollander, G.A. (2002). Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat. Immunol.* 3, 1102-1108.
- Baron, C., Somogyi, R., Greller, L.D., Rineau, V., Wilkinson, P., Cho, C.R., Cameron, M.J., Kelvin, D.J., Chagnon, P., Roy, D.C., Busque, L., Sékaly, R.P., and Perreault, C. (2007). Prediction of graft-versus-host disease in humans by donor gene expression profiling. *PLoS. Med.* 4, e23.
- Bhandoola, A. and Sambandam, A. (2006). From stem cell to T cell: one route or many? *Nat. Rev. Immunol.* 6, 117-126.
- Bhandoola, A., Sambandam, A., Allman, D., Meraz, A., and Schwarz, B. (2003). Early T lineage progenitors: new insights, but old questions remain. *J. Immunol.* 171, 5653-5658.
- Bhandoola, A., von Boehmer, H., Petrie, H.T., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2007). Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity* 26, 678-689.
- Blais, M.E., Louis, I., and Perreault, C. (2006). T-cell development: an extrathymic perspective. *Immunol. Rev.* 209, 103-114.
- Brandts, C.H., Sargin, B., Rode, M., Biermann, C., Lindtner, B., Schwable, J., Buerger, H., Muller-Tidow, C., Choudhary, C., McMahon, M., Berdel, W.E., and Serve, H. (2005). Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary

for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res.* *65*, 9643-9650.

Chagraoui, J., Niessen, S.L., Lessard, J., Girard, S., Coulombe, P., Sauvageau, M., Meloche, S., and Sauvageau, G. (2006). E4F1: a novel candidate factor for mediating BMI1 function in primitive hematopoietic cells. *Genes Dev.* *20*, 2110-2120.

Christensen, J.L. and Weissman, I.L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: A simple method to isolate long-term stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*, 14541-14546.

Clevers, H. (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* *127*, 469-480.

Cobas, M., Wilson, A., Ernst, B., Mancini, S.J., MacDonald, H.R., Kemler, R., and Radtke, F. (2004). β -catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J. Exp. Med.* *199*, 221-229.

Dar, A., Goichberg, P., Shinder, V., Kalinkovich, A., Kollet, O., Netzer, N., Margalit, R., Zsak, M., Nagler, A., Hardan, I., Resnick, I., Rot, A., and Lapidot, T. (2005). Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat. Immunol.* *6*, 1038-1046.

Ding, Q., Xia, W., Liu, J.C., Yang, J.Y., Lee, D.F., Xia, J., Bartholomeusz, G., Li, Y., Pan, Y., Li, Z., Bargou, R.C., Qin, J., Lai, C.C., Tsai, F.J., Tsai, C.H., and Hung, M.C. (2005). Erk associates with and primes GSK-3 β for its inactivation resulting in upregulation of β -catenin. *Mol. Cell* *19*, 159-170.

Du, S.J., Purcell, S.M., Christian, J.L., McGrew, L.L., and Moon, R.T. (1995). Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell Biol.* *15*, 2625-2634.

Duncan, A.W., Rattis, F.M., DiMascio, L.N., Congdon, K.L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J.M., Willert, K., Gaiano, N., and Reya, T. (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Immunol.* *6*, 314-322.

Fathke, C., Wilson, L., Shah, K., Kim, B., Hocking, A., Moon, R., and Isik, F. (2006). Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing. *BMC Cell Biol.* *7*, 4.

Fry, T.J., Sinha, M., Milliron, M., Chu, Y.W., Kapoor, V., Gress, R.E., Thomas, E., and Mackall, C.L. (2004). Flt3 ligand enhances thymic-dependent and thymic-independent immune reconstitution. *Blood* *104*, 2794-2800.

Gilliland, D.G. and Griffin, J.D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* *100*, 1532-1542.

- Gordon, M.D. and Nusse, R. (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol. Chem.* *281*, 22429-22433.
- Gounari, F., Aifantis, I., Khazaie, K., Hoeflinger, S., Harada, N., Taketo, M.M., and von Boehmer, H. (2001). Somatic activation of β -catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development. *Nat. Immunol.* *2*, 863-869.
- Gounari, F., Chang, R., Cowan, J., Guo, Z., Dose, M., Gounaris, E., and Khazaie, K. (2005). Loss of adenomatous polyposis coli gene function disrupts thymic development. *Nat. Immunol.* *6*, 800-809.
- Guo, X., Day, T.F., Jiang, X., Garrett-Beal, L., Topol, L., and Yang, Y. (2004). Wnt/ β -catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev.* *18*, 2404-2417.
- Guo, Z., Dose, M., Kovalovsky, D., Chang, R., O'Neil, J., Look, A.T., von Boehmer, H., Khazaie, K., and Gounari, F. (2007). β -catenin stabilization stalls the transition from double-positive to single-positive stage and predisposes thymocytes to malignant transformation. *Blood* *109*, 5463-5472.
- Hardy, R.R. and Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 595-621.
- Ioannidis, V., Beermann, F., Clevers, H., and Held, W. (2001). The β -catenin-TCF-1 pathway ensures CD4⁺CD8⁺ thymocyte survival. *Nat. Immunol.* *2*, 691-697.
- Ishikawa, K., Ishii, H., and Saito, T. (2006). DNA damage-dependent cell cycle checkpoints and genomic stability. *DNA Cell Biol.* *25*, 406-411.
- Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B.T., Jacobsen, S.E., and Nerlov, C. (2006). Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat. Immunol.* *7*, 1048-1056.
- Kohn, A.D. and Moon, R.T. (2005). Wnt and calcium signaling: β -Catenin-independent pathways. *Cell Calcium* *38*, 439-446.
- Kondo, M., Wagers, A.J., Manz, M.G., Prohaska, S.S., Scherer, D.C., Beilhack, G.F., Shizuru, J.A., and Weissman, I.L. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for clinical application. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 759-806.
- Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hrouda, M., Lentfer, J., Schmidt, H.A., Technau, U., von Haeseler, A., Hobmayer, B., Martindale, M.Q., and Holstein, T.W. (2005). Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* *433*, 156-160.
- Lai, A. Y. and Kondo, M. (2006). Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J. Exp. Med.* *203*, 1867-1873.

- Lai, A. Y. and Kondo, M. (2007). Identification of a bone marrow precursor of the earliest thymocytes in adult mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 6311-6316.
- Liang, H., Chen, Q., Coles, A.H., Anderson, S.J., Pihan, G., Bradley, A., Gerstein, R., Jurecic, R., and Jones, S.N. (2003). Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* *4*, 349-360.
- Linton, P.J. and Dorshkind, K. (2004). Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.* *5*, 133-139.
- Liu, Z., Tang, Y., Qiu, T., Cao, X., and Clemens, T.L. (2006). A Dishevelled-1/Smad1 interaction couples WNT and bone morphogenetic protein signaling pathways in uncommitted bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 17156-17163.
- Lyons, J.P., Mueller, U.W., Ji, H., Everett, C., Fang, X., Hsieh, J.C., Barth, A.M., and McCrea, P.D. (2004). Wnt-4 activates the canonical beta-catenin-mediated Wnt pathway and binds Frizzled-6 CRD: functional implications of Wnt/ β -catenin activity in kidney epithelial cells. *Exp. Cell Res.* *298*, 369-387.
- Magnusson, M., Brun, A.C.M., Miyake, N., Larsson, J., Ehinger, M., Bjornsson, J.M., Wutz, A., Sigvardsson, M., and Karlsson, S. (2007). HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte development. *Blood* *109*, 3687-3696.
- Månsson, R., Hultquist, A., Sidinh, L., Yang, L., Anderson, K., Kharazi, S., Al-Hashmi, S., Liuba, K., Thoren, L., Adolfsson, J., Buza-Vidas, N., Qian, H., Soneji, S., Enver, T., Sigvardsson, M., and Jacobsen, S.E.W. (2007). Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity* *26*, 407-419.
- Martin, C.H., Aifantis, I., Scimone, M.L., von Andrian, U.H., Reizis, B., von Boehmer, H., and Gounari, F. (2003). Efficient thymic immigration of B220⁺ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. *Nat. Immunol.* *4*, 866-873.
- Mikels, A.J. and Nusse, R. (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits β -catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* *4*, e115.
- Min, H., Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2005). Effects of aging on early B- and T-cell development. *Immunol. Rev.* *205*, 7-17.
- Montecino-Rodriguez, E. and Dorshkind, K. (2006). Evolving patterns of lymphopoiesis from embryogenesis through senescence. *Immunity* *24*, 659-662.
- Mulroy, T., McMahon, J.A., Burakoff, S.J., McMahon, A.P., and Sen, J. (2002). Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur. J. Immunol.* *32*, 967-971.

- Nakae, J., Kitamura, T., Kitamura, Y., Biggs, W.H., Arden, K.C., and Accili, D. (2003). The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev. Cell* 4, 119-129.
- Nijnik, A., Woodbine, L., Marchetti, C., Dawson, S., Lambe, T., Liu, C., Rodrigues, N.P., Crockford, T.L., Cabuy, E., Vindigni, A., Enver, T., Bell, J.I., Slijepcevic, P., Goodnow, C.C., Jeggo, P.A., and Cornall, R.J. (2007). DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* 447, 686-690.
- Nusse, R. (2001). An ancient cluster of Wnt paralogues. *Trends Genet.* 17, 443.
- Osafune, K., Takasato, M., Kispert, A., Asashima, M., and Nishinakamura, R. (2006). Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. *Development* 133, 151-161.
- Park, E., Kim, G.H., Choi, S.C., and Han, J.K. (2006). Role of PKA as a negative regulator of PCP signaling pathway during *Xenopus* gastrulation movements. *Dev. Biol.* 292, 344-357.
- Passegue, E., Wagers, A.J., Giuriato, S., Anderson, W.C., and Weissman, I.L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J. Exp. Med.* 202, 1599-1611.
- Prud'homme, B., Lartillot, N., Balavoine, G., Adoutte, A., and Vervoort, M. (2002). Phylogenetic analysis of the Wnt gene family. Insights from lophotrochozoan members. *Curr. Biol.* 12, 1395-1400.
- Pukrop, T., Klemm, F., Hagemann, T., Gradl, D., Schulz, M., Siemes, S., Trumper, L., and Binder, C. (2006). Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 5454-5459.
- Reya, T. and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-850.
- Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I.L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-414.
- Reya, T., O'Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R., and Grosschedl, R. (2000). Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity*. 13, 15-24.
- Rossi, D.J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J., and Weissman, I.L. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 447, 725-729.

- Rossi, D.J., Bryder, D., Zahn, J.M., Ahlenius, H., Sonu, R., Wagers, A.J., and Weissman, I.L. (2005a). Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 9194-9199.
- Rossi, F.M., Corbel, S.Y., Merzaban, J.S., Carlow, D.A., Gossens, K., Duenas, J., So, L., Yi, L., and Ziltener, H.J. (2005b). Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat. Immunol.* *6*, 626-634.
- Sambandam, A., Maillard, I., Zediak, V.P., Xu, L., Gerstein, R.M., Aster, J.C., Pear, W.S., and Bhandoola, A. (2005). Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat. Immunol.* *6*, 663-670.
- Sauvageau, G., Iscove, N.N., and Humphries, R.K. (2004). In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene* *23*, 7223-7232.
- Scheller, M., Huelsken, J., Rosenbauer, F., Taketo, M.M., Birchmeier, W., Tenen, D.G., and Leutz, A. (2006). Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive β -catenin activation. *Nat. Immunol.* *7*, 1037-1047.
- Schwarz, B.A., Sambandam, A., Maillard, I., Harman, B.C., Love, P.E., and Bhandoola, A. (2007). Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *J. Immunol.* *178*, 2008-2017.
- Seifert, J.R. and Mlodzik, M. (2007). Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 126-138.
- Sitnicka, E., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Buza-Vidas, N., Adolfsson, J., and Jacobsen, S.E. (2002). Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity* *17*, 463-472.
- Socolovsky, M., Nam, H., Fleming, M.D., Haase, V.H., Brugnara, C., and Lodish, H.F. (2001). Ineffective erythropoiesis in *Stat5a*^{-/-}*5b*^{-/-} mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* *98*, 3261-3273.
- Staal, F.J.T. and Clevers, H.C. (2005). Wnt signalling and haematopoiesis: a Wnt-Wnt situation. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 21-30.
- Staal, F.J.T., Weerkamp, F., Baert, M.R.M., van den Burg, C.M.M., van Noort, M., de Haas, E.F.E., and van Dongen, J.J.M. (2004). Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34⁺ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion. *J. Immunol.* *172*, 1099-1108.
- Steelman, C.A., Recknor, J.C., Nettleton, D., and Reecy, J.M. (2006). Transcriptional profiling of myostatin-knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy. *FASEB J.* *20*, 580-582.

Sudo, K., Ema, H., Morita, Y., and Nakauchi, H. (2000). Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 192, 1273-1280.

Terra, R., Louis, I., LeBlanc, R., Ouellet, S., Zúñiga-Pflücker, J.C., and Perreault, C. (2005). T cell generation by lymph node resident progenitor cells. *Blood* 106, 193-200.

Thorsteinsdottir, U., Mamo, A., Kroon, E., Jerome, L., Bijl, J., Lawrence, H.J., Humphries, K., and Sauvageau, G. (2002). Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* 99, 121-129.

Trowbridge, J.J., Moon, R.T., and Bhatia, M. (2006). Hematopoietic stem cell biology: too much of a Wnt thing. *Nat. Immunol.* 7, 1021-1023.

Trowbridge, J.J., Xenocostas, A., Moon, R.T., and Bhatia, M. (2005). Glycogen synthase kinase-3 is an in vivo regulator of hematopoietic stem cell repopulation. *Nat. Med.* 12, 89-98.

Veeman, M.T., Axelrod, J.D., and Moon, R.T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of β -catenin-independent Wnt signaling. *Dev. Cell* 5, 367-377.

Verbeek, S., Izon, D., Hofhuis, F., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Wilson, A., MacDonald, H.R., and Clevers, H. (1995). An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* 374, 70-74.

Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452.

Wils, E.J., Braakman, E., Verjans, G.M.G.M., Rombouts, E.J.C., Broers, A.E.C., Niesters, H.G.M., Wagemaker, G., Staal, F.J.T., Lowenberg, B., Spits, H., and Cornelissen, J.J. (2007). Flt3 ligand expands lymphoid progenitors prior to recovery of thymopoiesis and accelerates T cell reconstitution after bone marrow transplantation. *J. Immunol.* 178, 3551-3557.

Wilson, A. and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 93-106.

Wu, X., Quondamatteo, F., Lefever, T., Czuchra, A., Meyer, H., Chrostek, A., Paus, R., Langbein, L., and Brakebusch, C. (2006). Cdc42 controls progenitor cell differentiation and β -catenin turnover in skin. *Genes Dev.* 20, 571-585.

Xu, Y., Banerjee, D., Huelsken, J., Birchmeier, W., and Sen, J.M. (2003). Deletion of β -catenin impairs T cell development. *Nat. Immunol.* 4, 1177-1182.

Yang, L., Bryder, D., Adolfsson, J., Nygren, J., Mansson, R., Sigvardsson, M., and Jacobsen, S.E. (2005). Identification of Lin⁻Scal⁺kit⁺CD34⁺Flt3⁻ short-term

hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* *105*, 2717-2723.

Yu, Q. and Sen, J.M. (2007). β -catenin regulates positive selection of thymocytes but not lineage commitment. *J. Immunol.* *178*, 5028-5034.

Zediak, V.P. and Bhandoola, A. (2005). Aging and T cell development: interplay between progenitors and their environment. *Semin. Immunol.* *17*, 337-346.

Zediak, V.P., Maillard, I., and Bhandoola, A. (2007). Multiple prethymic defects underlie age-related loss of T progenitor competence. *Blood* DOI 10.1182/blood-2007-01-071605.

Zhao, Y., Lin, Y., Zhan, Y., Yang, G., Louie, J., Harrison, D.E., and Anderson, W.F. (2000). Murine hematopoietic stem cell characterization and its regulation in BM transplantation. *Blood* *96*, 3016-3022.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Thymic Cellularity Is Increased in Recipients of Wnt4-Transduced FL Cells

(A) Cell numbers in the BM, spleen, mesenteric LN and thymus were assessed 16 weeks after injection of FL cells transduced with *Wnt4-GFP* or *GFP*.

(B) Proportion of GFP+ cells among FL cells injected on day 0 and recipient cells harvested after 16 weeks.

(C) DN, double-positive (DP) and mature thymocyte subsets were analysed using CD4 and CD8 staining.

(D) Proportion of ETP ($\text{Lin}^{\text{lo/neg}}\text{CD117}^{\text{hi}}\text{CD25}^-$), DN2 cells ($\text{Lin}^{\text{lo/neg}}\text{CD117}^{\text{hi}}\text{CD25}^+$) and DN3 cells ($\text{Lin}^{\text{lo/neg}}\text{CD117}^{\text{hi}}\text{CD25}^-$) in thymi of recipients of Wnt4+ or control FL cells.

Dot plots of thymocytes stained with antibodies against CD117 and CD25 and gated on $\text{Lin}^{\text{lo/neg}}$ as described by Bhandoola *et al.* (Bhandoola and Sambandam, 2006).

Histograms depict the mean \pm SEM for the two experimental groups. n=8 and n=6 mice per group for Wnt4+ and control chimeras respectively. ***p < 0.01, †p < 0.005.

Figure 2. Increased Numbers of BM LSKs and CLPs in Primary Recipients of Wnt4+ FL Cells

BM cells from recipients of Wnt4+ (n = 3) and control (n = 4) FL cells were stained for Lin markers, CD117, Scd1 and CD127. One representative dot plot is shown (top) from four independent experiments performed. Histograms show percentage and absolute numbers of LSKs and CLPs (mean \pm SEM). ***p < 0.01, †p < 0.005, ††p < 0.0005.

Figure 3. Wnt4 Has A Threshold Effect on Discrete Stages of B-Cell Development

BM cells from Wnt4^{lo} (<10% GFP+ cells; top), Wnt4^{hi} (>10% GFP+ cells; middle) and control primary recipients were stained with antibodies against B220, CD43, CD24, IgM and IgD.

(A) Representative flow cytometry dot plots.

(B) Proportion of B220+ cells in Wnt4+ and control mice.

(C) Proportion of B cell developmental subsets in Wnt4^{hi} and control mice. Histograms represent the mean \pm SEM from five separate experiments. n = 14 for Wnt4+ (7 Wnt4^{hi} + 7 Wnt4^{lo}) and n = 8 for control chimeras. *p < 0.05, **p < 0.03.

Figure 4. Wnt4 Enhances Myeloid but Decreases Erythroid Development in The BM

Flow cytometry analyses of BM from primary recipients of Wnt4+ and control FL cells.

(A) Subsets of myeloid progenitors (Lin⁻CD127⁻CD117^{hi}Sca-1⁻ cells): common myeloid progenitors (CMP: CD34⁺CD16/CD32^{lo}), granulocyte-monocyte progenitors (GMP; CD34⁺CD16/CD32^{hi}), and megaryocyte-erythrocyte progenitors (MEP; CD34⁻CD16/CD32^{lo}).

(B) CD11b⁺Gr-1^{-/lo} monocytes and CD11b⁺Gr-1^{hi} granulocytes. (c) Immature erythroid fractions based on staining for CD71 and Ter119. Histograms depict the mean \pm SEM from four separate experiments. n = 7 for Wnt4+ and n = 4 for control chimeras.*p < 0.05, **p < 0.03, ***p<0.01, †p <0.005.

Figure 5. Analysis of BM LSK Subsets

(A) BM LSKs of recipient mice were analyzed for Flt3 expression by flow cytometry. One representative dot plot is shown for Wnt4+ (top) and control chimeras (bottom). Histograms show percentage and numbers of total LSKs, Flt3⁺ LSKs and Flt3⁻ LSKs. Numbers in parentheses indicate average fold-increase in Wnt4+ versus control recipients. Far right panel indicates the percentage of Flt3⁺ cells within the LSK compartment.

(B) Cell cycle analysis was performed on BM Flt3⁺ and Flt3⁻ LSKs. We show representative profiles (top) and average percentages of LSKs in G₀/G₁ and S+G₂/M phase of the cell cycle (bottom).

(C) Annexin-V staining was analyzed after gating on cells negative for propidium iodide (to exclude necrotic cells). Histograms depict percentage and numbers of Annexin-V⁺ cells in Flt3⁺ and Flt3⁻ LSKs.

(A-C) Data represent the mean ± SEM of 3 mice per group. *p < 0.05, **p < 0.03.

(D) Correlation between thymic cellularity and numbers of BM Flt3⁺ or Flt3⁻ LSKs. The Pearson linear correlation coefficient is represented by R values.

(E) Limiting dilution assay was performed using Ly5.2+ BM cells from primary Wnt4+ and control recipients co-injected with Ly5.1+ helper BM cells in irradiated Ly5.1+ secondary recipients (n = 25 recipients/group). Mice were considered reconstituted if more than 0.5% each myeloid (anti-Gr-1 /Mac-1), B (anti-CD19) and T (anti-TCRβ) lineage cells were Ly5.2⁺. Frequency of long-term HSCs (competitive reconstituting units) was determined using Poisson probabilities; 95% confidence intervals were 2.9 x 10⁴–1.8 x 10⁵ for Wnt4+ recipients, and 7 x 10⁴–5.8 x 10⁵ for controls.

Figure 6. Transcriptional Targets of Wnt4 in LSKs

Real-time RT-PCR analyses were performed on sorted GFP-negative BM LSKs from recipients of Wnt4+ or control FL cells. A total of 62 genes were analyzed (Table S1). Shown are the gene transcripts that were differentially expressed in the two groups. Transcript levels were normalized to *Hprt* levels and set as 1 in control LSKs (dotted line). Data represent the mean \pm SEM from three independent experiments. Levels of statistical significance for comparison of control vs. Wnt4+ LSKs are * $p < 0.05$, ** $p < 0.03$, *** $p < 0.01$, † $p < 0.005$.

Figure 7. Wnt4 activates JNK but not the canonical Wnt pathway

(A) Real-time RT-PCR analysis of four classic target genes of the canonical Wnt pathway was performed on GFP-negative BM LSKs from control and Wnt4+ primary recipients as described in Fig. 6. None of the genes was differentially expressed in mice reconstituted with Wnt4+ FL cells versus controls.

(B) Representative Western blots from FL cells that have been co-cultured for 15 min, 60 min or 120 min on Wnt4-producing versus control fibroblasts, showing β -catenin, phosphorylated JNK (T183/Y185) and total JNK. Beta-actin was used as a loading control. Graphs represent relative intensities of β -catenin and phosphorylated JNK (mean \pm SEM) from three separate experiments. * $p < 0.05$, †† $p < 0.0005$.

Figure 1

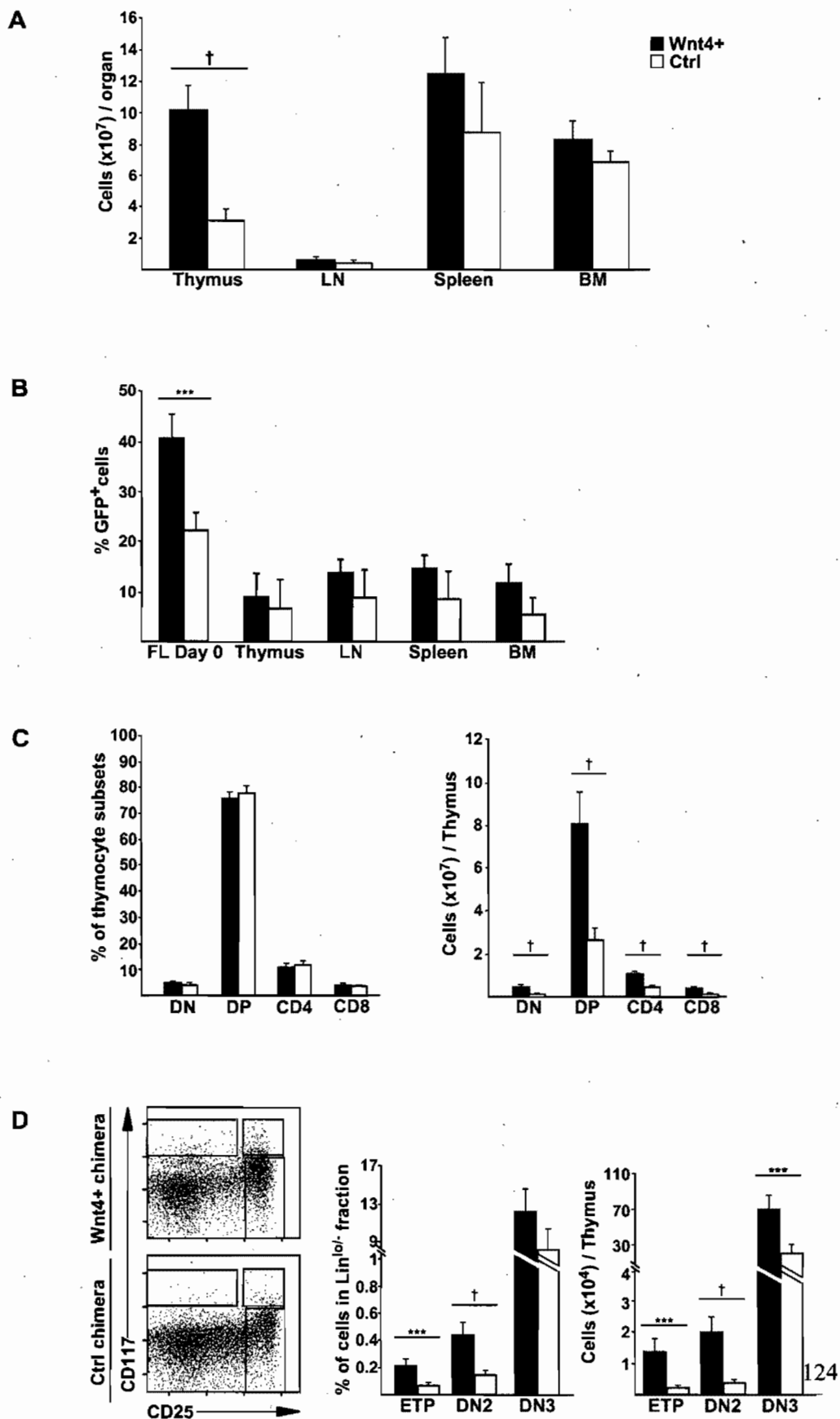


Figure 2

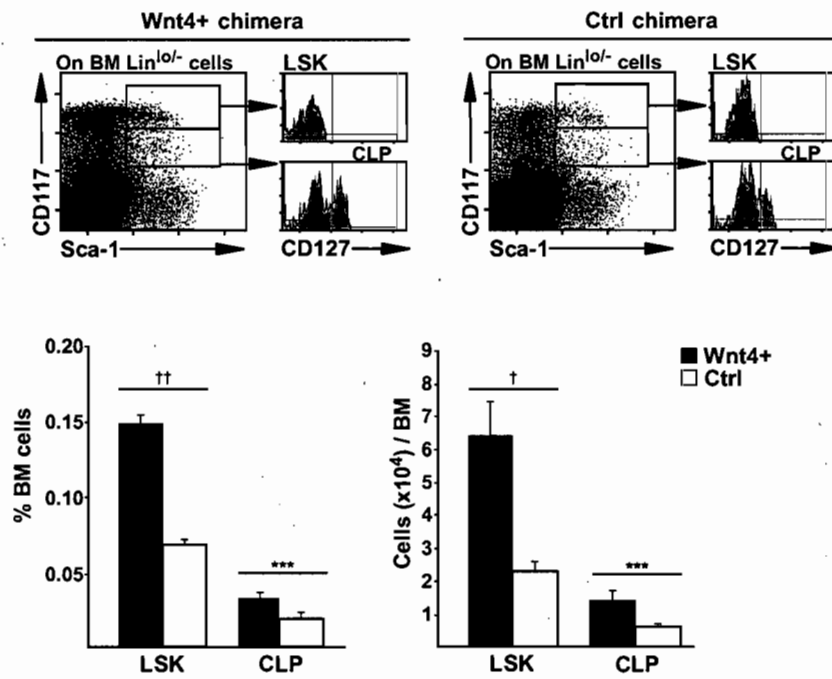


Figure 3

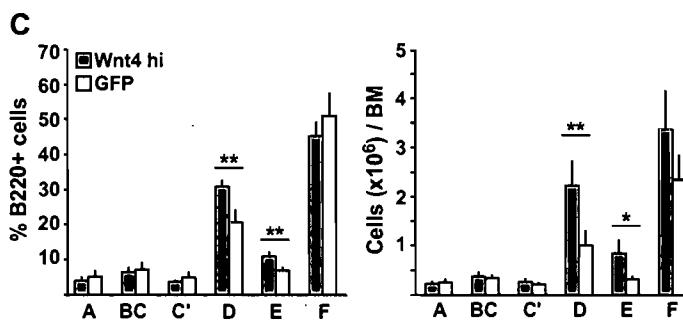
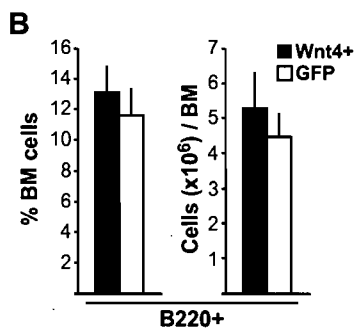
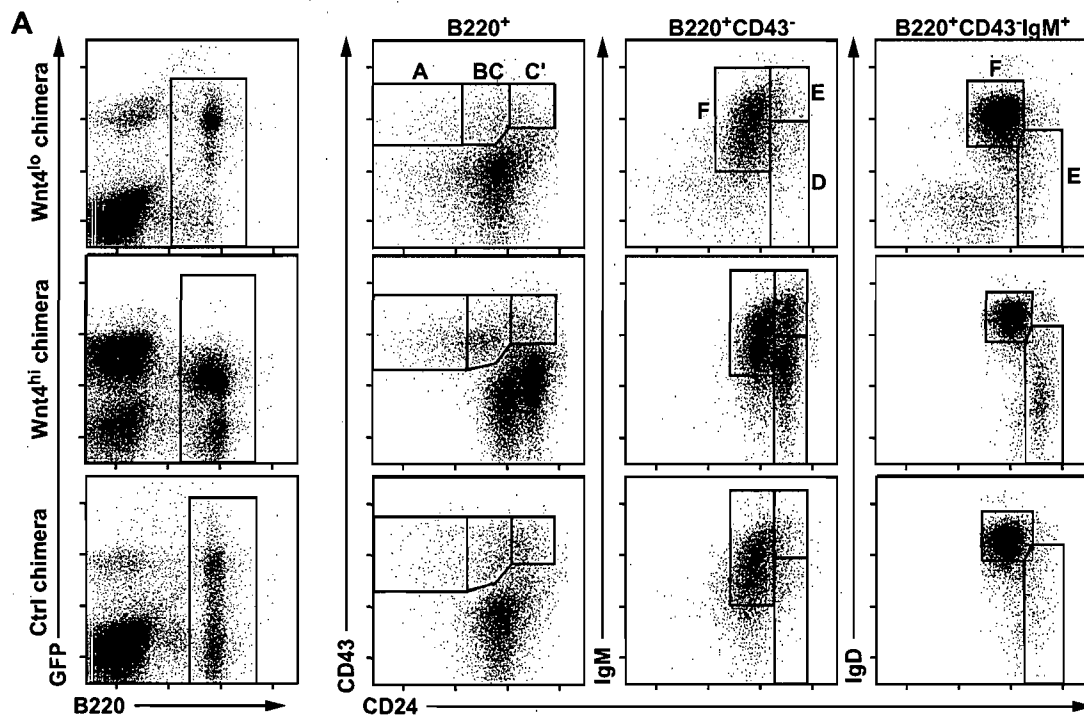


Figure 4

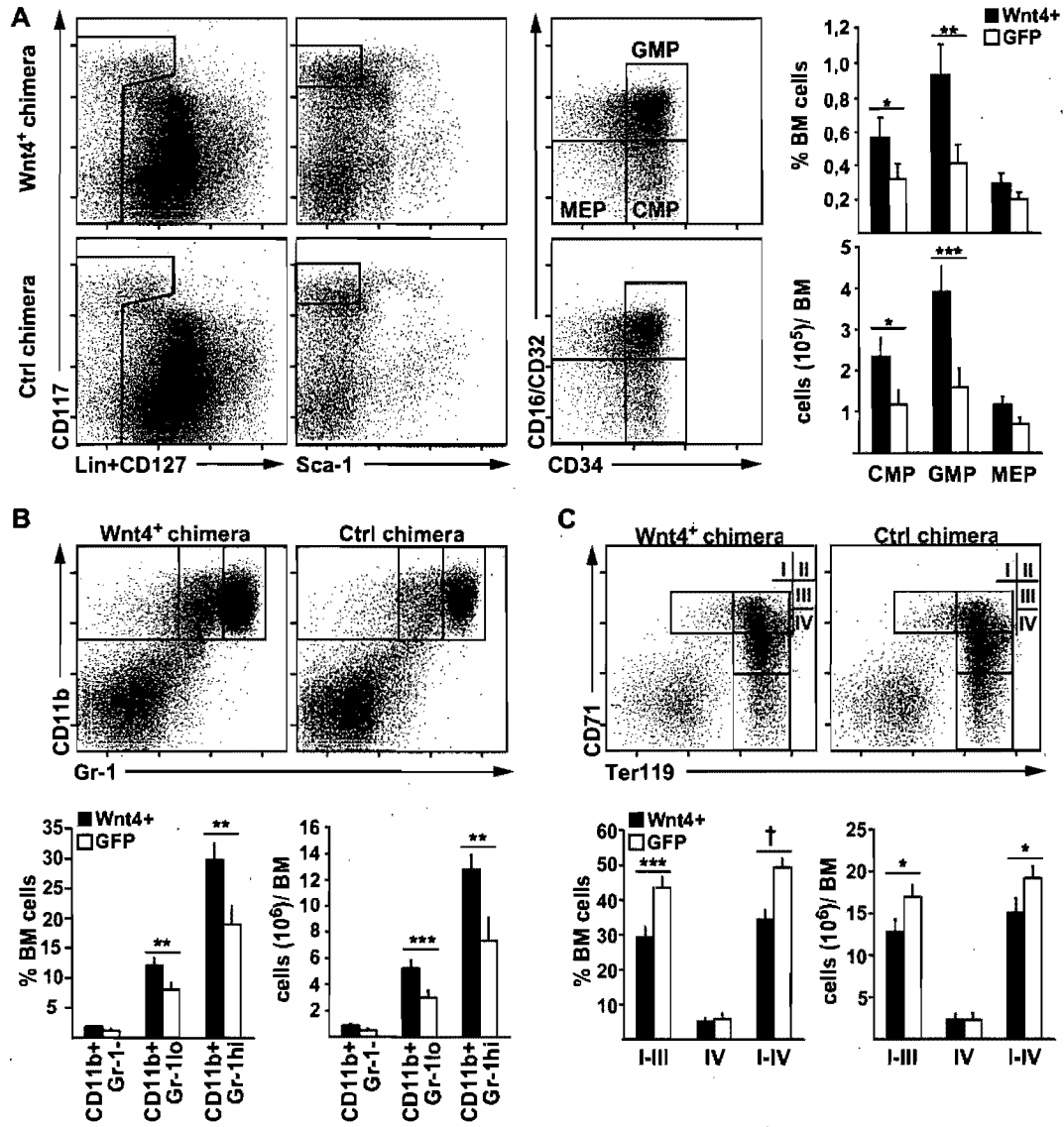


Figure 5

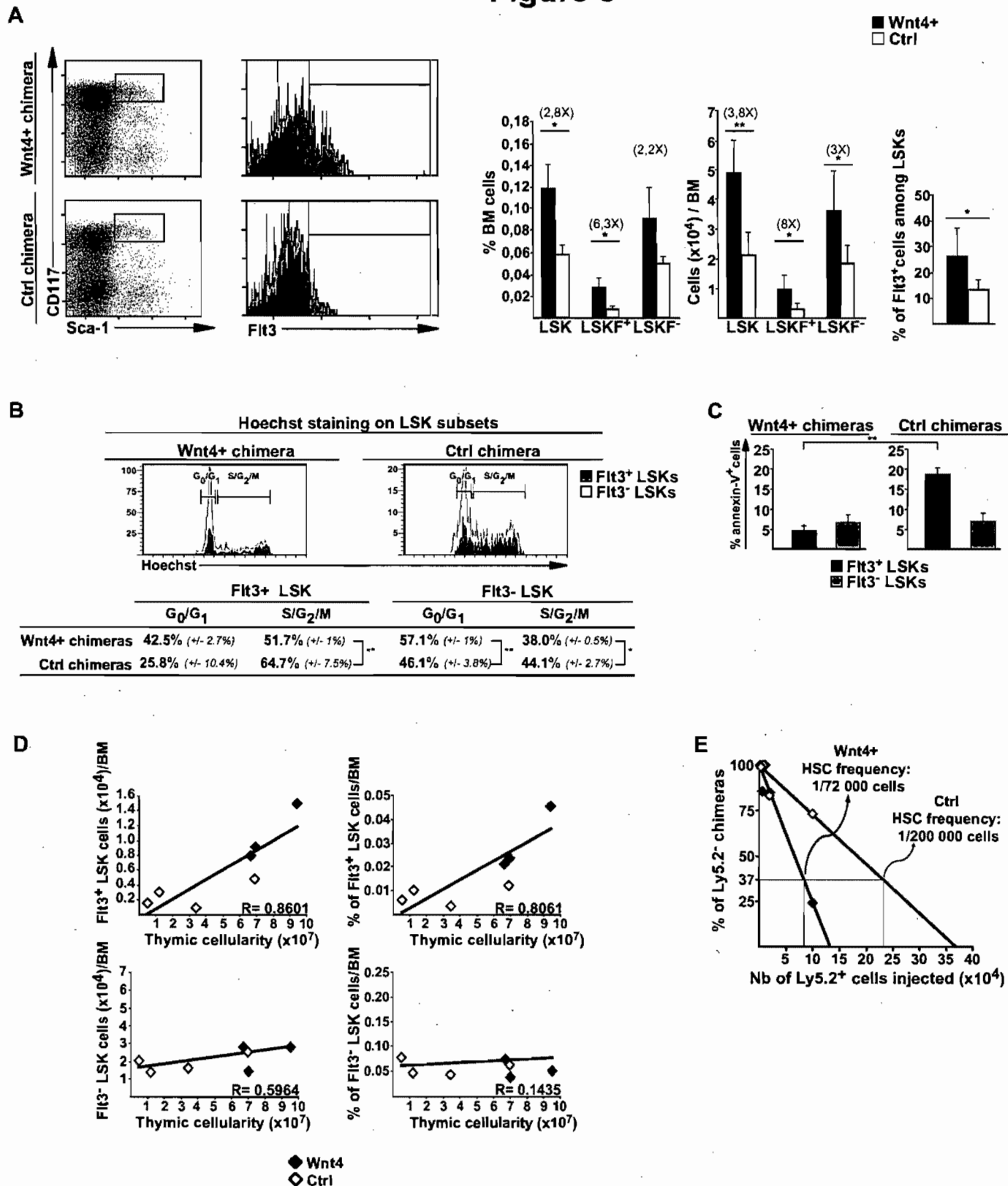


Figure 6

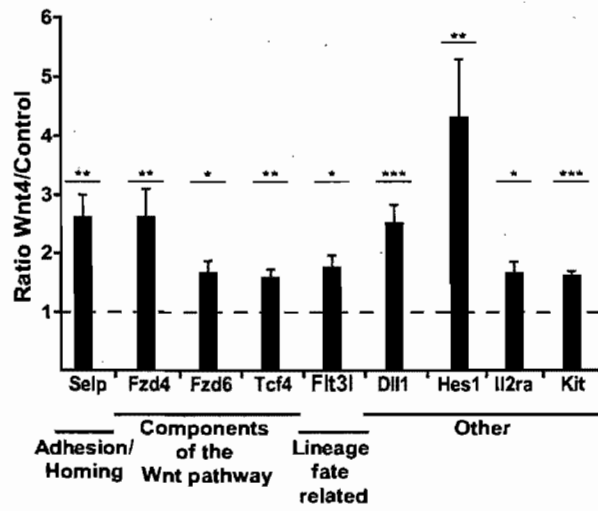
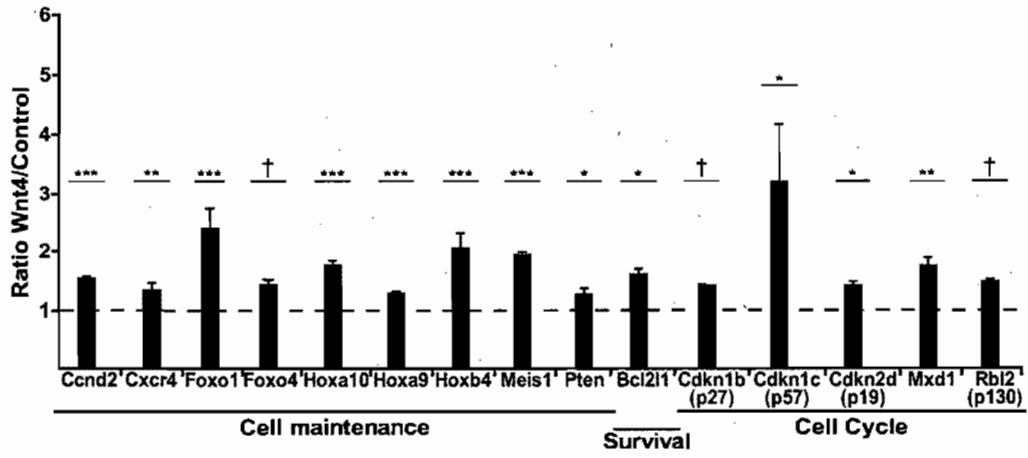
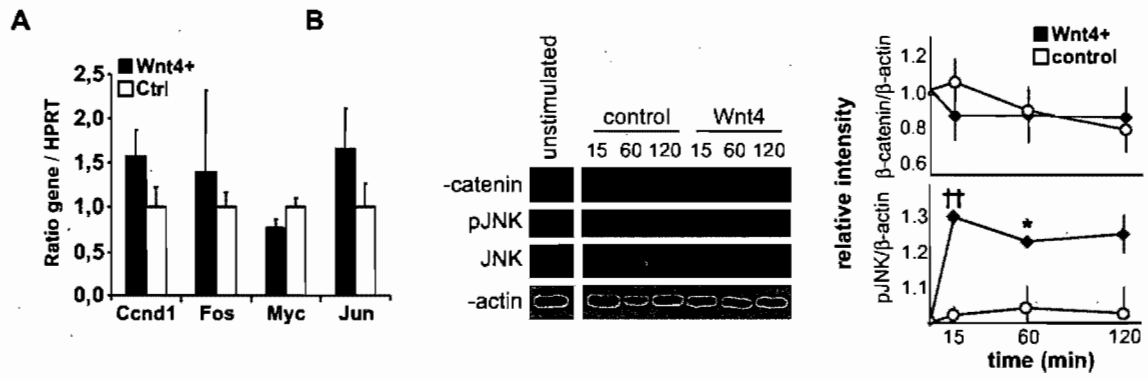
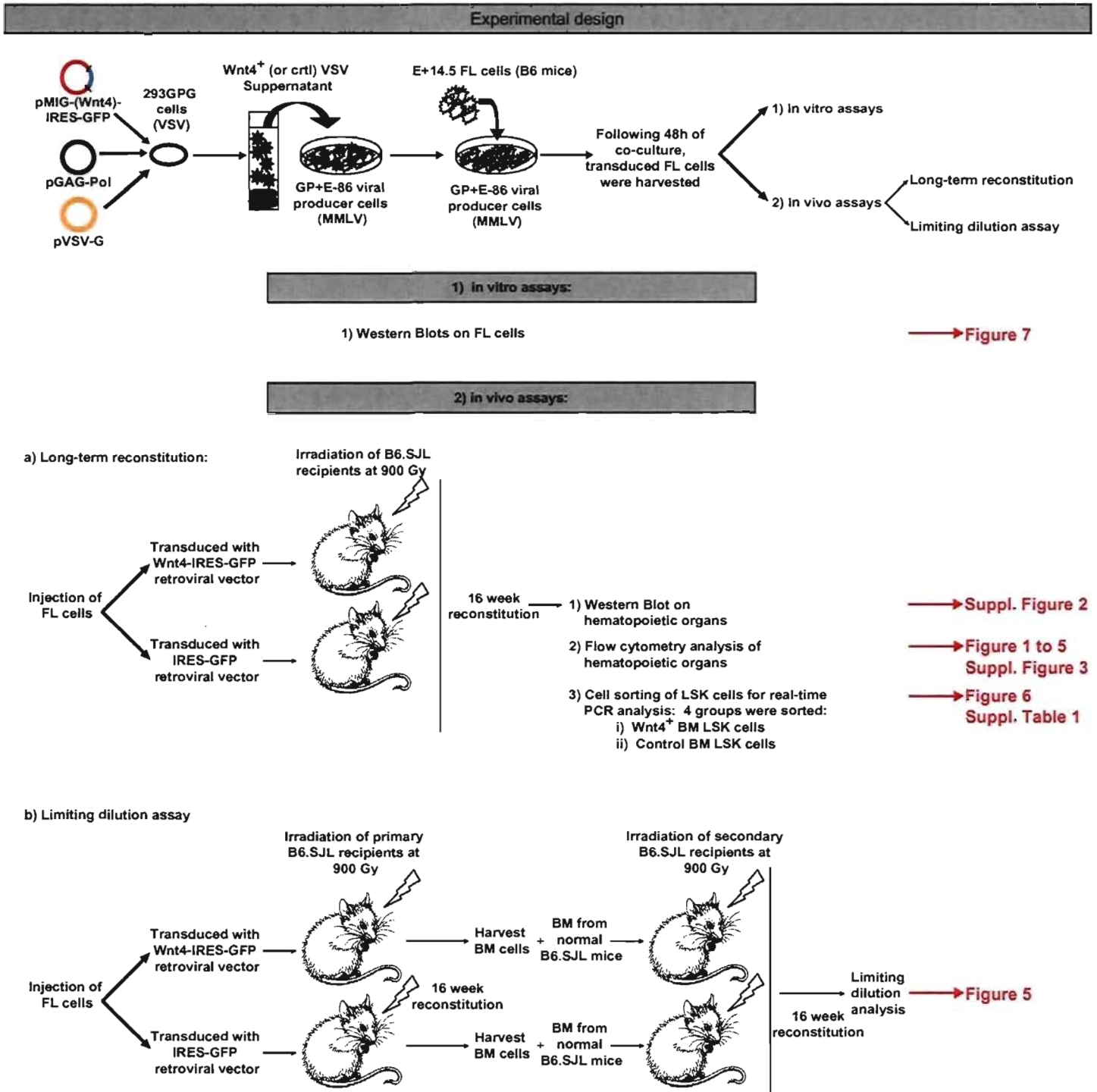


Figure 7

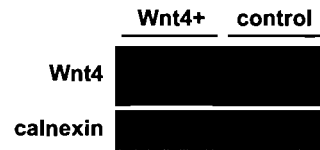


Supplementary Figure 1



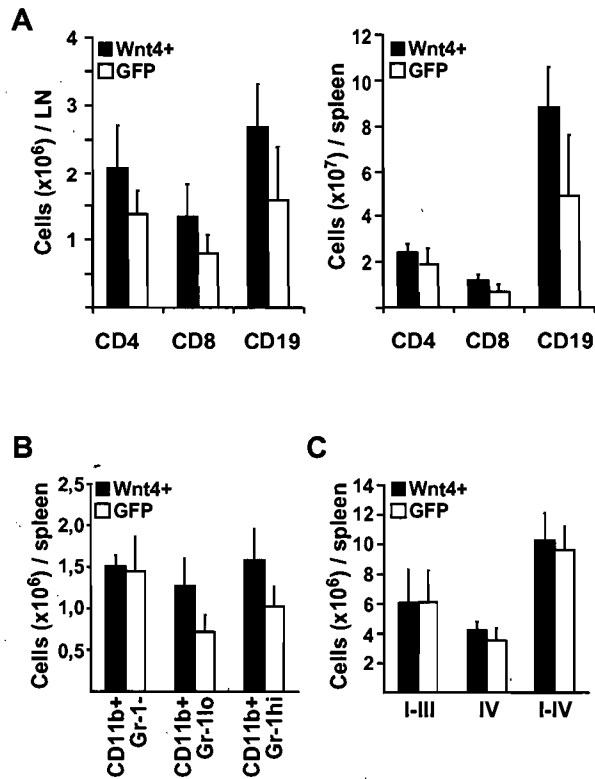
Supplementary Figure 1: Schematic overview of experimental procedures performed in the present study.

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2 - Wnt4 protein is expressed in chimeric mice. Western blot showing recombinant Wnt4 in the thymi of three Wnt4+ chimeric mice but not in controls. Calnexin was used to confirm equal loading in all samples.

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3 - Wnt4 has no major impact on mature cells in peripheral organs. (a) Numbers of mature T (CD4⁺ and CD8⁺) and B (CD19⁺) lymphocytes in mesenteric lymph nodes and spleen of chimeric mice. Histograms represent the mean \pm SEM from six separate experiments. $n=8$ for Wnt4⁺ and $n=6$ for control chimeras. Numbers of (b) myeloid and (c) erythroid cells in the spleen of primary recipients. Erythroid differentiation stages were identified as follows: CD71^{hi}Ter119^{lo} (stage I), CD71^{hi}Ter119^{hi} (II), CD71^{lo}Ter119^{hi} (III), and CD71^{hi}Ter119^{hi} (IV). Histograms represent the mean \pm SEM from four separate experiments. $n=7$ for Wnt4⁺ and $n=4$ for control chimeras. None of the differences were statistically significant.

Supplementary Table 1

Cell maintenance

Gene symbol	Gene name	Ref Seq	References
Bmi1	Bmi1 polycomb ring finger oncogene	NM_007552	(Lessard and Sauvageau, 2003; Park et al., 2003; Kirstetter et al., 2006; Scheller et al., 2006)
Ccnd2	Cyclin D2	NM_009829	(Cheshier et al., 1999)
Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	NM_021704	(Sugiyama et al., 2006)
Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	NM_009911	(Brenner et al., 2004; Sugiyama et al., 2006)
E4f1	E4F transcription factor 1	NM_007893	(Chagraoui et al., 2006)
Foxo1	forkhead box O1	NM_019739	(Tothova et al., 2007c)
Foxo3a	forkhead box O3a	NM_019740	(Tothova et al., 2007b)
Foxo4	myeloid/lymphoid or mixed lineage-leukemia translocation to 7 homolog (Mllt7)	NM_018789	(Tothova et al., 2007a)
Hoxa10	homeo box A10	NM_008263	(Magnusson et al., 2007; Nakae et al., 2003; Buske et al., 2001)
Hoxa9	homeo box A9	NM_010456	(Thorsteinsdottir et al., 2002)
Hoxb4	homeo box B4	NM_010459	(Antonchuk et al., 2002; Sauvageau et al., 1995; Kirstetter et al., 2006; Scheller et al., 2006; Thorsteinsdottir et al., 1999)
Meis1	myeloid ecotropic viral integration site 1	NM_010789	(Wang et al., 2006)
Pten	phosphatase and tensin homolog	NM_008960	(Zhang et al., 2006)

Survival

Gene symbol	Gene name	Ref Seq	References
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	NM_009741	(Willert et al., 2003; Park et al., 1995)
Bcl2l1	Bcl2-like 1 (Bcl-xL)	NM_009743	(Park et al., 1995)
Trp53	transformation related protein 53 (p53)	NM_011640	(Ito et al., 2004)

Cell cycle

Gene symbol	Gene name	Ref Seq	References
Ccnc	Cyclin C	NM_016746	(Passegue et al., 2005)
Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	NM_007669	(Cheng et al., 2000b; Kirstetter et al., 2006; Scheller et al., 2006)
Cdkn1b	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27)	NM_009875	(Cheng et al., 2000a)
Cdkn1c	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57)	NM_009876	(Forsberg et al., 2005)
Cdkn2a	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)	NM_009877	(Janzen et al., 2006)
Cdkn2b	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)	NM_007670	(Latres et al., 2000)
Cdkn2c	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18)	NM_007671	(Yu et al., 2006a; Yuan et al., 2004)
Cdkn2d	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19)	NM_009878	(Park et al., 2003)
Mxd1	Max dimerization protein 1 (Mad1)	NM_010751	(Foley et al., 1998; Walkley et al., 2005; Roussel et al., 1996)
Rbl1	retinoblastoma-like 1 (p107)	NM_011249	(Passegue et al., 2005)
Rbl2	retinoblastoma-like 2 (p130)	NM_011250	(Passegue et al., 2005)

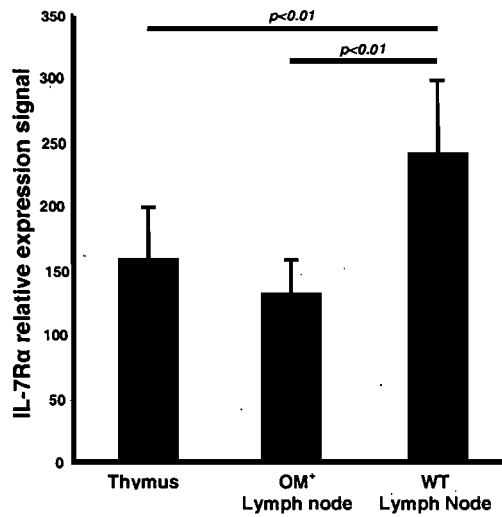
Annexe 1 : Figures supplémentaires

Figure 1 : Relative expression of IL-7R α transcripts in stroma-enriched cells from the thymus, WT and OM+ lymph nodes. Stromal cells were obtained as previously described³⁵³. Following mRNA extraction and hybridization on Affymetrix murine MOE430A gene chips, data were normalized using the Robust Multichip Averaging method. Bars represent the mean \pm SD of three independent biological and experimental triplicates.

Annexe 1 : Figures supplémentaires (suite)

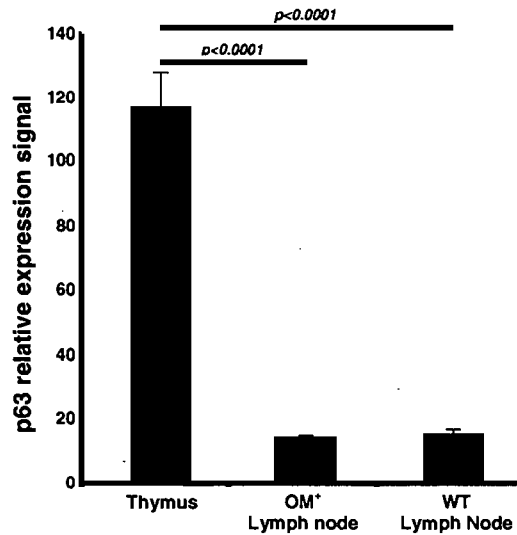


Figure 2 : Relative expression of p63 transcripts in stroma-enriched cells from the thymus, WT and OM+ lymph nodes. Stromal cells were obtained as previously described³⁵⁴. Following mRNA extraction and hybridization on Affymetrix murine MOE430A gene chips, data were normalized using the Robust Multichip Averaging method. Bars represent the mean \pm SD of three independent biological and experimental triplicates.

Annexe 1 : Figures supplémentaires (suite)

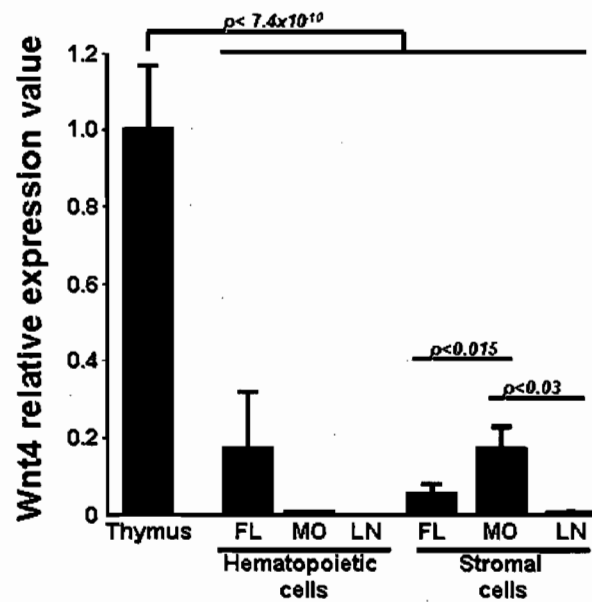


Figure 3 : Levels of *Wnt4* transcripts in the stromal and hematopoietic fraction or total (for thymus) of selected organs. mRNA values were normalized according to *Hprt* and thymus mRNA levels were set as 1. Data are mean \pm SD from three or four independent experiments. Differences between groups were evaluated with Student's t test.

6. DISCUSSION

Le but de nos travaux était de comprendre quels sont les signaux nécessaires à la différenciation des progéniteurs T en évaluant d'une part la nature des progéniteurs aptes à se différencier en lymphocytes T et, d'autre part, la nature des signaux produits par le stroma nécessaires à l'induction de cette différenciation. Pour y parvenir, nous nous sommes posé les questions suivantes:

- Sachant que le développement T normal se produit uniquement dans le thymus, et non dans les ganglions, dans un contexte physiologique normal, retrouve-t-on les mêmes progéniteurs dans ces deux organes ?
- Du point de vue de l'environnement, retrouve-t-on des différences au niveau des signaux produits par les stromas thymiques et ganglionnaires qui permettraient de comprendre pourquoi, dans un contexte normal, le thymus demeure le seul organe apte à supporter le développement de progéniteurs T et la génération de lymphocytes T matures et fonctionnels?

6.1 Développement T extra-thymique

6.1.1 Introduction

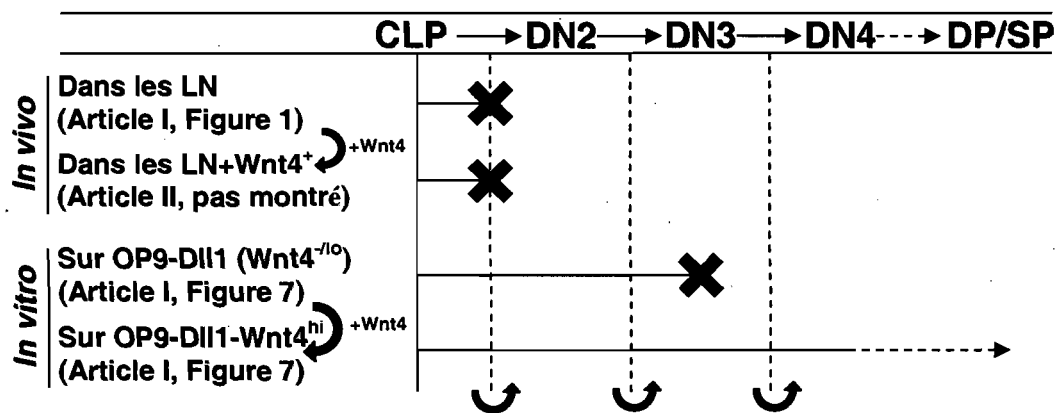
Les mécanismes moléculaires qui régulent la différenciation de précurseurs T demeurent encore très mal caractérisés. Le thymus diffère des autres organes de plusieurs façons et notre objectif consistait à évaluer quelles étaient les caractéristiques moléculaires que devait posséder cet organe pour lui permettre l'accomplissement de ses fonctions. Nous avons tenté d'élucider cette question avec l'utilisation d'un modèle de souris transgénique pour l'Oncostatin M (OM). Ces souris surexpriment l'OM sous le contrôle du promoteur proximal p56^{lck} restreignant ainsi son expression au niveau des lymphocytes T³⁵⁵. Cette transgénèse entraîne une modification des ganglions lymphatiques telle que ces derniers deviennent aptes à supporter un développement T extra-thymique massif, thymus-indépendant³⁵⁶⁻³⁵⁹. Le projet consistait à se poser la question suivante : étant donné que le développement T, dans certaines conditions, est possible dans les ganglions³⁶⁰⁻³⁶², en quoi cet organe diffère-t-il du thymus ? Ceci permettrait de comprendre pourquoi ce développement T ganglionnaire ne s'y produit pas normalement.

6.1.2 Dichotomie des résultats *in vivo* et *in vitro*

Nous avons tout d'abord remarqué que la nature des progéniteurs présents dans ces deux organes est différente (Article 1, Figure 1). Contrairement au thymus qui contient ces deux types de progéniteurs, les ganglions ne contiennent pas d'ETP mais plutôt des progéniteurs

phénotypement CLP ($\text{Lin}^{-/\text{o}}\text{ckit}^{/\text{o}}\text{IL7R}\alpha^+$). Dans un environnement ganglionnaire normal, ces CLP ne se différencient que jusqu'à l'étape pré-DN2, étape à laquelle leur différenciation est bloquée. Si on leur fournit un environnement apte à la différenciation T (sur OP9-Dll1), ces CLP acquièrent la capacité de poursuivre leur développement jusqu'à l'étape DN3, où un autre blocage dans leur différenciation s'observe (article I, Figure 6). Nous avons évalué la présence, dans la fraction stromale du thymus et du ganglion, de transcrits connus comme étant importants au développement T, dont l'IL-7, Dll1 et 4, KitL et Flt3L ainsi que les divers Wnts (article I, Figure 4). Nous n'avons remarqué aucune différence dans les niveaux de transcrits de toutes ces protéines entre le thymus et les ganglions, sauf pour les transcrits de Wnt4 et Wnt7b, absents des ganglions. Nous nous sommes concentrés sur Wnt4 car cette protéine a déjà été rapportée comme jouant un rôle dans la thymopoïèse^{363,364}. Nous avons suggéré que l'absence de Wnt4 dans les ganglions serait peut-être responsable du fait que cet organe ne supporte pas la lymphopoïèse T dans un contexte physiologique. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé le modèle de différenciation T *in vitro* dans lequel nous avons induit la surexpression de Wnt4 dans les OP9-Dll1. Nous avons observé que la différenciation des progéniteurs ganglionnaires devient possible dans ce contexte, et s'effectue jusqu'à la génération de lymphocytes T simples positifs. Ceci étaye notre hypothèse proposant que l'absence de développement T dans les ganglions soit attribuable à l'absence de Wnt4 dans cet organe. La suite du projet, soit l'article II, consistait à évaluer le phénotype induit par une surexpression systémique de Wnt4 dans le compartiment hématopoïétique chez la souris. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle d'infection rétrovirale où nous avons infecté du foie fœtal de souris avec un vecteur rétroviral exprimant ou pas Wnt4 dont nous nous sommes servi pour reconstituer à long-terme des receveuses irradiées. Suite aux résultats publiés dans l'article I, nous nous attendions à voir un développement T extra-thymique dans les ganglions mésentériques. Ceci n'a pas été le cas. Pourquoi ?

**Schéma de différenciation des cellules phénotypement
CLP ($Lin^{-/lo}CD44^{+}CD25^{-}ckit^{lo}Sca1^{lo}CD127^{+}$),
présentes dans les ganglions mésentériques (LN)**



Ce schéma résume les résultats que nous avons obtenus, dans les diverses conditions, en ce qui a trait à la différenciation des progéniteurs présents dans les ganglions normaux. On voit qu'*in vivo*, dans un contexte normal ou lorsque Wnt4 est surexprimé, les ganglions sont incapables de supporter la différenciation T. Dans ces deux cas, la différenciation est arrêtée au même endroit, soit à l'étape pré-DN2. Par contre, *in vitro*, la différenciation de ces progéniteurs est possible. Sur des OP9-Dll1, les progéniteurs ganglionnaires se différencient à divers niveaux selon la présence, ou non, de Wnt4 dans le milieu. En effet, la différenciation de CLP à DN3 ne dépend pas, ou peu, de l'expression de Wnt4. Des essais de PCR quantitatifs montrent que les OP9-Dll1 n'expriment que peu de Wnt4 (voir Article I, Figure 4). Nos résultats montrent aussi que la différenciation de DN3 à SP est dépendante de la surexpression de Wnt4 par les cellules stromales.

6.1.3 Hypothèses et discussion

Ceci suggère trois possibilités :

- 1) L'induction de la différenciation des CLP ganglionnaires observée *in vitro* ne serait pas un effet direct de Wnt4 sur ces cellules, mais serait plutôt secondaire à la signalisation de cette protéine sur les OP9-Dll1. Dans ce cas, l'absence de différenciation de cellules hématopoiétiques transduites avec Wnt4 *in vivo* serait causée par l'insensibilité des cellules du stroma ganglionnaire à l'effet de Wnt4.

- 2) Le ganglion serait inapte à synthétiser une ou plusieurs protéines, nécessaires à l'induction de la différenciation T, et qu'*in vivo*, Wnt4 ne remplacerait pas ce signal ou serait insuffisant pour compenser l'absence de ce signal.
- 3) Le ganglion contient une ou plusieurs molécules qui inhiberait la différenciation T et qu'*in vivo*, Wnt4 ne suffirait pas à contrecarrer ce signal d'inhibition.

Pour évaluer la première possibilité, il faudrait tout d'abord valider si la signalisation Wnt4 s'effectue sur les cellules stromales du ganglion. Si la signalisation sur le stroma est la même que celle que l'on observe dans les cellules hématopoïétiques, des niveaux plus élevés de phospho-JNK devraient être détectables dans les cellules stromales ganglionnaires. Si aucun signal Wnt4-dépendant n'est détectable dans ces cellules, cette première hypothèse pourrait être à considérer. En effet, le stroma ganglionnaire pourrait :

- 1) Ne pas exprimer le récepteur spécifique à la signalisation Wnt4, dont l'identité dans ce contexte est inconnue.
- 2) Exprimer un récepteur spécifique à Wnt4 mais différent que celui retrouvé sur les OP9-Dll1-Wnt4⁺. Ceci générerait une réponse à Wnt4 *in vivo* différente de celle que l'on voit *in vitro*.

Dans ces deux cas, le stroma ganglionnaire fournirait un environnement Wnt4⁺, mais inadéquat à la différenciation T. Ceci permettrait d'expliquer la divergence des résultats que nous avons obtenus *in vitro* et *in vivo* dans un milieu riche en Wnt4. De plus, nous pouvons ajouter à cette hypothèse le concept que l'identité de la cellule produisant Wnt4 affecte peut-être le signal reçu par les cellules. En effet, dans le contexte de différenciation *in vitro*, Wnt4 est produit par le stroma tandis qu'*in vivo*, Wnt4 est produit par les cellules hématopoïétiques. Ceci pourrait générer une réponse différente sur les cellules cibles. Par contre, Wnt4 est une protéine sécrétée et aucune information dans la littérature ne laisse suggérer que la nature de la cellule productrice influence le signal induit. Ceci restera toutefois à confirmer en évaluant si la cinétique ou la capacité de différenciation sont modifiées si c'est le stroma (*in vivo* ou *in vitro*) ou les cellules hématopoïétiques qui produisent la protéine.

Les deuxième et troisième hypothèses citées plus haut reviennent à suggérer que l'environnement ganglionnaire serait apte à recevoir un signal via Wnt4, mais ne serait pas apte à supporter la différenciation T par la présence (ou l'absence) de protéines clés (ou

inhibitrices) à ce processus. Pour tenter de comprendre ce qui pourrait se produire dans l'environnement ganglionnaire, il faut faire la comparaison entre ce dernier et les OP9-D111. Lors de nos essais, nous n'avons pas effectué d'analyse exhaustive sur les OP9-D111 pour pouvoir comparer les niveaux de transcrits autres que ceux que nous avons publiés (voir Article I, Figure 4). Par contre, la somme des informations que nous avons pourrait permettre de suggérer une explication plausible à l'absence de différenciation T dans les ganglions. En effet, nous avons rapporté que les niveaux de transcrits d'IL-7, de KitL, de D111 et 4, et de Flt3L étaient semblables et souvent supérieurs dans le stroma ganglionnaire par rapport au stroma thymique (voir Article I, Figure 4). Nous devons inévitablement vérifier si l'expression d'ARNm se traduit par la même quantité de protéines. Nous ne pouvons exclure la possibilité que des modifications post-transcriptionnelles différentes entre le thymus et les ganglions fassent en sorte que les niveaux protéiques soit différents entre ces deux organes, expliquant le phénotype observé. Ceci n'a, par contre, jamais été rapporté dans la littérature. Considérons, comme prémisses de base pour la discussion subséquente, que les niveaux protéiques produits soient les mêmes entre ces deux organes.

Nos résultats *in vitro* suggèrent que les étapes précoces de différenciation des CLP (jusqu'à DN3) s'effectuent de façon indépendante à la présence de Wnt4 (ou très faiblement dépendante). De quoi dépendrait l'initiation de la différenciation des progéniteurs présents dans les ganglions? Les résultats obtenus par Guy-Grand et son équipe ont permis de suggérer que le facteur limitant pour la différenciation des progéniteurs présents dans les ganglions est l'apparition de lymphocytes T thymiques ($\text{TCR}\alpha\beta^+$)³⁶⁵, probablement causée par un effet de compétition entre ces deux populations pour des cytokines dans le milieu³⁶⁶. Un article de Munitic suggère que la régulation dynamique de l'expression de surface de l'IL-7R sur les diverses populations lymphocytaires dans le thymus, avec une diminution de son expression à l'étape DP, permettrait d'éviter aux progéniteurs de compétitionner pour l'IL-7. En effet, l'induction de l'expression d'IL-7 sur les DP thymiques, qui ne l'expriment normalement pas, entraîne une diminution des populations de DN et de la cellularité thymique. Ceci est rétabli, au moins partiellement, en croisant des souris transgéniques pour l'IL-7R avec des souris transgéniques pour l'IL-7³⁶⁷.

Est-ce que les niveaux d'IL-7 pourraient expliquer les différents résultats obtenus, soit la différenciation des progéniteurs ganglionnaires *in vitro*, mais le maintien du blocage de la différenciation *in vivo*? Ayant montré que le thymus et les ganglions expriment le même

niveau de transcrits d'IL-7 (Article 1, Figure 4), cette hypothèse est-elle encore possible ? Combiné à ce qui a été publié dans la littérature, nos résultats permettent de suggérer que tel est le cas. En effet, l'initiation de la différenciation des CLP ganglionnaires dans des essais de co-culture sur des OP9-D111 est possible, probablement parce 1) nous ajoutons de l'IL-7 en excès dans le milieu, et 2) cet environnement ne contient aucune cellule apte à compétitionner avec les progéniteurs ganglionnaires pour cette cytokine.

In vivo, quoique produisant autant de transcrits d'IL-7 que les ganglions, le thymus est constitué à 85% de cellules DP, qui n'expriment pas le récepteur de l'IL-7³⁶⁸. Par contre, le ganglion est constitué majoritairement de lymphocytes T matures CD4+ et CD8+, tout deux exprimant le récepteur de l'IL-7³⁶⁹. Les lymphocytes T matures consomment l'IL-7³⁷⁰, ce qui induirait un état de « carence » pour les progéniteurs présents dans l'environnement ganglionnaire et inhiberait leur différenciation. Des analyses de micropuces d'ADN, faites sur des populations enrichies en stroma mais contenant une proportion non-négligeable de cellules hématopoïétiques, ont été effectuées par notre laboratoire. Ces micropuces d'ADN ont été effectuées à partir de thymus et de ganglion normal, ainsi que de ganglion OM⁺, apte à supporter la différenciation T (non-montré). Ces résultats confirment que les ganglions normaux contiennent des niveaux plus élevés que le thymus et le ganglion OM⁺ de transcrits de la chaîne α du récepteur de l'IL-7, spécifique à cette cytokine (voir Annexe 1, Figure 1). Ainsi, *in vivo*, la compétition pour l'IL-7 pourrait être limitante à la différenciation des progéniteurs dans les ganglions.

Aussi, sachant que Wnt4 est faiblement exprimé sur les OP9-D111, nous ne pouvons pas trancher entre deux possibilités concernant les étapes précoces de différenciation des CLP ganglionnaires:

- 1) si elles dépendent à la fois de l'IL-7 et de faibles niveaux de Wnt4
- 2) si elles ne dépendent que de l'IL-7, la présence de Wnt4 étant superflue à ces étapes.

Il serait intéressant, pour valider ces hypothèses, d'évaluer si la délétion complète de Wnt4 sur les OP9-D111 modifierait le comportement des CLP *in vitro*. En effet, si Wnt4 est superflue, la cinétique de différenciation ne serait pas modifiée pour la différenciation de CLP à DN3. Par contre, si de faibles niveaux de Wnt4 sont nécessaires à ces étapes précoces, la différenciation dans un environnement OP9-D111-Wnt4 devrait en être modifiée.

Pour valider l'hypothèse d'un effet limitant de l'IL-7 pour l'initiation de la différenciation des CLP ganglionnaires, il serait intéressant de voir si, sous l'effet d'une surexpression d'IL-7, les progéniteurs ganglionnaires deviennent aptes à initier leur différenciation vers la lignée T et, si tel est le cas, jusqu'à quelle étape. De plus, nous pourrions aussi évaluer si la reconstitution de souris avec des cellules hématopoïétiques surexprimant à la fois l'IL-7 et Wnt4 donnerait les mêmes résultats *in vivo* que ceux obtenus *in vitro*, suite à la co-culture de CLP ganglionnaires sur des OP9-D11-Wnt4⁺. Si cette hypothèse s'avère exacte, un apport supplémentaire d'IL-7 et de Wnt4 devrait permettre de voir apparaître un développement extra-thymique dans les ganglions de souris normales.

Nos résultats *in vitro* montrent aussi que la transition DN3-DN4 dépend, pour la différenciation de CLP ganglionnaires, de fortes concentrations de Wnt4 (voir schéma). Les résultats publiés dans la littérature se sont généralement concentrés sur l'implication de la voie canonique dans les diverses étapes de la différenciation T³⁷¹⁻³⁸⁰. Par contre, la voie non-canonique n'a pas attiré autant d'attention. Quel serait le rôle de Wnt4 à cette étape ? Nous avons établi que, dans les cellules de foie fœtal, Wnt4 induit la phosphorylation de JNK. Si Wnt4 active cette même voie dans ces cellules, l'activation de JNK pourrait jouer un rôle dans la différenciation des CLP de l'étape DN3 à DN4. Par contre, la délétion de JNK-1 et JNK-2 ne montre aucun phénotype au niveau de la différenciation T ou B³⁸¹. Par contre, dans ce dernier cas, la différenciation T se fait dans le thymus à partir de progéniteurs ETP, et nous observons que ces cellules ne requièrent pas, ou peu, de Wnt4 pour se différencier *in vitro* (Article 1, Figure 6). Aucune donnée dans la littérature ne permet de suggérer que l'induction d'un signal JNK pourrait favoriser cette étape de la différenciation T. La surexpression de Wnt4 induit la transcription de Bcl-xL (p=0.05) et une augmentation notable de 2.4 fois des transcrits de Bcl-2 (p=0.06). L'expression de ces deux molécules a déjà été évaluée dans les thymocytes et montre un patron hautement spécifique et réciproque, avec Bcl-2 exprimé au niveau des DN³⁸² et Bcl-xL au niveau des DP³⁸³. Par contre, la surexpression de Bcl-xL n'a aucun effet sur la population des DN, mais favorise la survie des populations subséquentes dans la thymopoïèse³⁸⁴. Aussi, la différenciation T se produit normalement dans des souris Bcl-2^{-/-}, malgré une diminution de la cellularité thymique³⁸⁵. À quoi serait due l'induction de la différenciation des CLP de DN3 à DN4 suite à la surexpression de Wnt4 ? Si l'effet majeur de Wnt4 implique l'induction de la survie dans les CSH, et que ceci se transpose chez ces DN3 ganglionnaires, une molécule anti-apoptotique intéressante à évaluer serait Bcl-2A1. En effet, cette molécule a été

identifiée comme l'effecteur de la cascade de survie induite par PKC/NF- κ B à l'étape de la β -sélection³⁸⁶. C'est la seule protéine de la famille de Bcl-2 dont l'expression corrèle avec la β -sélection. Mandal et son équipe ont surexprimé Bcl-2A1 dans des progéniteurs hématopoïétiques Rag-1^{-/-}. Ils rapportent que ceci permet la progression de la différenciation T, en favorisant la survie et non la prolifération à l'étape DN3³⁸⁷. Ainsi, la surexpression de Wnt4 favorise peut-être la différenciation des CLP ganglionnaires en favorisant la surexpression de Bcl-2A1 à l'étape de la β -sélection. Des analyses de PCR quantitatif seraient requises pour vérifier cette hypothèse. Pour tenter de comprendre le rôle de Wnt4 dans la différenciation de CLP ganglionnaires en lymphocytes T matures, *in vitro*, plusieurs analyses sont requises : Wnt4 induit-elle aussi la signalisation non-canonique, via JNK, dans ces cellules ? Voit-on une augmentation de la survie dans ces progéniteurs DN3 comme ce que l'on voit dans les LSKF médullaires ? Si tel est le cas, quelles molécules apoptotiques sont régulées par Wnt4 dans ce contexte ? Wnt4 régule-t-il l'expression de Bcl-2A1 dans ces progéniteurs ? Ceci est-il aussi vrai dans les progéniteurs « canoniques », provenant de la différenciation d'ETP ? Toutes ces questions laissent entrevoir plusieurs avenues passionnantes sur les cellules et mécanismes qui régulent la génération de lymphocytes T par le thymus.

De plus, outre la différenciation Wnt4-dépendante que nous avons observé *in vitro*, nous n'avons fait aucune analyse en ce qui a trait à la fonctionnalité des cellules générées à partir de CLP ganglionnaires. En effet, nous n'avons étudié que l'obtention du phénotype que présentent les lymphocytes T matures, soit l'expression de CD4 ou CD8 conjointement à l'expression de surface de la chaîne β du TCR. Il serait intéressant de voir si ces CLP ganglionnaires, lors de leur différenciation *in vitro*, génèrent des lymphocytes T matures et fonctionnels, aptes à engendrer une réponse immunitaire. Sachant que les progéniteurs ganglionnaires ont un phénotype CLP, il serait intéressant d'évaluer s'ils acquièrent, lors de leur différenciation, les mêmes caractéristiques que celles que nous avons rapportées chez les souris OM⁺³⁸⁸⁻³⁹¹, où la différenciation se fait entièrement dans le ganglion avec des cellules ayant initialement le même phénotype. Ceci permettrait de voir si les caractéristiques des lymphocytes T OM⁺ que nous avons rapportées sont attribuables à une différenciation extra-thymique ou plutôt causées par la différenciation de progéniteurs différents que les ETP thymiques conventionnels.

La nature des progéniteurs qui entrent dans le thymus ne fait toujours pas l'unanimité parmi les chercheurs qui s'intéressent à cette question. Par contre, une fois dans cet organe, le consensus est que les ETP sont les cellules progénitrices des lymphocytes T. Pourquoi est-ce le cas ? Est-ce un défaut intrinsèque aux autres organes de ne pouvoir recruter les ETP ou est-ce plutôt attribuable à un environnement défavorable à leur différenciation ailleurs que dans le thymus ? Notre schéma expérimental nous a permis de suggérer quelques hypothèses à ce sujet, tant du point de vue stromal qu'hématopoïétique, mais des analyses plus approfondies devront être effectuées.

6.2 Effets d'une surexpression de Wnt4 *in vivo*

6.2.1 Introduction

Wnt4 est une protéine dont les fonctions biologiques ont surtout été évaluées au niveau de la genèse des reins et de la détermination sexuelle³⁹²⁻³⁹⁴. On sait, depuis quelques années que Wnt4 est exprimée au niveau du thymus^{395,396}, où elle régulerait l'expression de FoxN1, dont l'absence est responsable du phénotype athymique de la souris nude³⁹⁷. Des souris déficientes pour Wnt4 ont été générées. Ces souris meurent 24 heures après la naissance d'une défaillance rénale et montrent une diminution de la cellularité thymique de 30%^{398,399}.

6.2.2 Résultats *in vivo*

Pour tenter d'élucider le rôle de Wnt4 *in vivo*, nous avons utilisé un modèle d'infection rétrovirale où nous avons infecté du foie fœtal de souris avec un vecteur rétroviral exprimant ou pas Wnt4 que nous avons ensuite injecté à des receveuses irradiées. Nous avons observé que Wnt4 n'affecte pas la génération de cellules matures. Les phénotypes les plus importants induits par sa surexpression ne se limitent qu'à certains sous-types de cellules immatures, dont une augmentation des LSKF⁺ dans la moelle et des ETP dans le thymus. Cette augmentation des LSKF⁺ n'est pas due à une augmentation de leur prolifération, mais plutôt à une augmentation de leur survie (article II). Comment agit Wnt4 *in vivo* ? Sachant que Wnt4 est une protéine sécrétée, il est difficile d'identifier si, *in vivo*, elle agit directement sur ces progéniteurs, ou indirectement via un effet sur la fraction non-hématopoïétique de ces souris. Les résultats de notre premier article (Article I, Figure 4) montrent lorsque mis sur un environnement propice à leur différenciation *in vitro*, sur des cellules OP9-Dll1, les ETP thymiques sont aptes à se différencier adéquatement et à générer des lymphocytes T matures. Dans ce même article (Article I, Figure 6), nous avons aussi montré que les OP9-Dll1 n'expriment que de très faibles niveaux de Wnt4.

6.2.3 Hypothèses et discussion

Ceci laisse entrevoir trois possibilités sur le rôle de Wnt4 dans la thymopoïèse:

- 1) La différenciation des progéniteurs ne dépend pas directement de Wnt4. Ceci suggérerait que Wnt4 aurait un rôle indirect lors de la thymopoïèse en agissant sur le stroma thymique plutôt que sur les progéniteurs T.
- 2) De faibles quantités de Wnt4 sont suffisantes pour la thymopoïèse, comme ce qu'on détecte chez les OP9-Dll1. Dans ce cas, il n'est pas possible de conclure si l'effet de Wnt4 s'effectue directement sur les progéniteurs ou indirectement via le stroma qui supporte cette différenciation T.
- 3) Les progéniteurs T *in vitro* produisent une certaine quantité de Wnt4, ce qui suffirait à produire une concentration de Wnt4 adéquate pour la différenciation T. En effet, il a été rapporté qu'*in vivo*, les progéniteurs T produisent une certaine quantité de Wnt4⁴⁰⁰. Ceci est possiblement aussi le cas *in vitro*. Dans un tel contexte, encore, Wnt4 pourrait agir directement sur les progéniteurs ou via le stroma.

Ne pas savoir quel compartiment (hématopoïétique ou non-hématopoïétique) est affecté par la production de Wnt4 limite la capacité d'interprétation de nos résultats. Si Wnt4 agit directement sur les progéniteurs ETP et/ou LSKF+ en induisant leur survie préférentielle, il y aurait une augmentation du nombre de progéniteurs T générés et une augmentation subséquente de la cellularité thymique. Si tel est le cas, les questions que nous devons nous poser devraient être orientées sur la cascade de signalisation induite par Wnt4 directement sur les progéniteurs. Quelle est la nature du récepteur (Fzd, mROR2, RYK ou Crypto) présent sur ces cellules hématopoïétiques qui leur permet de recevoir et de transmettre le signal Wnt4 ? Nous avons analysé la signalisation induite par Wnt4 et avons observé que la cascade de signalisation induite chez les cellules hématopoïétiques est la signalisation non-canonique JNK-dépendante. Ce signal non-canonique agit-il directement sur la survie des progéniteurs ou indirectement via l'inhibition d'un signal non-canonique ?

Mais, Wnt4 peut aussi affecter le stroma, lui permettant de fournir un environnement propice à la survie des progéniteurs. Si tel est le cas, il faudra plutôt concentrer nos efforts sur les effets induits par Wnt4 sur le stroma qui mèneraient à un tel phénotype : pourquoi l'effet de Wnt4 est-il spécifique à certains types de progéniteurs et pas à d'autres, comme les LSKF⁺ ? Wnt4 affecte-t-il le nombre de niches disponibles aux LSKF⁺ dans la moelle et aux ETP dans le thymus ? La conséquence directe d'une signalisation Wnt4 sur le stroma est-elle

aussi l'induction d'un signal non-canonique comme ce que l'on voit sur les progéniteurs, ou plutôt canonique comme certains l'ont rapporté dans la littérature ? Quelle molécule est produite sous l'effet d'un environnement riche en Wnt4 qui lui permet d'induire la survie des progéniteurs ?

6.2.3.1 Wnt4, cycle cellulaire et survie : gènes FoxO

Nos essais de reconstitutions hématopoïétiques montrent que Wnt4 affecte spécifiquement le compartiment LMPP de la moelle. Dans ce compartiment, Wnt4 diminue le pourcentage des cellules en cycle dans cette population, ce qui se traduit, du point de vue transcriptionnel par une augmentation marquée de p57, un inhibiteur du cycle cellulaire. L'augmentation du pourcentage de LMPP par Wnt4 s'effectue en favorisant la survie de ces cellules, qui se traduit par un pourcentage plus faible de cellules LSKF⁺ annexine V⁺ et une augmentation des transcrits de Bcl-x_L. Dans cette population, la signalisation induite par Wnt4 induit un signal non-canonique via la phosphorylation de JNK. L'activation de JNK a été impliquée dans toute une variété de processus incluant le développement embryonnaire, la survie/apoptose et la prolifération, le tout dépendant du contexte cellulaire^{401,402}. Nos résultats montrent que la surexpression de Wnt4 augmente les transcrits des gènes FoxO1 et FoxO4. Chez la drosophile, il a été rapporté que la signalisation JNK favorise la translocation de FoxO dans le noyau et la transcription de ses gènes cibles. De plus, la surexpression de JNK favorise, de façon FoxO-dépendante, l'augmentation de la longévité chez la drosophile⁴⁰³. Chez le *C. elegans*, cette augmentation de la longévité s'effectue par DAF16, l'orthologue de FoxO, qui favorise la résistance au stress oxydatif, aux pathogènes et aux dommages cellulaires. L'induction de la translocation nucléaire des membres de la famille FoxO induit 4 types de réponses (voir Figure 4).

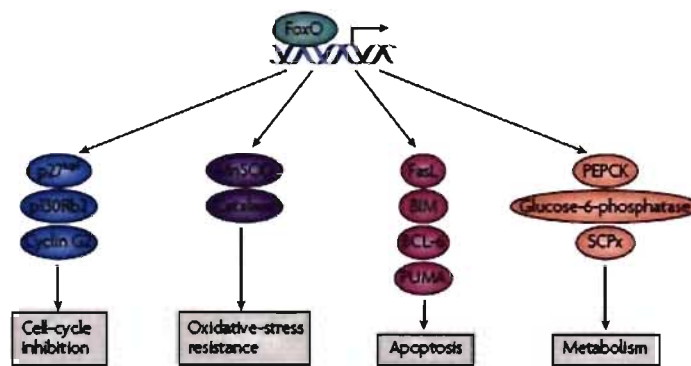


Figure 4: Réponses transcriptionnelles induite par une signalisation FoxO⁴⁰⁴

La résultante nette de l'effet de ces protéines dépend du contexte cellulaire, de modifications post-transcriptionnelles ainsi que d'interactions avec d'autres molécules. Par exemple, il a été rapporté que chez les lymphocytes T matures, FoxO induit l'arrêt du cycle cellulaire et favorise l'apoptose par l'induction de l'expression de BIM⁴⁰⁵. Par contre, certains articles rapportent qu'il est possible de dissocier l'arrêt du cycle cellulaire de l'apoptose, grâce à l'interaction entre FoxO et Sir2, une déacétylase présente chez *C. elegans* dont l'homologue chez l'humain est Sirt1^{406,407}. Parmi les réponses rapportées, il a été démontré que la famille des FoxO induit l'arrêt du cycle cellulaire via l'augmentation de p27 et p130⁴⁰⁸, deux transcrits que l'on voit induits suite à une signalisation Wnt4 sur les cellules hématopoïétiques. Des souris déficientes pour FoxO-1, -3 et -4 montrent un phénotype hématologique intéressant. En effet, ces souris montrent une déplétion de leur CSH causé par une augmentation de leur prolifération, une expansion des cellules myéloïdes et érythroïdes, un blocage au niveau de la transition DN1-DN2 dans les thymocytes, une diminution des LSK (Flt3⁺ et Flt3⁻) ainsi qu'une diminution de la transcription de p130, p21 et p27⁴⁰⁹. Ce phénotype montre plusieurs parallèles avec ce que l'on observe suite à la surexpression de Wnt4. Les quelques différences entre les souris FoxO1/3/4^{-/-} et nos chimères Wnt4⁺ suggèrent qu'il y aurait une spécificité d'effets selon les divers FoxO. En effet, les effets attribuables à la délétion de FoxO3 ne seraient pas observés dans nos chimères car Wnt4 induit la transcription de FoxO1 et FoxO4 mais pas celle de FoxO3. D'ailleurs, il est intéressant de noter que FoxO3 a été impliqué dans la régulation de la différenciation des érythroblastes⁴¹⁰. FoxO1 induit la survie et la maturation des thymocytes⁴¹¹. Ceci suggère une spécificité dans les mécanismes d'actions des divers membres de cette famille.

Il serait intéressant d'évaluer le rôle exact de la régulation de FoxOs par Wnt4. En effet, les gènes FoxO sont actifs dans des situations de stress. Notre modèle, via la transfection rétrovirale et la reconstitution de souris irradiées, pourrait favoriser l'apparition de stress cellulaire chez nos chimères. Est-ce uniquement dans ce contexte que nous voyons un tel phénotype ou serait-il aussi observable en analysant des souris transgéniques pour Wnt4 où l'environnement, moins manipulé, contient moins de signaux de stress? Ce stress cellulaire est-il encore perceptible par les cellules 16 semaines post-reconstitution? Dans nos chimères, le rôle des FoxO est-il surtout d'inhiber le cycle cellulaire sous l'effet de Wnt4 ou bien de favoriser la survie? Wnt4 favorise-t-elle aussi l'induction de *Sirt*, qui favorise l'arrêt du cycle cellulaire et la survie? Pour décortiquer le rôle respectif des FoxO dans le

phénotype de nos souris, il sera intéressant d'évaluer si et comment le signal induit par Wnt4 affecte l'activité, la transcription, la phosphorylation, l'acétylation et la translocation au noyau, des gènes FoxO et d'évaluer si l'induction de cette cascade de signalisation explique les résultats que nous avons obtenus *in vivo*.

6.2.3.1 Wnt4, cycle cellulaire et survie : Flt3

Dans nos chimères, l'arrêt, ou ralentissement, de la progression du cycle cellulaire s'accompagne d'une augmentation de la survie spécifiquement au niveau de la sous-population LSKF⁺. Du point de vue transcriptionnel, nous avons observé l'augmentation des transcrits de Bcl-x_L et de Bcl-2. Nous avons aussi noté une augmentation de 2 fois dans les transcrits de Flt3L sous l'effet d'une surexpression de Wnt4 (Article II, Figure 6). Karlsson et son équipe ont rapporté qu'*in vitro*, la liaison Flt3 avec son ligand, mais pas celle de c-kit avec KitL, induit la transcription de Bcl-2 et Bcl-x_L⁴¹². L'équipe de Jacobsen a généré des souris déficientes pour Flt3L. Ils montrent que le compartiment CSH n'est pas affecté par cette délétion mais que la fraction CLP l'est avec une diminution des progéniteurs précoces de la lignée B (à chacune des étapes de leur développement) et de la lignée T (diminution de 72% des DN1/DN2, rétablissement des pourcentages à l'étape DN3)⁴¹³. Ils montrent aussi que l'incubation de CLP avec Flt3L induit la survie de ces cellules, mais sans en évaluer le mécanisme. Ainsi, la survie spécifique des LSKF⁺, dans notre modèle, pourrait s'effectuer non pas par un effet direct de Wnt4 sur la survie, mais plutôt via la surexpression de la transcription de Flt3L qui favorise la survie des cellules Flt3⁺, dont les LMPP. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les cellules favorisées par Wnt4 sont les cellules plus immatures, Wnt4 semble n'avoir aucun effet sur les cellules matures. Ceci corrèle avec l'expression de Flt3 sur les cellules hématopoïétiques. En effet, les cellules matures n'expriment pas Flt3 et les cellules immatures que l'on voit affectées par la présence de Wnt4 sont généralement celles qui l'expriment (voir Figure 5).

Ainsi, il serait intéressant de voir si, dans un contexte où Flt3L ou son récepteur n'est pas exprimé (souris Flt3^{-/-} ou Flt3L^{-/-}), nous voyons les mêmes phénotypes que ceux induits par la surexpression de Wnt4 dans un environnement normal. Ceci permettrait de voir si Wnt4 affecte les diverses cellules hématopoïétiques de façon dépendante ou non à la production de Flt3L et à la liaison de cette cytokine à son récepteur.

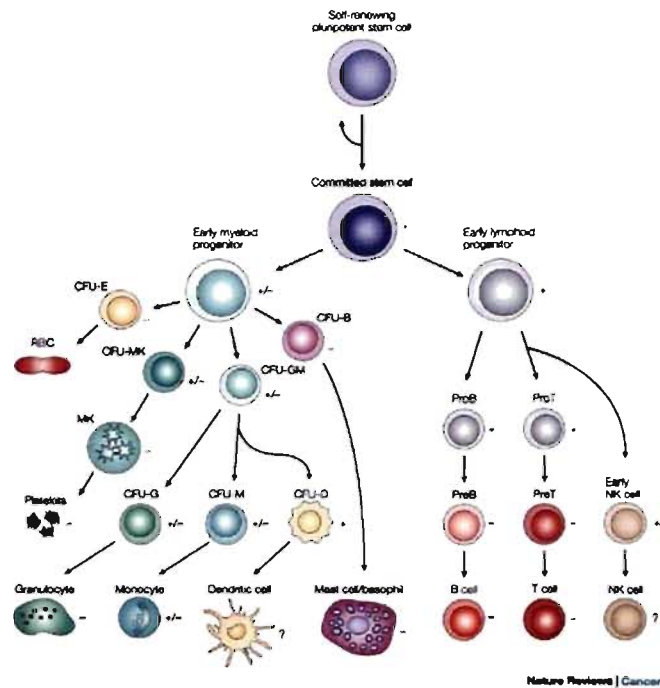


Figure 5 : L'expression de surface *FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3)* de lors des diverses étapes de l'hématopoïèse⁴¹⁴.

La perturbation d'un système à l'homéostasie entraîne plusieurs modifications transcriptionnelles. Décortiquer les voies de signalisation responsables d'un phénotype, surtout si l'on considère toutes les modifications post-transcriptionnelles que peuvent subir les diverses protéines, est une tâche très ardue. Par contre, l'observation que Wnt4 induit l'expression de Flt3L, la corrélation entre l'expression de Flt3 et les cellules ciblées par Wnt4, conjointement à son effet sur l'induction de la transcription des FoxO est extrêmement intéressante. Ceci ouvre des voies passionnantes sur les rôles de Wnt4 *in vivo*.

6.2.3.2 Wnt4 et vieillissement

Suite à l'analyse de nos résultats, il est intéressant de noter que :

- 1) les progéniteurs hématopoïétiques les plus affectés par le vieillissement sont les mêmes que ceux favorisés suite à la surexpression systémique de Wnt4 dans le compartiment hématopoïétique, soit les LSKF+ et les ETP.
- 2) les organes dans lesquels se retrouvent ces cellules sont ceux qui, dans un contexte physiologique, expriment Wnt4. En effet, la MO et le thymus expriment normalement des transcrits de Wnt4 dans la fraction non-hématopoïétique CD45⁻ (voir Annexe 1, Figure 3).

Les niveaux de transcrits de Wnt4 dans ces deux organes varient-ils avec l'âge ? Si tel est le cas, est-ce que ceci pourrait contribuer au vieillissement du système immunitaire ? Quel serait le mécanisme moléculaire qui régirait ce phénomène ? Ce vieillissement s'effectuerait-il directement, en induisant un signal sur les progéniteurs hématopoïétiques ou indirectement, par l'induction de signaux spécifiques sur le stroma ?

Le vieillissement du système immunitaire est un processus complexe, multifactoriel et mène à la détérioration progressive des fonctions immunologiques. Un des premiers signes du vieillissement est un déclin de la production de lymphocytes T par le thymus. Chez la souris âgée (+/- 24 mois), l'involution thymique entraîne une diminution drastique du nombre de lymphocytes produits, soit 0.7% de ce qui est produit chez un nouveau-né⁴¹⁵. Ce déclin de la production de lymphocytes T par le thymus a pour conséquence de diminuer la diversité du répertoire des TCRs présents en périphérie. De plus, ce déclin de la fonction thymique entrave le rétablissement du compartiment T périphérique suite à une immunodéplétion grave, comme suivant une infection au HIV ou un traitement de chimiothérapie. Le vieillissement a été rapporté comme attribuable à un défaut 1) du microenvironnement⁴¹⁶⁻⁴¹⁹, et/ou 2) des progéniteurs médullaires qui migrent au thymus⁴²⁰⁻⁴²².

Quelle qu'en soit la cause, il a été démontré que le vieillissement n'affecte pas le nombre de LSK totaux dans la MO, mais modifie le ratio LSKF⁻/LSKF⁺ en faveur des LSKF⁻. Le vieillissement entraîne une augmentation de la prolifération de ces LSKF⁻, une diminution du potentiel lymphoïde de ces cellules qui corrèle avec une modification du patron d'expression génique qui favorise, avec l'âge, l'induction de transcrits spécifiques à la lignée myéloïde. Cette diminution des LSKF⁺ chez les souris âgées est-elle entièrement dépendante du vieillissement de la cellule LSKF⁺ qui l'a généré ? Ou est-ce plutôt l'environnement (la niche) dans lequel se trouvent ces LSK qui est affecté par le vieillissement ?

1) Wnt4 et stroma

Aucune donnée dans la littérature ne suggère un rôle de Wnt4 dans le stroma médullaire, au niveau de sa capacité à supporter l'hématopoïèse. Des informations intéressantes existent en ce qui a trait aux gènes en aval et en amont de Wnt4 qui pourraient permettre de lui suggérer un rôle dans l'atrophie thymique, du point de vue stromal. En effet, il a été rapporté que la fraction épithéliale du thymus est réduite avec l'âge. En effet, le ratio CD45⁻/CD45⁺

diminue avec l'âge et est associé à une diminution de la taille du thymus, une perturbation de son architecture, une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose chez les cellules épithéliales thymiques^{423,424}.

Chez l'adulte, le contrôle homéostatique des tissus est médié par des cellules souches tissu-spécifiques, comme ce que l'on retrouve dans le système hématopoïétique, autant au niveau des tissus montrant un « *turn-over* » élevé que faible⁴²⁵. Il a récemment été démontré que, dans des conditions d'homéostasie, les progéniteurs épithéliaux continuent à être actifs après la naissance et contribuent constamment à la génération (*turn-over*) de nouvel épithélium⁴²⁶. Plusieurs données montrent que, lors du vieillissement, les tissus voient une diminution de leur capacité à maintenir l'homéostasie ou à retrouver l'état d'homéostasie suite à un stress ou à un traumatisme cellulaire. Ces données suggèrent l'implication potentielle d'un déclin des cellules souches tissu-spécifiques lors du vieillissement. Au niveau du thymus et des organes contenant des cellules épithéliales stratifiées, le régulateur clé pour la prolifération basale des cellules souches est l'induction du facteur de transcription p63⁴²⁷. p63, aussi appelé Trp63, une molécule appartenant à la famille de gènes suppresseurs de tumeurs comprenant p53 et p73⁴²⁸. Ces trois protéines montrent une grande homologie de séquence en ce qui a trait à leur site de liaison à l'ADN mais possèdent des fonctions biologiques différentes⁴²⁹. Chez les souris p63^{-/-}, l'observation initiale a été un amaigrissement très prononcé des cellules de la peau. Grâce à l'étude du développement de l'épithélium thymique, l'équipe de Senoo a montré que p63 (l'isoforme Np63) joue un rôle majeur dans le maintien du potentiel prolifératif des progéniteurs épithéliaux⁴³⁰. Sa délétion entraîne une augmentation de l'apoptose et la clairance des cellules épithéliales thymique en prolifération, et elle est associée au vieillissement du compartiment épithélial du thymus chez la souris⁴³¹. De plus, il a été rapporté que la régénération du thymus adulte, induite suite à un traitement au dexaméthasone ou à une irradiation systémique légère (2 Gray), entraîne une expansion des cellules épithéliales thymiques précoces, phénotypiquement K5+K8+⁴³². Cette expansion entraîne l'augmentation des facteurs de transcription p63, c-myc et TCF3 au niveau du stroma thymique⁴³³. Il a été rapporté que la synthèse de Wnt4 est induite par p63. La délétion de p63 entraîne, chez des kératinocytes, la diminution de l'expression de plusieurs gènes, dont Wnt4⁴³⁴. De plus, la délétion de p63 entraîne une accélération de la sénescence de l'épithélium thymique et une accélération du vieillissement de ce compartiment^{435,436}.

Dans le stroma de thymus normal, la transcription de p63 est induite dans les mêmes proportions que Wnt4, soit de 7.5 fois, par rapport aux ganglions mésentériques normaux (voir Annexe 1, Figure 2). De plus, Wnt4 a été rapportée comme induisant la transcription de FoxN1⁴³⁷. La délétion de ce gène est responsable du phénotype athymique chez les souris⁴³⁸. FoxN1 n'est pas responsable de l'induction du primordium thymique mais plutôt de la différenciation des précurseurs épithéliaux primitifs en cellules épithéliales sous-capsulaires, corticales et médullaires^{439,440}. Dans le compartiment cortical, l'expression de FoxN1 diminue avec l'âge de façon plus marquée que la diminution du nombre de cellules épithéliales corticales⁴⁴¹. Ceci suggère que la diminution de FoxN1 avec l'âge est attribuable surtout à un défaut fonctionnel de la transcription de ce gène plutôt qu'à la diminution du nombre de cellules qui le transcrivent⁴⁴².

Ainsi, nous pourrions envisager l'hypothèse que le phénotype thymique observé chez nos souris serait une augmentation p63-indépendante de Wnt4 dans le thymus qui induirait l'induction de la survie de ces cellules épithéliales (par Bcl-2 et Bcl-x_L) et induirait, ou rétablirait, les niveaux de FoxN1 et permettrait la différenciation des progéniteurs épithéliaux en cellules épithéliales plus différenciées. Ceci aurait comme effet possible d'augmenter la fraction stromale qui, à son tour, pourrait recruter et supporter la différenciation d'un plus grand nombre de progéniteurs T immatures du sang. Pour valider si la surexpression de Wnt4 simule la « régénération » du compartiment épithélial thymique, il serait intéressant de voir si l'expression de Wnt4 est régulée de façon dose-dépendante par p63. De plus, il faudrait évaluer si les cellules épithéliales thymiques CD45⁻ et les cellules FoxN1⁺ dans le stroma thymique sont augmentées de façon dose-dépendante selon l'expression de Wnt4.

2) Wnt4 et cellules hématopoïétiques

Au niveau des progéniteurs hématopoïétiques, Wnt4 agit spécifiquement sur les cellules sensibles à l'effet du vieillissement. En effet, le vieillissement résulte en une diminution de la fraction Flt3⁺ des LSK ainsi qu'une diminution des progéniteurs thymiques. Wnt4 agit en augmentant les pourcentages relatifs des progéniteurs précoces qui entrent dans le thymus (ETP/DN2) et/ou au niveau des progéniteurs présents dans la moelle (LSKF⁺). Comment Wnt4 pourrait contribuer à renverser le processus de vieillissement dans les cellules hématopoïétiques ? Deux nouveaux articles publiés dans *Science* suggèrent que le vieillissement cellulaire s'accompagne d'une augmentation de la signalisation Wnt-β-

caténine dépendante^{443,444}. Dans le premier, les auteurs montrent que la signalisation Wnt β -caténine-dépendante est plus active avec l'âge et entraîne une sénescence accélérée des cellules, dont la peau et les cellules intestinales. Grâce à des souris *klotho*^{-/-} qui représentent un modèle de vieillissement prématuré, ils montrent que la forme soluble de *klotho* dans le sang permettrait d'inhiber ce signal Wnt- β -caténine-dépendant, retardant ainsi le processus de vieillissement⁴⁴⁵. Le deuxième article montre des résultats qui vont dans le même sens, mais dans un contexte de régénération musculaire⁴⁴⁶. Des essais sur des souris parabiosées jumelant des souris âgées avec des souris plus jeunes montrent que cette association diminue la réponse fibrogénique, par une diminution des dépôts de collagène, et augmente la prolifération des progéniteurs myogéniques chez la souris plus âgée. De plus, l'inverse est observé chez les souris plus jeunes. Grâce à des souris TOPGAL, exprimant un gène rapporteur, β -galactosidase, sous le contrôle du promoteur de TCF, les auteurs démontrent que la voie de signalisation canonique de Wnt augmente dans les muscles avec l'âge. Des inhibiteurs de ce signal (sFzd3 ou DKK1) inhibent la réponse fibrogénique produite par le sérum de souris plus âgées et, inversement, la surexpression de *Wnt3a* dans du sérum de souris jeunes l'induit⁴⁴⁷.

L'âge est un processus multifactoriel et aucune molécule à elle seule ne pourrait permettre d'expliquer le phénomène de sénescence induit avec le temps, mais plusieurs molécules peuvent agir de concert pour l'induire ou l'inhiber. *Wnt4* pourrait être un des joueurs contribuant négativement à la sénescence du compartiment hématopoïétique. En effet, suite à un signal induit par *Wnt4*, le compartiment hématopoïétique pourrait être moins sensible à l'effet du vieillissement. Ceci serait induit par une survie accrue, menant à un maintien ou une augmentation du pourcentage des cellules normalement affectées par ce processus *in vivo*. Si un tel phénomène est vrai, ceci permettrait d'expliquer le phénotype modeste des souris *Wnt4*^{-/-}, où les souris meurent trop rapidement pour mettre en lumière un vieillissement prématuré⁴⁴⁸. L'âge induit une augmentation de la signalisation Wnt β -caténine-dépendante et *Wnt4* active, dans le compartiment hématopoïétique, un signal non-canonique JNK-dépendant (article II, Figure 7). Si *Wnt4* empêche ou limite la cinétique du vieillissement du compartiment hématopoïétique, comment ce phénomène pourrait-il se produire ? Pour répondre à cette question, il faut tout d'abord établir deux possibilités, soit que *Wnt4* 1) active la voie non-canonique uniquement ou que 2) active la voie canonique en inhibant la signalisation via la voie canonique. Si la première hypothèse est vraie, *Wnt4* pourrait induire, dans notre contexte de transfections rétrovirales, un signal intracellulaire β -

caténine-indépendant si fort qu'il parviendrait à faire pencher la balance vers le « non-vieillessement » en surpassant le signal de sénescence β -caténine-dépendant induit par l'âge. Par contre, si Wnt4 inhibe la signalisation canonique, cette protéine agirait comme un inhibiteur du signal canonique β -caténine chez les souris, au même titre que Dkk1 ou sFzd3. Dans ce cas, il est intéressant de rappeler que dans un contexte de cellules embryonnaires rénales, Wnt4 a été rapporté comme apte à séquestrer la β -caténine à la membrane cellulaire, empêchant ainsi sa translocation au noyau, inhibant ainsi la transcription TCF-dépendante⁴⁴⁹. Si le même mécanisme se produit aussi dans un contexte de cellules hématopoïétiques, ceci suggère que la deuxième hypothèse (l'inhibition de la voie canonique par Wnt4) serait favorisée.

Nos résultats montrent que Wnt4 a un effet au niveau des cellules immunitaires les plus affectées par le vieillissement. Plusieurs expériences doivent maintenant être effectuées pour tenter de mieux caractériser les divers mécanismes enclenchés par une signalisation Wnt4, ainsi que les effets spécifiques que cela engendre à la fois sur les cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques.

6.3 Perspectives futures

Toutes les expériences faites sur Wnt4 montrent que, chez la souris et dans nos conditions expérimentales, aucun effet délétère dans la différenciation des cellules hématopoïétiques n'est observé suite à sa surexpression. Par contre, plusieurs paramètres resteront à être évalués avant de considérer l'usage de cette protéine à des fins thérapeutiques. En effet, nous commençons à peine, grâce aux travaux présentés dans le contexte de cette thèse, à défricher les rôles induits par une surexpression de Wnt4 et allons devoir nous pencher sur plusieurs points :

- 1) *L'induction de la signalisation Wnt4 se fait-elle exclusivement en activant une cascade de signalisation non-canonique ou plutôt conjointement avec une inhibition de la voie canonique ?*

Nous avons observé que l'activation de la cascade de signalisation par Wnt4 se traduit, du moins au niveau du foie fœtal, non pas par une augmentation du pool de β -caténine mais plutôt par une augmentation de la proportion de JNK phosphorylé. Par contre, de nouveaux résultats suggèrent que la voie canonique, par TCF-1, peut être activée en l'absence de β -caténine⁴⁵⁰. Il sera donc crucial d'évaluer l'activation de TCF-1 suite à une signalisation Wnt4. Si l'activité transcriptionnelle de TCF-1 n'est pas modifiée, cela suggère que Wnt4 n'active que la voie non-canonique, sans interférer avec la voie canonique. Si elle est augmentée, cela impliquera que Wnt4 active à la fois la voie non-canonique et canonique « TCF-1-dépendante ». Par contre, si elle est diminuée, cela suggère que Wnt4 active la voie non-canonique conjointement à l'inhibition active de la voie canonique. Les implications de cette dernière possibilité sont d'un intérêt capital surtout à la lumière des articles suggérant que l'induction de la signalisation via la voie canonique aurait un rôle à jouer au niveau du vieillissement^{451,452}. Outre l'intérêt scientifique, avec la pénurie d'informations disponibles concernant la voie non canonique dans la thymopoïèse et l'hématopoïèse, les implications de nos résultats seraient la possibilité de moduler la signalisation à la fois par la voie canonique et non-canonique.

- 2) *Il y a-t-il une différence entre l'induction d'un signal autocrine de Wnt4 par rapport à une signalisation paracrine ?*

Certains résultats préliminaires que nous avons obtenus suggèrent que les cellules produisant Wnt4, recevant à la fois un signal autocrine et paracrine, ne réagissent pas de façon identique à celles ne recevant qu'un signal paracrine. Ceci est observé autant du point de vue de leur développement, où par exemple au niveau des érythrocytes dont la génération était régulée négativement par l'expression autocrine de Wnt4, que du point de vue transcriptionnel, où l'induction de quelques gènes différaient entre la population de cellules Wnt4⁺ et Wnt4⁻. Ceci est dû soit à un effet différent entre la signalisation paracrine ou autocrine de Wnt4, soit à notre stratégie de surexpression. En effet, la transduction rétrovirale fait en sorte que, inévitablement, les cellules infectées sont intrinsèquement différentes des cellules non-infectées à cause, entre autres, de leur prolifération. Ces divergences d'effets que nous avons observés sont-elles attribuables au fait que la nature même des cellules aptes à être infectées est différente ou plutôt seraient-elles attribuables à une différence fonctionnelle causée par la production versus la réception d'un signal Wnt4. Ce facteur est crucial car il sera déterminant dans l'élaboration d'une stratégie à des fins thérapeutiques.

- 3) *Il y a-t-il une concentration locale de Wnt4 qui est optimale pour maximiser l'effet positif sur le développement hématopoïétique ?*

Dans certaines populations étudiées, dont les lymphocytes B, nous avons noté que les phénotypes corrèlent avec la quantité de Wnt4. En effet, les souris ayant le plus haut pourcentage de cellules productrices de Wnt4, et donc une concentration locale de Wnt4 dans la moelle la plus élevée, présentaient le phénotype B le plus marqué. Ceci suggère que la concentration de Wnt4 pourrait potentiellement modifier, de façon positive ou négative, le phénotype que l'on observe. Ceci serait similaire à d'autres molécules, comme IL-7⁴⁵³ ou HoxB4⁴⁵⁴, qui montrent un niveau seuil en deçà et au delà duquel les effets favorables induits sont modifiés, voir même inhibés. Par contre, cet effet de dose n'a jamais été rapporté dans le cas de Wnt. Il nous faudra évaluer quelle concentration de Wnt4 devrait être atteinte pour générer le plus d'effets positifs sur le développement hématopoïétique mais sans induire d'effets néfastes. En effet, étant donné que l'érythropoïèse est réduite sous l'effet de Wnt4, une concentration locale trop élevée dans la moelle pourrait être délétère et mener à de l'anémie. Ainsi, il serait nécessaire d'évaluer les effets générés par Wnt4 à diverses doses, via la génération de souris

transgéniques où Wnt4 serait mis sous le contrôle de divers promoteurs : fort, faible, ubiquitaire ou ayant une expression plus ciblée dans le thymus et/ou la moelle.

- 4) *Le système hématopoïétique, dont plusieurs axes de différenciation sont amplifiés sous l'effet de Wnt4, est-il fonctionnel ?*

Autant *in vitro*, pour la génération de lymphocytes T matures à partir de progéniteurs ganglionnaires, qu'*in vivo* suite à la reconstitution à long terme de chimères, nous n'avons évalué que les phénotypes de différenciation de chacune des sous-populations générées sous l'effet d'une surexpression de Wnt4. Il serait capital, lors d'une étape subséquente, d'évaluer si les cellules générées sont fonctionnelles. En effet, accroître la génération d'une population cellulaire n'implique pas que le système immunitaire en est avantagé. Par exemple, la surexpression de β -caténine constitutivement active a été rapportée comme induisant une augmentation de la population de CSH dans la moelle. Par contre, ces cellules ne sont pas fonctionnelles et incapables de reconstituer un hôte^{455,456}. Ainsi, nous allons devoir évaluer si les cellules produites dans un environnement enrichi en Wnt4 génèrent une réponse immunitaire fonctionnelle, autant au niveau de l'immunité innée qu'acquise. Quoique leur nombre en périphérie ne soit pas modifié chez nos chimères, il sera nécessaire de voir si ces cellules, à maturité, subissent une modification de leur capacité à générer une réponse immunologique primaire et secondaire similaire, accrue ou moindre sous l'effet d'une surexpression de Wnt4.

- 5) *Les cellules dont la différenciation n'est pas induite par Wnt4 (progéniteurs mégakaryocytaires/érythrocytaires) sont-ils affectés négativement par sa surexpression ?*

Wnt4 favorise la différenciation de l'axe LMPP de la différenciation immunitaire à partir des CSH. Cela s'effectue-t-il au détriment de la différenciation mégakaryocytaire/érythrocytaire? Dans notre modèle, nous avons observé que les pourcentages de progéniteurs GMP étaient semblables mais la population érythroblastique CD71⁺ était diminuée par rapport aux contrôles. Par contre, les cellules matures, dans toutes les populations analysées étaient identiques entre les deux groupes. Nos souris montraient, dans les organes hématopoïétiques, une proportion de cellules Wnt4⁺ de 10 à 15% seulement. Si une concentration plus élevée de Wnt4 entraîne l'amplification de l'axe LMPP au détriment de l'axe MeK, cela nous

empêcherait de considérer Wnt4 comme globalement bénéfique pour le système. Nous devons valider cette hypothèse car, si tel est le cas, cela pourrait avoir des conséquences extrêmement néfastes à l'homéostasie du système menant, peut-être à l'anémie et à une thrombopénie.

- 6) *La voie de signalisation et les gènes dont la transcription est induite par Wnt4 est-elle la même dans toutes les cellules affectées par ce signal ?*

Nous avons analysé la cascade de signalisation induite par Wnt4 au niveau de cellules de foie fœtal infectées par un vecteur rétroviral. Sachant qu'il existe certaines différences au niveau de l'hématopoïèse fœtal et adulte^{457,458}, il sera nécessaire de confirmer si cette cascade est aussi celle induite lors de l'hématopoïèse adulte.

De plus, Wnt4 étant une protéine sécrétée, il sera essentiel de valider si elle agit directement sur les progéniteurs ou indirectement, suite à l'induction d'un signal au niveau du stroma. Ceci est un point qui va nécessiter une attention particulière car il déterminera plusieurs conditions lors de la transposition éventuelle de ce traitement à des fins thérapeutiques chez l'humain. De plus, le profil de transcription génique induit sous l'effet (direct ou indirect) de Wnt4 a été évalué au niveau d'une population de cellules Lin-Scal⁺c-kit⁺. Cette population, quoiqu'enrichie en CSH, demeure très hétérogène. Pour tenter de mieux cerner les effets directs de Wnt4 sur les sous-populations affectées par sa surexpression, un criblage global des gènes sur- ou sous-exprimés sur chacune des populations affectées par Wnt4 s'avère crucial.

- 7) *Les effets de Wnt4 sont-ils dus à une production locale constante ou peuvent-ils être générés via une incubation ex vivo des CSH avec Wnt4?*

Il sera aussi indispensable d'évaluer si l'induction de la survie de la population médullaire LSKF⁺ dépend d'une exposition continue à Wnt4 ou si une incubation ponctuelle, *ex vivo*, avec Wnt4 entraîne l'induction du même phénotype à long terme. Ceci est un point important car, comme il a été rapporté dans la littérature, l'induction de la survie cellulaire (ou la dérégulation de l'induction de l'apoptose) est un paramètre ayant une incidence très néfaste sur la génération de cancers^{459,460}. Sachant que Wnt4 cause une augmentation de la survie à une étape si précoce de la différenciation, ceci pourrait entraîner la génération de leucémies. Par contre, aucun cas n'a été détecté chez les souris que nous avons évaluées.

8) *La surexpression de Wnt4 affecte-t-elle uniquement les LMPP ou plutôt les CSH qui les génèrent ?*

Il nous faudra aussi évaluer si Wnt4 agit directement sur la population LSKF⁺ ou si elle favorise leur génération à partir de leurs cellules précurseurs, les CSH. Ceci implique d'évaluer si Wnt4 agit en modifiant la nature/fonctionnalité des CSH ou si elle modifie uniquement le potentiel de survie des LSKF⁺ directement. Cette question est aussi importante à évaluer au niveau des progéniteurs des LSKF⁺ : la surexpression de Wnt4 favorise-t-elle chacune des sous-populations de façon indépendante ou l'augmentation de ces populations résulte-t-elle d'un effet uniquement sur les LSKF⁺ ? Si Wnt4 favorise la survie et mène à l'expansion spécifique de chacune des sous-populations indépendantes, cela devient passionnant d'un point de vue thérapeutique. En effet, ceci pourrait suggérer la possibilité d'élaborer des stratégies excessivement ciblées, adaptables sur mesure aux patients, selon les déficiences cellulaires spécifiques qu'ils pourraient présenter.

6.4 Perspectives thérapeutiques

L'importance des lymphocytes dans l'éradication du cancer est de plus en plus reconnue. De nombreux articles l'ont démontré de façon fort éloquente^{461,462}. Il a clairement été établi que les lymphocytes T sont responsables i) de l'élimination des cellules cancéreuses via la reconnaissance d'antigènes de surface spécifiques par les cellules T ainsi que ii) l'élimination de cellules transformées, qui apparaissent continuellement dans l'organisme. L'immunodéficience augmente les risques de développer des cancers⁴⁶³. En effet, Shankaran a démontré récemment qu'il y avait une augmentation de l'incidence de tumeurs spontanées et induites chimiquement chez des souris immunodéficientes⁴⁶⁴. Pour des individus atteints de maladies associées avec une immunodéficience, comme le cancer, le SIDA et l'immunosénescence induite par le vieillissement, l'importance de trouver des moyens de renforcer leur système immunitaire devient capital. Ceci pourrait s'effectuer via le transfert de cellules immunitaires pour contrecarrer la diminution de la production *in situ* de lymphocytes T induite par l'involution thymique.

Ainsi, nos travaux axés sur Wnt4 et sa capacité à induire, *in vivo*, la génération d'un plus grand nombre de progéniteurs LMPP se traduisant par une thymopoïèse accrue, peut s'avérer avoir un impact important dans un tel contexte. En effet, une stratégie *ex vivo* impliquant l'induction d'un signal Wnt4 sur certaines populations de cellules immunitaires pourrait

résulter en un traitement intéressant pour l'hypoplasie thymique induite par des maladies ou le vieillissement⁴⁶⁵, et pour améliorer la résultante clinique des patients atteints de cancers.

7. Conclusion

Nos travaux ont porté sur le rôle de Wnt4 dans le système immunitaire chez la souris. Nous avons démontré que la surexpression de cette protéine, via l'induction d'un signal non-canonique, favorise la survie d'une population de LMPP qui se traduit par une augmentation de tous les axes de différenciations cellulaires, sauf celui de la différenciation mégakaryo/érythrocytaire. Le phénotype le plus marquant est une augmentation de la thymopoïèse, via l'augmentation de la proportion des progéniteurs les plus immatures dans le thymus.

Comme mentionné dans la section précédente, cette découverte pourrait avoir des implications cliniques extrêmement intéressantes. Par contre, nous sommes encore loin de l'élaboration de stratégies cliniques chez l'humain. En effet, plusieurs paramètres restent à évaluer avant la transposition potentielle de nos résultats chez l'humain. De façon intéressante, l'alignement de la séquence protéique de Wnt4 révèle un très haut degré de conservation entre l'humain et la souris, avec une séquence identique à 98.9% et similaire à 99.7%. Ces homologues ne diffèrent qu'au niveau de quatre résidus d'acides aminés, regroupés près de la région C-terminale⁴⁶⁶. Par contre, l'expression des marqueurs de surface des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques diffèrent considérablement entre la souris et l'humain, et la contrepartie humaine des LMPP murins n'a pas encore été identifiée. De plus, un des marqueurs clé de nos expériences, soit Flt3, n'a pas le même patron de distribution entre ces deux organismes. Chez l'humain, Flt3 est exprimé sur les CSH et cette différence de distribution suggère que le rôle de la signalisation via ce récepteur dans le développement hématopoïétique pourrait avoir des conséquences bien différentes. Chez l'humain, une mutation de Flt3 est une des causes les plus fréquentes du développement de leucémies myéloïdes aiguës. Nous avons noté que la majorité des cellules cibles favorisées par l'expression de Wnt4 expriment Flt3. Ceci suggère que ce récepteur pourrait participer, de façon indirecte, à l'induction des signaux de Wnt4.

Ainsi, pour considérer l'utilisation de cette protéine dans le contexte de thérapie chez l'humain, nous devons être extrêmement prudents. Par contre, les effets bénéfiques que nous observons dans notre modèle murin sont extrêmement positifs et permettent d'entrevoir avec optimisme l'utilisation de cette famille de protéines, à signalisation non-canonique, dans le cadre de plusieurs applications humaines intéressantes.

Now this is not the end.

It is not even the beginning of the end.

But it is, perhaps, the end of the beginning...

Sir Winston Churchill
(1874 - 1965)

Reference List

1. Morrison, S. J., Uchida, N. & Weissman, I. L. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 35-71 (1995).
2. Ogawa, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* **81**, 2844-2853 (1993).
3. Zon, L. I. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* **86**, 2876-2891 (1995).
4. Laird, D. J., De Tomaso, A. W., Cooper, M. D. & Weissman, I. L. 50 million years of chordate evolution: seeking the origins of adaptive immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 6924-6926 (2000).
5. Shintani, S. *et al.* Do lampreys have lymphocytes? The Spi evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 7417-7422 (2000).
6. Iwasaki, H. & Akashi, K. Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene* **26**, 6687-6696 (0 AD).
7. Sharpless, N. E. & DePinho, R. A. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 703-713 (2007).
8. Shortman, K. & Liu, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 151-161 (2002).
9. Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. & Ezekowitz, R. A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-1318 (1999).
10. Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216 (2002).
11. Padlan, E. A. Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* **31**, 169-217 (1994).
12. Garcia, K. C., Teyton, L. & Wilson, I. A. Structural basis of T cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 369-397 (1999).
13. Fearon, D. T. & Locksley, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**, 50-53 (1996).
14. ASTER, R. H. & JANDL, J. H. PLATELET SEQUESTRATION IN MAN. I. METHODS. *J. Clin. Invest* **43**, 843-855 (1964).
15. Furne, J. K., Springfield, J. R., Ho, S. B. & Levitt, M. D. Simplification of the end-alveolar carbon monoxide technique to assess erythrocyte survival. *J. Lab Clin. Med.* **142**, 52-57 (2003).
16. Wright, D. E., Wagers, A. J., Gulati, A. P., Johnson, F. L. & Weissman, I. L. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* **294**, 1933-1936 (2001).

17. Tetley, T. D. Macrophages and the pathogenesis of COPD. *Chest* **121**, 156S-159S (2002).
18. Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Whitney, A. R. & DeLeo, F. R. Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 1408-1418 (2005).
19. Rathmell, J. C. & Thompson, C. B. Pathways of Apoptosis in Lymphocyte Development, Homeostasis, and Disease. *Cell* **109**, S97-S107 (2002).
20. Sprent, J. Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol* **5**, 433-438 (1993).
21. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197 (2000).
22. Kondo, M., Weissman, I. L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-672 (1997).
23. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197 (2000).
24. Kondo, M., Weissman, I. L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-672 (1997).
25. Shizuru, J. A., Negrin, R. S. & Weissman, I. L. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu. Rev. Med.* **56**, 509-538 (2005).
26. Morrison, S. J. & Weissman, I. L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. **1**, 661-673 (1994).
27. Adolfsson, J. *et al.* Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. **15**, 659-669 (2001).
28. Adolfsson, J. *et al.* Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306 (2005).
29. Yoshida, T., Ng, S. Y., Zuniga-Pflucker, J. C. & Georgopoulos, K. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol.* **7**, 382-391 (2006).
30. Lai, A. Y. & Kondo, M. Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J. Exp. Med.* **203**, 1867-1873 (2006).

31. Yang, L. *et al.* Identification of Lin-Sca1+kit+CD34+Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* **105**, 2717-2723 (2005).
32. Sitnicka, E. *et al.* Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity*. **17**, 463-472 (2002).
33. Mackarehtschian, K. *et al.* Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* **3**, 147-161 (1995).
34. McKenna, H. J. *et al.* Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95**, 3489-3497 (2000).
35. Adolfsson, J. *et al.* Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)-c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. **15**, 659-669 (2001).
36. Adolfsson, J. *et al.* Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)-c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. **15**, 659-669 (2001).
37. Adolfsson, J. *et al.* Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306 (2005).
38. Lai, A. Y. & Kondo, M. Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J. Exp. Med.* **203**, 1867-1873 (2006).
39. Yoshida, T., Ng, S. Y., Zuniga-Pflucker, J. C. & Georgopoulos, K. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol.* **7**, 382-391 (2006).
40. Mansson, R. *et al.* Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity*. **26**, 407-419 (2007).
41. Adolfsson, J. *et al.* Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306 (2005).
42. Lai, A. Y. & Kondo, M. Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J. Exp. Med.* **203**, 1867-1873 (2006).
43. Yoshida, T., Ng, S. Y., Zuniga-Pflucker, J. C. & Georgopoulos, K. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol.* **7**, 382-391 (2006).

44. Mansson, R. *et al.* Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity*. **26**, 407-419 (2007).
45. Mansson, R. *et al.* Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity*. **26**, 407-419 (2007).
46. Iwasaki, H. & Akashi, K. Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene* **26**, 6687-6696 (0 AD).
47. Konstantinov, I. E. In search of Alexander A. Maximow: the man behind the unitarian theory of hematopoiesis. *Perspect. Biol. Med.* **43**, 269-276 (2000).
48. Potten, C. S. & Loeffler, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**, 1001-1020 (1990).
49. Dick, J. E., Magli, M. C., Huszar, D., Phillips, R. A. & Bernstein, A. Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hemopoietic system of W/W^v mice. *Cell* **42**, 71-79 (1985).
50. Keller, G., Paige, C., Gilboa, E. & Wagner, E. F. Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoietic precursors. *Nature* **318**, 149-154 (1985).
51. Williams, D. A., Lemischka, I. R., Nathan, D. G. & Mulligan, R. C. Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature* **310**, 476-480 (1984).
52. Lemischka, I. R., Raullet, D. H. & Mulligan, R. C. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* **45**, 917-927 (1986).
53. Keller, G. & Snodgrass, R. Life span of multipotential hematopoietic stem cells in vivo. *J. Exp. Med.* **171**, 1407-1418 (1990).
54. Keller, G. & Snodgrass, R. Life span of multipotential hematopoietic stem cells in vivo. *J. Exp. Med.* **171**, 1407-1418 (1990).
55. Till, J. E. & McCulloch, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* **14**, 213-222 (1961).
56. McCulloch, E. A. & Till, J. E. Perspectives on the properties of stem cells. *Nat. Med.* **11**, 1026-1028 (2005).
57. Till, J. E. & McCulloch, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* **14**, 213-222 (1961).
58. BECKER, A. J., McCulloch, E. A. & Till, J. E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**, 452-454 (1963).

59. Siminovitch, L., McCulloch, E. A. & Till, J. E. THE DISTRIBUTION OF COLONY-FORMING CELLS AMONG SPLEEN COLONIES. *J. Cell Physiol* **62**, 327-336 (1963).
60. Siminovitch, L., Till, J. E. & McCulloch, E. A. DECLINE IN COLONY-FORMING ABILITY OF MARROW CELLS SUBJECTED TO SERIAL TRANSPLANTATION INTO IRRADIATED MICE. *J. Cell Physiol* **64**, 23-31 (1964).
61. Siminovitch, L., McCulloch, E. A. & Till, J. E. THE DISTRIBUTION OF COLONY-FORMING CELLS AMONG SPLEEN COLONIES. *J. Cell Physiol* **62**, 327-336 (1963).
62. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7-25 (1978).
63. Magli, M. C., Iscove, N. N. & Odartchenko, N. Transient nature of early haematopoietic spleen colonies. *Nature* **295**, 527-529 (1982).
64. Pardee, A. B. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**, 603-608 (1989).
65. Lansdorp, P. M. Intrinsic control of stem cell fate. *Stem Cells* **15 Suppl 1**, 223-225 (1997).
66. Brummendorf, T. H., Dragowska, W., Zijlmans, J. M. J. M., Thornbury, G. & Lansdorp, P. M. Asymmetric cell divisions sustain long-term hematopoiesis from single-sorted human fetal liver cells. *J. Exp. Med.* **188**, 1117-1124 (1998).
67. Ema, H. & Nakauchi, H. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood* **95**, 2284-2288 (2000).
68. Suda, T., Suda, J. & Ogawa, M. Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**, 2520-2524 (1984).
69. Takano, H., Ema, H., Sudo, K. & Nakauchi, H. Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. *J. Exp. Med.* **199**, 295-302 (2004).
70. Morrison, S. J. & Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**, 1068-1074 (2006).
71. Domen, J. & Weissman, I. L. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol. Med. Today* **5**, 201-208 (1999).
72. Wagers, A. J., Christensen, J. L. & Weissman, I. L. Cell fate determination from stem cells. *Gene Ther.* **9**, 606-612 (2002).
73. Domen, J. & Weissman, I. L. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol. Med. Today* **5**, 201-208 (1999).

74. Domen, J. & Weissman, I. L. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol. Med. Today* **5**, 201-208 (1999).
75. Wagers, A. J., Christensen, J. L. & Weissman, I. L. Cell fate determination from stem cells. *Gene Ther.* **9**, 606-612 (2002).
76. Larsson, J. & Karlsson, S. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* **24**, 5676-5692 (2005).
77. Abkowitz, J. L., Catlin, S. N. & Guttorp, P. Evidence that hematopoiesis may be a stochastic process in vivo. *Nat Med.* **2**, 190-197 (1996).
78. Morrison, S. J. & Weissman, I. L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity.* **1**, 661-673 (1994).
79. Kondo, M. *et al.* Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* **407**, 383-386 (2000).
80. Bittner, J. J. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* **84**(2172), 162. 8-14-1936.
Ref Type: Generic
81. Korteweg, R. On the manner in which the disposition to carcinoma of the mammary gland is inherited in mice. *Genetica* **18**, 350-371. 1-1-1936.
Ref Type: Generic
82. Lane, P. W. *Mouse Newsletter* **36**, 40. 1-1-1967.
Ref Type: Generic
83. Thomas, K. R., Musci, T. S., Neumann, P. E. & Capecchi, M. R. Swaying is a mutant allele of the proto-oncogene Wnt-1. *Cell* **67**, 969-976 (1991).
84. Tsukamoto, A. S., Grosschedl, R., Guzman, R. C., Parslow, T. & Varmus, H. E. Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell* **55**, 619-625 (1988).
85. <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>.
Ref Type: Generic
86. Sharma, R. P. & Chopra, V. L. Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **48**, 461-465 (1976).
87. Nusse, R. & Varmus, H. E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* **31**, 99-109 (1982).
88. van, O. A. & Nusse, R. Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene int-1; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact. *Cell* **39**, 233-240 (1984).

89. Cabrera, C. V., Alonso, M. C., Johnston, P., Phillips, R. G. & Lawrence, P. A. Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene. *Cell* **50**, 659-663 (1987).
90. Rijsewijk, F. *et al.* The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* **50**, 649-657 (1987).
91. Sidow, A. Diversification of the Wnt gene family on the ancestral lineage of vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 5098-5102 (1992).
92. Miller, J. R. The Wnts. *Genome Biol.* **3**, REVIEWS3001 (2002).
93. Tanaka, K., Kitagawa, Y. & Kadowaki, T. Drosophila segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **277**, 12816-12823 (2002).
94. Bijlmakers, M. J. & Marsh, M. The on-off story of protein palmitoylation. *Trends in Cell Biology* **13**, 32-42 (2003).
95. Pepinsky, R. B. *et al.* Identification of a Palmitic Acid-modified Form of Human Sonic hedgehog. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 14037-14045 (1998).
96. Willert, K. *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448-452 (2003).
97. Zhai, L., Chaturvedi, D. & Cumberledge, S. Drosophila wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine. *J. Biol. Chem.* **279**, 33220-33227 (2004).
98. Willert, K. *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448-452 (2003).
99. Willert, K. *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448-452 (2003).
100. Mason, J. O., Kitajewski, J. & Varmus, H. E. Mutational analysis of mouse Wnt-1 identifies two temperature-sensitive alleles and attributes of Wnt-1 protein essential for transformation of a mammary cell line. *Mol. Biol. Cell* **3**, 521-533 (1992).
101. Takada, R. *et al.* Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev. Cell* **11**, 791-801 (2006).
102. Neumann, C. J. & Cohen, S. M. Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the Drosophila wing. *Development* **124**, 871-880 (1997).
103. Gurdon, J. B. & Bourillot, P. Y. Morphogen gradient interpretation. *Nature* **413**, 797-803 (2001).
104. Affolter, M. & Basler, K. The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* **8**, 663-674 (2007).

105. Zecca, M., Basler, K. & Struhl, G. Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-844 (1996).
106. Kiecker, C. & Niehrs, C. A morphogen gradient of Wnt/[beta]-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development* **128**, 4189-4201 (2001).
107. Sancho, E., Batlle, E. & Clevers, H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 695-723 (2004).
108. Vinson, C. R., Conover, S. & Adler, P. N. A *Drosophila* tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature* **338**, 263-264 (1989).
109. Chan, S. D. *et al.* Two homologs of the *Drosophila* polarity gene frizzled (fz) are widely expressed in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* **267**, 25202-25207 (1992).
110. Strutt, D. Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates. *Development* **130**, 4501-4513 (2003).
111. Huang, H. C. & Klein, P. S. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol.* **5**, 234 (2004).
112. Hsieh, J. C. Specificity of WNT-receptor interactions. *Front Biosci.* **9**, 1333-1338 (2004).
113. Hsieh, J. C., Rattner, A., Smallwood, P. M. & Nathans, J. Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 3546-3551 (1999).
114. Wu, C. H. & Nusse, R. Ligand receptor interactions in the Wnt signaling pathway in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **277**, 41762-41769 (2002).
115. Chen, C. M., Strapps, W., Tomlinson, A. & Struhl, G. Evidence that the cysteine-rich domain of *Drosophila* Frizzled family receptors is dispensable for transducing Wingless. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 15961-15966 (2004).
116. Povelones, M. & Nusse, R. The role of the cysteine-rich domain of Frizzled in Wingless-Armadillo signaling. *EMBO J.* **24**, 3493-3503 (2005).
117. Wang, H. Y., Liu, T. & Malbon, C. C. Structure-function analysis of Frizzleds. *Cell Signal.* **18**, 934-941 (2006).
118. He, X., Semenov, M., Tamai, K. & Zeng, X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* **131**, 1663-1677 (2004).
119. He, X., Semenov, M., Tamai, K. & Zeng, X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* **131**, 1663-1677 (2004).

120. Semenov, M. V. *et al.* Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol.* **11**, 951-961 (2001).
121. Liu, G., Bafico, A., Harris, V. K. & Aaronson, S. A. A novel mechanism for Wnt activation of canonical signaling through the LRP6 receptor. *Mol. Cell Biol.* **23**, 5825-5835 (2003).
122. Tamai, K. *et al.* LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**, 530-535 (2000).
123. Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J. & Skarnes, W. C. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* **407**, 535-538 (2000).
124. Kelly, O. G., Pinson, K. I. & Skarnes, W. C. The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development* **131**, 2803-2815 (2004).
125. He, X., Semenov, M., Tamai, K. & Zeng, X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* **131**, 1663-1677 (2004).
126. Zeng, X. *et al.* A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* **438**, 873-877 (2005).
127. Davidson, G. *et al.* Casein kinase 1 [gamma] couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* **438**, 867-872 (2005).
128. Oishi, I. *et al.* The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes to Cells* **8**, 645-654 (2003).
129. Lu, W., Yamamoto, V., Ortega, B. & Baltimore, D. Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* **119**, 97-108 (2004).
130. Halford, M. M. *et al.* Ryk-deficient mice exhibit craniofacial defects associated with perturbed Eph receptor crosstalk. *Nat Genet* **25**, 414-418 (2000).
131. Yamaguchi, T. P., Bradley, A., McMahon, A. P. & Jones, S. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* **126**, 1211-1223 (1999).
132. Yoda, A., Oishi, I. & Minami, Y. Expression and function of the Ror-family receptor tyrosine kinases during development: lessons from genetic analyses of nematodes, mice, and humans. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **23**, 1-15 (2003).
133. Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L. & Moon, R. T. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2625-2634 (1995).
134. Wong, G. T., Gavin, B. J. & McMahon, A. P. Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol. Cell Biol.* **14**, 6278-6286 (1994).

135. Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L. & Moon, R. T. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2625-2634 (1995).
136. Moon, R. T. *et al.* Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Development* **119**, 97-111 (1993).
137. Moon, R. T., DeMarais, A. & Olson, D. J. Responses to Wnt signals in vertebrate embryos may involve changes in cell adhesion and cell movement. *J Cell Sci Suppl* **17**, 183-188 (1993).
138. Torres, M. A. *et al.* Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol.* **133**, 1123-1137 (1996).
139. Torres, M. A. *et al.* Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol.* **133**, 1123-1137 (1996).
140. He, X. *et al.* A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* **275**, 1652-1654 (1997).
141. Itoh, K., Jacob, J. & Sokol, Y. A role for *Xenopus* Frizzled 8 in dorsal development. *Mech. Dev.* **74**, 145-157 (1998).
142. Torres, M. A. *et al.* Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol.* **133**, 1123-1137 (1996).
143. Mikels, A. J. & Nusse, R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* **4**, e115 (2006).
144. Guder, C. *et al.* The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene* **25**, 7450-7460 (2006).
145. Segditsas, S. & Tomlinson, I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* **25**, 7531-7537 (2006).
146. Ozawa, M., Baribault, H. & Kemler, R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* **8**, 1711-1717 (1989).
147. Funayama, N., Fagotto, F., McCrea, P. & Gumbiner, B. M. Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta-catenin: evidence for intracellular signaling. *J Cell Biol.* **128**, 959-968 (1995).
148. Karnovsky, A. & Klymkowsky, M. W. Anterior axis duplication in *Xenopus* induced by the over-expression of the cadherin-binding protein plakoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **92**, 4522-4526 (1995).

149. Heasman, J. *et al.* Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* **79**, 791-803 (1994).
150. Haegel, H. *et al.* Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* **121**, 3529-3537 (1995).
151. Peifer, M., McCrea, P. D., Green, K. J., Wieschaus, E. & Gumbiner, B. M. The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the *Drosophila* segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol.* **118**, 681-691 (1992).
152. McCrea, P. D., Turck, C. W. & Gumbiner, B. A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* **254**, 1359-1361 (1991).
153. Papkoff, J. Regulation of complexed and free catenin pools by distinct mechanisms. Differential effects of Wnt-1 and v-Src. *J Biol. Chem.* **272**, 4536-4543 (1997).
154. Behrens, J. *et al.* Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* **280**, 596-599 (1998).
155. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* **16**, 3797-3804 (1997).
156. Roose, J. *et al.* The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* **395**, 608-612 (1998).
157. Zeng, X. *et al.* A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* **438**, 873-877 (2005).
158. Bryja, V., Schulte, G., Rawal, N., Grahn, A. & Arenas, E. Wnt-5a induces Dishevelled phosphorylation and dopaminergic differentiation via a CK1-dependent mechanism. *J Cell Sci* **120**, 586-595 (2007).
159. Bryja, V., Gradl, D., Schambony, A., Arenas, E. & Schulte, G. Beta-arrestin is a necessary component of Wnt/beta-catenin signaling in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **104**, 6690-6695 (2007).
160. Stadel, R., Hoffmann, R. & Basler, K. Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr. Biol.* **16**, R378-R385 (2006).
161. Huber, O. *et al.* Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech. Dev.* **59**, 3-10 (1996).
162. Stadel, R., Hoffmann, R. & Basler, K. Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr. Biol.* **16**, R378-R385 (2006).
163. Barker, N. *et al.* The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J* **20**, 4935-4943 (2001).

164. Stadel, R., Hoffmans, R. & Basler, K. Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr. Biol.* **16**, R378-R385 (2006).
165. Axelrod, J. D., Miller, J. R., Shulman, J. M., Moon, R. T. & Perrimon, N. Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev.* **12**, 2610-2622 (1998).
166. Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. & Mlodzik, M. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* **94**, 109-118 (1998).
167. Wong, H. C. *et al.* Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol. Cell* **12**, 1251-1260 (2003).
168. Sheldahl, L. C. *et al.* Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol.* **161**, 769-777 (2003).
169. Zeng, L. *et al.* The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell* **90**, 181-192 (1997).
170. Westfall, T. A. *et al.* Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/beta-catenin activity. *J Cell Biol.* **162**, 889-898 (2003).
171. Slusarski, D. C., Yang-Snyder, J., Busa, W. B. & Moon, R. T. Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev. Biol.* **182**, 114-120 (1997).
172. Westfall, T. A. *et al.* Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/beta-catenin activity. *J Cell Biol.* **162**, 889-898 (2003).
173. Slusarski, D. C., Yang-Snyder, J., Busa, W. B. & Moon, R. T. Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev. Biol.* **182**, 114-120 (1997).
174. Slusarski, D. C., Yang-Snyder, J., Busa, W. B. & Moon, R. T. Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev. Biol.* **182**, 114-120 (1997).
175. Westfall, T. A. *et al.* Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/beta-catenin activity. *J Cell Biol.* **162**, 889-898 (2003).
176. Strutt, D. & Strutt, H. Differential activities of the core planar polarity proteins during *Drosophila* wing patterning. *Dev. Biol.* **302**, 181-194 (2007).
177. Heisenberg, C. P. *et al.* Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* **405**, 76-81 (2000).
178. Noselli, S. JNK signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Trends in Genetics* **14**, 33-38 (1998).
179. Gutkind, J. S. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol. Chem.* **273**, 1839-1842 (1998).

180. Coso, O. A. *et al.* The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**, 1137-1146 (1995).
181. Minden, A., Lin, A., Claret, F. X., Abo, A. & Karin, M. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**, 1147-1157 (1995).
182. Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y. & Baltimore, D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* **89**, 1067-1076 (1997).
183. Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. & Mlodzik, M. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* **94**, 109-118 (1998).
184. Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. & Mlodzik, M. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* **94**, 109-118 (1998).
185. Mudher, A. *et al.* Dishevelled regulates the metabolism of amyloid precursor protein via protein kinase C/mitogen-activated protein kinase and c-Jun terminal kinase. *J Neurosci.* **21**, 4987-4995 (2001).
186. Maye, P., Zheng, J., Li, L. & Wu, D. Multiple mechanisms for Wnt11-mediated repression of the canonical Wnt signaling pathway. *J Biol. Chem.* **279**, 24659-24665 (2004).
187. Le, F. N. *et al.* The proinvasive activity of Wnt-2 is mediated through a noncanonical Wnt pathway coupled to GSK-3beta and c-Jun/AP-1 signaling. *FASEB J* **19**, 144-146 (2005).
188. Schulte, G. *et al.* Purified Wnt-5a increases differentiation of midbrain dopaminergic cells and dishevelled phosphorylation. *J Neurochem.* **92**, 1550-1553 (2005).
189. Mikels, A. J. & Nusse, R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* **4**, e115 (2006).
190. Logan, C. Y. & Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev Cell Dev. Biol.* **20**, 781-810 (2004).
191. Austin, T. W., Solar, G. P., Ziegler, F. C., Liem, L. & Matthews, W. A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood* **89**, 3624-3635 (1997).
192. Dosen, G. *et al.* Wnt expression and canonical Wnt signaling in human bone marrow B lymphopoiesis. *BMC Immunology* **7**, 13 (2006).
193. Ivanova, N. B. *et al.* A Stem Cell Molecular Signature. *Science* **298**, 601-604 (2002).
194. Reya, T. *et al.* Wnt Signaling Regulates B Lymphocyte Proliferation through a LEF-1 Dependent Mechanism. *Immunity* **13**, 15-24 (2000).

195. Van Den Berg, D. J., Sharma, A. K., Bruno, E. & Hoffman, R. Role of Members of the Wnt Gene Family in Human Hematopoiesis. *Blood* **92**, 3189-3202 (1998).
196. Reya, T. *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-414 (2003).
197. Reya, T. *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-414 (2003).
198. Austin, T. W., Solar, G. P., Ziegler, F. C., Liem, L. & Matthews, W. A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood* **89**, 3624-3635 (1997).
199. Van Den Berg, D. J., Sharma, A. K., Bruno, E. & Hoffman, R. Role of Members of the Wnt Gene Family in Human Hematopoiesis. *Blood* **92**, 3189-3202 (1998).
200. Willert, K. *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448-452 (2003).
201. Duncan, A. W. *et al.* Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Immunol.* **6**, 314-322 (2005).
202. Yamane, T. *et al.* Wnt Signaling Regulates Hemopoiesis Through Stromal Cells. *J Immunol* **167**, 765-772 (2001).
203. Nemeth, M. J., Topol, L., Anderson, S. M., Yang, Y. & Bodine, D. M. Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **104**, 15436-15441 (2007).
204. Nygren, J. M., Bryder, D. & Jacobsen, S. E. Prolonged cell cycle transit is a defining and developmentally conserved hemopoietic stem cell property. *J Immunol* **177**, 201-208 (2006).
205. Bowie, M. B. *et al.* Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *J Clin. Invest* **116**, 2808-2816 (2006).
206. Brandon, C., Eisenberg, L. M. & Eisenberg, C. A. WNT signaling modulates the diversification of hematopoietic cells. *Blood* **96**, 4132-4141 (2000).
207. Murdoch, B. *et al.* Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **100**, 3422-3427 (2003).
208. Willert, K. *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448-452 (2003).
209. Ranheim, E. A. *et al.* Frizzled 9 knock-out mice have abnormal B-cell development. *Blood* **105**, 2487-2494 (2005).
210. Reya, T. *et al.* Wnt Signaling Regulates B Lymphocyte Proliferation through a LEF-1 Dependent Mechanism. *Immunity* **13**, 15-24 (2000).

211. Reya, T. *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-414 (2003).
212. Reya, T. *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-414 (2003).
213. Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B. T., Jacobsen, S. E. & Nerlov, C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol.* **7**, 1048-1056 (2006).
214. Scheller, M. *et al.* Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat Immunol.* **7**, 1037-1047 (2006).
215. Scheller, M. *et al.* Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat Immunol.* **7**, 1037-1047 (2006).
216. Gavin, B. J., McMahon, J. A. & McMahon, A. P. Expression of multiple novel Wnt-1/int-1-related genes during fetal and adult mouse development. *Genes Dev.* **4**, 2319-2332 (1990).
217. Ungar, A. R., Kelly, G. M. & Moon, R. T. Wnt4 affects morphogenesis when misexpressed in the zebrafish embryo. *Mechanisms of Development* **52**, 153-164 (1995).
218. Hollyday, M., McMahon, J. A. & McMahon, A. P. Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. *Mechanisms of Development* **52**, 9-25 (1995).
219. Christian, J. L., Gavin, B. J., McMahon, A. P. & Moon, R. T. Isolation of cDNAs partially encoding four Xenopus Wnt-1/int-1-related proteins and characterization of their transient expression during embryonic development. *Developmental Biology* **143**, 230-234 (1991).
220. Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G. & McMahon, A. P. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* **372**, 679-683 (1994).
221. Kispert, A., Vainio, S. & McMahon, A. P. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* **125**, 4225-4234 (1998).
222. Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G. & McMahon, A. P. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* **372**, 679-683 (1994).
223. Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N. & McMahon, A. P. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* **397**, 405-409 (1999).
224. Pongracz, J., Hare, K., Harman, B., Anderson, G. & Jenkinson, E. J. Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. *Eur. J Immunol* **33**, 1949-1956 (2003).

225. Balciunaite, G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* **3**, 1102-1108 (2002).
226. Staal, F. J. *et al.* Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur. J Immunol* **31**, 285-293 (2001).
227. Mulroy, T., McMahon, J. A., Burakoff, S. J., McMahon, A. P. & Sen, J. Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur. J Immunol* **32**, 967-971 (2002).
228. Balciunaite, G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* **3**, 1102-1108 (2002).
229. Balciunaite, G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* **3**, 1102-1108 (2002).
230. Cai, Y. *et al.* Phosphorylation of Pax2 by the c-Jun N-terminal Kinase and Enhanced Pax2-dependent Transcription Activation. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 1217-1222 (2002).
231. Osafune, K., Takasato, M., Kispert, A., Asashima, M. & Nishinakamura, R. Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. *Development* **133**, 151-161 (2006).
232. Maurus, D., Heligon, C., Burger-Schwarzler, A., Brandli, A. W. & Kuhl, M. Noncanonical Wnt-4 signaling and EAF2 are required for eye development in *Xenopus laevis*. *EMBO J* **24**, 1181-1191 (2005).
233. Lyons, J. P. *et al.* Wnt-4 activates the canonical beta-catenin-mediated Wnt pathway and binds Frizzled-6 CRD: functional implications of Wnt/beta-catenin activity in kidney epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **298**, 369-387 (2004).
234. Golan, T., Yaniv, A., Bafico, A., Liu, G. & Gazit, A. The Human Frizzled 6 (HFz6) Acts as a Negative Regulator of the Canonical Wnt{middle dot}{beta}-Catenin Signaling Cascade. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14879-14888 (2004).
235. Golan, T., Yaniv, A., Bafico, A., Liu, G. & Gazit, A. The Human Frizzled 6 (HFz6) Acts as a Negative Regulator of the Canonical Wnt{middle dot}{beta}-Catenin Signaling Cascade. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14879-14888 (2004).
236. Lyons, J. P. *et al.* Wnt-4 activates the canonical beta-catenin-mediated Wnt pathway and binds Frizzled-6 CRD: functional implications of Wnt/beta-catenin activity in kidney epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **298**, 369-387 (2004).
237. Terada, Y. *et al.* Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats. *J Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1223-1233 (2003).
238. Balciunaite, G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* **3**, 1102-1108 (2002).

239. Nishikawa, S. I., Hashi, H., Honda, K., Fraser, S. & Yoshida, H. Inflammation, a prototype for organogenesis of the lymphopoietic/hematopoietic system. *Curr. Opin. Immunol* **12**, 342-345 (2000).
240. Nishikawa, S. I., Hashi, H., Honda, K., Fraser, S. & Yoshida, H. Inflammation, a prototype for organogenesis of the lymphopoietic/hematopoietic system. *Curr. Opin. Immunol* **12**, 342-345 (2000).
241. Miller, J. F. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunol Rev* **185**, 7-14 (2002).
242. Miller, J. F. & Osoba, D. Current concepts of the immunological function of the thymus. *Physiol Rev* **47**, 437-520 (1967).
243. Miller, J. F. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunol Rev* **185**, 7-14 (2002).
244. Miller, J. F. Immunological function of the thymus. *Lancet* **2**, 748-749 (1961).
245. Manley, N. R. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. *Semin. Immunol* **12**, 421-428 (2000).
246. Larsen W.J *Human Embryology 3rd ed.* (2001).
247. Cordier, A. C. & Haumont, S. M. Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *Am. J Anat.* **157**, 227-263 (1980).
248. Suniara, R. K., Jenkinson, E. J. & Owen, J. J. Studies on the phenotype of migrant thymic stem cells. *Eur. J Immunol* **29**, 75-80 (1999).
249. Manley, N. R. & Capecchi, M. R. Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev. Biol.* **195**, 1-15 (1998).
250. Manley, N. R. & Capecchi, M. R. Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev. Biol.* **195**, 1-15 (1998).
251. Balciunaite, G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* **3**, 1102-1108 (2002).
252. Reth, M. Immunodeficiency. Trapping the nude mouse gene. *Curr. Biol.* **5**, 18-20 (1995).
253. Steinmann, G. G., Klaus, B. & Muller-Hermelink, H. K. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand. J Immunol* **22**, 563-575 (1985).
254. Hirokawa, K. Understanding the mechanism of the age-related decline in immune function. *Nutr. Rev* **50**, 361-366 (1992).

255. Foss, D. L., Donskoy, E. & Goldschneider, I. The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J Exp. Med.* **193**, 365-374 (2001).
256. Foss, D. L., Donskoy, E. & Goldschneider, I. Functional demonstration of intrathymic binding sites and microvascular gates for prothymocytes in irradiated mice. *Int. Immunol* **14**, 331-338 (2002).
257. Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E. & Petrie, H. T. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp. Med.* **194**, 127-134 (2001).
258. Porritt, H. E., Gordon, K. & Petrie, H. T. Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J Exp. Med.* **198**, 957-962 (2003).
259. Porritt, H. E., Gordon, K. & Petrie, H. T. Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J Exp. Med.* **198**, 957-962 (2003).
260. Foss, D. L., Donskoy, E. & Goldschneider, I. The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J Exp. Med.* **193**, 365-374 (2001).
261. Donskoy, E., Foss, D. & Goldschneider, I. Gated importation of prothymocytes by adult mouse thymus is coordinated with their periodic mobilization from bone marrow. *J Immunol* **171**, 3568-3575 (2003).
262. Donskoy, E., Foss, D. & Goldschneider, I. Gated importation of prothymocytes by adult mouse thymus is coordinated with their periodic mobilization from bone marrow. *J Immunol* **171**, 3568-3575 (2003).
263. Adolfsson, J. *et al.* Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)-c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. **15**, 659-669 (2001).
264. Adolfsson, J. *et al.* Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306 (2005).
265. Igarashi, H., Gregory, S. C., Yokota, T., Sakaguchi, N. & Kincade, P. W. Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity* **17**, 117-130 (2002).
266. Kondo, M., Weissman, I. L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-672 (1997).
267. Martin, C. H. *et al.* Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. *Nat Immunol* **4**, 866-873 (2003).

268. Krueger, A. & von Boehmer, H. Identification of a T Lineage-Committed Progenitor in Adult Blood. *Immunity* **26**, 105-116 (2007).
269. Gounari, F. *et al.* Tracing lymphopoiesis with the aid of a pTalpha-controlled reporter gene. *Nat Immunol* **3**, 489-496 (2002).
270. Radtke, F. *et al.* Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547-558 (1999).
271. Milner, L. A., Kopan, R., Martin, D. I. & Bernstein, I. D. A human homologue of the *Drosophila* developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. *Blood* **83**, 2057-2062 (1994).
272. Maillard, I. *et al.* Notch-dependent T-lineage commitment occurs at extrathymic sites following bone marrow transplantation. *Blood* **107**, 3511-3519 (2006).
273. Rumfelt, L. L., Zhou, Y., Rowley, B. M., Shinton, S. A. & Hardy, R. R. Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors. *J Exp. Med.* **203**, 675-687 (2006).
274. Schwarz, B. A. *et al.* Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *J Immunol* **178**, 2008-2017 (2007).
275. Schwarz, B. A. *et al.* Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *J Immunol* **178**, 2008-2017 (2007).
276. Buza-Vidas, N., Luc, S. & Jacobsen, S. E. Delineation of the earliest lineage commitment steps of haematopoietic stem cells: new developments, controversies and major challenges. *Curr. Opin. Hematol.* **14**, 315-321 (2007).
277. Anderson, G. & Jenkinson, E. J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol* **1**, 31-40 (2001).
278. Godfrey, D. I., Zlotnik, A. & Suda, T. Phenotypic and functional characterization of c-kit expression during intrathymic T cell development. *J Immunol* **149**, 2281-2285 (1992).
279. von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M. & Murray, R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* **7**, 147-154 (1997).
280. Schmitt, T. M., Ciofani, M., Petrie, H. T. & Zuniga-Pflucker, J. C. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp. Med.* **200**, 469-479 (2004).
281. Benz, C. & Bleul, C. C. A multipotent precursor in the thymus maps to the branching point of the T versus B lineage decision. *J Exp. Med.* **202**, 21-31 (2005).
282. Sambandam, A. *et al.* Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol* **6**, 663-670 (2005).

283. Heinzl, K., Benz, C., Martins, V. C., Haidl, I. D. & Bleul, C. C. Bone marrow-derived hemopoietic precursors commit to the T cell lineage only after arrival in the thymic microenvironment. *J Immunol* **178**, 858-868 (2007).
284. Michie, A. M. & Zuniga-Pflucker, J. C. Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. *Semin. Immunol* **14**, 311-323 (2002).
285. Bhandoola, A., Sambandam, A., Allman, D., Meraz, A. & Schwarz, B. Early T lineage progenitors: new insights, but old questions remain. *J Immunol* **171**, 5653-5658 (2003).
286. Koyasu, S. *et al.* Pre-TCR signaling components trigger transcriptional activation of a rearranged TCR alpha gene locus and silencing of the pre-TCR alpha locus: implications for intrathymic differentiation. *Int. Immunol* **9**, 1475-1480 (1997).
287. Starr, T. K., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev Immunol* **21**, 139-176 (2003).
288. Bhandoola, A., Sambandam, A., Allman, D., Meraz, A. & Schwarz, B. Early T lineage progenitors: new insights, but old questions remain. *J Immunol* **171**, 5653-5658 (2003).
289. Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T. & Zlotnik, A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol.* **150**, 4244-4252 (1993).
290. Shortman, K. & Wu, L. Early T lymphocyte progenitors. *Annu. Rev Immunol* **14**, 29-47 (1996).
291. Sen, J. Signal transduction in thymus development. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* **47**, 197-215 (2001).
292. Misslitz, A. *et al.* Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp. Med.* **200**, 481-491 (2004).
293. Benz, C., Heinzl, K. & Bleul, C. C. Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. *Eur. J Immunol* **34**, 3652-3663 (2004).
294. Liu, C. *et al.* Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood* **108**, 2531-2539 (2006).
295. Liu, C. *et al.* The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi. *Blood* **105**, 31-39 (2005).
296. Kurobe, H. *et al.* CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* **24**, 165-177 (2006).

297. Ueno, T. *et al.* CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp. Med.* **200**, 493-505 (2004).
298. Schwarz, B. A. *et al.* Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *J Immunol* **178**, 2008-2017 (2007).
299. Suzuki, G. *et al.* Pertussis toxin-sensitive signal controls the trafficking of thymocytes across the corticomedullary junction in the thymus. *J Immunol* **162**, 5981-5985 (1999).
300. Aiuti, A. *et al.* Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lympho-hematopoietic progenitors. *Eur. J Immunol* **29**, 1823-1831 (1999).
301. Lesley, J., Hyman, R. & Schulte, R. Evidence that the Pgp-1 glycoprotein is expressed on thymus-homing progenitor cells of the thymus. *Cell Immunol* **91**, 397-403 (1985).
302. Prockop, S. E. *et al.* Stromal cells provide the matrix for migration of early lymphoid progenitors through the thymic cortex. *J Immunol* **169**, 4354-4361 (2002).
303. Scimone, M. L., Aifantis, I., Apostolou, I., von, B. H. & von Andrian, U. H. A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **103**, 7006-7011 (2006).
304. Ruiz, P., Wiles, M. V. & Imhof, B. A. Alpha 6 integrins participate in pro-T cell homing to the thymus. *Eur. J Immunol* **25**, 2034-2041 (1995).
305. Scimone, M. L., Aifantis, I., Apostolou, I., von, B. H. & von Andrian, U. H. A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **103**, 7006-7011 (2006).
306. Rossi, F. M. *et al.* Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol* **6**, 626-634 (2005).
307. van de, W. M., Castrop, J., Korinek, V. & Clevers, H. Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Mol. Cell Biol.* **16**, 745-752 (1996).
308. Oosterwegel, M. *et al.* Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development* **118**, 439-448 (1993).
309. Oosterwegel, M. *et al.* Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development* **118**, 439-448 (1993).
310. van de, W. M. *et al.* Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* **88**, 789-799 (1997).
311. Verbeek, S. *et al.* An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* **374**, 70-74 (1995).

312. Schilham, M. W. *et al.* Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. *J Immunol* **161**, 3984-3991 (1998).
313. van de, W. M., Castrop, J., Korinek, V. & Clevers, H. Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Mol. Cell Biol.* **16**, 745-752 (1996).
314. Goux, D. *et al.* Cooperating pre-T-cell receptor and TCF-1-dependent signals ensure thymocyte survival. *Blood* **106**, 1726-1733 (2005).
315. Ioannidis, V., Beermann, F., Clevers, H. & Held, W. The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nat Immunol* **2**, 691-697 (2001).
316. Ioannidis, V., Beermann, F., Clevers, H. & Held, W. The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nat Immunol* **2**, 691-697 (2001).
317. Okamura, R. M. *et al.* Redundant regulation of T cell differentiation and TCRalpha gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity* **8**, 11-20 (1998).
318. Staal, F. J. *et al.* Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur. J Immunol* **31**, 285-293 (2001).
319. Weerkamp, F. *et al.* Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *PNAS* **103**, 3322-3326 (2006).
320. Pongracz, J., Hare, K., Harman, B., Anderson, G. & Jenkinson, E. J. Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. *Eur. J Immunol* **33**, 1949-1956 (2003).
321. Mulroy, T., McMahon, J. A., Burakoff, S. J., McMahon, A. P. & Sen, J. Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur. J Immunol* **32**, 967-971 (2002).
322. Hsu, W., Shakya, R. & Costantini, F. Impaired mammary gland and lymphoid development caused by inducible expression of Axin in transgenic mice. *J Cell Biol.* **155**, 1055-1064 (2001).
323. Gounari, F. *et al.* Somatic activation of beta-catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development. *Nat Immunol* **2**, 863-869 (2001).
324. Gounari, F. *et al.* Loss of adenomatous polyposis coli gene function disrupts thymic development. *Nat Immunol* **6**, 800-809 (2005).
325. Gounari, F. *et al.* Loss of adenomatous polyposis coli gene function disrupts thymic development. *Nat Immunol* **6**, 800-809 (2005).
326. Guo, Z. *et al.* Beta-catenin stabilization stalls the transition from double-positive to single-positive stage and predisposes thymocytes to malignant transformation. *Blood* **109**, 5463-5472 (2007).

327. Mulroy, T., Xu, Y. & Sen, J. M. beta-Catenin expression enhances generation of mature thymocytes. *Int. Immunol* **15**, 1485-1494 (2003).
328. Mulroy, T., Xu, Y. & Sen, J. M. beta-Catenin expression enhances generation of mature thymocytes. *Int. Immunol* **15**, 1485-1494 (2003).
329. Mulroy, T., Xu, Y. & Sen, J. M. beta-Catenin expression enhances generation of mature thymocytes. *Int. Immunol* **15**, 1485-1494 (2003).
330. Pongracz, J. E., Parnell, S. M., Jones, T., Anderson, G. & Jenkinson, E. J. Overexpression of ICAT highlights a role for catenin-mediated canonical Wnt signalling in early T cell development. *Eur. J Immunol* **36**, 2376-2383 (2006).
331. Pongracz, J. E., Parnell, S. M., Jones, T., Anderson, G. & Jenkinson, E. J. Overexpression of ICAT highlights a role for catenin-mediated canonical Wnt signalling in early T cell development. *Eur. J Immunol* **36**, 2376-2383 (2006).
332. Jeannet, G. *et al.* Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of {beta}-catenin and {gamma}-catenin. *Blood* (2007).
333. Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B. T., Jacobsen, S. E. & Nerlov, C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol.* **7**, 1048-1056 (2006).
334. Scheller, M. *et al.* Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat Immunol.* **7**, 1037-1047 (2006).
335. Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B. T., Jacobsen, S. E. & Nerlov, C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol.* **7**, 1048-1056 (2006).
336. Scheller, M. *et al.* Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat Immunol.* **7**, 1037-1047 (2006).
337. Huelsken, J. *et al.* Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol.* **148**, 567-578 (2000).
338. Xu, Y., Banerjee, D., Huelsken, J., Birchmeier, W. & Sen, J. M. Deletion of beta-catenin impairs T cell development. *Nat Immunol* **4**, 1177-1182 (2003).
339. Cobas, M. *et al.* Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J Exp. Med.* **199**, 221-229 (2004).
340. Cobas, M. *et al.* Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J Exp. Med.* **199**, 221-229 (2004).
341. Goux, D. *et al.* Cooperating pre-T-cell receptor and TCF-1-dependent signals ensure thymocyte survival. *Blood* **106**, 1726-1733 (2005).
342. Koch, U. *et al.* Simultaneous loss of {beta}- and {gamma}-catenin does not perturb hematopoiesis or lymphopoiesis. *Blood* (2007).

343. Thomas, E. D. Bone marrow transplantation from bench to bedside. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **770**, 34-41 (1995).
344. Miller, C. L. & Eaves, C. J. Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* **94**, 13648-13653 (1997).
345. Bryder, D. & Jacobsen, S. E. Interleukin-3 supports expansion of long-term multilineage repopulating activity after multiple stem cell divisions in vitro. *Blood* **96**, 1748-1755 (2000).
346. Varnum-Finney, B. *et al.* Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med.* **6**, 1278-1281 (2000).
347. de, H. G. *et al.* In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1. *Dev. Cell* **4**, 241-251 (2003).
348. Willert, K. *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448-452 (2003).
349. Reya, T. *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-414 (2003).
350. Krosi, J. *et al.* In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med.* **9**, 1428-1432 (2003).
351. Antonchuk, J., Sauvageau, G. & Humphries, R. K. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* **109**, 39-45 (2002).
352. Amsellem, S. *et al.* Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med.* **9**, 1423-1427 (2003).
353. Blais, M. E., Louis, I. & Perreault, C. T-cell development: an extrathymic perspective. *Immunol Rev* **209**, 103-114 (2006).
354. Blais, M. E., Louis, I. & Perreault, C. T-cell development: an extrathymic perspective. *Immunol Rev* **209**, 103-114 (2006).
355. Clegg, C. H., Rulffes, J. T., Wallace, P. M. & Haugen, H. S. Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature* **384**, 261-263 (1996).
356. Louis, I. *et al.* Changes in the lymph node microenvironment induced by oncostatin M. *Blood* **102**, 1397-1404 (2003).
357. Clegg, C. H., Rulffes, J. T., Wallace, P. M. & Haugen, H. S. Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature* **384**, 261-263 (1996).
358. Clegg, C. H., Haugen, H. S., Rulffes, J. T., Friend, S. L. & Farr, A. G. Oncostatin M transforms lymphoid tissue function in transgenic mice by stimulating lymph node

- T-cell development and thymus autoantibody production. *Exp. Hematol.* **27**, 712-725 (1999).
359. Boileau, C., Houde, M., Dulude, G., Clegg, C. H. & Perreault, C. Regulation of extrathymic T cell development and turnover by oncostatin M. *J Immunol* **164**, 5713-5720 (2000).
360. Clegg, C. H., Rulffes, J. T., Wallace, P. M. & Haugen, H. S. Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature* **384**, 261-263 (1996).
361. Guy-Grand, D. *et al.* Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J Exp. Med.* **197**, 333-341 (2003).
362. Antica, M. & Scollay, R. Development of T lymphocytes at extrathymic sites. *J Immunol* **163**, 206-211 (1999).
363. Mulr y, T., McMahon, J. A., Burakoff, S. J., McMahon, A. P. & Sen, J. Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur. J Immunol* **32**, 967-971 (2002).
364. Balciunaite, G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* **3**, 1102-1108 (2002).
365. Guy-Grand, D. *et al.* Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J Exp. Med.* **197**, 333-341 (2003).
366. Jameson, S. C. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* **2**, 547-556 (2002).
367. Munitic, I. *et al.* Dynamic regulation of IL-7 receptor expression is required for normal thymopoiesis. *Blood* **104**, 4165-4172 (2004).
368. Sudo, T. *et al.* Expression and Function of the Interleukin 7 Receptor in Murine Lymphocytes. *PNAS* **90**, 9125-9129 (1993).
369. Sudo, T. *et al.* Expression and Function of the Interleukin 7 Receptor in Murine Lymphocytes. *PNAS* **90**, 9125-9129 (1993).
370. Mazzucchelli, R. & Durum, S. K. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol* **7**, 144-154 (2007).
371. Duncan, A. W. *et al.* Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Immunol.* **6**, 314-322 (2005).
372. Yu, Q. & Sen, J. M. β -catenin regulates positive selection of thymocytes but not lineage commitment. *J. Immunol.* **178**, 5028-5034 (2007).
373. Gounari, F. *et al.* Somatic activation of beta-catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development. *Nat Immunol* **2**, 863-869 (2001).

374. Guo, Z. *et al.* Beta-catenin stabilization stalls the transition from double-positive to single-positive stage and predisposes thymocytes to malignant transformation. *Blood* **109**, 5463-5472 (2007).
375. Ioannidis, V., Beermann, F., Clevers, H. & Held, W. The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nat Immunol* **2**, 691-697 (2001).
376. Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B. T., Jacobsen, S. E. & Nerlov, C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol.* **7**, 1048-1056 (2006).
377. Reya, T. *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-414 (2003).
378. Scheller, M. *et al.* Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat Immunol.* **7**, 1037-1047 (2006).
379. Willert, K. *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448-452 (2003).
380. Xu, Y., Banerjee, D., Huelsken, J., Birchmeier, W. & Sen, J. M. Deletion of beta-catenin impairs T cell development. *Nat Immunol* **4**, 1177-1182 (2003).
381. Sabapathy, K. *et al.* c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have similar and stage-dependent roles in regulating T cell apoptosis and proliferation. *J Exp. Med.* **193**, 317-328 (2001).
382. Ioannidis, V., Beermann, F., Clevers, H. & Held, W. The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nat Immunol* **2**, 691-697 (2001).
383. Grillot, D. A., Merino, R. & Nunez, G. Bcl-XL displays restricted distribution during T cell development and inhibits multiple forms of apoptosis but not clonal deletion in transgenic mice. *J Exp. Med.* **182**, 1973-1983 (1995).
384. Grillot, D. A., Merino, R. & Nunez, G. Bcl-XL displays restricted distribution during T cell development and inhibits multiple forms of apoptosis but not clonal deletion in transgenic mice. *J Exp. Med.* **182**, 1973-1983 (1995).
385. Matsuzaki, Y. *et al.* Role of bcl-2 in the Development of Lymphoid Cells From the Hematopoietic Stem Cell. *Blood* **89**, 853-862 (1997).
386. Mandal, M. *et al.* The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *J Exp. Med.* **201**, 603-614 (2005).
387. Mandal, M. *et al.* The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *J Exp. Med.* **201**, 603-614 (2005).
388. Blais, M. E. *et al.* Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses? *Blood* **103**, 3102-3110 (2004).

389. Boileau, C., Houde, M., Dulude, G., Clegg, C. H. & Perreault, C. Regulation of extrathymic T cell development and turnover by oncostatin M. *J Immunol* **164**, 5713-5720 (2000).
390. Louis, I. *et al.* Changes in the lymph node microenvironment induced by oncostatin M. *Blood* **102**, 1397-1404 (2003).
391. Terra, R., Labrecque, N. & Perreault, C. Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules. *J Immunol* **169**, 684-692 (2002).
392. Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G. & McMahon, A. P. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* **372**, 679-683 (1994).
393. Kispert, A., Vainio, S. & McMahon, A. P. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* **125**, 4225-4234 (1998).
394. Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N. & McMahon, A. P. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* **397**, 405-409 (1999).
395. Pongracz, J., Hare, K., Harman, B., Anderson, G. & Jenkinson, E. J. Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. *Eur. J Immunol* **33**, 1949-1956 (2003).
396. Balciunaite, G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* **3**, 1102-1108 (2002).
397. Balciunaite, G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* **3**, 1102-1108 (2002).
398. Kispert, A., Vainio, S. & McMahon, A. P. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* **125**, 4225-4234 (1998).
399. Mulroy, T., McMahon, J. A., Burakoff, S. J., McMahon, A. P. & Sen, J. Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur. J Immunol* **32**, 967-971 (2002).
400. Balciunaite, G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* **3**, 1102-1108 (2002).
401. Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-252 (2000).
402. Ip, Y. T. & Davis, R. J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 205-219 (1998).
403. Wang, M. C., Bohmann, D. & Jasper, H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* **121**, 115-125 (2005).

404. van der, H. A. & Burgering, B. M. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol. Cell Biol.* **8**, 440-450 (2007).
405. Stahl, M. *et al.* The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol* **168**, 5024-5031 (2002).
406. Brunet, A. *et al.* Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303**, 2011-2015 (2004).
407. Giannakou, M. E. & Partridge, L. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol.* **14**, 408-412 (2004).
408. Birkenkamp, K. U. & Coffey, P. J. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 292-297 (2003).
409. Tothova, Z. *et al.* FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* **128**, 325-339 (2007).
410. Bakker, W. J. *et al.* FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J Cell Biol.* **164**, 175-184 (2004).
411. Leenders, H., Whiffield, S., Benoist, C. & Mathis, D. Role of the forkhead transcription family member, FKHR, in thymocyte differentiation. *Eur. J Immunol* **30**, 2980-2990 (2000).
412. Karlsson, R. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase is essential for kit ligand-mediated survival, whereas interleukin-3 and flt3 ligand induce expression of antiapoptotic Bcl-2 family genes. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 923-931 (2003).
413. Sitnicka, E. *et al.* Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity.* **17**, 463-472 (2002).
414. Stirewalt, D. L. & Radich, J. P. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* **3**, 650-665 (2003).
415. Hirokawa, K. Understanding the mechanism of the age-related decline in immune function. *Nutr. Rev* **50**, 361-366 (1992).
416. Zhu, X. *et al.* Lymphohematopoietic progenitors do not have a synchronized defect with age-related thymic involution. *Aging Cell* **6**, 663-672 (2007).
417. Pan, L. *et al.* Stem Cell Aging Is Controlled Both Intrinsically and Extrinsically in the Drosophila Ovary. *Cell Stem Cell* **1**, 458-469 (2007).
418. Boyle, M., Wong, C., Rocha, M. & Jones, D. L. Decline in Self-Renewal Factors Contributes to Aging of the Stem Cell Niche in the Drosophila Testis. *Cell Stem Cell* **1**, 470-478 (2007).

419. Gui, J. *et al.* The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells. *Int. Immunol.* **19**, 1201-1211 (2007).
420. Zediak, V. P., Maillard, I. & Bhandoola, A. Multiple prethymic defects underlie age-related loss of T progenitor competence. *Blood* **110**, 1161-1167 (2007).
421. Rossi, D. J. *et al.* Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 9194-9199 (2005).
422. Rossi, D. J., Bryder, D. & Weissman, I. L. Hematopoietic stem cell aging: mechanism and consequence. *Exp. Gerontol.* **42**, 385-390 (2007).
423. Gray, D. H. D. *et al.* Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* **108**, 3777-3785 (2006).
424. Gui, J. *et al.* The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells. *Int. Immunol.* **19**, 1201-1211 (2007).
425. Weissman, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**, 157-168 (2000).
426. Bleul, C. C. *et al.* Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* **441**, 992-996 (2006).
427. Senoo, M., Pinto, F., Crum, C. P. & McKeon, F. p63 Is Essential for the Proliferative Potential of Stem Cells in Stratified Epithelia. *Cell* **129**, 523-536 (2007).
428. Mills, A. A. p53: link to the past, bridge to the future. *Genes Dev.* **19**, 2091-2099 (2005).
429. Levrero, M. *et al.* The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci* **113**, 1661-1670 (2000).
430. Senoo, M., Pinto, F., Crum, C. P. & McKeon, F. p63 Is Essential for the Proliferative Potential of Stem Cells in Stratified Epithelia. *Cell* **129**, 523-536 (2007).
431. Senoo, M., Pinto, F., Crum, C. P. & McKeon, F. p63 Is Essential for the Proliferative Potential of Stem Cells in Stratified Epithelia. *Cell* **129**, 523-536 (2007).
432. Popa, I. *et al.* Regeneration of the adult thymus is preceded by the expansion of K5+K8+ epithelial cell progenitors and by increased expression of Trp63, cMyc and Tcf3 transcription factors in the thymic stroma. *Int. Immunol* **19**, 1249-1260 (2007).
433. Popa, I. *et al.* Regeneration of the adult thymus is preceded by the expansion of K5+K8+ epithelial cell progenitors and by increased expression of Trp63, cMyc and Tcf3 transcription factors in the thymic stroma. *Int. Immunol* **19**, 1249-1260 (2007).

434. Barbieri, C. E., Tang, L. J., Brown, K. A. & Pietenpol, J. A. Loss of p63 Leads to Increased Cell Migration and Up-regulation of Genes Involved in Invasion and Metastasis. *Cancer Res* **66**, 7589-7597 (2006).
435. Keyes, W. M. & Mills, A. A. p63: a new link between senescence and aging. *Cell Cycle* **5**, 260-265 (2006).
436. Keyes, W. M. *et al.* p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes Dev.* **19**, 1986-1999 (2005).
437. Balciunaite, G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* **3**, 1102-1108 (2002).
438. Balciunaite, G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* **3**, 1102-1108 (2002).
439. Nehls, M. *et al.* Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* **272**, 886-889 (1996).
440. Blackburn, C. C. *et al.* The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **93**, 5742-5746 (1996).
441. Ortman, C. L., Dittmar, K. A., Witte, P. L. & Le, P. T. Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *Int. Immunol.* **14**, 813-822 (2002).
442. Ortman, C. L., Dittmar, K. A., Witte, P. L. & Le, P. T. Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *Int. Immunol.* **14**, 813-822 (2002).
443. Liu, H. *et al.* Augmented Wnt Signaling in a Mammalian Model of Accelerated Aging. *Science* **317**, 803-806 (2007).
444. Brack, A. S. *et al.* Increased Wnt Signaling During Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis. *Science* **317**, 807-810 (2007).
445. Liu, H. *et al.* Augmented Wnt Signaling in a Mammalian Model of Accelerated Aging. *Science* **317**, 803-806 (2007).
446. Brack, A. S. *et al.* Increased Wnt Signaling During Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis. *Science* **317**, 807-810 (2007).
447. Brack, A. S. *et al.* Increased Wnt Signaling During Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis. *Science* **317**, 807-810 (2007).
448. Mulroy, T., McMahon, J. A., Burakoff, S. J., McMahon, A. P. & Sen, J. Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur. J Immunol* **32**, 967-971 (2002).

449. Bernard, P., Fleming, A., Lacombe, A., Harley, V. R. & Vilain, E. Wnt4 inhibits beta-catenin /TCF signaling by redirecting beta-catenin to the cell membrane. *Biol. Cell* (2007).
450. Jeannet, G. *et al.* Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of {beta}-catenin and {gamma}-catenin. *Blood* (2007).
451. Brack, A. S. *et al.* Increased Wnt Signaling During Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis. *Science* **317**, 807-810 (2007).
452. Liu, H. *et al.* Augmented Wnt Signaling in a Mammalian Model of Accelerated Aging. *Science* **317**, 803-806 (2007).
453. Aspinall, R. T cell development, ageing and Interleukin-7. *Mech. Ageing Dev.* **127**, 572-578 (2006).
454. Klump, H., Schiedlmeier, B. & Baum, C. Control of self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: HOXB4 on the threshold. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **1044**, 6-15 (2005).
455. Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B. T., Jacobsen, S. E. & Nerlov, C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol.* **7**, 1048-1056 (2006).
456. Scheller, M. *et al.* Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat Immunol.* **7**, 1037-1047 (2006).
457. Puri, M. C. & Bernstein, A. Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* **100**, 12753-12758 (2003).
458. Douagi, I., Vieira, P. & Cumano, A. Lymphocyte commitment during embryonic development, in the mouse. *Semin. Immunol* **14**, 361-369 (2002).
459. Vermeulen, K., Van Bockstaelé, D. R. & Berneman, Z. N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann. Hematol.* **84**, 627-639 (2005).
460. Reed, J. C. & Pellecchia, M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* **106**, 408-418 (2005).
461. Dhodapkar, M. V., Krasovsky, J., Osman, K. & Geller, M. D. Vigorous premalignancy-specific effector T cell response in the bone marrow of patients with monoclonal gammopathy. *J Exp. Med.* **198**, 1753-1757 (2003).
462. Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107-1111 (2001).
463. Wheeler, C. J. *et al.* Thymic CD8+ T cell production strongly influences tumor antigen recognition and age-dependent glioma mortality. *J Immunol* **171**, 4927-4933 (2003).

464. Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107-1111 (2001).
465. Miller, R. A. The aging immune system: primer and prospectus. *Science* **273**, 70-74 (1996).
466. Jordan, B. K. *et al.* Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am. J Hum. Genet* **68**, 1102-1109 (2001).