

Université de Montréal

**Effet de la surexpression du gène *Hoxb4* sur la
prolifération homéostatique des cellules T mémoires**

par

Héloïse Frison

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

en Microbiologie et Immunologie

Août 2012

© Héloïse Frison, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Effet de la surexpression du gène *Hoxb4* sur la
prolifération homéostatique des cellules T mémoires**

Présenté par :
Héloïse Frison

évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Laurent Sabbagh, président-rapporteur
Janetta Bijl, directrice de recherche
Nathalie Labrecque, co-directrice
Nathalie Arbour, membre du jury

Résumé

Les cellules T mémoires (Tm) protègent l'organisme contre les réinfections de pathogènes qu'il a déjà combattu. Les Tm possèdent plusieurs propriétés en commun avec les cellules souches hématopoïétiques (CSH), notamment la capacité de se différencier, de s'auto-renouveler et de maintenir une population relativement constante au sein de l'organisme via des mécanismes homéostatiques. Il a été démontré que *Hoxb4*, un membre de la famille des facteurs de transcription *Hox*, était capable d'induire l'expansion des CSH *in vivo* et *in vitro* de façon rapide. Au vu de ces parallèles, nous avons posé l'hypothèse que la surexpression de *Hoxb4* pourrait induire l'expansion de populations de Tm. Nous avons analysé les populations de Tm et lymphocytes T naïfs (Tn) dans les organes lymphoïdes de souris transgéniques surexprimant *Hoxb4* et les avons comparées à des souris de type sauvage (wt). Alors que la fréquence des cellules T matures *Hoxb4* diminuait avec l'âge, leur phénotype ainsi que leur viabilité demeuraient inchangés. Ensuite, nous avons procédé à des transplantations en compétition de Tm (CD4⁺CD44^{hi}) *Hoxb4* et wt chez des hôtes dépourvus de lymphocytes T (CD3^{-/-}) dans le but d'évaluer leur contribution à la reconstitution du compartiment T après 2 mois. Au final, les Tm wt avait contribué un peu plus que les Tm *Hoxb4* à la reconstitution (~60%). Des analyses fonctionnelles et phénotypiques ont montré que les Tm *Hoxb4* possédaient une fonctionnalité normale, mais se distinguaient des Tm wt par la présence d'une faible population qui présentait un phénotype « mémoire central » (Tcm), conférant habituellement une longévité accrue. Les cellules des ganglions lymphatiques totaux des hôtes furent transplantées de façon sérielle chez trois générations de nouveaux hôtes. Le phénotype Tcm observés chez les Tm *Hoxb4* était récapitulé chez les hôtes secondaires uniquement. Les ratios sont demeurés en faveur des Tm wt lors des deux transplantations suivantes, mais les Tm *Hoxb4* ont commencé à montrer un avantage compétitif chez certains hôtes quaternaires. Une transplantation en compétition à court terme de Tm *Hoxb4* et wt marqués avec un marqueur cytoplasmique ont démontré la présence chez les Tm *Hoxb4* seulement d'une faible population CD62L^{hi} proliférant lentement. Ainsi, l'expansion préférentielle de Tcm CD4 par le biais d'une

sélection ou d'une différenciation induite par la surexpression de *Hoxb4* pourrait potentiellement leur permettre de maintenir un état de quiescence leur permettant de persister plus longtemps suite à des transplantations sérielles.

Mots-clés : Cellules T mémoires, homéostasie, gènes *Hox*, cellules souches hématopoïétiques, lymphopénie.

Abstract

Memory T cells (Tm) protect the organism against reinfection from pathogens they've already encountered. Tm share characteristics with hematopoietic stem cells (HSC), such as the capacity to differentiate, self-renew and maintain a relatively constant population via homeostatic mechanisms. *Hoxb4*, a member of the *Hox* genes family of transcription factors, has been shown to expand HSCs rapidly *in vivo* and *in vitro*. Thus, drawing from these parallels we hypothesise that *Hoxb4* overexpression could lead to expansion of Tm populations. Tm and naïve T cell (Tn) populations were analysed in the lymphoid organs of young and aged transgenic mice overexpressing *Hoxb4* in comparison with wild type (wt) mice. While the frequencies of mature Hoxb4 T cells in lymphoid organs seemed to decline with age, the phenotype or the cell viability remained unaffected. Next, CD4⁺CD44^{hi} Hoxb4 Tm were transferred into T cell deficient (CD3^{-/-}) hosts in competition with wt CD4⁺CD44^{hi} Tm and evaluated for their contribution to T cell reconstitution after 2 months. Engraftment of wt Tm in secondary lymphoid organs was slightly higher than Hoxb4 Tm (~60%). Functional assays and phenotypic analysis showed that Hoxb4 Tm exhibited normal functionality, but in contrast to wt Tm, a fraction of Hoxb4 Tm exhibited a more central memory (Tcm) phenotype, indicative of a longer lifespan. Total lymph nodes from hosts were serially re-transplanted for three generations. The Tcm phenotype of the Hoxb4 Tm present in the primary hosts was recapitulated in the secondary but not in the tertiary hosts. The ratios remained in favor of the wt Tm after two subsequent expansion rounds, but Hoxb4 Tm showed a competitive advantage over wt Tm in some quaternary hosts. Cell tracking of a short term transplantation of Hoxb4 and wt Tm in competition exposed a small population of CD62L^{hi} cells displaying slow proliferation in the Hoxb4 Tm only. Thus preferential CD4⁺ Tcm expansion by selection or differentiation could potentially allow Hoxb4 Tm to persist longer following serial transplantations due to a more quiescent state.

Keywords : Memory T cells, homeostasis, *Hox* genes, hematopoietic stem cells, lymphopenia.

Table des matières

Introduction.....	1
1. L'hématopoïèse.....	2
1.1 Les cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	5
1.1.1 Homéostasie des CSH.....	8
1.1.2 Facteurs pouvant réguler l'homéostasie des CSH.....	10
1.1.2.1 Les gènes Hox.....	11
1.1.2.2 La régulation des gènes Hox.....	15
1.2 La différenciation des CSH en lignées distinctes.....	16
1.2.1 La lignée mégakaryocyte/érythroïde.....	16
1.2.2 La lignée myéloïde.....	17
1.2.3 La lignée lymphoïde.....	17
2. Le système immunitaire adaptatif.....	20
2.1 La réaction immunitaire médiée par les lymphocytes T.....	20
2.1.1 Reconnaissance antigénique.....	20
2.1.1.1 Phases de la réponse des lymphocytes T.....	21
2.1.2 Génération des Tm.....	25
2.1.2.1 Modèles de développement des Tm.....	25
2.1.2.2 Signaux et facteurs de transcription contrôlant le développement des Tm.....	26
2.1.3 Caractéristiques et sous-populations des Tm.....	27
2.1.4 Homéostasie des lymphocytes T.....	30
2.1.4.1 Homéostasie des Tn.....	31
2.1.4.2 Homéostasie des Tm.....	34
2.1.5 Les gènes <i>Hox</i> et les cellules T.....	37
3. Hypothèse(s) et objectifs.....	39
3.1 Raisonnement.....	39
3.1.1 Propriété d'auto-renouvellement.....	39

3.1.2	Quiescence	39
3.1.3	Auto-renouvellement symétrique en réponse à un stress	40
3.1.4	Profil transcriptionnel apparenté	40
3.1.5	Hypothèse.....	41
3.1.6	Objectifs	41
Matériel et méthodes	42
1.	Animaux.....	43
2.	Transfert adoptif de Tm CD4 ⁺ en compétition	43
3.	Cytométrie en flux.....	44
3.1	Expression des marqueurs mémoires des Tm de souris jeunes et âgées.....	44
3.2	Expression des marqueurs des Tm lors des transplantations sérielles	45
4.	Marquage Annexine V	45
5.	Production de cytokines par stimulation PMA/ionomycine et détection par marquage intracellulaire.....	46
6.	Real-time Quantitative PCR (RT-QPCR).....	47
7.	Analyses statistiques	47
Résultats	48
1.	Modèle transgénique murin de surexpression du gène <i>Hoxb4</i> chez les Tm	49
2.	Incidence de la surexpression de <i>Hoxb4</i> sur la proportion de Tmp exprimant certains marqueurs mémoires et leur viabilité.....	52
3.	Transfert adoptif de Tmp CD4 ⁺ en compétition chez des hôtes déficients en cellules T.....	55
4.	Phénotype des Tmp <i>Hoxb4</i> suite à la PIL.....	58
5.	Transferts adoptifs sériels de Tmp en compétition	60
6.	Fonctionnalité et phénotype des Tmp après transplantations sérielles	63
7.	Prolifération homéostatique à court terme des Tmp <i>in vivo</i> en compétition.....	65
Discussion	67
1.	Rappel des hypothèses et objectifs.....	68
2.	Mise en contexte des résultats.....	68

2.1	Effet du vieillissement sur les Tmp.....	68
2.2	Effet combiné de l'âge et de la surexpression de Hoxb4 sur les Tm	70
2.3	Effet de <i>Hoxb4</i> sur la prolifération homéostatique des Tm	71
2.3.1	Hypothèse 1 : la mort cellulaire	72
2.3.2	Hypothèse 2 : le cycle cellulaire	74
2.3.3	Hypothèse 3 : la migration	76
	Conclusion	79
	Limitations de l'étude et plans futures	81
	Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau I.	Marqueurs naïfs et mémoires des lymphocytes T.....	22
-------------------	--	----

Liste des figures

Figure 1.	L'hématopoïèse.....	4
Figure 2.	Auto-renouvellement des cellules souches.....	9
Figure 3.	Les gènes et le développement embryonnaire.....	12
Figure 4.	<i>HOXB4</i> induit l'expansion massive de CSH <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	14
Figure 5.	Les différents sous-types de la mémoire immunologique.....	29
Figure 6.	Nombre de Tn et Tm CD4 ⁺ et CD8 ⁺ en périphérie en fonction de l'âge.....	31
Figure 7.	Signaux extrinsèques modulant l'activation, la survie et la prolifération des Tn et Tm.....	34
Figure 8.	Effets de la surexpression de <i>Hoxb4</i> sur le vieillissement des Tmp.....	51
Figure 9.	La surexpression de <i>Hoxb4</i> a peu d'effet sur les proportions de Tmp exprimant certains profils phénotypiques	53
Figure 10.	La viabilité des Tmp ne diminue pas en fonction de l'âge ou de la surexpression de <i>Hoxb4</i>	55
Figure 11.	Schéma expérimental du transfert adoptif des Tmp <i>Hoxb4</i> et wt en compétition.....	56
Figure 12.	Les Tmp <i>Hoxb4</i> sont moins compétitifs au niveau de l'expansion en situation de PIL mais non au niveau de la fonctionnalité.....	57
Figure 13.	Les Tmp <i>Hoxb4</i> ont un phénotype Tcm plus marqué après en situation de PIL.....	59
Figure 14.	Schéma expérimental du transfert adoptif sériel à partir des ganglions lymphatiques des hôtes CD3 ^{-/-} reconstitués.....	60
Figure 15.	Les Tmp <i>Hoxb4</i> continuent de s'appauvrir dans les organes lymphoïdes des hôtes secondaires et tertiaires, mais pas les hôtes quaternaires.....	61
Figure 16.	Les Tmp <i>Hoxb4</i> conservent un phénotype Tcm dans la BM des hôtes secondaires.....	63
Figure 17.	La surexpression de <i>Hoxb4</i> entraîne une accumulation accrue des Tmp dans les LN et la Spl après une semaine.....	65

Liste des abréviations utilisées

¢	Cellules
5-Fu	5-Fluorouracil
AGM	Aorte gonades mésonéphros
BM	Moelle osseuse (<i>Bone marrow</i>)
CFSE	<i>Carboxylfluorescein succinimidyl ester</i>
CFU	<i>Colony forming unit</i>
CLP	Progéniteur lymphoïde commun (<i>Common lymphoid progenitor</i>)
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMP	Progéniteur myéloïde commun (<i>Common myeloid progenitor</i>)
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CRU	<i>Competitive repopulating unit</i>
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CTV	Cell Trace Violet™
DN	Double négatif
EPO	Érythropoïétine
ETP	Progéniteur T précoce (<i>Early T-lineage progenitors</i>)
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte monocyte colony stimulationg factor</i>
GMP	Progéniteur ganolycte macrophage (<i>Ganulocyte macrophage progenitor</i>)
HEV	Veinule à endothélium épais (<i>High endothelium veinule</i>)
Hox	Homeobox
IL	Interleukine
Lin	<i>Lineage</i>
LKS	Fraction Lin ⁻ c-kit ⁺ Sca-1 ⁺

LMPP	Progéniteur multipotent lymphoïde (<i>Lymphoïde biased multipotent progenitor</i>)
LN	Ganglions lymphatiques (<i>Lymph nodes</i>)
LT-CSH	Cellule souche hématopoïétique à long terme
MEP ou Mkep	Progéniteur mégakaryocyte/érythroïde commun (<i>Megakaryocytic/erythroid progenitor</i>)
MPP	Progéniteur multi-potent (<i>Multipotent progenitor</i>)
NK	<i>Natural Killer</i>
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PcG	Famille Polycomb (<i>Polycomb group</i>)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCR1	<i>Polycomb repressive complex 1 (PCR1)</i>
PCR2	<i>Polycomb repressive complex 2 (PCR2)</i>
PIL	Prolifération induite par la lymphopénie
RCT	Récepteur des cellules T
RT-QPCR	<i>Real Time Quantitative Polymerase chain reaction</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SDF-1	<i>Stromal cell derived factor 1</i>
SLAM	<i>Signaling lymphocytic activation molecule</i>
Spl	Rate (<i>Spleen</i>)
ST-CSH	Cellule souche hématopoïétique à court terme
Tcm	Cellule T mémoire centrale
TEC	Cellule épithéliale thymique (<i>Thymic epithelial cell</i>)
Tem	Cellule T mémoire effectrice
Tfh	Cellule T <i>follicular helper</i>
Tm	Cellule T mémoire
Tmp	Cellule T mémoire phénotype
Tn	Cellule T naïve

TrxG	Famille Trithorax (<i>Trithorax group</i>)
Tscm	Cellule T « <i>stem-cell</i> » mémoire
wt	Type sauvage (<i>Wild type</i>)

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier chaleureusement ma directrice Janet de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir accordé une chance alors que je débutais mon cheminement en recherche. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir offert une place au sein de ton laboratoire dans lequel on ne s'ennuie jamais et où une ambiance cordiale règne. Mes trois dernières années furent remplies d'action et d'émotions, et je repars la tête pleine de connaissances fraîches et d'idées nouvelles. Je te remercie tout particulièrement pour les leçons d'hématologie qui viennent considérablement compléter ma formation d'immunologiste.

Merci à ma co-directrice Nathalie d'avoir stimulé mon intérêt pour l'immunologie et plus particulièrement les cellules T durant les cours au baccalauréat. Ta passion pour ton domaine transpire réellement dans tout ce que tu fais et nous inspire à aller plus loin. Je suis vraiment reconnaissante que tu m'aies accueillie dans ton laboratoire pour mon premier stage et que tu m'aies recrutée pour ce projet passionnant.

J'aimerais remercier les membres du laboratoire de Nathalie pour leur aide précieuse en immunologie durant mon projet, un hybride de concepts d'hématologie et de techniques d'immunologie. Je souhaite tout particulièrement remercier Pamela pour ton aide indispensable dans la mise au point et l'analyse, ainsi que lors d'expériences lourdes. J'ai adoré travailler avec toi et je te souhaite toutes les chances de réussite dans tout ce que tu accomplis. Merci énormément pour tout.

Je veux remercier de tout cœur Marilaine, Charles-Étienne et Mona d'avoir partagé ces dernières années avec moi. Votre aide au laboratoire et votre amitié ont été indispensables dans tout ce que j'ai accompli. Marilaine, j'ai adoré travaillé avec toi et je suis heureuse que nous sommes devenues si bonnes amies. Merci pour toute l'aide que tu m'as apporté dans absolument tout et merci pour nos conversations qui m'ont tant fait sourire. Charles-Étienne, merci pour ta patience et ton enthousiasme à chercher la réponse à n'importe quelle question. Tu n'hésites jamais à prendre le temps d'aider quelqu'un, et tu as le talent de remonter le moral de n'importe qui. Mona, ta présence dans le laboratoire était vraiment

agréable. Merci de nous avoir fait découvrir plein de choses et d'avoir été une excellente amie. Merci également aux deux nouvelles recrues du laboratoire, Gloria (qui reprend mon projet) et Gratianna. Je vous souhaite tous du succès dans tout ce que vous faites.

Je remercie Olga, qui en plus de m'avoir réellement aidée dans mon cheminement, a été une amie fidèle et sincère tout au long de notre maîtrise. Je ne peux te dire à quel point notre amitié m'est chère et bien qu'à la fin de ton parcours nous étions inséparables, tu as dû quitter notre belle ville pour aller poursuivre tes études sur un autre continent. Bien que tu me manques beaucoup, je suis heureuse pour toi et je sais que nous nous reverrons bientôt. Je suis convaincue que tu iras loin!

Je dois tout particulièrement adresser de très sincères remerciements à ma très grande amie Mwrianna. En 13 années d'amitié tu as toujours su me faire rire et m'écouter. Je ne serais pas ou je suis sans ton aide, ton support, ta compagnie. Non seulement je te dois mes réussites au baccalauréat et à la maîtrise, mais je te dois infiniment pour la rédaction de ce mémoire que j'ai fait alors que tu rédigeais le tien. Cela m'a particulièrement encouragée et motivée à persévérer. Merci d'avoir répondu avec patience à mes mille questions et merci d'être là!

Merci également au reste des amis, de longue date ou ceux que j'ai rencontrés au centre de recherche, qui étaient toujours là pour m'offrir un moment de détente dans la vie tumultueuse d'une étudiante de maîtrise.

Tout dernièrement, j'aimerais remercier ma mère Anne, mon frère Blaise et ma grand-mère. Maman, merci de m'avoir offert tout le support possible dans mes études. Tu es certainement la personne la plus indispensable à tous mes succès. Merci de m'avoir donné le goût d'étudier, d'apprendre, de voyager et tant d'autres. Merci à Blaise d'avoir passé du temps à rédiger nos thèses ensemble et je te souhaite bonne chance pour ta fin de maîtrise. Merci à toi mamie, j'espère rester aussi jeune que tu as su le demeurer.

Et finalement, merci du fond du cœur à Kevin d'avoir été avec moi à presque chaque moment durant lesquels je rédigeais ce mémoire. Merci de m'avoir supportée durant ces mois et d'avoir été si gentil avec moi.

Introduction

1. L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus par lequel toutes les cellules matures du sang sont générées. Elles ont une durée de vie limitée et doivent être remplacées fréquemment tout au long de la vie de l'organisme ce qui nécessite un processus de régénération hautement régulé. Toutes ces cellules sont issues d'une seule cellule initiatrice nommée cellule souche hématopoïétique (CSH) que l'on retrouve aussi bien dans l'embryon que chez l'adulte. L'hématopoïèse embryonnaire a lieu dans le sac vitellin de l'embryon puis subséquemment, à mesure que l'embryon se développe, le site de l'hématopoïèse migre vers la région de l'aorte-gonade-mésonephros (AGM), le placenta, le foie fœtal, la rate, et la moelle osseuse (Yamasaki et al., 2011).

Le sang est un organe absolument essentiel à l'organisme et l'un des premiers à apparaître durant l'embryogénèse. De ce fait, le système hématopoïétique évolue au même rythme que le développement de l'embryon.

On distingue deux types hématopoïèse soient l'hématopoïèse primitive, débutant chez l'embryon et essentiellement présente mais non exclusive au sac vitellin, et l'hématopoïèse définitive ou adulte. Cette dernière est caractérisée par la génération de cellules érythroïdes matures anucléées et plus petites que leurs homologues primitifs, la migration progressive du site de l'hématopoïèse dont la moelle osseuse est l'ultime destination, la diversification des progéniteurs, soit les progéniteurs multipotents (*mutlipotent progenitors*, MPP) et l'établissement d'une population stable de CSH (Dzierzak, 2005; Dzierzak and Medvinsky, 1995; Lensch, 2012; Tavassoli, 1991).

L'érythropoïèse primitive, la première genèse de cellules sanguines enclenchée durant le développement, dépend de facteurs de croissance différents de l'érythropoïèse définitive. Les érythrocytes définitifs requièrent le *stem cell factor* (SCF) et l'hormone glycoprotéique érythropoïétine (EPO) et son récepteur pour leur développement contrairement aux érythrocytes primitifs (Lin et al., 1996; Waskow et al., 2004). Les érythrocytes définitifs proviennent essentiellement du foie fœtal et non du sac vitellin. En

effet, les progéniteurs érythroïdes, qui sont issus du sac vitellin viennent rapidement coloniser le foie fœtal où ils procèdent à se différencier davantage et mûrir jusqu'au moment de la prochaine migration (McGrath and Palis, 2005).

Les MPP détectables durant l'hématopoïèse primitive possèdent un potentiel d'auto-renouvellement fortement réduit et l'établissement d'une population stable de CSH représente une caractéristique importante de l'hématopoïèse définitive (Orkin and Zon, 2002). Bien que l'hématopoïèse débute dans le sac vitellin, l'origine même des CSH demeure à ce jour controversée. On a démontré que les CSH seraient originaires du sac vitellin puisqu'elles permettent la reconstitution d'hôtes néonataux (Palis and Yoder, 2001). Par contre, il a également été postulé que les CSH qui sont capables de reconstituer le système hématopoïétique d'hôtes adultes proviendraient de l'AGM (Ivanovs et al., 2011) mais qu'ils nécessitent l'apport du sac vitellin pour finalement aller s'établir dans le foie fœtal (Kumaravelu et al., 2002). En outre, le nombre de CSH venant coloniser le foie fœtal s'accroît à mesure que le nombre de CSH en circulation augmente, et l'AGM cesse de générer des CSH alors que le sac vitellin est du moins plus propice à les maintenir. Le placenta fait également partie des sites importants du développement et source des CSH (Gekas et al., 2010; Lee et al., 2010; Mikkola et al., 2005).

Une autre caractéristique attribuée à l'hématopoïèse définitive est la hiérarchisation des lignées ainsi que le commencement de la lymphopoïèse (Figure 1) (Lensch, 2012; McGrath and Palis, 2005). À ce stade, le système hématopoïétique est maintenant mature et les cellules sanguines de l'adulte sont présentes, soutenues par un apport constant de facteurs de survie provenant de la moelle osseuse.

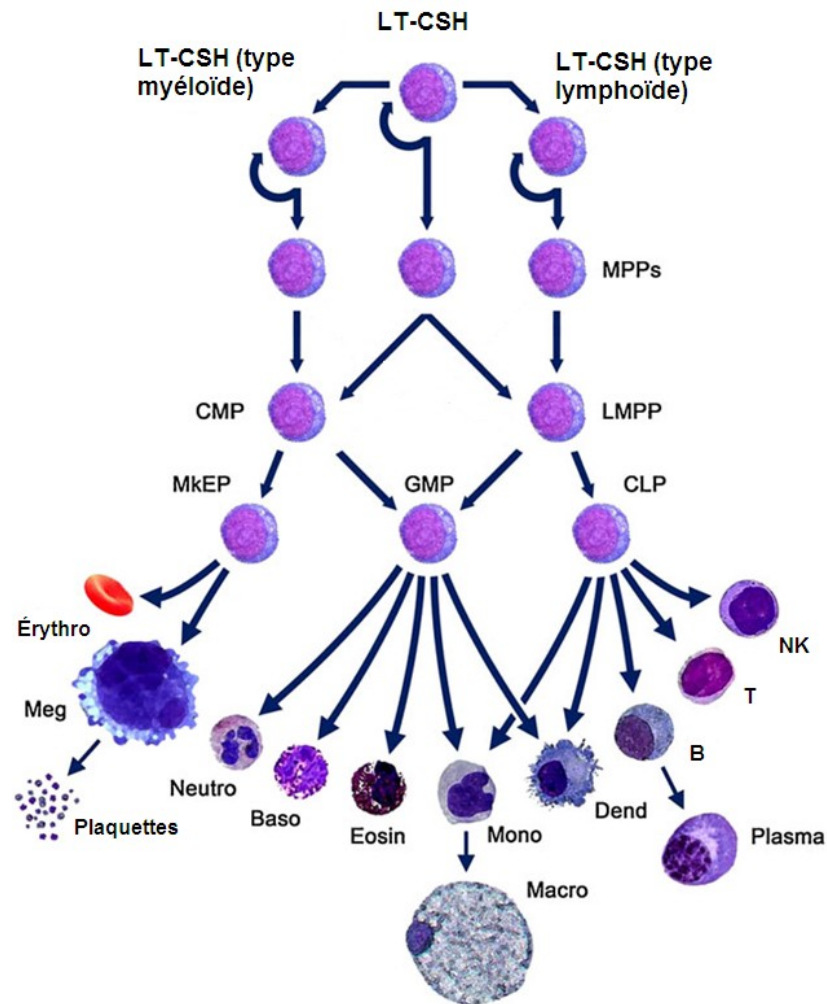


Figure 1. L'hématopoïèse. Les cellules souches hématopoïétiques ont la capacité de s'auto-renouveler et de générer toutes les cellules matures du sang en passant par des étapes de différenciation en progéniteurs. LT-CSH, cellules souche hématopoïétique à long terme; MPP, progéniteur multipotent; CMP, progéniteur myéloïde commun; LMPP, progéniteur multipotent lymphoïde; MkEP, progéniteur mégakaryocyte/érythroïde; GMP, progéniteur granulocyte macrophage. Adaptée de Lensch, M.W. 2012. An Evolving Model of Hematopoietic Stem Cell Functional Identity. *Stem cell reviews*

1.1 Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Toutes les cellules matures du sang proviennent à la base d'un seul type de cellule capable de se différencier. Cette cellule dite « cellule souche » prend origine directement de l'embryon, à la différence qu'elle possède un potentiel de différenciation plus restreint et qu'elle ne donne pas lieu à des sous-types cellulaires non hématopoïétiques. On qualifie de cellule souche une cellule ayant la capacité de s'auto-renouveler fréquemment à très long terme ainsi que la capacité de générer des cellules de différentes lignées et avec des fonctions distinctes. Plus particulièrement, on attribue aux CSH la propriété de pouvoir reconstituer le système lymphohématopoïétique d'un hôte animal irradié suite à une transplantation (Yoder et al., 1997). Cette reconstitution ne résulte pas de la conversion spontanée des CSH en cellules matures, mais de la différenciation régulée et progressive des cellules souches primitives en intermédiaires moins primitifs. En outre, toutes les cellules souches ne sont pas capables de reconstitution à long-terme. On distingue les *long-term* (LT)-CSH des *short-term* (ST)-CSH de par leur capacité à reconstituer un hôte de façon définitive. Les hôtes irradiés avec une dose létale doivent rapidement recevoir des CSH pour reconstituer leur système hématopoïétique pour survivre. Les ST-CSH sont capables de reconstituer le compartiment hématopoïétique de souris irradiées en 12 semaines. Les LT-CSH sont quant à elles capables de reconstituer et perdurer chez les hôtes murins après 20 à 30+ semaines suivant la greffe. De même, les progéniteurs dérivant des cellules souches possèdent un léger potentiel d'auto-renouvellement se détériorant à mesure que ceux-ci deviennent moins primitifs.

L'auto-renouvellement et le maintien à long-terme sont naturellement discernables par des études de transplantation et de culture, mais on peut également isoler les cellules possédant ces qualités grâce à leur phénotype. Les CSH ne possèdent pas les marqueurs de surface extracellulaires typiques pour les lignées hématopoïétiques (Lin, *lineage markers* : CD3, B220, Mac-1, Gr-1, TER-119). Les CSH expriment également les marqueurs c-kit et Sca-1 (LKS pour Lin⁻, c-kit⁺ et Sca-1⁺). La population LKS présente un fort enrichissement en CSH et était longtemps le standard employé pour l'étude de ces cellules (Morrison et

al., 1995a). D'autres marqueurs tels les membres de la famille de récepteurs *signaling lymphocytic activation molecule* (SLAM) semblent également permettre de distinguer différents sous-types de CSH en se basant sur leur phénotype (Kiel et al., 2005; Kim et al., 2006). Aussi, le récepteur à activité tyrosine kinase Flk-2 a été rapporté comme étant un marqueur différentiel entre les LT-CSH et les ST-CSH (expression négative et positive respectivement) (Christensen and Weissman, 2001).

Les LT-CSH sont maintenues essentiellement en phase G_0 , soit en dehors du cycle cellulaire de réplication de l'ADN et de division. Il a été montré qu'environ 75% des LT-CSH restent en G_0 alors que 5% sont en phase S/ G_2 /M et 20% sont en phase G_1 (Cheshier et al., 1999). Les CSH du foie fœtal sont largement en état de prolifération (30%) (Morrison et al., 1995a), mais acquièrent un état de quiescence lorsqu'elles deviennent des CSH définitives. Néanmoins, ces CSH adultes demeurent prêtes à entrer en cycle rapidement pour répondre aux changements environnementaux. On peut détecter ces états de quiescence (préparation) et de prolifération par des signatures moléculaires particulières (Venezia et al., 2004). Ainsi, un faible pourcentage de la population de LT-CSH assure l'apport en cellules sanguines de chaque sous-type pendant que la majorité demeure en état de quiescence. Durant cette phase, les ST-CSH sont capables de réparer les dommages à l'ADN et ainsi conserver leur intégrité génomique (Ogawa, 1993). Il a par ailleurs été démontré que cet état de quiescence était critique au maintien à long-terme de cette population puisque la suppression du « checkpoint » du cycle cellulaire p21 chez les CSH menait à une abrogation de leur auto-renouvellement puis à une déplétion rapide due à une mort prématurée (Cheng et al., 2000). Les gènes de la famille *Polycomb* (Polycomb Group, PcG), impliqués dans la répression de gènes par régulation épigénétique, jouent également un rôle dans la régulation de la quiescence chez les CSH. Le gène *Bmi1*, dont la protéine encodée fait partie du *Polycomb repressive complex 1* (PCR1), est essentiel au maintien de la capacité d'auto-renouvellement des CSH car il réprime le locus $p16^{Ink4a}/p14^{Arf}$ (p19 chez la souris) responsable d'inhiber la division cellulaire (Iwama et al., 2004; Park et al., 2003). De plus, il a été montré que le gène *Ezh2*, membre du *Polycomb repressive complex 2*

(PCR2) est nécessaire pour l'expansion des CSH de foie fœtal (Mochizuki-Kashio et al., 2011). L'entrée en cycle durant la différenciation permet d'éliminer les cellules qui ont subi des dommages ou qui sont sénescents, donc de préserver une population saine de CSH.

Les mécanismes régulant le choix entre le maintien à long-terme par auto-renouvellement et la différenciation des CSH ont longuement été étudiés. On a tenté dans le passé d'expliquer comment les propriétés apparemment antagonistes de longévité et plasticité, particulières aux cellules souches, pouvaient se concilier. On a initialement pensé que la sélection de la voie d'auto-renouvellement était gouvernée par des facteurs indéterminés et aléatoires, mais exprimés par des probabilités fixes, soit le modèle stochastique (Ogawa, 1993). Plusieurs modèles présentant quelques variations ont été proposés, basés sur le nombre de divisions effectuées préalablement par les CSH ou suggérant l'existence de clones de CSH intrinsèquement plus prolifératifs. Cependant, ces modèles demeuraient peu concluants puisqu'ils étudiaient des populations mixtes plutôt que les CSH directement puisque les moyens pour les isoler étaient limités. En contraste, les modèles plus récents et mieux acceptés se basent sur des constatations telles que l'isolement par leur phénotype de cellules à fort potentiel prolifératif, lequel décroît avec le gain de maturité (et d'engagement) des cellules. On parle ainsi de modèles déterministes puisqu'on peut prédire le potentiel d'auto-renouvellement d'une cellule ou population de cellules d'après certaines observations tel le phénotype. Ces modèles sont appuyés par des études qui démontrent que le renouvellement des CSH ne s'effectue pas à travers la totalité de la population par rotation progressive, mais est plutôt accompli par une population de CSH dite dormante (van der Wath et al., 2009). Ces modèles n'excluent pas que les facteurs externes tels des signaux extrinsèques ou environnementaux (cytokines, facteurs de transcription) ou un stress hématopoïétique affecte le choix de division (Morrison et al., 1995b; Viswanathan and Zandstra, 2003). Les CSH doivent ainsi posséder un programme leur permettant de bloquer l'une ou l'autre des voies.

1.1.1 Homéostasie des CSH

Tel que décrit plus haut, des facteurs intrinsèques vont déterminer le potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation des CSH en condition physiologique. Néanmoins, ces cellules forment ensemble une population stable dont le nombre se voit régulé de lui-même par des mécanismes homéostatiques. Cette population appartient à une niche, laquelle définit son environnement, sa taille et tous les facteurs auxquels elle est exposée. Le concept d'une niche hématopoïétique fut proposé pour la première fois en 1978 par Schofield et demeure un sujet d'étude majeur (Schofield, 1978).

Les CSH résident essentiellement dans la moelle osseuse, où on les retrouve à proximité de cellules stromales de l'endosteum dans la cavité médullaire. Les CSH doivent interagir avec les ostéoblastes localisés dans la niche endostéale (Arai et al., 2004). Les ostéoblastes sont connus pour soutenir le maintien des CSH en leur procurant des facteurs de croissance essentiels, notamment le *granulocyte monocyte colony stimulation factor* (GM-CSF), l'interleukin 6 (IL-6), le ligand kit, la chimiokine CXCL12 ou *stroma-derived factor* (SDF-1) et les ligands de Notch (Calvi et al., 2003; Taichman and Emerson, 1994). Il a été postulé que la niche ostéoblastique est non seulement nécessaire à la survie des CSH mais régule également leur état de quiescence (Arai and Suda, 2007).

L'homéostasie des CSH est liée avec la détermination du choix de division (modèle stochastique vs déterministe). Afin de maintenir un nombre constant de la population chez l'adulte, les CSH vont effectuer une division asymétrique produisant une cellule fille identique à la cellule mère et une cellule différenciée ne possédant pas de capacité d'auto-renouvellement (Figure 2). De ce fait, le nombre de cellules souches pluripotentes reste inchangé. Il s'agit ici d'un mécanisme assurant une régulation homéostatique des CSH tel que dicté par les facteurs de survie et de croissance limitants fournis par la niche ostéoblastique. Il a été suggéré que lors de cette division asymétrique, les composants cellulaires (ARNm ou protéines) se distribuent de façon polarisée. En conséquence, la mitose qui s'ensuit générerait deux cellules distinctes (Wilson and Trumpp, 2006).

Lors de l'auto-renouvellement, les CSH peuvent également entreprendre une division symétrique, générant ainsi deux cellules souches filles identiques à la cellule mère. Ce processus mène à un dédoublement des cellules souches pluripotentes et ainsi une expansion de la population de CSH. Les CSH effectuent une expansion massive lors de l'ontogénie alors que leur nombre doit être établi et procèdent largement à un auto-renouvellement de maintien durant la vie d'adulte.

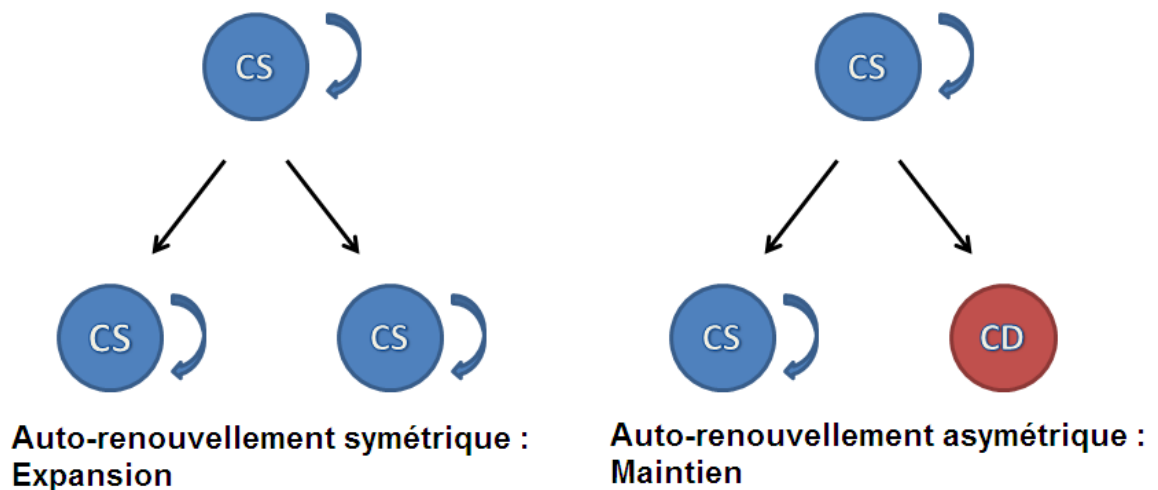


Figure 2. Auto-renouvellement des cellules souches. Les CSH peuvent effectuer un auto-renouvellement symétrique où elles génèrent deux cellules-filles identiques à la cellule mère suite à la division menant à une expansion de la population. Les CSH peuvent également effectuer un auto-renouvellement asymétrique et générer une cellule fille identique à la cellule mère et une cellule différenciée. CS, cellule souche; CD, cellule différenciée.

Le choix d'exécuter une division menant à l'expansion ou au maintien de la population repose sur des facteurs extrinsèques tels le microenvironnement fourni par la niche et de facteurs intrinsèques. Maintenir un équilibre homéostatique implique que les CSH soient capables de proliférer activement lorsque la niche le permet. Afin de conserver

une population relativement constante en nombre, les CSH doivent être capables de répondre à un stress hématopoïétique. Ce stress peut être induit par un agent chimiotoxique, par exemple le 5-fluorouracil (5-FU) ou par l'introduction d'une nouvelle niche essentiellement vacante (greffe d'un hôte irradié). En effet, bien que les CSH restent largement en état de quiescence, elles peuvent procéder à une expansion massive lorsque la niche est déplétée afin de remplacer les cellules perdues (Wilson et al., 2008). Ce processus est soutenu et accéléré par la niche elle-même et les facteurs qu'elle procure (ter Huurne et al., 2010). Il est cependant important de noter qu'après une transplantation de moelle osseuse, l'expansion des CSH n'est pas comparable à celle qu'elles subissent lors de la colonisation du foie fœtal et ceux-ci ne parviennent pas à atteindre à nouveau les niveaux physiologiques normaux (Harrison et al., 1990).

1.1.2 Facteurs pouvant réguler l'homéostasie des CSH

En plus des cytokines fournies par la niche, l'homéostasie des CSH est régulée par d'autres facteurs extrinsèques tels les facteurs activant certaines cascades de signalisation. Spécifiquement, des facteurs tels que Wnt ont été rapportés comme jouant un rôle dans le maintien des CSH en favorisant leur prolifération accélérée (Reya et al., 2003). L'inhibition des Wnt a par ailleurs des effets nocifs sur la formation et le maintien des CSH (Luis et al., 2012). Le facteur de transcription Notch, impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques, est fourni par les ostéoblastes et est un facteur clé de l'induction de la prolifération des CSH *ex vivo*. Ce signal est essentiel suite à un stress hématopoïétique, mais est dispensable lorsque l'homéostasie est rétablie (Varnum-Finney et al., 2011; Varnum-Finney et al., 2000).

La prolifération des CSH est également modulée par des régulateurs transcriptionnels agissant sur la chromatine par régulation épigénétique, soit la méthylation de l'ADN ou la modification des histones. Parmi ces régulateurs épigénétiques, les répresseurs transcriptionnels membres de la famille PcG et activateurs transcriptionnels membres de la famille *Trithorax group* (TrxG) sont particulièrement importants. Les gènes PcG répriment les gènes suppresseurs de tumeurs (p16 et p19) ce qui favorise l'entrée en

cycle (Konuma et al., 2010). Plus particulièrement, l'oncogène *Bmi1* est essentiel au renouvellement et à la survie des CSH puisque son abrogation mène à l'arrêt de la prolifération et l'apoptose (Lessard and Sauvageau, 2003) et sa surexpression augmente leur division symétrique tout en maintenant les propriétés de cellules souches (Iwama et al., 2004). Similairement, l'inactivation de *Mll5*, membre de la famille TrxG, a un effet drastique sur l'homéostasie et le potentiel de repopulation des CSH (Zhang et al., 2009).

D'autres facteurs intrinsèques figurent également parmi les régulateurs importants de l'homéostasie des CSH. Des facteurs majeurs de leur expansion sont les gènes de la famille Homeobox (*Hox*).

1.1.2.1 Les gènes *Hox*

Les gènes de la famille *Hox* sont des gènes codant pour des facteurs de transcription capables de se lier à l'ADN par leur domaine homeobox (Desplan et al., 1985; Fainsod et al., 1986). Ce domaine de 183 paires de base fut découvert chez la drosophile (McGinnis et al., 1984). Ces gènes sont également présent chez les mammifères où ils présentent une forte homologie de séquence intra et inter espèce reflétant un haut niveau de conservation à travers l'évolution (Gaunt, 1994; Morgan, 1997; Rabin et al., 1986). Ces gènes jouent un rôle important au niveau de l'organisation du plan corporel lors du développement embryonnaire et dictent l'identité des segments puis ultimement des membres du corps. Ces gènes sont de ce fait extrêmement importants puisqu'ils contrôlent l'expression d'une multitude d'autres gènes. Ils sont par ailleurs surnommés les gènes maîtres du contrôle. Ils furent nommés *Homeobox* puisqu'une seule mutation est nécessaire pour affecter les gènes qui se trouvent en aval et causer des mutations dites homéotiques, par exemple la polydactylie (Tabin, 1992; Zakany et al., 1997), la duplication d'une structure du corps à un autre endroit (antennapedia et bithorax chez la drosophile) ou se traduisant parfois par des malformations létales (Hombria and Lovegrove, 2003).

Chez les mammifères, on compte 39 gènes *Hox* organisés en quatre complexes, nommées *a*, *b*, *c* et *d*, d'après leur homologie de séquence. Chaque complexe comporte jusqu'à 13 gènes (*a1*, *a2*, ..., *a13*) et sont issus d'une duplication en plus d'une délétion de

certaines gènes survenue très tôt au cours de l'évolution (Pendleton et al., 1993). Ces gènes régulent l'identité des segments embryonnaires qui déterminent le plan corporel de l'adulte et leur arrangement ordonné allant dans le sens 3' à 5' reflète l'organisation de l'axe antéropostérieur (A/P) (Burke et al., 1995; Kessel and Gruss, 1990). Ainsi, les gènes en amont (1, 2, 3, ...) seront exprimés plus tôt lors du développement et révèlent l'identité des segments antérieurs alors que ceux en aval (... , 11, 12, 13) façonnent les segments postérieurs (Zakany and Duboule, 1999) (Figure 3). On parle ainsi d'un phénomène de colinéarité spatiale et temporelle. Par ailleurs, les gènes du cluster *a* sont exprimés plus tôt dans le développement que ceux du cluster *d* (Coletta et al., 1994).

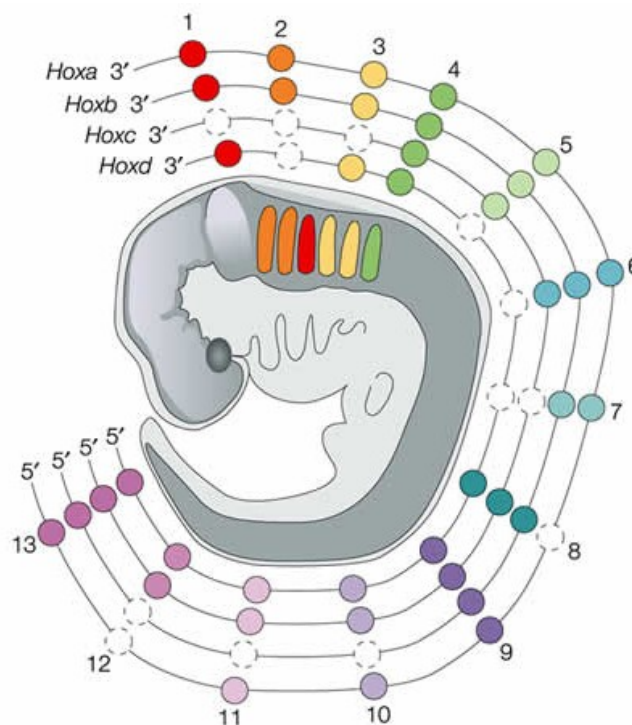


Figure 3 : Les gènes et le développement embryonnaire. Les 39 gènes *Hox* sont répartis en 4 clusters. L'expression des gènes *Hox* est qualifiée de colinéaire car elle s'ordonne dans le temps et l'espace. L'identité des segments plus antérieurs de l'embryon est régulée par les gènes situés en amont (3') du cluster et les segments plus postérieurs en aval (5'). Adaptée de Santagati, F., and F.M. Rijli. 2003. Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nature reviews. Neuroscience* 4:806-818.

Les gènes *Hox* ne jouent toutefois pas seulement un rôle lors du développement embryonnaire. En effet, plusieurs études ont démontré des effets importants sur diverses fonctions physiologiques adultes lorsqu'un ou plusieurs gènes *Hox* sont supprimés. Entre autres, l'effet de la délétion du paralogue *Hoxa9*, *Hoxb9* et *Hoxd9* affecte le développement des glandes mammaires durant et après la période de gestation chez la souris (Duboule, 1999). L'idée que les gènes *Hox* soient également impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse fut proposée lorsqu'il fut découvert que leur expression colinéaire se reflétait également dans la hiérarchisation de la différenciation des lignées hématopoïétiques (Magli et al., 1991). On rapporte en effet que l'expression des gènes *Hox* (plus particulièrement ceux en aval) diminue à mesure que les cellules gagnent en maturité et se différencient (Sauvageau et al., 1994). Des études ont par ailleurs montré que l'expression des gènes du cluster *Hoxa* semble être requise pour l'hématopoïèse définitive puisqu'ils représentent les gènes les plus exprimés des fractions hématopoïétiques primitives et que l'ablation de seulement un allèle du locus entier est suffisant pour perturber ce processus et causer un biais de différenciation (Lebert-Ghali et al., 2010).

Plusieurs de ces gènes sont capables de moduler l'expansion de cellules hématopoïétiques à différents niveaux de maturité. Par exemple, des études de surexpression ont démontré l'implication de *HOXB3* dans l'induction de la prolifération des cellules myéloïdes (Sauvageau et al., 1997), le potentiel de *HOXA10* à sélectionner les progéniteurs mégacaryocytes pour abolir les autres lignées et causer des leucémies myéloïdes (Magnusson et al., 2007; Thorsteinsdottir et al., 1997), la capacité de *Hoxa9* à collaborer avec *Meis1*, un autre gène homeobox, pour transformer les cellules hématopoïétiques (Kroon et al., 1998). La surexpression de ces gènes *Hox* mène ainsi dans la plupart des cas à des leucémies.

Parmi ces gènes, le gène *Hoxb4* est d'un intérêt tout particulier puisqu'il a été démontré que lorsque surexprimé, il parvenait rapidement et significativement à accroître des populations de cellules hématopoïétiques très primitives *in vivo* et *in vitro* et possédait

un avantage compétitif marqué comparativement aux cellules contrôles (Voir figure 4)(Antonchuk et al., 2002; Helgason et al., 1996; Sauvageau et al., 1995).

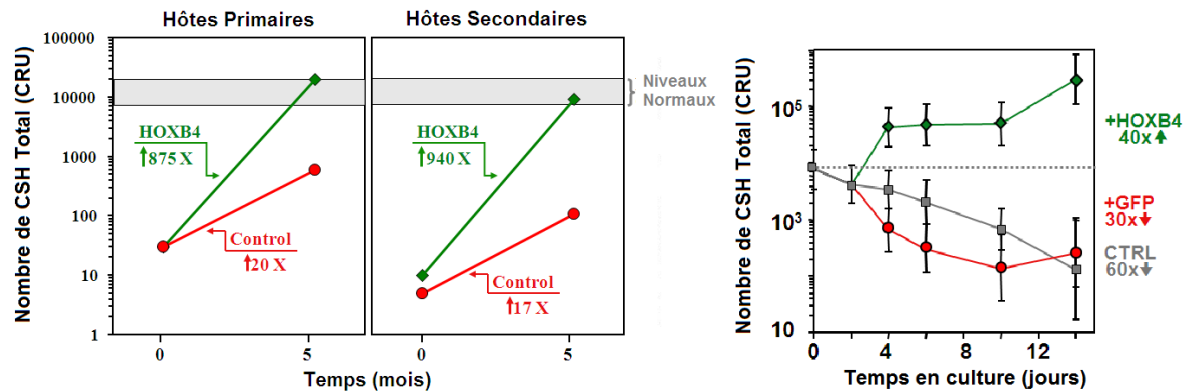


Figure 4. *HOXB4* induit l'expansion massive de CSH *in vivo* et *in vitro*. La surexpression rétrovirale de *HOXB4* chez les CSH induit une expansion significative par rapport aux CSH contrôles *in vivo* et ce même après transplantation dans des hôtes secondaires. Cette expansion est également observable en culture *in vitro*. Adaptée de Sauvageau, G., U. Thorsteinsdottir, C.J. Eaves, H.J. Lawrence, C. Largman, P.M. Lansdorp, and R.K. Humphries. 1995. Overexpression of *HOXB4* in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations *in vitro* and *in vivo*. *Genes & development* 9:1753-1765 et Antonchuk, J., G. Sauvageau, and R.K. Humphries. 2002. *HOXB4*-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. *Cell* 109:39-45. CRU, *competitive repopulating unit*.

Ces études ont démontré que *Hoxb4* parvenait à accroître les CSH suite à une greffe de moelle osseuse beaucoup plus efficacement que leurs homologues contrôles et ce à très long terme, sans affecter le potentiel de différenciation ou sans dépasser les nombres physiologiques normaux ou affecter leur fonction. Ceci suggère qu'il s'agirait d'un facteur essentiel et limitant pour la régénération hématopoïétique (Antonchuk et al., 2001; Thorsteinsdottir et al., 1999). Ces expériences ont pavé la voie du développement de thérapies d'infection rétrovirale *ex vivo* visant à accroître les CSH humaines en maintenant

leur propriétés (Antonchuk et al., 2002). Par ailleurs, des modèles plus appropriés à des applications cliniques de co-culture utilisant des cellules stromales pouvant produire la protéine HOXB4 furent également développés (Amsellem et al., 2003). L'expansion *ex vivo* des CSH représente une percée majeure dans l'amélioration des thérapies contre les leucémies, alors que présentement les transferts de moelle osseuse ne parviennent pas à atteindre les niveaux physiologiques espérés de CSH (Harrison et al., 1990).

Bien que les mécanismes par lesquels *Hoxb4* est capable d'induire cette expansion demeurent méconnus, certains des gènes cibles activés par ce gène sont connus. Entre autre, le gène *c-myc*, impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et favorisant la prolifération cellulaire, est un gène cible activé par *Hoxb4* et est capable d'induire l'auto-renouvellement de CSH lorsque surexprimé (Sato et al., 2004). Plusieurs autres gènes cibles liés à la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire, l'apoptose et l'auto-renouvellement des CSH furent identifiés (Forrester and Jackson, 2012). Néanmoins, l'activité de *Hoxb4* ne se reflète pas uniquement dans les gènes se trouvant en aval, mais également dans l'interaction avec des co-facteurs, tels que *Pbx* et *Meis*, ou d'autres activateurs transcriptionnels exprimés différemment selon les populations cellulaires et le contexte, induisant ainsi des réponses variées (Morgan et al., 2004). Il est à noter cependant que des mutants de la protéine Hox qui sont incapables de se lier aux protéines de la famille Pbx conservent leurs propriétés d'induction de l'expansion des CSH (Beslu et al., 2004).

1.1.2.2 La régulation des gènes *Hox*

Les gènes *Hox* sont des facteurs de transcription, dont leur expression est elle-même régulée par d'autres facteurs de transcription. Entre autres, ils sont sujets à des régulations épigénétiques médiées par des facteurs de transcription tels que PcG et TrxG (Lee et al., 2007; van Oostveen et al., 1999). *Bmi1*, un PcG trouvé chez les mammifères, est un facteur de transcription possédant un chromodomaine et est responsable de la répression des gènes en rendant la chromatine compacte (hétérochromatine) et indisponible pour être transcrite (van der Lugt et al., 1996). La présence des gènes PcG est par ailleurs plus marquée chez

les progéniteurs hématopoïétiques plus primitifs, suggérant un rôle important dans la régulation de l'hématopoïèse (Lessard et al., 1998). Cette importance a d'ailleurs été démontrée puisque la délétion de *Bmi1* cause des défauts d'auto-renouvellement et de repopulation chez les CSH (Takahara, 2008). À l'inverse, le gène *Mll*, membre de la famille TrxG chez les mammifères, induit une méthylation d'histone rendant la chromatine accessible à la transcription (euchromatine) activant ainsi la transcription des gènes *Hox*. Plusieurs leucémies sont associées à des translocations impliquant *Mll*, se traduisant par une expression aberrante et continue des gènes *Hox* (Eklund, 2011). De façon similaire à *Bmi1*, la délétion de *Mll* affecte la population quiescente des CSH et leur potentiel de repopulation (McMahon et al., 2007).

1.2 La différenciation des CSH en lignées distinctes

Le sang assure maintes fonctions vitales de l'organisme et pour ce faire, sa composition est très variée. Le sang approvisionne en oxygène et en énergie toutes les cellules du corps, soutient la régénérescence des tissus endommagés, et défend l'organisme contre les attaques des pathogènes. Les cellules matures du sang sont divisées en trois catégories distinctes : la lignée mégakaryocyte/érythroïde, la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde (Figure 1).

1.2.1 La lignée mégakaryocyte/érythroïde

La lignée mégakaryocyte/érythroïde dérive du progéniteur mégakaryocyte/érythroïde (*megakaryocytic/erythroid progenitor*, MkEP ou MEP) lui-même dérivant du progéniteur commun myéloïde (*common myeloid progenitor*, CMP) (Klimchenko et al., 2009). Le MEP peut se différencier en érythrocytes, premières cellules sanguines générées lors de l'hématopoïèse primitive, ou en mégakaryocytes capables de produire des thrombocytes ou plaquettes responsables de la coagulation du sang. Des tests de cultures en milieu semi-solide, la méthylcellulose, additionné de facteurs de croissance permettent d'identifier les progéniteurs de ces deux types cellulaires d'après l'apparence des colonies formées. Les colonies plus hétérogènes et donc plus primitives, correspondant

aux CMP, sont appelées *colony forming unit granulocyte/erythrocyte/macrophage/megakaryocyte* (CFU-GEMM) alors que les *colony forming unit erythrocyte* (CFU-E) et *colony forming unit megakaryocyte* (CFU-MEG) désignent les colonies moins primitives issues du MEP (Dzierzak and Medvinsky, 1995). Certains facteurs viennent réguler la différenciation du MEP, entre autres l'EPO et la thrombopoïétine assurent l'engagement vers les lignés érythroïde et mégakaryocyte respectivement.

1.2.2 La lignée myéloïde

Les cellules de la lignée myéloïde incluent les granulocytes (les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles), les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages. Ces cellules sont qualifiées de globules blancs (ou leukocytes) en contraste avec les globules rouges (ou érythrocytes). Elles proviennent tous du progéniteur granulocyte macrophage (*granulocyte macrophage progenitor*, GMP) lui-même dérivant du CMP. Tout comme les CFU-E et CFU-MEG, ce progéniteur est identifiable en culture, sous le nom de *colony forming unit granulocyte macrophage* (CFU-GM) (Dzierzak and Medvinsky, 1995). Les cellules matures de cette lignée sont des cellules immunes faisant partie du système immunitaire inné (ou non-spécifique). Elles ne permettent pas d'acquérir une immunité envers les pathogènes spécifiques susceptibles d'être rencontrés de nouveau, toutefois elles possèdent des mécanismes leur permettant de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs). Les cellules myéloïdes sont capables de phagocytose et jouent également un rôle crucial dans l'activation du système immunitaire adaptif. Parmi leurs fonctions les plus connues, celle de la présentation d'antigènes aux lymphocytes T génère beaucoup d'intérêt. Certaines cellules myéloïdes telles les monocytes, les cellules dendritiques et les macrophages sont qualifiées de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles.

1.2.3 La lignée lymphoïde

La dernière lignée hématopoïétique à émerger est la lignée lymphoïde. Celle-ci est divisée en trois branches principales : les cellules B, les cellules T et les cellules *natural*

killers (NK). Les lymphocytes se distinguent par leur large noyau relatif à leur cytoplasme, lorsque non activés. Les principaux progéniteurs de cette lignée, les progéniteurs lymphoïdes communs (*common lymphoid progenitors*, CLP), sont détectables dans le sac vitellin par co-culture avec des cellules stromales de moelle osseuse ou de thymus fœtal (Dzierzak and Medvinsky, 1995; Kondo et al., 1997). Cependant, ils ne forment une population stable que dans la moelle osseuse adulte, provenant des MPP qui y nichent. Ces progéniteurs peuvent générer des lymphocytes B, T et NK et sont incapables de reconstituer les autres lignées lorsque transplantés dans un hôte irradié (Karsunky et al., 2008).

Malgré le fait que certaines caractéristiques des lymphocytes B et T soient apparentés, notamment leur dépendance à l'IL-7, la genèse des cellules T quant à elle se distingue par plusieurs aspects.

Alors que la génération des cellules B se situe dans la moelle osseuse, les cellules T matures sont produites dans le thymus. Ce dernier est colonisé par des progéniteurs dérivant de la moelle osseuse qui entreprennent la thymopoïèse. Pourtant, le thymus ne possède pas de progéniteurs thymiques qui ont une capacité d'auto-renouvellement et de maintien et celui-ci dépend de l'apport continu en progéniteurs provenant de la moelle osseuse (Misslitz et al., 2006). Deux théories sont proposées concernant l'origine et l'identité de la cellule initiatrice de la thymopoïèse. L'une suggère que les MPP de la moelle osseuse se différencient en CLP qui perdent leur potentiel myéloïde et migrent vers le thymus où ils acquièrent rapidement un phénotype dit *double négatif 1* (DN1) et sont donc indétectables (Karsunky et al., 2008; Serwold et al., 2009). Cependant, les thymocytes les plus immatures, les DN1, que l'on qualifie de progéniteurs T précoce (*early T-lineage progenitors*, ETP) conservent un potentiel myéloïde non attribué aux CLP ce qui laisse croire qu'ils seraient plus apparentés aux MPP (Bell and Bhandoola, 2008), bien que ni les MPP ou les CSH ne parviennent à migrer d'eux-mêmes au thymus (Schwarz and Bhandoola, 2006). Les CLP semblent parvenir à coloniser le thymus et générer des cellules T (Saran et al., 2010), mais ils ne seraient pas les progéniteurs principaux responsables. Entre autre, il a été démontré que les cellules ayant tout juste pénétré le thymus n'ont pas de

potentiel lymphoïde B, suggérant qu'ils ne pouvaient provenir de CLP (Masuda et al., 2005). Finalement, des études phénotypiques, fonctionnelles et de cinétiques ont démontré que les ETP et CLP différaient l'un de l'autre, indiquant qu'il s'agirait de populations distinctes (Allman et al., 2003). Une hypothèse basée sur ces théories soutient que les CLP ne représentent pas une population homogène et donc ne correspondent pas à la source unique ou majoritaire de progéniteurs thymiques (Yang et al., 2010).

Un élément majeur dans la détermination de l'engagement vers les lignées lymphoïdes B ou T est la voie de signalisation Notch. Les protéines de la famille Notch (Notch1, Notch2, Notch3, Notch4) sont des récepteurs transmembranaires impliqués dans une multitude de processus développementaux. Ils reconnaissent les ligands Delta-like (DL1, DL2, DL3) et Jagged (Jag1 et Jag2). Ces protéines sont connues pour jouer un rôle dans les choix de différenciation binaire. Leur rôle est tout particulièrement étudié dans le choix de différenciation en lymphocytes B ou T (Radtke et al., 2010). Par ailleurs, les CSH qui viennent coloniser le thymus expriment le récepteur Notch1 et entre en contact avec les cellules épithéliales thymiques (*thymic epithelial cells*, TEC) qui eux expriment le ligand DL4 (Beaudette-Zlatanova et al., 2011; Mohtashami et al., 2010).

2. Le système immunitaire adaptatif

Pour se défendre contre l'abondance des pathogènes avec lesquels nous entrons en contact, les organismes pluricellulaires possèdent des lignes de défenses qui composent le système immunitaire. Chez les vertébrés, on retrouve un système immunitaire adaptatif dont les éléments produisent des réactions ciblées contre des pathogènes. Ce système est basé sur la reconnaissance d'antigène médiée par un vaste répertoire de récepteurs spécifiques présents chez les lymphocytes.

Les lymphocytes sont particulièrement efficaces à générer une réponse à grande échelle, coordonnée et délimitée en intensité et en temps par de nombreux facteurs. Grâce à leur très longue durée de vie, les lymphocytes T sont ainsi d'excellents candidats pour le développement de thérapies régénératives à long terme contre des pathogènes ciblés.

2.1 La réaction immunitaire médiée par les lymphocytes T

Les lymphocytes B et T sont capables d'engendrer des réactions immunitaires dirigées contre des pathogènes spécifiques. Les cellules T jouent un rôle crucial dans l'immunité cellulaire contre les cellules cancéreuses, les virus et autres parasites intracellulaires. Le succès de ces réponses immunitaires provient de la capacité à générer une pléthore de récepteurs pouvant reconnaître des pathogènes ayant développé des mécanismes d'évasion du système immunitaire inné, et maintenir un état d'alerte constant contre des réinfections. Ce processus se décompose en étapes précises.

2.1.1 Reconnaissance antigénique

Les lymphocytes T sont générés dans le thymus et passent par différents stades de développement. Ceux qui sont exportés du thymus intègrent la circulation sanguine puis demeurent en périphérie en tant que cellules T matures $CD4^+$ ou $CD8^+$ (Starr et al., 2003). Ces cellules sont dites « naïves » (T_n) quand elles n'ont pas encore rencontré l'antigène que leur récepteur de cellule T (RCT) reconnaît et peuvent demeurer dans l'organisme en

conservant un état de quiescence (Sprent et al., 2008; Tough and Sprent, 1994). Le RCT reconnaît uniquement les peptides présentés par les molécules du CMH présentes chez les CPA. Les cellules T CD4⁺ reconnaissent les peptides présentés par les molécules de classe II du CMH alors que les cellules T CD8⁺ sont restreintes aux peptides présentés par les molécules de classe I du CMH. Tandis que les molécules de classe I du CMH sont présentes chez toutes les cellules nucléées, les molécules de classe II du CMH ne sont uniquement présentes que chez les CPA professionnelles qui sont capables d'internaliser des antigènes par endocytose pour les présenter aux RCT des cellules T CD4⁺.

2.1.1.1 *Phases de la réponse des lymphocytes T*

Les T_n circulent dans le sang à travers l'organisme à la recherche de leur antigène et résident principalement dans les ganglions lymphatiques où ils peuvent rencontrer les cellules dendritiques, des CPA professionnelles. Celles-ci circulent dans l'organisme et internalisent puis expriment les peptides étrangers à la surface par leurs molécules du CMH qu'elles présentent ensuite aux T_n une fois qu'elles ont migré vers les ganglions lymphatiques.

Les T_n sont des cellules qui ne prolifèrent que très peu et ne se divisent que très rarement (Surh and Sprent, 2005). Ils expriment de hauts niveaux du récepteur de chimiokine CCR7 et de la L-sélectine CD62L, responsables du chimiotactisme et de l'adhésion des cellules T aux parois des veinules à endothélium épais (*high endothelium venules*, HEV) respectivement ce qui permet l'entrée des cellules dans les ganglions lymphatiques par diapédèse (Link et al., 2007). Lors d'une infection, les T_n vont inspecter les cellules dendritiques à la recherche de l'antigène pour lequel leur RCT est spécifique. Lorsque le RCT reconnaît le peptide ancré dans les molécules du CMH (complexe peptide/CMH) et que les signaux de co-stimulation sont présents, il y a activation des cellules T. Les T_n entrent alors en phase effectrice caractérisée par une prolifération massive et une différenciation en cellules T effectrices (T_e). Les T_n se mettent alors à changer de phénotype en exprimant différents niveaux de marqueurs extracellulaires. Une

cellule T activée se différencie en cellules T effectrices (Te) alors qu'elle entre en phase de prolifération que l'on appelle la phase d'expansion clonale. Elle se met alors à changer son phénotype en régulant à la baisse ou à la hausse certains marqueurs. Ces changements permettent de suivre l'évolution des populations à travers la réaction immune. Le tableau 1 résume l'expression différentielle de marqueurs sélectionnés associés à des fonctions ou phénotypes chez les cellules T.

Tableau 1 : Marqueurs naïfs et mémoires des lymphocytes T

Marqueurs	CD4				CD8			
	Tn	Te	Tcm	Tem	Tn	Te	Tcm	Tem
CD44	bas	haut	haut	haut	bas	haut	haut	haut
CD62L	haut	bas	haut/bas*	bas	haut	bas	haut	bas
1B11	bas	haut	bas	haut	bas	haut	bas	haut
CD127	int/haut	nég/bas	haut	haut	int/haut	nég/bas	haut	haut
Sca-1	bas	n.d.	haut	haut	bas	n.d.	haut	haut
Ly6C	bas	n.d.	haut	haut	bas/int	bas/int	haut	haut
CD122	nég/bas	int/haut	nég/bas	nég/bas	bas	haut	haut	haut
CCR7	haut	nég/bas	haut	nég/bas	haut	nég/bas	haut	nég/bas
CD28	bas/int	haut	haut	haut	bas/int	haut	haut	haut
CD25	bas	haut	bas	bas	bas	haut	bas	bas
Bcl-2	int/haut	bas	haut	bas/int	int/haut	bas	haut	bas/int

* Dépend de l'espèce humain/souris
n.d. = non déterminé

Malgré leur très fort potentiel prolifératif, les Te ont une très courte durée de vie puisque leur prolifération n'est pas soutenue à long terme. À la suite d'une réaction immune, le pathogène ciblé est éliminé de l'organisme grâce aux fonctions effectrices des Te. Ceux-ci disparaissent rapidement par apoptose, excepté une faible population (5-10%) de ces cellules qui échappent à la mort cellulaire (Badovinac et al., 2002). Ces cellules peuvent alors se différencier en cellules que l'on qualifie de T mémoires (Tm) car elles assurent une protection contre les antigènes qu'elles ont déjà éliminés et procurent alors une mémoire immunologique. Lorsqu'elles entrent à nouveau en contact avec un antigène rencontré lors d'une infection antérieure, ces Tm vont répondre à une re-stimulation de façon immédiate en acquérant des fonctions effectrices. De ce fait, les Tm sont capables de monter des réponses immunes secondaires plus fortes, plus sensibles et plus rapides que les

réponses immunes primaires. En comparaison, une réponse immune primaire montée par des Tn est moins rapide puisque la reconnaissance de l'antigène nécessite plus de temps et ne parvient ainsi pas à prévenir l'infection. Contrairement aux Tn, les Tm sont caractérisés par la capacité de rapidement produire des cytokines après une courte stimulation antigénique (Kambayashi et al., 2003). L'infection ne peut alors se propager et l'organisme se trouve immunisé tant que les Tm sont présents. Néanmoins, à l'inverse des Te, les Tm demeurent en état de quiescence après la résolution de l'infection. De plus, contrairement aux Tn, les Tm sont capables de s'auto-renouveler ce qui assure le maintien de leur population (Bourgeois and Stockinger, 2006; Dalai et al., 2011; Fearon et al., 2001). Cette caractéristique est également retrouvée chez les CSH, une population cellulaire qui doit également se maintenir tout au long de la vie de l'organisme. La mémoire immunologique repose alors sur le fait que les Tm forment une population de cellules qui demeurent très longtemps dans l'organisme en conservant leurs propriétés et spécificité.

Les Tm sont souvent étudiés en laboratoire par le biais de modèles transgéniques monoclonaux suite à la résorption d'une réponse immune ciblée lors d'une infection. Ces Tm dits infectieux possèdent la même spécificité antigénique et la même cinétique de réaction ce qui facilite leur étude.

En plus des Tm dits infectieux qui proviennent d'une stimulation par un antigène étranger, il existe des Tm générés naturellement dits « *memory phenotype* » (Tmp). Ces Tmp sont généralement étudiés en modèles non infectieux, et peuvent même être générés spontanément dans des souris élevées en conditions « *specific pathogen free* » (exempts de pathogènes spécifiques) (Pereira et al., 1986; Vos et al., 1992). Ces Tmp proviennent d'interactions du RCT avec les peptides du soi et commensaux, cependant il s'agit d'interactions faibles et de courte durée. Les Tmp ainsi générés possède un profil semblable aux Tm infectieux conventionnels, mais dépendant de signaux de survie différents (Surh and Sprent, 2008). De plus, les Tmp possèdent également des propriétés anti-tumorales ainsi qu'un profil transcriptionnel apparentés aux Tm infectieux (Dummer et al., 2002; Goldrath et al., 2004).

En conditions physiologiques, les Tmp s'accumulent lentement dans l'organisme, mais leur génération peut être induite en situation de lymphopénie (Boyman et al., 2012; Goldrath and Bevan, 1999; Kieper and Jameson, 1999). Généralement, les Tn se maintiennent par des mécanismes homéostatiques soutenus par certains signaux de survie. Cependant, lorsque le nombre de cellules T périphériques se voit diminuer, ou encore lorsque les Tn sont introduits dans un nouvel environnement entièrement dépourvu de cellules T (transfert adoptif dans un hôte lymphopénique), ces derniers vont procéder à une prolifération homéostatique accélérée et transiter vers un phénotype mémoire et devenir des Tmp. Cette prolifération induite par la lymphopénie (PIL) requiert aussi une interaction avec les molécules du CMH et peptides du soi de faible affinité en plus de cytokines (Seddon and Zamoyska, 2002; Sharma et al., 2009). En plus d'exhiber les mêmes marqueurs mémoires, les Tmp acquièrent aussi des fonctions mémoires, les rendant presque indiscernables des vrais Tm ayant rencontré un antigène étranger (Cho et al., 2000; Goldrath and Bevan, 1999; Kieper and Jameson, 1999; Murali-Krishna and Ahmed, 2000; Tanchot et al., 2002). Entre autres, il a été démontré chez des souris transgéniques monoclonales non immunisées que les Tmp proviennent en partie de réactions immunes contre des antigènes étrangers et ce même en milieu exempt de pathogènes (Haluszczak et al., 2009; Sprent and Surh, 2011). De plus, ces Tmp ont le potentiel de reconnaître d'autres antigènes étrangers auxquels ils n'ont pas été exposés à des degrés variés d'affinité étant donnée la très grande variabilité de leurs récepteurs polyclonaux. De ce fait, ils sont impliqués dans les réactions immunes au même titre que les Tmp infectieux.

Malgré leurs similitudes, les Tmp se distinguent des Tm infectieux de plusieurs façons. Les Tm infectieux possèdent un avantage compétitif par rapport aux Tmp lorsqu'ils sont introduits dans le même environnement (Cheung et al., 2009). Les Tmp ne parviennent pas à monter une réponse immune secondaire aussi forte et d'aussi longue durée que les Tm infectieux. De plus, les Tmp semblent avoir un défaut au niveau de leur parcours migratoire comparativement aux Tm infectieux (Cheung et al., 2009).

Les T_m infectieux restent à ce jour plus étudiés et plusieurs modèles furent proposés afin déterminer comment leur génération se produisait. Les T_{mp}, bien que générés en fréquences et conditions différentes, sont tout de même issus d'une activation via le RCT et peuvent être intégrés à ces modèles.

2.1.2 Génération des T_m

Plusieurs théories furent avancées quant au processus de génération des T_m. L'élucidation de cette question permettrait entre autres de mieux comprendre et cibler les facteurs permettant la production de T_m et l'établissement d'une mémoire immunologique compétente.

2.1.2.1 Modèles de développement des T_m

Il existe des modèles qui suggèrent que la détermination de la génération de la mémoire s'effectue au moment de la stimulation antigénique d'après l'intensité de l'interaction RCT/CMH-peptide (Zehn et al., 2012). Généralement, ces modèles impliquent que les T_n passent par un stade T_e avant d'atteindre un stade T_m. On parle alors de modèles de différenciation linéaire (Bannard et al., 2009; Farber, 1998; Pepper and Jenkins, 2011). Les critères venant dicter cette différenciation peuvent cependant varier d'un modèle à l'autre. Chez les cellules T CD8⁺, il a été démontré que la génération de T_m était fortement influencée par l'intensité et la qualité des interactions RCT/CMH-peptide (Leignadier and Labrecque, 2010). Certains modèles vont favoriser le nombre d'interactions RCT/CMH-peptide comme déterminant majeur de la différenciation en T_m (Leignadier et al., 2011), d'autres vont privilégier la durée de l'interaction (Kaech et al., 2002). En outre, le modèle linéaire progressif suggère que le retrait progressif de l'antigène dans le milieu amène une diminution de la prolifération des T_e et vient changer progressivement la nature des signaux activateurs et de survie des T_m à mesure que l'infection se dissipe (Lanzavecchia and Sallusto, 2005; Wherry and Ahmed, 2004). Plusieurs auteurs ont proposé que les différents sous-types de T_m existants proviennent ainsi de degrés de différenciation correspondant à différents degrés et temps d'activation.

Il existe également des modèles qui suggèrent que la différenciation en T_m est plutôt préprogrammée chez les T_n et que ceux-ci deviendraient des T_m sans passer par le stade T_e (Chang et al., 2007; Lauvau et al., 2001; Manjunath et al., 2001; Moulton et al., 2006). Ce modèle que l'on appelle divergent présuppose que les T_n vont directement acquérir les fonctions mémoires lors de la première division suite à l'activation. Ainsi, en se basant sur des caractéristiques observées chez les cellules souches, il a été proposé que les T_n effectueraient des divisions asymétriques afin de générer des cellules filles différentes (Chang et al., 2007). Cette asymétrie proviendrait d'une polarisation du contenu cellulaire en une fraction proximale (vers le RCT interagissant avec le CMH-peptide) et une fraction distale (à l'opposé de la synapse immunologique) (Chang and Reiner, 2008; Oliaro et al., 2010). Ce phénomène fut également observé chez les T_m suite à une réponse immunitaire secondaire (Ciocca et al., 2012). Ce modèle est entre autre supporté par des études génétiques comparatives qui démontrent que les T_m s'apparenteraient plus aux T_n qu'aux T_e et que leur production se feraient ainsi parallèlement (Holmes et al., 2005).

2.1.2.2 *Signaux et facteurs de transcription contrôlant le développement des T_m*

La transition vers les T_m requiert plusieurs signaux. Tel que mentionné plus haut, les T_m infectieux nécessitent une stimulation antigénique via des interactions RCT/CMH-peptide en plus des signaux des molécules de co-stimulation. La génération des T_{mp} requière plutôt des interactions faibles avec les peptides du soi pour les T_n lorsqu'en situation de lymphopénie. Il a été démontré que le facteur de transcription Blimp-1 avait un effet négatif sur la génération de T_m CD8⁺ puisque sa délétion entraînait une accumulation des T_m (Kallies et al., 2006; Martins et al., 2006; Rutishauser et al., 2009), mais que le facteur de transcription Bcl-6 avait un effet antagoniste sur celui-ci (Crotty et al., 2010; Ichii et al., 2004; Johnston et al., 2009). Inversement, la fréquence des T_m CD8⁺ après activation est largement diminué chez les hôtes Bcl-6^{-/-} alors que la surexpression de ce gène favorise leur génération (Ichii et al., 2002).

De plus, des études ont soulevé l'importance des éléments de la signalisation de Wnt dans ce processus. La cascade de signalisation Wnt est un élément critique de la régulation de l'auto-renouvellement des CSH (Reya et al., 2003). Tcf-1, un facteur de transcription activé par cette cascade de signalisation, est nécessaire à la différenciation en Tm de par son induction de l'expression des molécules Bcl-2 et IL-2R β ainsi que son interaction avec Eomesdermin (Zhou et al., 2010). Au moment de la transition vers la phase mémoire, les cellules T destinées à devenir des Tm expriment de hauts niveaux de Tcf1 et Lef1 et leur délétion entraîne une perte de la génération de la mémoire immunologique (Jeannet et al., 2010; Zhao et al., 2010). Par ailleurs, la signalisation de Wnt, induite par le ligand Wnt3 ou des inhibiteurs de la GSK3 β a montré une augmentation de l'expression de Tcf1 et Lef1, qui sont deux facteurs associés à la formation de la mémoire immunologique (Cui and Kaech, 2010; Gattinoni et al., 2009). Cette augmentation menait à la génération forcée de Tm avec des propriétés de cellules souches accrues telles qu'une forte capacité d'auto-renouvellement et de différenciation.

Chez les cellules T CD4⁺, les facteurs de transcription qui ont des fonctions importantes au niveau de la formation de la mémoire immunologique sont moins bien connus. Tout comme chez les cellules T CD8⁺, l'expression de Bcl-2, un facteur anti-apoptotique, inhibe l'action du facteur pro-apoptotique Bim et est nécessaire à la génération de Tm, d'autant plus que sa surexpression mène à un surplus de cellules échappant à la phase de contraction (Wojciechowski et al., 2007). Également, le facteur de transcription Bcl-6 est absolument essentiel à la différenciation des cellules T *follicular helper* (Tfh), une population de cellules impliquée dans la réponse immune des cellules B dans les centres germinaux (Nurieva et al., 2009). Ce facteur joue également un rôle dans la formation des Tfh mémoires (Weber et al., 2012).

2.1.3 Caractéristiques et sous-populations des Tm

L'ensemble des Tm est essentiellement hétérogène et ceux-ci peuvent être séparés en différentes catégories selon les propriétés qu'elles arborent. Les Tn qui circulent en

périphérie expriment typiquement de faibles niveaux du marqueur d'activation CD44 (CD44^{lo}) (Surh and Sprent, 2005). En revanche, les Tm expriment de hauts niveau de ce marqueur et il a été suggéré qu'il pouvait jouer un rôle dans la survie des Tm en maintenant leur cycle cellulaire et en diminuant la susceptibilité à des facteurs pro-apoptotiques (Baaten et al., 2010).

Certains Tm exhibent un phénotype plus apparenté aux Tn en exprimant des marqueurs de migration tel que le CD62L et CCR7. Ces marqueurs identifient communément les Tm dit « mémoires centraux » (Tcm) qui demeurent généralement dans les organes lymphoïdes secondaires tels les ganglions lymphatiques et la rate où ils peuvent s'auto-renouveler lentement (Lefrancois and Marzo, 2006). L'autre catégorie de Tm, nommée « mémoires effecteurs » (Tem), résident plutôt dans les tissus non-lymphoïdes où ils s'auto-renouvellent peu fréquemment et demeurent à l'affût des antigènes étrangers. Ils n'expriment ni le CD62L ni le CCR7. Les marqueurs identifiant ces populations sont résumés dans le Tableau 1 et la Figure 5.

Les Tcm présentent des propriétés distinctes des Tem notamment en ce qui a trait à leur capacité d'auto-renouvellement à long terme (Macallan et al., 2004). Malgré le fait qu'elles produisent de plus faibles niveaux de cytokines que les Tem, suite à une re-stimulation elles peuvent rapidement acquérir des fonctions effectrices de nouveau et possiblement se différencier en Tem (Lefrancois and Marzo, 2006; Stemberger et al., 2009; Wakim and Bevan, 2010). Des études moléculaires ont effectivement démontré que les Tcm possédaient une signature génétique distincte se situant entre les Tn et Tem (Willinger et al., 2005).

Récemment, une équipe a tenté d'identifier une population de Tm qui seraient apparentée aux cellules souches de par ses propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation (Gattinoni et al., 2011; Gattinoni et al., 2009). Pour cette raison, cette population de Tm nouvellement découverte fut nommée de « stem cell memory » (Tscm). Ces cellules sont identifiées par leur phénotype CD44^{lo}CD62L^{hi}Sca-1^{hi}CD122^{hi}Bcl-2^{hi} et sont capables de se maintenir dans l'organisme à plus long terme, se divisent plus

rapidement et plus longtemps, ont un plus fort potentiel de différenciation vers les autres populations de Tm et un plus fort potentiel anti-tumoral que les Tn, les Tem ou les Tcm. Toutes ces qualités en font un candidat de choix pour le développement de thérapies immunes.

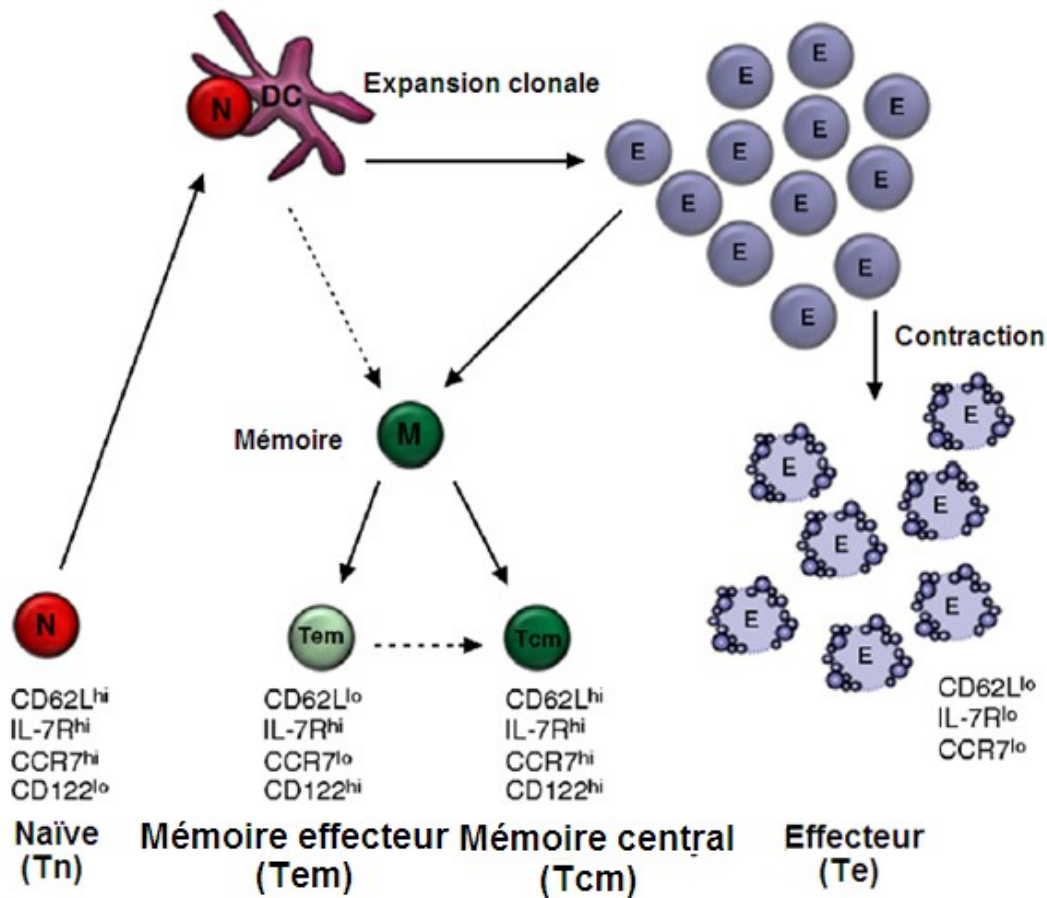


Figure 5. Les différents sous-types de la mémoire immunologique. Les Tm générés suite à la reconnaissance antigénique peuvent se différencier en Tem, caractérisés par une faible expression du CD62L, ou en Tcm, caractérisés par une forte expression du CD62L. Adaptée de Wakim, L.M., and M.J. Bevan. 2010. From the thymus to longevity in the periphery. *Current opinion in immunology* 22:274-278.

En dernier lieu, une étude de comparaison de signatures moléculaires fut réalisée entre les Tm et les CSH. Cette étude cherchait à comparer les profils transcriptionnels totaux de différentes populations (Tn, Tm, LT- et ST-CSH). Il a ainsi été montré que plusieurs transcripts, dont certains sont associés à la capacité d'auto-renouvellement et au maintien à long terme, se trouvaient enrichis chez les Tm et les LT-CSH (Luckey et al., 2006). Ceci vient renforcer l'idée que les mécanismes homéostatiques assurant le maintien de ces deux populations cellulaires pourraient être très apparentés.

2.1.4 Homéostasie des lymphocytes T

La population totale de cellules T dans l'organisme demeure relativement constante ce qui implique qu'il existe des mécanismes pour réguler leur homéostasie (Surh and Sprent, 2005). Les Tn sont générées par le thymus chez les jeunes organismes. Toutefois, alors que le thymus est particulièrement actif durant le début de la vie des organismes, il commence à s'atrophier chez l'adulte, réduisant ainsi le nombre de thymocytes générés (Linton et al., 2005). Les Tn en périphérie parviennent néanmoins à subsister dans le corps en recevant des signaux de survie. En contrepartie, les Tm et les Tmp sont maintenus par des mécanismes homéostatiques indépendants des Tn (Stockinger et al., 2004) et s'accumulent lentement dans l'organisme avec l'âge faisant en sorte que le ratio de Tm : Tn s'accroît peu à peu (Figure 6).

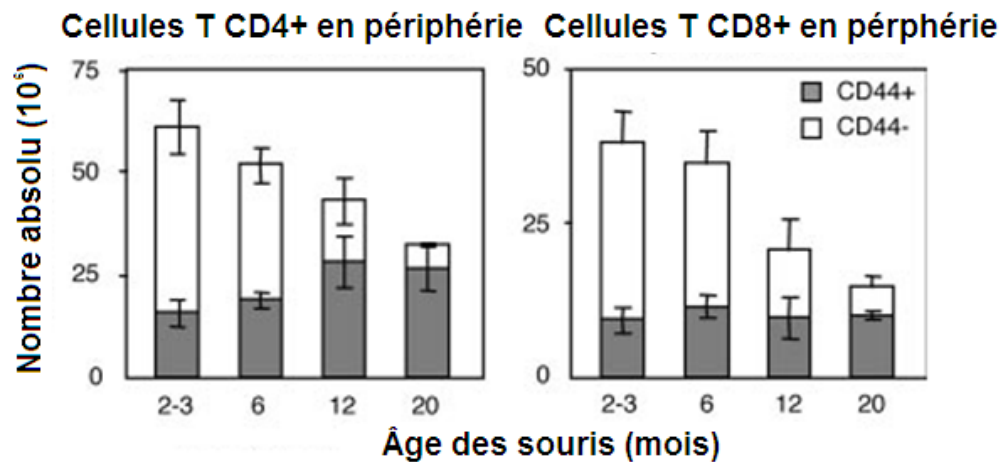


Figure 6. Nombre de Tn et Tm CD4⁺ et CD8⁺ en périphérie en fonction de l'âge. Adaptée de Bourgeois, C., G. Kassiotis, and B. Stockinger. 2005. A major role for memory CD4 T cells in the control of lymphopenia-induced proliferation of naive CD4 T cells. *Journal of immunology* 174:5316-5323.

Pour assurer leur maintien, les cellules T sont capables de prolifération basale désignée prolifération homéostatique et, lorsqu'il y a déplétion du compartiment T, elles peuvent entrer en prolifération accélérée dite prolifération spontanée. En situation de lymphopénie, les Tn et Tm ont des besoins similaires et se retrouvent ainsi en compétition pour recevoir les signaux de survie. Les Tm ont par ailleurs un avantage compétitif par rapport aux Tn lorsqu'en compétition puisqu'ils parviennent à inhiber la différenciation et maintien de ces derniers. Cet avantage compétitif est lié à diversité du répertoire RCT de chacun de sorte qu'une population ayant un répertoire plus varié parvient à supplanter l'autre (Bourgeois et al., 2005; Leitao et al., 2009; Min et al., 2004).

2.1.4.1 Homéostasie des Tn

Les Tn sont des cellules qui ne s'auto-renouvellent que très rarement. La taille de leur population est surtout dictée par le nombre d'émigrants thymiques qui réussissent à intégrer la périphérie d'après les facteurs limitant leur niche (Takada and Jameson, 2009). Le nombre d'émigrants thymiques dépasse largement le nombre de cellules T qui finissent

par intégrer la périphérie; il s'agit d'un processus qui est régulé par des mécanismes homéostatiques (Ma et al., 2011). En ce sens, la greffe de thymus multiples a pour effet d'augmenter le nombre d'émigrants thymiques récents présents en périphérie, mais le nombre de cellules intégrant de façon stable la population de Tn dépasse faiblement les niveaux normaux (Berzins et al., 1999). Tout comme l'activation antigénique des cellules T nécessite deux signaux (via le RCT et via les molécules de co-stimulation), les Tn dépendent en conditions physiologiques de signaux de survie fournis par des cytokines et par le contact avec les molécules du CMH (Guimond et al., 2005; Labrecque et al., 2001; Schluns et al., 2000; Takeda et al., 1996; Tanchot et al., 1997).

Les Tn CD4⁺ comme les CD8⁺ expriment de hauts niveaux de récepteurs aux cytokines, particulièrement le récepteur à l'IL-7. L'IL-7 est produite par les cellules stromales du thymus, des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse et est nécessaire tout au long de la vie des cellules T (Huang and Luther, 2012; Link et al., 2007; Surh and Sprent, 2005; von Freeden-Jeffry et al., 1995). Le récepteur à l'IL-7 est composé d'une chaîne alpha (IL-7R α ou CD127) et de la chaîne gamma commune (γ c ou CD132) retrouvée chez d'autres récepteurs dont les cytokines peuvent également moduler l'homéostasie des Tn (IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, IL-21) (Boyman et al., 2007). La signalisation de l'IL-7 agit comme un signal homéostatique et peut induire l'expansion des cellules T en hôtes lymphopéniques et *ex vivo* (Carrette and Surh, 2012; Rochman et al., 2009; Sun et al., 2006). À l'inverse, le transfert adoptif de Tn dans des hôtes IL-7^{-/-} abolie la survie et la prolifération homéostatique (Tan et al., 2001). La délétion du gène de l'IL-7 ou l'injection d'anticorps anti-IL-7 viennent également diminuer la survie et la prolifération des cellules T *in vivo* (Vivien et al., 2001). Étant donnée son importance dans le maintien des cellules T en périphérie, l'IL-7 est un facteur limitant de la niche Tn. Par exemple, la signalisation de l'IL-7 induit une plus forte réponse homéostatique chez les Tn CD8⁺, indiquant que les Tn CD4⁺ et CD8⁺ doivent employer des moyens différents et complémentaires pour ne pas nuire au maintien des Tn CD4⁺ (Ernst et al., 1999; Tan et al., 2002). Par ailleurs, pour réduire la compétition entre les différents compartiments et

maximiser le nombre de cellules T, l'expression du récepteur à l'IL-7 est régulée à la baisse suite à une induction de la signalisation de l'IL-7 (Park et al., 2004). De ce fait, les cellules T qui n'ont pas reçu les signaux de l'IL-7 expriment de plus hauts niveaux d'IL-7R et peuvent plus facilement les recevoir. Un des mécanismes par lesquels la signalisation de l'IL-7 parvient à induire le maintien homéostatique chez les Tn CD4⁺ et CD8⁺ est par la régulation de facteurs anti-apoptotiques tel Bcl-2 (Purton et al., 2007a; Schluns et al., 2000; Vivien et al., 2001).

Les Tn sont également maintenus en vie par des signaux homéostatiques fournis par l'interaction de faible affinité du RCT avec les molécules du CMH et des peptides du soi (Boyman et al., 2009; Rooke et al., 1997; Viret et al., 1999). Les Tn CD4⁺ et CD8⁺ sont graduellement perdus après transfert adoptif chez des hôtes déficients pour les molécules de classe II et I du CMH respectivement (Surh and Sprent, 2000). En effet, malgré le fait que lors de la thymopoïèse les thymocytes soient sélectionnés d'après la faible réactivité de leur RCT pour les antigènes du soi, les Tn en périphérie sont paradoxalement dépendants de ces interactions (Sprent and Cho, 2008; Takeda et al., 1996). Ces interactions ne sont toutefois pas aléatoires et se limiteraient d'après la spécificité du RCT sélectionné, engendrant ainsi une compétition pour les signaux de survie et une diversification du répertoire (Hataye et al., 2006; Leitao et al., 2009). Les différents mécanismes homéostatiques des Tn sont résumés dans la Figure 7.

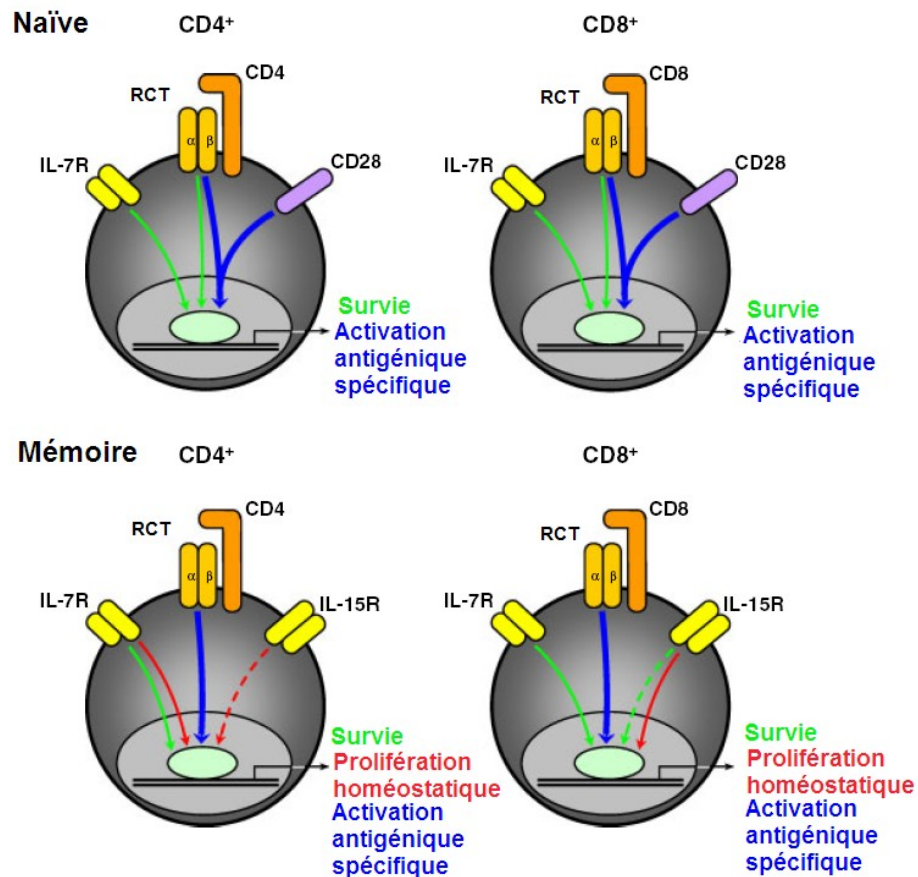


Figure 7. Signaux extrinsèques modulant l'activation, la survie et la prolifération des T_n et T_m. Les T_n dépendent de deux signaux pour l'activation antigénique (RCT/CMH-peptide et molécules de co-stimulation) ainsi que pour leur survie (RCT/CMH-peptides du soi et IL-7). Les T_m dépendent uniquement des cytokines (IL-7 ou IL-15) pour leur survie et maintien. Adaptée de Boyman O, Letourneau S, Krieg C, Sprent J: **Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells.** *Eur J Immunol* 2009, **39**:2088-2094.

2.1.4.2 Homéostasie des T_m

Les T_m répondent aussi à des signaux afin de maintenir leur nombre par des mécanismes homéostatiques. De ce fait, l'organisme est capable de se prévaloir d'être infecté à nouveau par les mêmes pathogènes, puisque les T_m conservent leur spécificité antigénique. De façon semblable aux T_n, les T_m nécessitent des cytokines pour survivre

(Schluns and Lefrancois, 2003). Notamment, les Tm requièrent l'IL-7 et l'IL-15 pour leur maintien ainsi que leur prolifération basale et spontanée (Purton et al., 2007b; Schluns et al., 2000).

L'IL-7 est abondamment disponible dans les organes lymphoïdes pour l'homéostasie des lymphocytes T (et B). Les niveaux d'IL-7 sont particulièrement élevés dans les ganglions lymphatiques, où les Tcm sont présumés nicher en partie à cause de leur expression du CD62L et CCR7 (Harp et al., 2010; Schuster et al., 2009). L'IL-7 est également abondant dans la moelle osseuse (Funk et al., 1995; Guimond et al., 2009; Hara et al., 2012). Il a été proposé que la moelle osseuse serait le réservoir des Tm CD8⁺, soit l'endroit où ces derniers se rendent pour proliférer et s'accumuler (Becker et al., 2005; Mazo et al., 2005). Les Tm CD8⁺ sont connus pour migrer vers la moelle osseuse où elles reçoivent des signaux induisant leur auto-renouvellement et subséquemment leur accumulation. Les Tm CD4⁺ quant à eux vont migrer et former une sous-population dans la moelle osseuse caractérisée par une forte expression du Ly6C (Tokoyoda et al., 2009). La moelle osseuse agit ici plutôt comme une niche où les Tm CD4⁺ s'y maintiennent de façon constante et où ils sont susceptibles de recevoir les signaux de survie nécessaires. Ainsi, la niche est nécessaire au maintien des Tm et n'engendre pas nécessairement une accumulation marquée de ceux-ci tels que dans le réservoir. La divergence des signaux présents dans l'environnement se traduit par un état métabolique cellulaire différent (quiescence versus prolifération) et par un phénotype et une fonctionnalité différents.

Les Tm sont également sensibles aux niveaux d'IL-15 présent dans le milieu. Alors que l'IL-15 est plutôt dispensable à l'homéostasie des Tn, il vient jouer un rôle important au niveau de la prolifération basale et spontanée des Tm (Guimond et al., 2005; Judge et al., 2002; Lodolce et al., 1998). La signalisation de l'IL-7 peut induire la prolifération homéostatique des Tm CD8⁺ en conditions normales (Kittipatarin and Khaled, 2009; Schluns et al., 2000). Toutefois les Tm CD8⁺ ne dépendent pas nécessairement de l'IL-7 puisque le traitement avec des anticorps bloquant l'IL-7 n'a que peu d'effet sur leur prolifération basale (Goldrath et al., 2002). En revanche, l'abolition de la signalisation de

l'IL-15 entraîne la perte des Tm CD8⁺. En situation de lymphopénie cependant, les Tm CD8⁺ dépendent de l'IL-7 et l'IL-15 et seul l'absence des deux cytokines abolie complètement leur prolifération spontanée (Goldrath et al., 2002; Tan et al., 2002). Chez les Tm CD4, on distingue également des besoins différents selon le type de Tm et l'environnement dans lequel ils se trouvent. L'IL-15 ne semble pas jouer de rôle en situation de lymphopénie ou les niveaux d'IL-7 sont surabondants (Tan et al., 2002). Cependant, bien que les Tmp CD4⁺ ne soient généralement pas dépendants de signaux de l'IL-15, les Tm antiviraux le sont en situation nonlymphopénique normale (Purton et al., 2007b). Ces Tm présentent un potentiel prolifératif plus lent, mais plus soutenu.

Malgré les similarités entre les signaux de survie des Tm CD4⁺ et CD8⁺, l'administration d'IL-15 induit cependant une plus forte expansion des Tm CD8⁺ que les Tm CD4⁺ *in vivo* et *in vitro* (Melchionda et al., 2005). De plus, le transfert adoptif de Tm CD8⁺ dans des hôtes IL-15^{-/-} réduit fortement leur prolifération (Kennedy et al., 2000). Il a même été suggéré que, d'après les besoins étroitement imbriqués des Tm CD4⁺ et CD8⁺ pour les signaux de survie, ceux-ci se retrouveraient dans des réservoirs différents (les intestins pour les Tm CD4⁺ et les LN périphériques pour les Tm CD8⁺) afin de s'isoler l'un de l'autre et d'éviter d'entrer en compétition (Yang et al., 2011). Le concept de l'existence de niches distinctes est renforcé par l'induction de l'expression de 4-1BB chez les Tm CD8⁺ par l'IL-15, mais pas chez les CD4⁺ Tm ou les CD8⁺ Tn (Pulle et al., 2006; Sabbagh et al., 2007). L'interaction de 4-1BB avec son ligand 4-1BBL induit l'activation de facteurs anti-apoptotique (Bcl-2) et la répression de facteurs pro-apoptotique (Bim) affectant ainsi la durée de vie des Tm CD8⁺. Par ailleurs, l'IL-21, une cytokine dont le récepteur est également composé de la chaîne γ c, semble également avoir un rôle important dans l'homéostasie des T matures, qui expriment constitutivement l'IL-21R, en promouvant l'activation de facteurs anti-apoptotiques (Ostiguy et al., 2007). Plus particulièrement, les Tm se voient proliférer plus et s'accumuler dans les souris transgéniques surexprimant l'IL-21 (Allard et al., 2007). Les signaux modulant la survie et prolifération des Tm sont résumés dans la Figure 7.

En contrepartie, à l'inverse des Tn, les Tm infectieux survivent largement en absence d'interaction TCR/CMH (Boyman et al., 2012). Il est connu que les Tm CD4⁺ et les Tm CD8⁺ survivent à long terme dans des hôtes déficients en CMH de classe II et de classe I respectivement (Murali-Krishna et al., 1999; Swain, 2000). Les Tm sont en effet capables de survivre à long terme dans ces hôtes pourvu que les cytokines appropriées soient présentes. Toutefois, alors que les modèles infectieux permettent assez facilement la génération et le suivi des Tm CD8⁺ lors de réponses cytotoxiques robustes, les T CD4⁺ sont plus souvent étudiés via les Tmp. De plus, alors que les Tm CD8⁺ infectieux ne dépendent pas de la signalisation via le RCT et ont une prolifération robuste, les Tmp CD4⁺ se distinguent en deux catégories soient une population dépendante des interactions RCT/CMH (pouvant proliférer rapidement) et une population qui ne nécessite pas cette signalisation (à prolifération lente) et qui se maintient ainsi à très long terme (Boyman et al., 2006; Leignadier et al., 2008).

2.1.5 Les gènes *Hox* et les cellules T

Les Tm dépendent de nombreux facteurs extrinsèques pour leur survie et prolifération. L'activation antigénique affecte la prolifération immédiate des cellules T alors que les signaux homéostatiques engendrent un auto-renouvellement lent et soutenu. Étant donnée l'importance des Tm au sein de la mémoire immunologique et de la protection à long terme contre les pathogènes qui nous entourent, beaucoup d'études ont tenté de déterminer l'existence de facteurs intrinsèques pouvant réguler leur auto-renouvellement. Tel que décrit plus tôt, il est connu que les facteurs de transcription de la famille des gènes *Hox* sont capables de moduler l'auto-renouvellement des CSH de façon à provoquer leur expansion.

Peu d'études à ce jours ont tenté d'établir un lien entre la prolifération des cellules T et ces facteurs de transcription. Une étude a démontré une activation transcriptionnelle progressive des gènes *Hox* suite à une stimulation via le RCT de cellules T quiescentes et que cette activation s'effectuait dans le sens 3' à 5' (Care et al., 1994). Plus spécifiquement,

cette étude montrait aussi que l'inhibition de l'expression de *Hoxb4*, facteur connu modulant l'expansion des CSH, arrêta la prolifération des cellules T récemment activées. Cela semble établir un lien entre la prolifération immédiate et les gènes *Hox*. Néanmoins, aucune étude tentant d'établir un lien entre les gènes *Hox* et la prolifération des Tm n'a été entreprise à ce jour.

3. Hypothèse(s) et objectifs

3.1 Raisonnement

À la lumière des faits mentionnés plus haut, on peut apercevoir certains parallèles entre les CSH et les Tm. Ces parallèles sont :

3.1.1 Propriété d'auto-renouvellement

Tel que mentionné plus haut, les deux qualités qui sont propres aux cellules souches de tous genres sont la capacité de se différencier en cellules de différentes lignées ou fonctions et de s'auto-renouveler. Les CSH, contrairement aux cellules souches embryonnaires, sont retrouvées chez l'adulte et y demeure en nombre relativement constant. Chez l'humain, il a été déterminé que le nombre ultime de divisions qu'une CSH pouvait subir, bien que supérieur au reste des cellules somatiques, était de moins de 100 (Lansdorp, 1997; Wilson et al., 2008). Les Tm forment également une population relativement stable dans l'organisme et maintiennent leur nombre tout au long de la vie d'un individu. Ces cellules sont capables par mécanismes d'auto-renouvellement homéostatique de demeurer et s'accumuler dans l'organisme au même titre que les CSH (Stemberger et al., 2009).

3.1.2 Quiescence

Bien que le potentiel d'auto-renouvellement confère une longévité accrue aux cellules souches et T mémoires, elles ne peuvent être constamment en prolifération. Le nombre de divisions qu'une cellule subira demeure limité, et pour prolonger sa durée de vie, les CSH passent en phase de quiescence, entrant en mitose rarement et effectuant peu de dépenses énergétiques (Arai and Suda, 2007; Cheshier et al., 1999; Orford and Scadden, 2008; Wilson et al., 2008). De façon similaire, les Tm arborent un état de quiescence jusqu'au moment où des signaux viennent exacerber leur prolifération homéostatique ou leur réponse antigénique (Dalai et al., 2011; Hamilton and Jameson, 2012).

3.1.3 Auto-renouvellement symétrique en réponse à un stress

Les CSH et les Tm vont tous deux répondre à un stress causant une diminution de leurs nombres ou du nombre de cellules en aval de leur programme de différenciation. Alors que la plupart des cellules somatiques sont remplacées par de nouvelles cellules au bout de leur vie, les CSH et Tm sont capables d'auto-renouvellement symétrique, soit une division cellulaire générant deux cellules filles identiques, ce qui leur permet d'augmenter en nombre en réponse à une modification de la niche. Cette propriété leur permet également de s'accumuler dans l'organisme.

3.1.4 Profil transcriptionnel apparenté

Dans une étude de comparaison de signatures moléculaires, les profils transcriptionnels totaux ont démontré une forte similitude entre les LT-CSH et les Tm corrélant avec l'enrichissement de transcrits de gènes associés au maintien des cellules souches à long terme (Luckey et al., 2006).

Toutes ces ressemblances convergent vers le concept d'une cellule Tm dite « *stem-like* ». Cette idée a été proposée par plusieurs auteurs (Gattinoni et al., 2009; Luckey et al., 2006; Stemberger et al., 2009) et constitue la base et l'inspiration de ce projet.

3.1.5 Hypothèse

À la lumière de ces rapprochements, nous avons posé l'hypothèse que le gène *Hoxb4*, capable d'accroître une population de CSH *in vivo* et *in vitro*, aura également un effet sur la prolifération homéostatique des Tm.

3.1.6 Objectifs

L'objectif général du projet est d'étudier l'effet de la surexpression du gène *Hoxb4* dans des populations de Tm chez la souris.

Les objectifs spécifiques de ce projet sont :

- 1) Faire une étude phénotypique et fonctionnelle des compartiments T des souris transgéniques (Tg) surexprimant le gène *Hoxb4* en fonction de l'âge
- 2) Comparer le potentiel de prolifération homéostatique des Tm surexprimant *Hoxb4* (Tm *Hoxb4*) avec celui des Tm de type sauvage (Tm wt) transplantés en compétition dans un hôte lymphopénique (déficient en cellules T)

Matériel et méthodes

1. Animaux

Toutes les expériences ont été approuvées par le Comité de Protection des Animaux du centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Les souris de type sauvage (*wild type*, wt) C57BL/6 (CD45.2) et B6.SJL (CD45.1) proviennent de la compagnie The Jackson Laboratory. Les souris receveuses mutantes pour la chaîne CD3ε proviennent du laboratoire du Dr. Bernard Malissen (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, (Malissen et al., 1995)). Les souris Tg Hoxb4.3 exprimant le transgène *Hoxb4* proviennent du laboratoire de Dr. Guy Sauvageau (Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie). Ce modèle comprend un transgène comportant la séquence d'ADNc du gène *Hoxb4* murin sous le contrôle de promoteurs exclusivement lymphoïdes, soit le promoteur RCTVβ, l'amplificateur Igu régulant la production d'IgM chez les cellules B et le promoteur du gène Lck participant à la signalisation du RCT (Bijl et al., 2006). Les souris Tg Hoxb4.3 furent génotypées par *polymerase chain reaction* (PCR) en utilisant la séquence du gène *hGH* (séquence sens : CGGACTGGGCAGATCTTCAA, séquence anti-sens : CCTTGTCCATGTCCTTCCTGAA) placée en aval du promoteur dans la cassette. Les souris Tg Hoxb4.3 utilisées pour les expériences de compétition sont issues de croisements entre Hoxb4.3 (CD45.2) et B6.SJL (CD45.1) pour obtenir une portée double positive (CD45.1/.2). Tous les animaux ont été hébergés à l'animalerie du centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont en conditions exemptes de pathogène spécifiques (*specific pathogen free*).

2. Transfert adoptif de Tm CD4⁺ en compétition

Les expériences de transplantation en compétition ont été réalisées en triant des Tm CD4⁺ Hoxb4 et wt (ratio 1 :1) provenant de cellules de ganglions lymphatiques (inguinaux, brachiaux et mésentériques) et rate (de souris Hoxb4.3 (CD45.1/.2) et wt (B6.SJL CD45.1)) avec un FACS Aria III (BD Bioscience) avec les marqueurs suivants : les positives pour le PerCP anti-mouse CD4 (GK1.5, BioLegend) et exprimant fortement le APC ou PE/Cy7 CD44 (IM7, BioLegend) et négatives pour le PE anti-mouse CD25 (PC16, BD Bioscience) et le FITC anti-mouse NK1.1 (PK136, BioLegend). Pour les expériences de

transplantations sérielles, 2×10^5 ϕ furent transplantées en PBS par injection intraveineuse dans la queue dans des hôtes déficients en cellules T ($CD3\epsilon^{-/-}$) de même sexe pour une période de 8 semaines. Après, les cellules de ganglions lymphatiques totaux des hôtes primaires furent recueillies et transplantées avec 10×10^6 ϕ (nombre déterminé pour avoir environ $1-2 \times 10^5$ de Tm dans les ganglions lymphatiques) dans de nouveaux hôtes déficients en cellules T pour une période de 8 semaines. Pour l'expérience de transplantation en compétition à court terme, les Tm furent triés de la même façon en les marquant au CellTrace™ Violet (CTV, voir protocole Life Technologies), un équivalent du *carboxylfluorescein succinimidyl ester* (CFSE), avant le tri puis en injectant 7×10^5 ϕ (ratio 1 :1 de Tm Hoxb4 et wt) dans des hôtes déficients en cellules T pour une période de 1 semaine.

3. Cytométrie en flux

L'expression des marqueurs de surface des lymphocytes a été mesurée par *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) sur un appareil LSR II (BD Bioscience). Les marquages extracellulaires ont été exécutés en resuspendant les cellules à une densité de 1×10^6 ϕ /50 μ L en FACSWASH (DMEM sans rouge de phénol + 3% p/v sérum de cheval + 3% p/v Hepes 1M + 0,1% p/v azoture de sodium) puis incubées sur glace à la noirceur pendant 30 minutes avec les anticorps selon la concentration indiquée (déterminée par titrage).

3.1 Expression des marqueurs mémoires des Tm de souris jeunes et âgées

Les anticorps suivants ont été achetés chez BioLegend : Pacific blue ® anti-mouse CD62L (MEL-14), PerCP anti-mouse CD8 α (53-6.7), Alexa 647 anti-mouse Ly6C (HK1.1), PE/Cy7 anti-mouse Sca-1 (E13-161.7).

Les anticorps suivants ont été achetés chez BD Bioscience : APC/Cy7 anti-mouse CD4 (GK1.5L3T4), PE/Cy7 anti-mouse CD44 (IM7).

Les anticorps suivants ont été achetés chez eBioscience : Biotin anti-mouse CD127 (A7R34, avec Streptavidine PE de chez BioLegend).

3.2 Expression des marqueurs des Tm lors des transplantations sérielles

Les anticorps suivants ont été achetés chez BioLegend : PerCP anti-mouse CD4 (GK1.5), Pacific Blue® anti-mouse CD45.1 (A20), PerCP anti-mouse CD3 (1B11), FITC anti-mouse CD45.1 (A20), PE/Cy7 anti-mouse Sca-1 (E13-161.7), Pacific Blue® anti-mouse Sca-1 (E13-161.7).

Les anticorps suivants ont été achetés chez BD Bioscience : APC/Cy7 anti-mouse CD4 (GK1.5L3T4), PE/Cy7 anti-mouse CD44 (IM7), FITC anti-mouse Ly6C (AL-21), APC anti-mouse CD45.2 (104), PE anti-mouse CD3 (145-2C11), PE/Cy7 anti-mouse CD62L (MEL-14) et V500® anti-mouse CD45.2 (104).

Les anticorps suivants ont été achetés chez eBioscience : Biotin anti-mouse CD127 (A7R34) et eFluor® 605N CD62L (MEL-14).

4. Marquage Annexine V

Les cellules furent préalablement marquées par marquage extracellulaire conventionnel avec les anticorps suivants : APC/Cy7 anti-mouse CD4 (GK1.5 BD Bioscience), PE/Cy7 anti-mouse CD44 (IM7, BD Bioscience), PE anti-mouse CD62L (MEL-14, BioLegend). Ensuite, les cellules furent lavées et centrifugées, resuspendues en *Annexin V Binding Buffer* (BioLegend) à une concentration de 1×10^5 par $100 \mu\text{L}$. Les cellules furent marquées en ajoutant $3 \mu\text{L}$ de Pacific Blue® Annexine V (BioLegend) et en les incubant à température pièce pendant 15 minutes puis en ajoutant $400 \mu\text{L}$ de *Annexin V Binding Buffer* et $7 \mu\text{L}$ de 7-AAD (BD Bioscience). Les mesures au LSR II pour les cellules marquées à l'Annexine V furent prises immédiatement après le marquage.

5. Production de cytokines par stimulation PMA/ionomycine et détection par marquage intracellulaire

Pour mesurer la production de cytokines des T_m, des splénocytes furent resuspendus à une concentration de 1×10^6 /mL en milieu RPMIc (RPMI complété (Wisent Bioproducts) avec FBS 10% p/v, Pénicilline-Streptomycine 1% p/v, L-glutamine 1% p/v, β -mercaptoéthanol (10^{-5} M), acides aminés non essentiels 1% p/v, pyruvate de sodium 1% p/v, HEPES 1% p/v (Life Technologies)). Une solution de PMA/ionomycine ($5 \mu\text{g}/50 \mu\text{g}/\text{mL}$ en RPMIc (Life Technologies)) était ajoutée à la suspension cellulaire pour une concentration finale de $50 \text{ng}/500 \text{ng}/\text{mL}$ ($10 \mu\text{L}$ de PMA/ionomycine par mL de suspension) pendant 4h à 37°C . Pour bloquer le transport vésiculaire et conserver les cytokines à l'intérieur de la membrane cytoplasmique, une solution de Brefeldine A ($1 \text{mg}/\text{mL}$) fut ajoutée au splénocytes activés pour une concentration de $0,01 \mu\text{g}$ par mL de suspension pour les deux dernières heures de culture à 37°C . À la fin des 4 heures d'incubation, les splénocytes furent lavés avec du PBS 1X froid et fixés avec de la formaldéhyde 4% p/v (avec volume égal de PBS) à température pièce pendant 20 minutes avant d'être lavés puis laissés une nuit à 4°C à la noirceur. Pour effectuer le marquage intracellulaire des cytokines, la membrane des cellules fixées fut perméabilisée avec une solution de saponine (0,5% p/v dans du FACSWASH) puis incubés 30 minutes à la noirceur en présence de saponine avec les anticorps suivants : FITC rat anti-mouse IFN- γ (XMG1.2, BD Bioscience), PE rat anti-mouse TNF- α (MP6-XT22, BD Bioscience), APC rat anti-mouse IL-2 (JES6-5H4, BD Bioscience), et leurs isotypes contrôles; FITC Rat IgG1 (Life Technologies), I5 PE (BioLegend) et I28 APC (BioLegend). Les cellules fixées furent ensuite marquées par marquage extracellulaire conventionnel avec les anticorps suivants : Pacific Blue ® anti-mouse CD45.1 (A20, BioLegend), PE/Cy7 anti-mouse CD45.2 (104, BioLegend), APC/Cy7 anti-mouse CD44 (IM7, BioLegend), PerCP anti-mouse CD4 (GK1.5, BioLegend).

6. Real-time Quantitative PCR (RT-QPCR)

L'ARN fut isolé par TRIzol (voir protocole Life Technologies) à partir de fractions allant de 2×10^5 à 1×10^6 de cellules T mémoires et naïves $CD4^+$ et $CD8^+$ isolés par cytométrie en flux puis traité à la DNase I (Amp. Grade de Life Technologies, voir protocole de la compagnie) et EDTA 25mM. Ensuite, l'ARN exempt d'ADN génomique fut complété par réaction de transcription inverse pour obtenir l'ADN complémentaire (ADNc) avec l'enzyme de transcriptase inverse (MMLV, voir protocole Life Technologies). L'ADNc généré fut amplifié par RT-QPCR en utilisant le SYBR Green (Applied Biosystems) et mesuré en triplicata (accepté dans un intervalle de C_T de 0.5) sur un appareil thermocycleur ABI 7500 (Applied Biosystems). Les séquences des amorces pour la détection du gène *Hoxb4* (séquence sens : ACTCAAACCTATGTGACCCCAAGT, anti-sens : GGCTGGAAGCCGCTCTCT) et du gène endogène *Gapdh* (séquence sens : AACTTTGGCATTGTGGAAGG, séquence anti-sens : ATGGAGGGATGATGTTCTGG) ont été validées avec le SYBR Green en effectuant une courbe standard. Le ΔC_T de chaque échantillon fut calculé d'après la différence entre la valeur C_T du gène *Hoxb4* et celle du gène endogène. La valeur $\Delta\Delta C_T$ fut ensuite déterminée en soustrayant la moyenne des valeurs ΔC_T de chaque groupe d'échantillons de la valeur ΔC_T d'un échantillon calibrateur composé d'ADNc de cellules de thymus, rate, ganglions lymphatiques et moelle osseuse de souris transgéniques et wt. L'expression relative du gène *Hoxb4* fut calculée avec la formule $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Les valeurs proviennent de trois souris par condition (Tg Hoxb4.3 et wt).

7. Analyses statistiques

L'évaluation de la significativité des résultats entre les populations Tm Hoxb4 et Tm wt a été obtenue à l'aide du test Student (t) non pairé. Les résultats des comparaisons des souris jeunes vs âgées, Hoxb4 vs wt furent analysés avec un test ANOVA avec correction LSD. La différence était considérée significative lorsque la valeur de $p < 0.05$.

Résultats

1. Modèle transgénique murin de surexpression du gène *Hoxb4* chez les Tm

Les effets de la délétion de *Hoxb4* sur le développement et le phénotype des lymphocytes B et T ont déjà sommairement été étudiés auparavant et n'avaient pas démontré d'interférence majeure (Bijl et al., 2006). Nous cherchions ici à caractériser les effets de *Hoxb4* sur des sous-types de cellules T spécifiques, notamment les cellules Tn et Tm. Pour ce faire, nous avons employé un modèle de souris transgénique surexprimant le gène *Hoxb4* dans la lignée lymphoïde (Figure 8a). L'expression du transgène est placée entre autre sous le contrôle du promoteur TCR V β . Nous avons alors cherché à déterminer si l'expression du transgène était détectable dans tous les sous-types de cellules T. Nous avons ainsi isolé des fractions de cellules Tn (CD44^{lo} CD62L^{hi}) et Tmp (CD44^{hi} CD62L^{lo}) CD4⁺ et CD8⁺ chez des souris Tg *Hoxb4* et wt pour y extraire l'ARN et le quantifier par RT-QPCR (Figure 8a). L'expression de *Hoxb4* était de 40 à 50 fois plus élevée chez les Tn CD4⁺ et CD8⁺ *Hoxb4* que leur homologue wt. Nous avons également déterminé que l'expression de *Hoxb4* était détectable chez les Tmp et qu'elle était ~6 fois plus élevée chez les Tmp CD4⁺ Tg, comparativement à une différence de ~90 fois chez les Tmp CD8⁺ Tg.

Ayant confirmé que *Hoxb4* était surexprimé chez les Tmp, nous avons évalué si cette surexpression influençait le phénotype et la proportion des différentes populations lymphocytaires T par FACS. Nous avons déterminé que les pourcentages des populations totales de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ demeuraient similaires entre les souris *Hoxb4* et wt jeunes (8-16 semaines), suggérant que *Hoxb4* n'affecte pas le développement des lymphocytes T. Il est connu qu'avec l'âge, la fonction thymique diminue entraînant une réduction du nombre de Tn générés par le thymus circulant en périphérie par rapport à un nombre de Tmp restant relativement constant (Linton and Dorshkind, 2004). Nous avons alors cherché à déterminer si des altérations seraient perceptibles à plus long terme, soit chez des souris âgées (>65 semaines). On peut apercevoir un déclin du pourcentage de cellules T CD4⁺ chez les souris Tg *Hoxb4* âgées par rapport aux jeunes souris dans la rate (Spl) ($18.20 \pm 1.98\%$ vs $10.69 \pm 1.00\%$ ($p < 0.001$)). On observe également chez les souris

Tg *Hoxb4* un déclin avec l'âge au niveau des cellules T CD8⁺ dans la rate (Spl $10.88 \pm 0.607\%$ vs $5.28 \pm 0.71\%$ ($p < 0.02$)) (Figure 8b). Cette différence n'est pas observable chez les souris wt âgées, où l'on peut d'ailleurs apercevoir un plus fort pourcentage de cellules T que chez les souris Tg *Hoxb4* âgées. Ceci indique que la surexpression de *Hoxb4* cause une diminution des cellules T dans les organes lymphoïdes pouvant s'expliquer par une augmentation de la mort cellulaire, une prolifération plus forte des Tm wt, ou encore parce que les cellules T auraient plutôt migré ailleurs.

Étant donnée la disparité entre les pourcentages de cellules T dans les organes lymphoïdes des souris jeunes vs âgées, nous avons cherché à savoir si cette différence se reflétait dans les différents compartiments T. Nous avons ainsi déterminé la teneur en Tn et Tmp des cellules CD4⁺ et CD8⁺ dans chacun des organes en évaluant leur phénotype à l'aide du marqueur d'activation CD44. Tel qu'attendu, le pourcentage de Tmp trouvé dans les ganglions lymphatiques des souris *Hoxb4* augmente avec l'âge aussi bien chez les cellules CD4⁺ que CD8⁺ ($7.72 \pm 1.24\%$ vs $26.24 \pm 9.51\%$ ($p < 0.05$) et $10.58 \pm 1.83\%$ vs $39.2 \pm 13.31\%$ ($p < 0.02$)) (Figure 8c). On peut par ailleurs observer la même tendance chez les souris wt ($13.87 \pm 3.73\%$ vs $32.17 \pm 9.15\%$). À l'inverse, le pourcentage de Tmp dans la moelle osseuse (BM) semble diminuer chez les souris *Hoxb4* et wt âgées (Tmp *Hoxb4* CD4⁺ jeunes vs âgées = $46.58 \pm 12.36\%$ vs $4.07 \pm 1.79\%$ ($p < 0.01$) et Tmp wt CD4⁺ jeunes vs âgées $40.65 \pm 5.73\%$ vs $12.31 \pm 7.4\%$ ($p < 0.05$)). L'incidence de l'âge sur les différents compartiments du système immunitaire est connue en partie et se reflète chez les Tmp wt. Toutefois, on observe quelques différences chez les Tmp *Hoxb4*. Ces résultats semblent indiquer qu'avec l'âge, *Hoxb4* aurait une incidence sur la survie des Tmp, ou encore qu'il pourrait affecter leur relocation vers d'autres organes ou tissus.

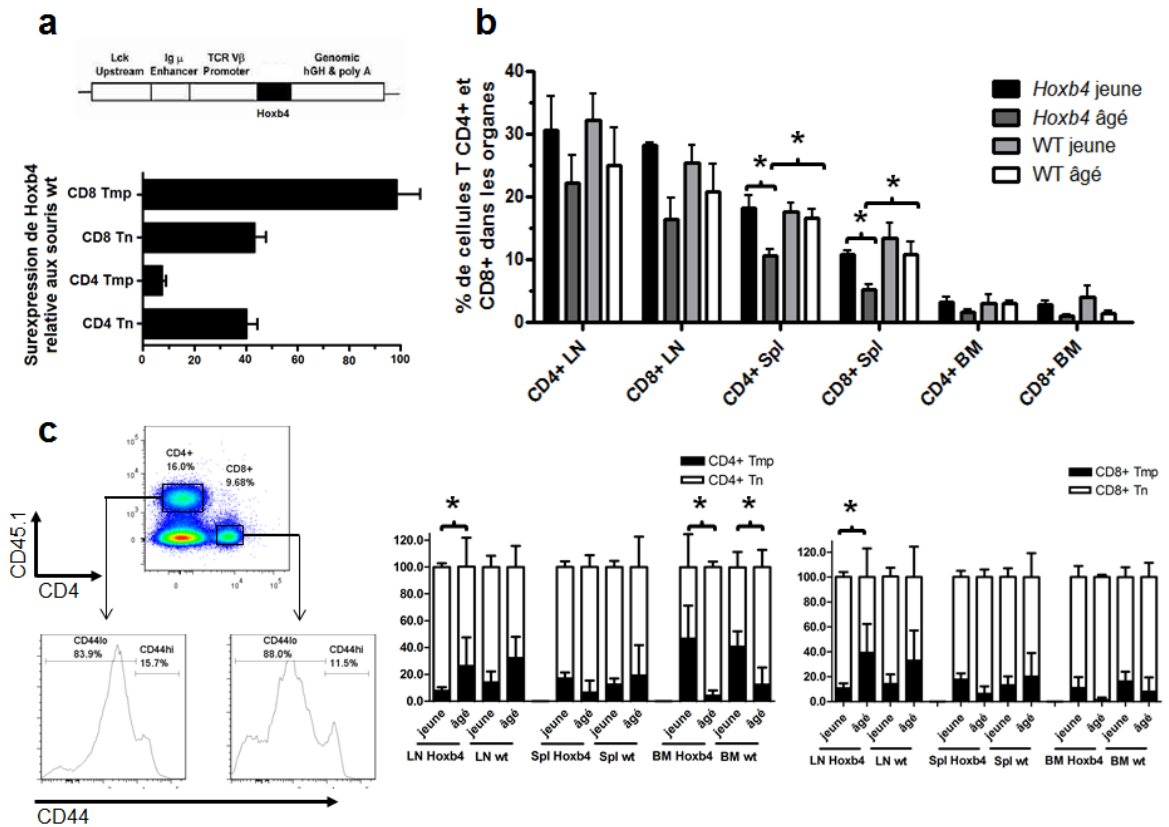


Figure 8 : Effets de la surexpression de *Hoxb4* sur le vieillissement des Tmp. (a) Expression de *Hoxb4* chez les souris Tg *Hoxb4* relative aux souris contrôles mesurée par RT-QPCR. n = 3 pour chaque groupe. Les organes lymphoïdes de souris *Hoxb4* et wt jeunes (8-16 semaines) et âgées (>65 semaines) furent analysés par cytométrie en flux pour déterminer la proportion des populations et sous-populations de cellules T. (b) Pourcentage de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ dans les organes lymphoïdes de souris jeunes et âgées wt et *Hoxb4*. (c) Pourcentage de Tmp et Tn dans les organes lymphoïdes de souris jeunes et âgées wt et *Hoxb4* obtenu selon le profil montré à gauche. LN, ganglions lymphatiques (*lymph nodes*); Spl, rate (*spleen*); BM, moelle osseuse (*bone marrow*). *Hoxb4* jeune n = 5, *Hoxb4* âgé n = 5, wt jeune n = 5, wt âgé n = 4. * p < 0.05.

2. Incidence de la surexpression de *Hoxb4* sur la proportion de Tmp exprimant certains marqueurs mémoires et leur viabilité

Nous avons tenté d'observer l'effet de la surexpression de *Hoxb4* sur les nombres de cellules T et plus spécifiquement les nombres de Tm dans les différents organes lymphoïdes. Nous avons ensuite cherché à déterminer si cette surexpression avait un effet sur des marqueurs mémoires typiques tels que mentionnés dans le tableau I. Nous avons caractérisé l'expression des marqueurs CD62L, Ly6C et Sca-1 chez les Tm (CD44^{hi}) des souris *Hoxb4* et wt, jeunes et âgées par cytométrie en flux. Les Tcm sont connues pour être des cellules possédant une très grande capacité d'auto-renouvellement et qui recirculent et s'accumulent vers les ganglions lymphatiques grâce à leur expression du CD62L (un marquage CCR7 fut également expérimenté mais ne fût pas concluant). Le Ly6C est un marqueur connu des Tm CD8⁺ (Walunas et al., 1995) et des Tm CD4⁺ possédant une longévité accrue particulièrement dans la moelle osseuse (Tokoyoda et al., 2009) et le Sca-1 est un marqueur identifiant les CSH, mais également fortement exprimé chez les Tm (Whitmire et al., 2009). Le marqueur CD62L affiche une expression généralement plus faible chez les Tmp CD4⁺ que chez les Tmp CD8⁺ dans tous les groupes (Figure 9). L'expression ne semble pas montrer de différence liée à l'âge ou à la surexpression de *Hoxb4* chez les Tmp. De même, on n'aperçoit pas de différence significative concernant l'expression des marqueurs Ly6C. Cependant, le marqueur Sca-1 est nettement plus exprimé chez les Tmp des souris âgées *Hoxb4* ou wt (Tmp *Hoxb4* CD4⁺ = LN 61.08 ± 8.76% vs 88.2 ± 1.42% (p < 0.05), Tmp *Hoxb4* CD8⁺ LN = 41.22 ± 9.14% vs 69.77 ± 8.93% (p < 0.05), Spl = 56.92 ± 8.64% vs 78.3 ± 3.19% (p < 0.05) et Tmp wt Spl = 49.84 ± 8.48% vs 76.4 ± 3.04% (p < 0.05)). D'autres marqueurs furent également testés (CD127, CD25, CD28, PD-1), et ne montraient pas de différence significative entre les groupes. Ces résultats démontrent que le profil des Tmp, comparable entre *Hoxb4* et wt, varie quelque peu avec l'âge et que *Hoxb4* aurait un effet plus marqué sur l'expression de Sca-1 au cours du vieillissement.

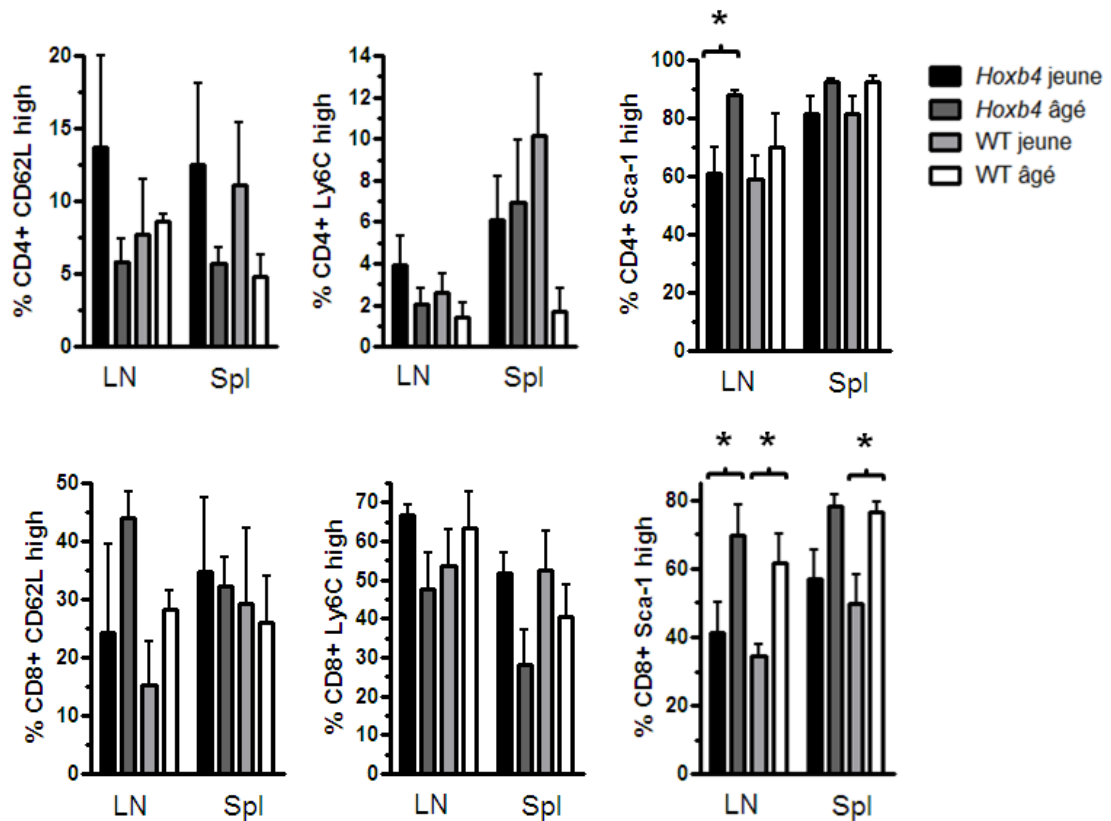


Figure 9 : La surexpression de *Hoxb4* a peu d'effet sur les proportions de Tmp exprimant certains profils phénotypiques. Les Tmp isolés des organes lymphoïdes de souris *Hoxb4* et wt jeunes (8-16 semaines) et âgées (>65 semaines) furent analysés par cytométrie en flux pour mesurer l'expression du CD62L, Ly6C et Sca-1. *Hoxb4* jeune n = 5, *Hoxb4* âgé n = 3, wt jeune n = 5, wt âgé n = 3. * p < 0.05.

Pour expliquer la différence dans la proportion de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires des souris *Hoxb4* âgées par rapport aux autres souris, nous avons évalué si les Tn et Tmp *Hoxb4* présentaient un déclin de viabilité par rapport aux contrôles. Pour ce faire, nous avons effectué un marquage Annexine V sur les différents sous-types T CD4⁺ (cette expérience fut également effectuée sur les Tn et Tmp CD8⁺ et a donné des résultats similaires). Les Tmp ont été identifiés d'après le phénotype CD4⁺CD44^{hi}CD62L^{lo} et les Tn d'après le phénotype CD4⁺CD44^{lo}CD62L^{hi} (Figure 10). Alors que les Tmp de tous les groupes de souris présentent un profil similaire de viabilité

incluant des cellules mourantes (entrant en apoptose, Annexine V⁺ 7AAD⁻) et des cellules apoptotiques (Annexine V⁺ 7AAD⁺), les Tn présentent presque exclusivement un profil de cellules vivantes (Chez les souris *Hoxb4* jeunes = vivantes 67.97 ± 4.02% vs 97.03 ± 1.28% (p < 0.02), mourantes 14.57 ± 1.34% vs 1.72 ± 1.42% (p < 0.001) et mortes 17.23 ± 4.84% vs 1.02 ± 0.60% (p < 0.03), chez les souris wt jeunes = vivantes 76.65 ± 0.85% vs 96.80 ± 0.60% (p < 0.05) et mortes 8.75 ± 0.93% vs 1.07 ± 0.50% (p < 0.02), les souris âgées ne montraient pas de différence significative). Ces résultats démontrent une corrélation entre l'expression du phénotype naïf, plus particulièrement par l'expression du CD62L, et une tendance à ne pas entrer en apoptose. Également, ces résultats démontrent que le déclin des cellules T CD4⁺ (et CD8⁺) observé chez les souris *Hoxb4* âgées ne corrèle par avec une diminution de la viabilité.

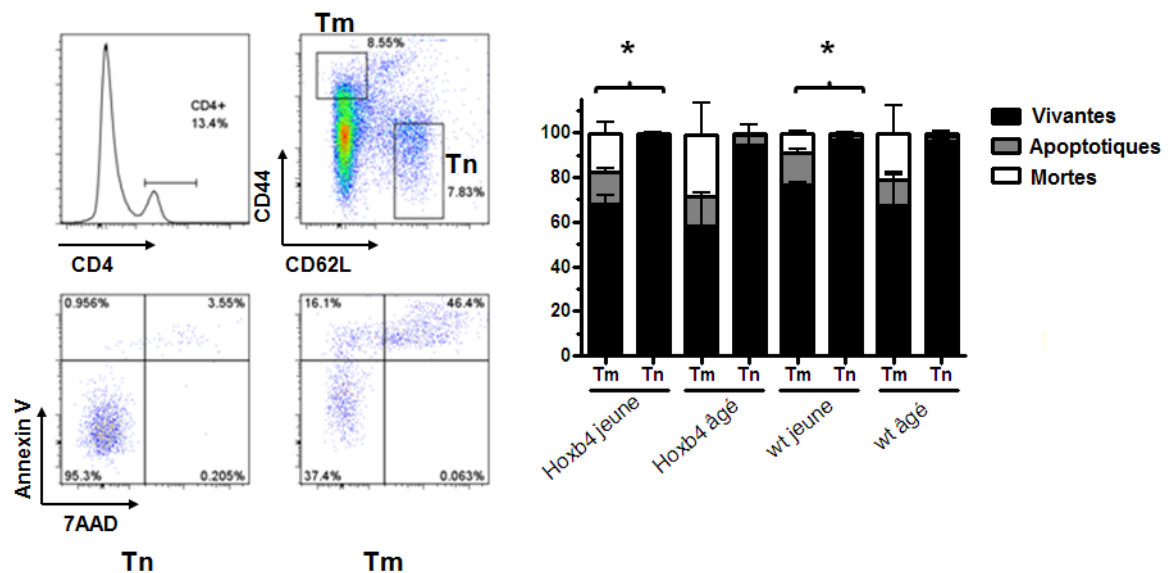


Figure 10. La viabilité des Tmp ne diminue pas en fonction de l'âge ou de la surexpression de *Hoxb4*. Des splénocytes ont été marqués par un marquage extracellulaire conventionnel puis par un marquage Annexine V et 7AAD et immédiatement analysés par FACS selon les populations Tn (CD4⁺CD44^{lo}CD62L^{hi}) et Tmp (CD4⁺CD44^{hi}CD62L^{lo}). Les cellules vivantes sont négatives pour l'Annexine V et 7AAD, les cellules apoptotiques sont positives pour l'Annexine V et négatives pour le 7AAD, les cellules mortes ou nécrotiques sont positives pour les deux marqueurs. *Hoxb4* jeune n = 3, *Hoxb4* âgé n = 3, wt jeune n = 3, wt âgé n = 3. * p < 0.05.

3. Transfert adoptif de Tmp CD4⁺ en compétition chez des hôtes déficients en cellules T

Hoxb4 étant un facteur connu pouvant induire l'expansion de CSH *in vivo* de façon significative chez des hôtes irradiés, nous avons évalué si ce gène pouvait induire une prolifération accrue des Tmp se traduisant par un avantage compétitif. Nous avons alors tenté d'évaluer leur potentiel de prolifération homéostatique durant la reconstitution du compartiment T d'hôtes lymphopéniques (PIL), de façon parallèle aux études de reconstitution hématopoïétique effectuées lors de la surexpression *HOXB4* (Antonchuk et al., 2001). 1×10^5 Tmp CD4⁺ *Hoxb4* et 1×10^5 Tmp wt ont été triés et transplantés (ratio 1 : 1) chez des hôtes déficients en cellules T (CD3^{-/-}) selon le schéma de la Figure 11. Les Tmp *Hoxb4* (CD45.1/2) pouvaient être distingués des Tmp wt (CD45.1) ainsi que des cellules provenant de l'hôte (CD45.2) à l'aide des marqueurs allotypiques (Figure 12a). Huit semaines après la transplantation, afin de permettre la PIL, l'analyse des ratios de Tmp *Hoxb4* : wt dans les organes a révélé que les Tmp wt parvenaient à reconstituer davantage le compartiment T que les Tmp *Hoxb4* (Spl = $70.22 \pm 6.13\%$ vs $29.63 \pm 6.09\%$ ($p < 0.02$) et BM = $75.47 \pm 6.39\%$ vs $24.17 \pm 6.27\%$ ($p < 0.005$)) (Figure 12a). On peut par ailleurs apercevoir une assez grande variabilité au niveau des ratios, particulièrement dans les ganglions lymphatiques. Une analyse de la viabilité des Tmp par marquage Annexin V au jour du sacrifice a révélé que les Tmp *Hoxb4* présentaient des niveaux similaires de cellules vivantes, apoptotiques et mortes suggérant que ce biais n'était pas expliqué par une mortalité accrue des Tmp *Hoxb4* (résultats non présentés).

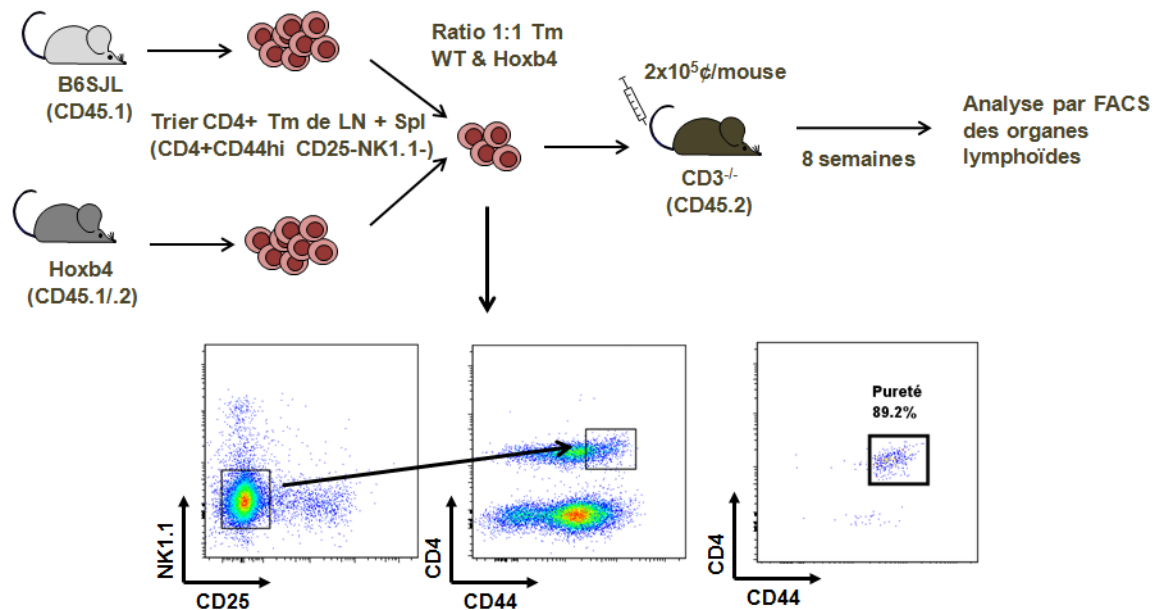


Figure 11. Schéma expérimental du transfert adoptif des Tmp Hoxb4 et wt en compétition. Les Tmp CD4⁺ furent triés selon le marqueur CD4⁺, le marqueur CD44^{hi} afin d'éliminer les cellules non activées tels les Tn pouvant entrer en PIL et se confondre aux Tmp, en s'assurant de garder la fraction de cellules négative pour le CD25 (afin d'éliminer les cellules T régulatrices qui pourraient freiner la prolifération des Tmp) et du marqueur NK1.1 (afin d'éliminer les cellules NK-T). ϕ , cellules.

Puisque les Tmp Hoxb4 semblaient moins compétitifs au niveau de la reconstitution, nous avons voulu savoir si ces derniers se distinguaient de leurs homologues wt par d'autres traits importants, notamment leur fonctionnalité. Nous avons testé la production de cytokines des Tmp par marquage intracellulaire suite à une courte stimulation par PMA-ionomycine (Figure 12b). Une production similaire de TNF- α et d'IL-2 est observée chez les 2 groupes, alors que les Tmp wt produisaient modestement plus d'IFN- γ ($24.70 \pm 2.90\%$ vs $35.77 \pm 1.20\%$) (Figure 12c). Les Tmp Hoxb4 semblaient néanmoins moins nombreuses à être polyfonctionnelles, c'est-à-dire à pouvoir produire toute les cytokines à la fois ($16.76 \pm 1.114\%$ vs $22.372 \pm 1.18\%$). Ces résultats démontrent que, bien que fonctionnels, les Tmp Hoxb4 ne s'accumulent pas dans les organes lymphoïdes secondaires au même titre que les Tmp wt.

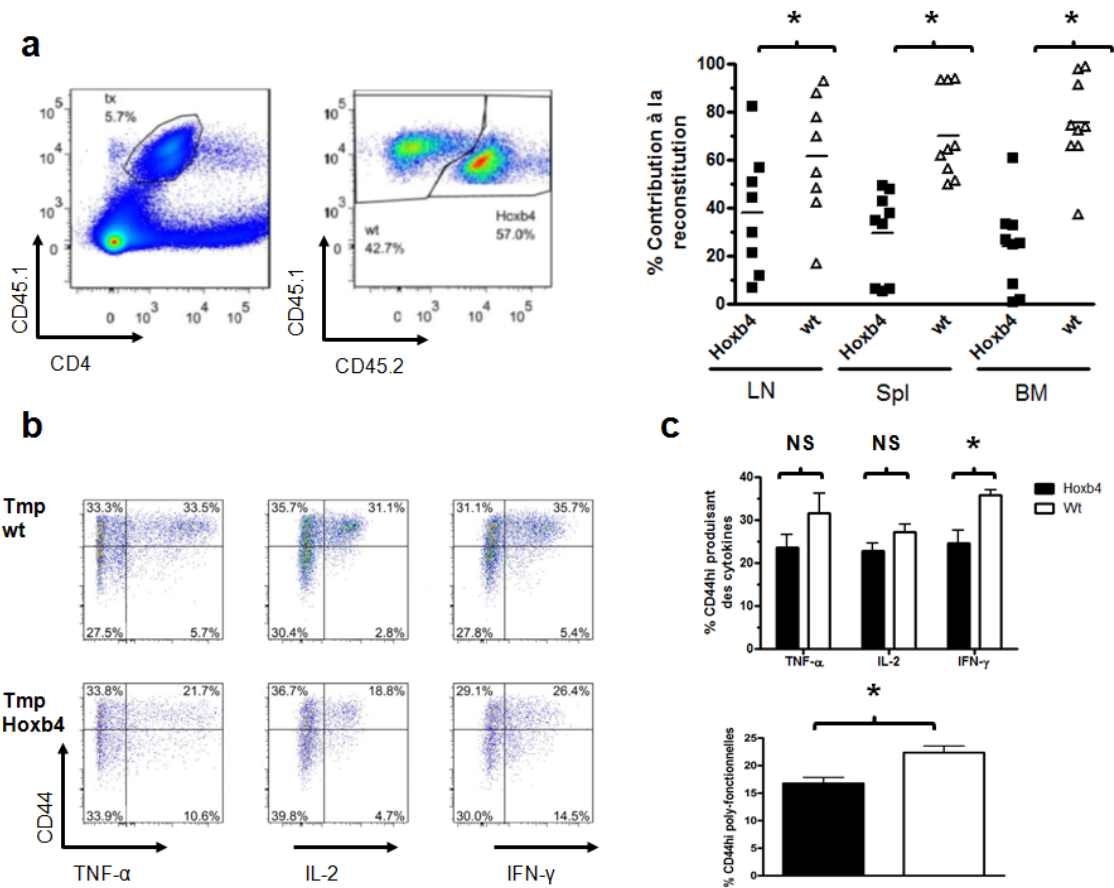


Figure 12. Les Tmp Hoxb4 réalisent une plus faible expansion en situation de PIL que les Tmp wt malgré une fonctionnalité normale. 2×10^5 Tmp isolés de souris Hoxb4 et Tmp wt furent transplantés dans un ratio 1:1 chez des hôtes CD3^{-/-} pour une période 8 semaines. Les ratios des populations de Tmp trouvés dans les organes lymphoïdes furent mesurés en plus de la capacité à produire des cytokines après une courte stimulation du RCT. (a) Contribution de chacune des populations des Tmp transplantés à la reconstitution du compartiment T dans les LN, la Spl et la BM. (b) Profil des cellules du donneur après stimulation. (c) Pourcentage de Tmp récupérés de la rate pouvant produire chacune ou toutes les cytokines (poly-fonctionnelles) après stimulation. Hoxb4 n = 9, wt n = 9. * p < 0.05.

4. Phénotype des Tmp Hoxb4 suite à la PIL

Étant donné la proportion sensiblement plus faible des Tmp Hoxb4 par rapport à aux Tmp contrôles dans les organes lymphoïdes secondaires, nous avons cherché à caractériser ces Tmp davantage en évaluant leur phénotype. Nous avons sélectionné des marqueurs d'activation (CD44, 1B11), associés au phénotype mémoire (Ly6C), à l'homéostasie des cellules T (CD127) et au phénotype Tcm (CD62L). Ces marqueurs présentaient des profils identiques pour les deux populations avant leur transfert adoptif à jour 0 (Figure 13 a). L'expression des marqueurs CD127, CD44 et 1B11 ne montre pas de différence significative entre les Tmp Hoxb4 et wt (Figure 13 b et c). En revanche, les marqueurs Ly6C et CD62L étaient notablement plus exprimés chez les Tmp Hoxb4 et ce dans tous les organes (LN Hoxb4 vs wt = Ly6C $11.1 \pm 3.61\%$ vs $2.88 \pm 0.92\%$ ($p < 0.05$) et CD62L $3.26 \pm 1.24\%$ vs $0.24 \pm 0.07\%$ ($p < 0.05$), Spl = Ly6C $12.26 \pm 2.22\%$ vs $3.41 \pm 0.85\%$ ($p < 0.01$) et CD62L $3.42 \pm 1.34\%$ vs $0.20 \pm 0.06\%$ ($p < 0.05$), BM = Ly6C $40.20 \pm 12.18\%$ vs $11.34 \pm 2.34\%$ ($p < 0.05$) et CD62L $13.92 \pm 7.10\%$ vs $0.353 \pm 0.23\%$ ($p < 0.05$)). D'autres marqueurs ont également été mesurés, tel que le Sca-1, et ne montraient pas de différence (résultats non présentés). L'expression différentielle des marqueurs Ly6C et CD62L est marquée dans la moelle osseuse où les Tmp CD4⁺ et CD8⁺ qui y nichent expriment habituellement de forts niveaux de Ly6C (Tokoyoda et al., 2009). Ces résultats démontrent que suite à une situation de PIL, les Tmp Hoxb4 acquièrent un phénotype plus apparenté aux Tcm et se démarquent des Tmp wt.

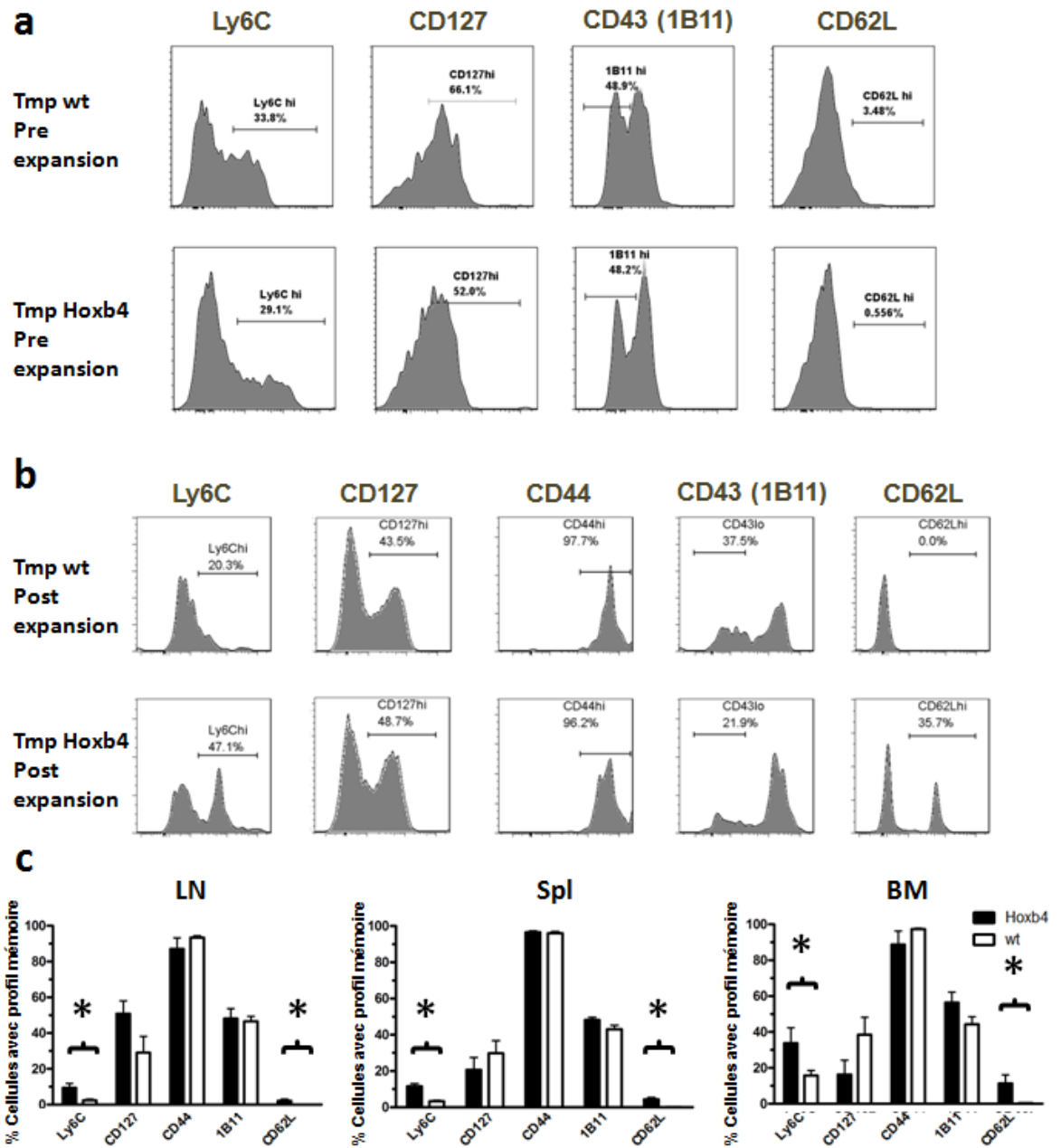


Figure 13. Les Tmp Hoxb4 ont un phénotype Tcm plus marqué suite à la PIL. L'expression de certains marqueurs mémoires fut mesurée par FACS chez les Tmp récupérés des organes lymphoïdes des hôtes reconstitués. Les profils montrent les marqueurs des Tmp wt et Hoxb4 observés dans la BM avant le transfert adoptif (a) et après 8 semaines (b). (c) La profération induite durant les 8 semaines augmente l'expression du Ly6C et CD62L chez les Tmp Hoxb4 que chez les Tmp wt. n = 9. * p < 0.05.

5. Transferts adoptifs sériels de Tmp en compétition

Des études de surexpression rétrovirale du gène *Hoxb4* ont démontré que le fort potentiel d'expansion des CSH de celui-ci était conservé suite à des transplantations sérielles indiquant qu'il s'agissait d'un effet à long terme (Sauvageau et al., 1995). Nous avons initialement étudié l'effet du vieillissement des Tmp *Hoxb4* au sein de leur organisme. Toutefois, afin d'étudier l'effet intrinsèque du vieillissement des Tmp, nous avons procédé à des transplantations sérielles dans lesquelles les Tmp initialement triés étaient réintroduits dans de nouveaux hôtes sériels, circonvenant ainsi le vieillissement de leur niche. De plus, les transplantations sérielles nous permettent d'observer l'effet de la surexpression de *Hoxb4* sur l'épuisement, le phénotype et la fonctionnalité des Tmp. Dans le but de déterminer si la surexpression de *Hoxb4* pouvait également avoir un effet à long terme chez les Tmp, nous avons étudié les ratios, la fonctionnalité et le phénotype des Tmp *Hoxb4* en compétition avec les Tmp wt au fil de transplantations. L'expérience fut réalisée selon le schéma de la Figure 14.

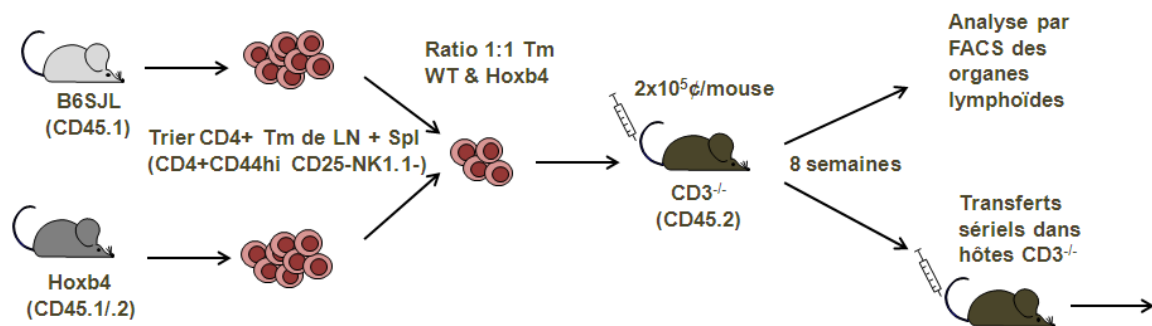


Figure 14. Schéma expérimental du transfert adoptif sériel à partir des LN des hôtes CD3^{-/-} reconstitués.

Les cellules de ganglions lymphatiques furent transplantées dans de nouveaux hôtes CD3^{-/-} à chaque 8 semaines selon le schéma de la Figure 15a. Les cellules de ganglions ne furent pas triées afin de préserver le ratio des populations de Tmp. Puisque les Tmp récupérés dans les ganglions représentaient environ 1% de la population totale, 10 x 10⁶

cellules furent transplantés dans chaque souris afin d'approximer les 1×10^5 Tmp transplantés chez les hôtes primaires.

Les ratios de Tmp Hoxb4/wt trouvés dans les organes des hôtes primaires sont récapitulés dans les hôtes secondaires, avec semblablement moins de variabilité (LN = $30.80 \pm 4.83\%$ vs $70.1 \pm 5.27\%$ ($p < 0.03$), Spl = $30.86 \pm 3.26\%$ vs $69.02 \pm 3.23\%$ ($p < 0.005$) et BM = $30.35 \pm 6.11\%$ vs $69.62 \pm 6.10\%$ ($p < 0.05$)) (Figure 15b). Suite à la troisième transplantation, on aperçoit les Tmp wt continuent de supplanter les Tmp Hoxb4 (Figure 15 c). Cependant, le nombre de Tmp détectables au bout de 24 semaines devient de plus en plus réduit jusqu'à parfois disparaître laissant des hôtes non reconstitués. Finalement, nous avons procédé à un quatrième transfert adoptif, de façon surprenante, les ratios au bout de 32 semaines devenaient très variables pour les deux seules souris qui restaient (Figure 15d). Dans les hôtes quaternaires, alors que les ratios des ganglions semblent relativement près du 1 : 1 initialement transplanté, la rate et la moelle osseuse paraissent être principalement colonisé par l'un ou par l'autre, avec des renversements de ratios flagrants dans deux souris (rate de l'une et moelle osseuse de l'autre). Ces résultats démontrent que *Hoxb4* semble avoir un effet négatif sur la prolifération ou l'accumulation des Tmp dans les organes lymphoïdes dès la première transplantation. Néanmoins, les ratios de Tmp Hoxb4/wt trouvés dans deux hôtes quaternaires lors de deux expériences indépendantes montrent une tendance des Tmp Hoxb4 à reprendre l'avantage à très long terme (8 mois). Dans ce cas, la surexpression de *Hoxb4*, dont les effets pro- et anti-apoptotiques variant selon l'identité de la cellule sont documentés (Morgan et al., 2004), pourrait potentiellement avoir un effet réversible sur la prolifération homéostatique des Tmp.

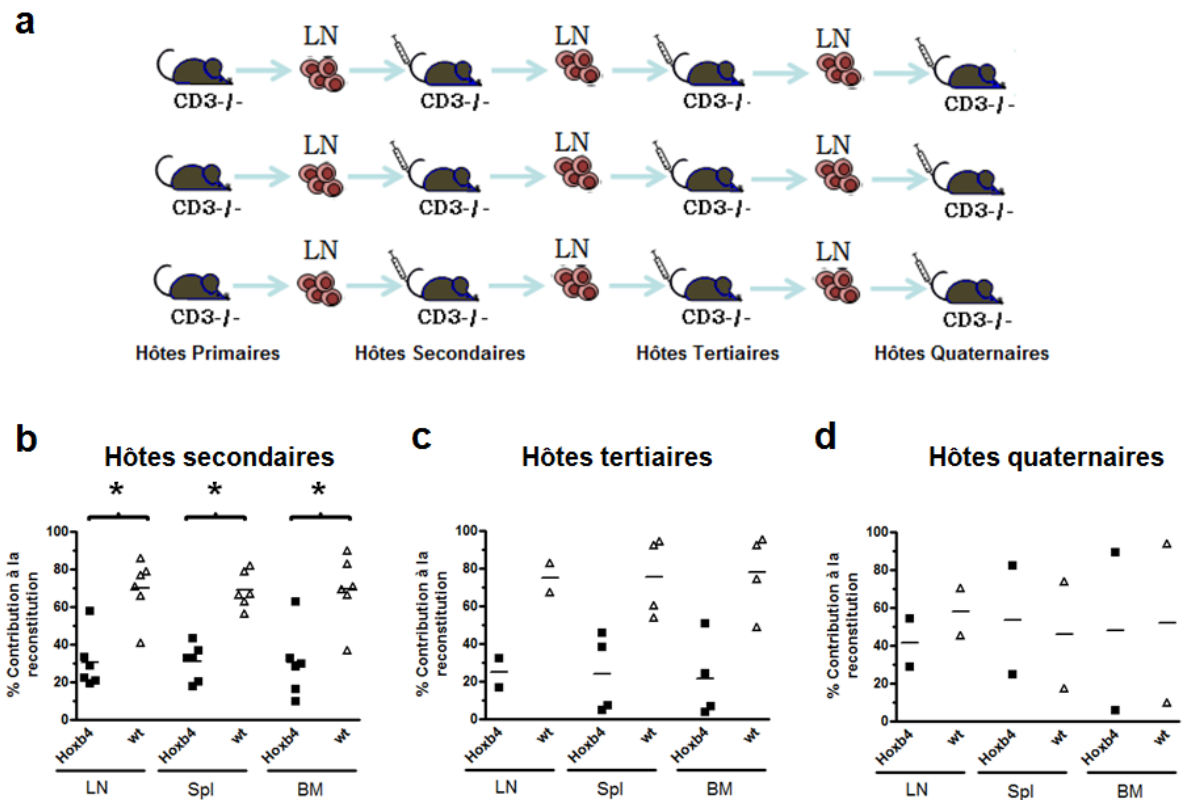


Figure 15. Les Tmp Hoxb4 continuent de s'appauvrir dans les organes lymphoïdes des hôtes secondaires et tertiaires, mais pas les hôtes quaternaires. Les ratios des Tmp Hoxb4 et wt récupérés dans les organes lymphoïdes des hôtes secondaires, tertiaires et quaternaires furent mesurés par FACS. (a) Schéma expérimental démontrant la procédure pour réaliser les transplantations sérielles. Contribution de chacune des populations des Tmp transplantés à la reconstitution du compartiment T dans les LN, la Spl et la BM chez les hôtes secondaires (b), tertiaires (c) et quaternaires (d). Hôtes secondaires n = 6, hôtes tertiaires n = 4, hôtes quaternaires n = 2 (2 expériences indépendantes). * p < 0.05.

6. Fonctionnalité et phénotype des Tmp après transplantations sérielles

Tel que lors de la transplantation dans les hôtes primaires, nous avons vérifié si les Tmp Hoxb4 conservaient leur fonctionnalité. Comme chez les hôtes primaires, les pourcentages de Tmp répondant à la stimulation du RCT *in vitro* en produisant des cytokines étaient les mêmes (Figure 16a). Les Tmp Hoxb4, tout comme les Tmp wt, ne perdent donc pas leur fonctionnalité suite aux transferts sériels. Par ailleurs, ils se mettent à produire davantage de cytokines au fil des transplantations passant de ~25% à ~40% à près de 55% en moyenne (Figure 12b et 16a). D'autre part, nous cherchions à examiner si le changement de phénotype observé lors de la première transplantation se récapitulait lors des transferts subséquents. En effet, les Tmp Hoxb4 des ganglions lymphatiques et de la rate des hôtes secondaires montrent une tendance vers une plus forte expression du Ly6C et du CD62L respectivement. De façon intéressante, le phénotype des Tmp Hoxb4 dans la moelle osseuse des hôtes secondaires est visiblement récapitulé (Ly6C = $31.04 \pm 6.04\%$ vs $7.18 \pm 2.06\%$ ($p < 0.01$) et CD62L = $26.10 \pm 7.71\%$ vs $8.61 \pm 5.23\%$ ($p < 0.01$)) (Figure 16b). En dernier lieu, les Tmp Hoxb4 extraits des hôtes tertiaires montrent une tendance à récapituler le phénotype Ly6C^{hi} et CD62L^{hi} même si les résultats ne sont pas significatifs dû à une diminution du nombre de souris reconstituées (Figure 16c). Ces résultats démontrent que le phénotype observé dans la moelle osseuse des hôtes primaires est récapitulé dans les hôtes sériels et cela même si les cellules transplantées ne provenaient pas de la moelle osseuse. Les Tmp provenant des ganglions lymphatiques vont ainsi migrer vers la moelle osseuse où ils auront tendance à acquérir un phénotype Tcm dans cet organe.

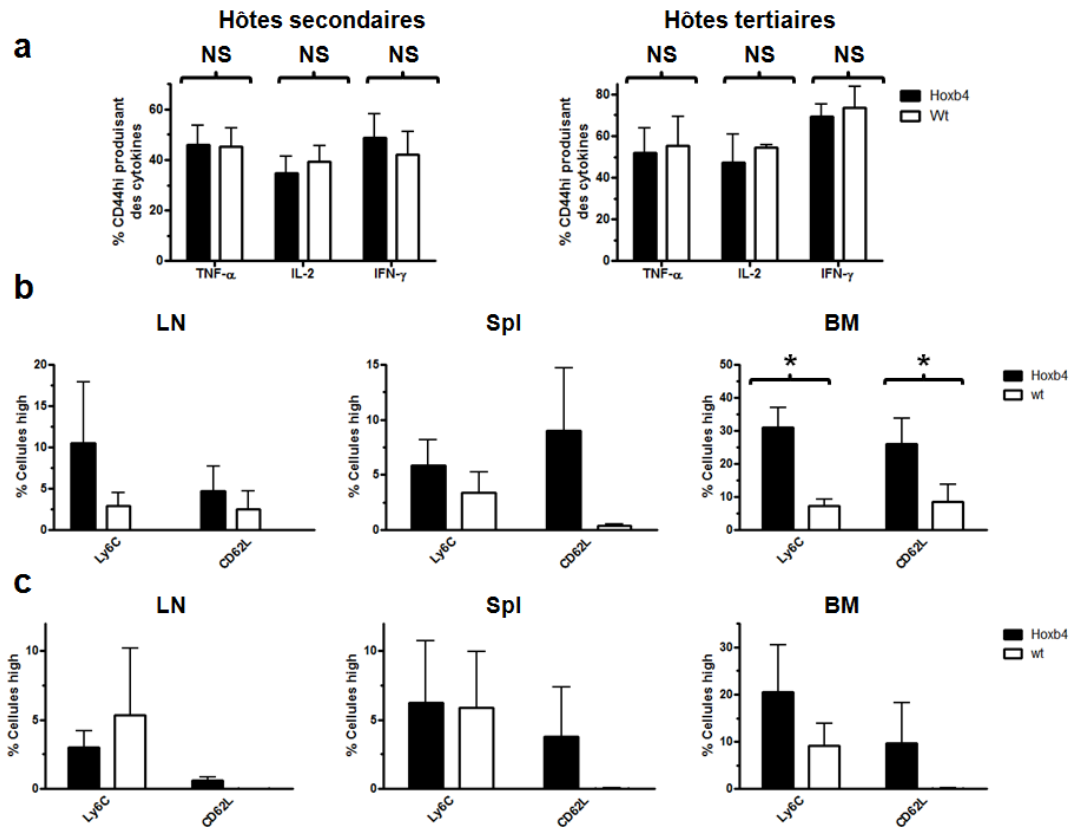


Figure 16. Les Tmp Hoxb4 conservent un phénotype Tcm dans la BM des hôtes secondaires. (a) Production de cytokines par les Tmp Hoxb4 et wt chez les hôtes secondaires et tertiaires mesurée par FACS. L'expression du Ly6C et CD62L, qui était élevée chez les Tmp Hoxb4 de la première transplantation, se récapitule chez les hôtes secondaires (b) et montre une tendance chez les hôtes tertiaires (c). Hôtes secondaires n = 6, hôtes tertiaires n = 4, (2 expériences indépendantes). * p < 0.05.

7. Prolifération homéostatique à court terme des Tmp *in vivo* en compétition

Les expériences de transplantation en compétition dans des hôtes CD3^{-/-} ont révélé que la surexpression de *Hoxb4* ne procurait pas d'avantage compétitif au niveau de la prolifération et de l'accumulation des Tmp dans les organes lymphoïdes au bout de 8 semaines (long terme). Dans le but d'examiner la PIL des Tmp à court terme, nous avons procédé à une expérience de compétition de Tmp *Hoxb4* et wt marqués au CTV puis transplantés dans des hôtes CD3^{-/-} pendant 7 jours. Puisque la période de PIL était beaucoup plus courte, 7×10^5 ϕ furent transplantés dans chaque souris afin de pouvoir les détecter chez les hôtes. Les Tmp furent triés d'après la méthode employée lors de l'expérience de compétition à long terme. Toutefois, afin d'obtenir suffisamment de Tmp pour pouvoir être détectables dans les organes au bout de 7 jours seulement, des Tmp exprimant des niveaux du marqueur d'activation CD44 moins élevés furent inclus dans le tri. Après 7 jours, les Tmp des deux groupes n'étaient pas détectables dans la moelle osseuse, possiblement car ils n'ont pas eu le temps d'y migrer. En revanche, de façon surprenante, les Tmp *Hoxb4* présentent une proportion beaucoup plus élevée que les Tmp wt dans les ganglions lymphatiques ($64.53 \pm 6.04\%$ vs $35.03 \pm 6.08\%$ ($p < 0.03$)) et la rate ($70.77 \pm 5.11\%$ vs $28.2 \pm 5.12\%$ ($p < 0.01$)) (Figure 17 a) et b). Les ratios sont ici inversés par rapport aux organes des hôtes de l'expérience de compétition à long terme. Ces ratios pourraient être expliqués par le fait que les Tmp *Hoxb4* auraient plus proliféré au bout des 7 jours que leurs homologues wt.

Par ailleurs, les Tmp *Hoxb4* et wt présentaient tous deux une population négative pour le CTV, indiquant que toutes ces cellules avaient rapidement proliféré et dilué le CTV dans le cytoplasme au fil des divisions. Cette population était négative pour le CD62L dans les deux groupes (Figure 17c). Cependant, nous pouvons apercevoir chez les Tmp *Hoxb4* une population CD62L^{hi} qui a moins divisé tel qu'illustré par le marquer CTV (Figure 17d). Cette faible population prolifère donc plus lentement et est quasi absente chez les Tmp wt. La surexpression de *Hoxb4* aurait ainsi potentiellement un effet sur la prolifération lente

des Tmp qui corrèlerait avec une plus forte accumulation de ces cellules dans les organes lymphoïdes à court terme.

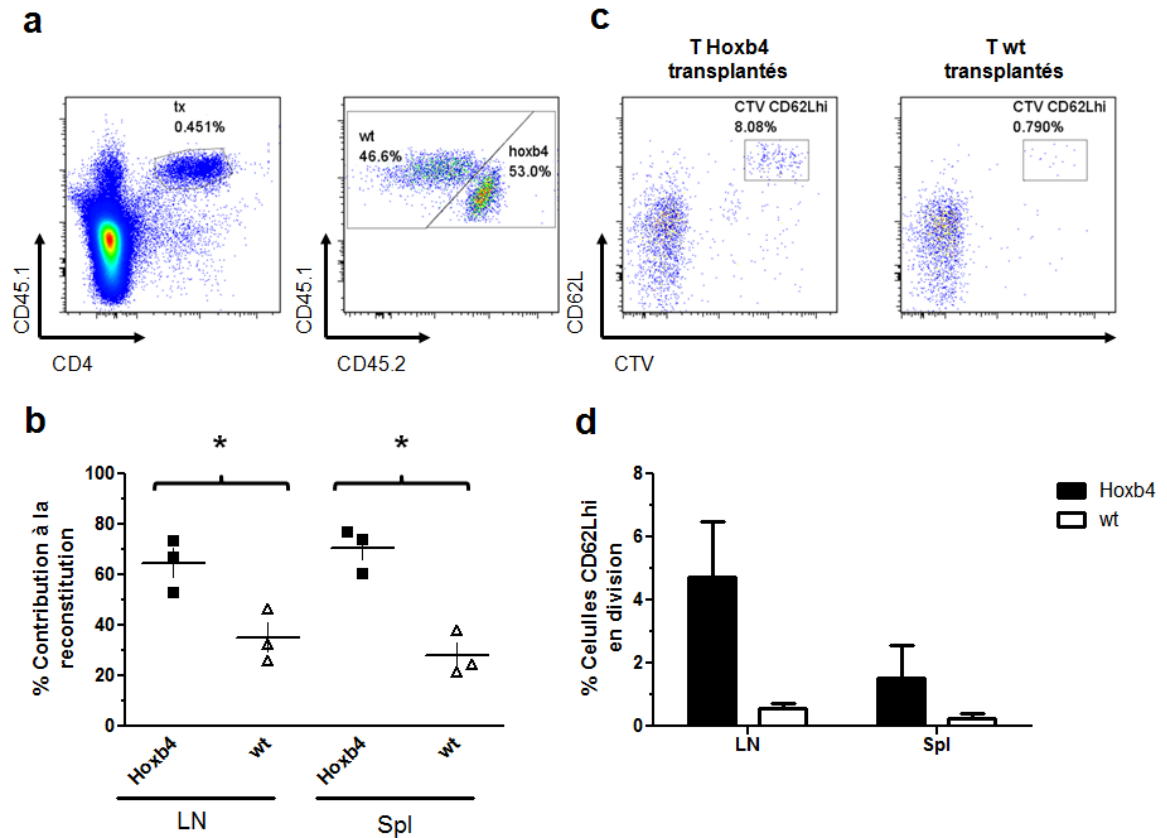


Figure 17. La surexpression de Hoxb4 entraîne une accumulation accrue des Tmp dans les LN et la Spl après une semaine. Un mixe de 7×10^5 Tmp Hoxb4 et wt (ratio 1:1) fut marqué au CTV puis transplanté chez des hôtes CD3^{-/-} dans le but d'étudier leur prolifération et ratios de contribution à la reconstitution au bout de 7 jours. (a) Les Tmp Hoxb4 présentent une plus forte accumulation que les Tmp wt dans les LN et la Spl. (b) cette différence représente un renversement des ratios observés lors des expériences de compétition à long terme. (c) Les Tmp Hoxb4 présentent une population CD62L^{hi} qui se divise lentement selon le marquage CTV. (d) Bien que non significatif, cette population est beaucoup moins marquée chez les Tmp wt. n = 3. * p < 0.05

Discussion

1. Rappel des hypothèses et objectifs

Basé sur des similarités observées chez les CSH et les Tm, nous avons initialement posé l'hypothèse que la surexpression du gène *Hoxb4* affecterait la prolifération des Tm *in vivo*. L'objectif général de ce projet était ainsi d'induire une expansion des Tmp par le biais de ce facteur de transcription.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle transgénique murin surexprimant le gène *Hoxb4* dans la lignée lymphoïde. Notre premier objectif (Figures 8-10) était de caractériser les effets possibles de la surexpression de *Hoxb4* chez les Tmp au cours du vieillissement. Particulièrement, nous nous sommes questionnés sur les effets combinés de la surexpression de *Hoxb4* et du vieillissement sur le nombre, la migration et le phénotype des Tmp. Nous avons observés des effets plutôt minimes de la surexpression de *Hoxb4* sur les Tmp, même en fonction de l'âge.

Ensuite, notre second objectif (Figure 11-17) était de déterminer l'effet de la surexpression de *Hoxb4* sur le potentiel d'expansion des Tmp. Nous avons ainsi procédé à des études de reconstitution du compartiment Tm par transplantation en compétition de Tmp CD4⁺. Cette expérience était directement inspirée des expériences de reconstitution hématopoïétique par greffe de moelle osseuse (Sauvageau et al., 1995) et visait à examiner les effets de *Hoxb4* à long terme sur la prolifération homéostatique des Tmp. Nos expériences de compétition ont révélé quelques effets inattendus de l'expression ectopique de *Hoxb4* sur le phénotype des Tmp CD4⁺ de même que sur leur prolifération.

2. Mise en contexte des résultats

2.1 Effet du vieillissement sur les Tmp

Le maintien d'un système hématopoïétique stable, tout comme le système immunitaire, est le résultat de mécanismes homéostatiques agissant dans l'organisme tout au long de sa vie. Tel qu'expliqué plus tôt, les CSH et Tm sont des cellules possédant une

très longue durée de vie par rapport au reste des cellules somatiques et sont ainsi plus sensibles aux effets du vieillissement. Les CSH s'accumulent avec l'âge dans des souris pouvant presque doubler en fréquence et possèdent un plus fort potentiel d'auto-renouvellement (Beerman et al., 2010; de Haan et al., 1997; Rossi et al., 2005; Sudo et al., 2000). Dans le compartiment T, les Tn répondent moins bien aux effets au vieillissement. Dû à une diminution de l'activité thymique, les Tn diminuent en nombre dans l'organisme, mais ils perdent également en fonctionnalité de façon indépendante du milieu dans lequel elles se trouvent (Swain et al., 2005). Entre autres, ces cellules perdent leur potentiel prolifératif, anti-greffon et anti-tumoral (Miller, 1996).

En revanche, les Tm conservent leur fonctionnalité au fil du temps (Kovaiou et al., 2005). Il est connu que les Tm, qui circulent dans l'organisme pendant de longues périodes puisqu'ils possèdent une forte capacité d'auto-renouvellement, finissent par s'accumuler (Nikolich-Zugich, 2008). Plus particulièrement, on observe des différences au niveau de la constitution de la population mémoire, c'est-à-dire qu'il y a une accumulation de Tcm chez les individus âgés (Kang et al., 2004).

Les résultats présentés dans ce mémoire montrent que la proportion de lymphocytes T totaux dans les organes lymphoïdes ne varie pas avec l'âge chez les souris wt (Figure 8). Concernant les proportions des Tn et Tm dans les organes, nos résultats démontraient une nette augmentation de la proportion des Tm dans les ganglions lymphatiques des souris wt âgées par rapport aux jeunes (Figure 8). Ceci est consistant avec plusieurs études démontrant une accumulation de cellules présentant un phénotype mémoire ($CD44^{hi}$) (Bourgeois et al., 2005; Globerson and Effros, 2000; Harp et al., 2010; Lerner et al., 1989). La proportion de Tm dans la moelle osseuse quant à elle semblait être inversement corrélée avec l'âge, du moins surtout pour les Tm $CD4^+$. Une étude a par ailleurs montré une tendance à observer une diminution des Tm dans la moelle osseuse avec l'âge (Herndler-Brandstetter et al., 2012).

2.2 Effet combiné de l'âge et de la surexpression de *Hoxb4* sur les Tm

Les effets de *Hoxb4* sur le vieillissement naturel des CSH n'est pas encore bien connu, mais une étude a déjà montré que la surexpression de ce gène pouvait induire une expansion des CSH à très long terme (>12 mois) chez la souris (Thorsteinsdottir et al., 1999). Tel que souligné plus tôt, les Tm sont également des cellules qui persistent longtemps dans l'organisme et sont donc susceptibles au vieillissement. Cette propriété permet alors l'étude des effets à long terme, par exemple un effet favorisant ou inhibant leur survie et leur maintien, de l'expression ectopique de *Hoxb4* chez ces cellules.

On remarque qu'un déclin du pourcentage de cellules T est apparent avec l'âge dans les organes lymphoïdes des souris Tg *Hoxb4* (Figure 8). Ceci contraste avec les proportions plutôt constantes de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ au cours du vieillissement chez les souris wt. Étant donné le fait que les proportions des cellules T chez les jeunes souris wt et *Hoxb4* sont comparables, ceci laisse croire que la surexpression du gène *Hoxb4* aurait possiblement un effet néfaste sur le maintien à long terme des cellules T que sur leur génération. Toutefois, malgré l'impact que la surexpression de *Hoxb4* semble avoir sur la proportion des cellules T dans les organes lymphoïdes, on n'observe pas d'effet au niveau du ratio de Tm et Tn dans les organes alors que ceux-ci demeurent comparables aux ratios trouvés chez les souris wt. Au niveau du phénotype avec l'âge, on détecte une légère augmentation de l'expression du Sca-1, un marqueur connu des CSH, chez les Tmp *Hoxb4* avec l'âge (Figure 9). Ce marqueur permet également d'isoler les Tscm, qui sont des Tmp dotés d'une longévité plus grande que les Tcm ou Tem (Gattinoni et al., 2011; Gattinoni et al., 2009).

On n'observe pas de différence majeure au niveau de la mortalité de cellules T chez les souris jeunes ou âgées (Figure 10). On aperçoit cependant une mortalité considérablement plus faible chez les Tn (CD62L^{hi}) que chez les Tm (CD62L^{lo}) avec le marquage Annexine V. Cette différence est présente chez tous les groupes bien que plus variable et non significative chez les souris âgées. Néanmoins, les Tm *Hoxb4* jeunes ou

âgés ne sont pas moins viables que leurs homologues wt et donc ne disparaissent pas par mort cellulaire. Ce résultat souligne le lien entre le phénotype CD62L^{hi}, une molécule permettant la migration vers les organes lymphoïdes, et l'absence de mortalité. Globalement, ces résultats démontrent un effet de l'âge sur la composition des compartiments T sans différence majeure entre les souris wt et Tg *Hoxb4*, mis à part une diminution du pourcentage de cellules T dans les organes des souris âgées. Cette différence pourrait possiblement s'expliquer par un effet au niveau de leur prolifération à long terme ou encore par une accumulation des Tm vers d'autres organes (ou tissus).

2.3 Effet de *Hoxb4* sur la prolifération homéostatique des Tm

Les Tmp *Hoxb4* étudiés chez les souris jeunes et âgées montraient peut d'effet du transgène sur leur phénotype. La diminution du compartiment T avec l'âge semblait souligner un possible effet de la surexpression de *Hoxb4* sur le potentiel prolifératif des cellules T à long terme (Figure 8). Nous avons alors cherché à déterminer le potentiel de prolifération homéostatique des Tmp suite à un stress. Nous cherchions également à comparer ce potentiel avec celui de Tmp wt. Les effets de la surexpression de *Hoxb4* sur l'expansion des CSH furent étudiés dans le cadre de transplantation en compétition dans des hôtes dépourvus de système hématopoïétique. En utilisant notre modèle de souris Tg *Hoxb4*, nous avons procédé à des études de reconstitution du compartiment T d'hôtes lymphopéniques de façon similaire. Ce transfert adoptif permettait ainsi d'introduire les Tmp dans une niche vide afin de stimuler leur expansion homéostatique (Figure 11).

Après 8 semaines de prolifération intense induite par le milieu lymphopénique, les Tmp *Hoxb4* ne parvenaient pas à réaliser une expansion plus grande que celle des Tmp contrôles (Figure 12). Les ratios des Tmp étaient plutôt favorables aux Tmp wt dans les ganglions lymphatiques et cette tendance était encore plus marquée dans la rate et la moelle osseuse. On n'observe toutefois que la fonctionnalité des Tmp *Hoxb4* n'est pas affectée et que ceux-ci sont capables de générer des cytokines après une courte stimulation (Figure 12). On remarque alors que la prolifération homéostatique des Tmp *Hoxb4* CD4 semble

être affectée tel que le suggérait la diminution du compartiment T chez les souris âgées. La PIL des Tmp dépend de deux facteurs importants soit la signalisation faible via le RCT par des peptides du soi de faible affinité et la présence d'IL-7. L'expansion devient maximale lorsque les Tm injectés proviennent d'un vaste répertoire de spécificité antigénique soit une population polyclonale (Hataye et al., 2006; Leitao et al., 2009). En effet, il a été démontré que la prolifération homéostatique n'induisait pas de biais de sélection de clones ayant une même spécificité antigénique et que cette diversité favorise la prolifération et le maintien des Tm (Osborne et al., 2011; Unsinger et al., 2009). De cette façon, les Tm évitent d'entrer en compétition pour les signaux nécessaires à leur maintien. De plus, les niveaux élevés d'IL-7 présents en situation de lymphopénie favorisent également une expansion optimale des Tm lorsque combinés avec la signalisation RCT (Osborne et al., 2011).

Les Tm transplantés lors de cette expérience semblent en effet avoir proliféré efficacement. Cependant, à l'encontre de nos attentes, les Tmp Hoxb4 se sont révélés être moins compétitifs que les Tmp wt. Les Tmp Hoxb4 parvenaient de moins en moins à coloniser les organes où à y proliférer que les Tmp wt au fil des transplantations (Figure 15). Ces résultats, qui contrastent fortement avec les effets normalement observés chez les CSH, pourraient s'expliquer par les hypothèses suivantes : (1) les Tm Hoxb4 s'épuisent plus rapidement à cause d'une mortalité accrue, (2) les Tm Hoxb4 ont un cycle cellulaire plus lent et voient leur prolifération freinée, (3) les Tm Hoxb4 semblent s'appauvrir dans les organes lymphoïdes secondaires parce qu'ils auraient plutôt migré vers d'autres organes ou tissus.

2.3.1 Hypothèse 1 : la mort cellulaire

Hoxb4 est un facteur limitant induisant la division symétrique *in vivo* engendrant ainsi une expansion de la population de cellules souches (Thorsteinsdottir et al., 1999). Il a été postulé que *Hoxb4* agissait sur l'état de primitivité des CSH afin de préserver leur capacité d'auto-renouvellement symétrique (Forrester and Jackson, 2012). Plus spécifiquement, les gènes cibles de *Hoxb4* sont des gènes associés aux cellules souches, typiquement impliqués dans l'activation du cycle cellulaire, l'auto-renouvellement, la survie et le maintien (Schiedlmeier et al., 2007). Il est donc raisonnable de penser que

l'expression ectopique de *Hoxb4* pourrait engendrer des cascades de signalisation ayant des effets similaires chez les Tm. En outre, il est possible que la surexpression de *Hoxb4* ait un effet négatif au niveau de la durée de vie intrinsèque des Tm, puisque leur pourcentage semble diminuer avec l'âge dans les organes lymphoïdes des souris transgéniques. Cependant, les marquages de cellules apoptotiques n'ont pas montré de différence significative avec l'âge ou l'expression de *Hoxb4*, suggérant que ces cellules n'entraient pas plus en apoptose à long terme. De plus, les mêmes marquages effectués lors de la prise de données à la fin des transplantations ne montraient pas de différence entre les Tmp wt et *Hoxb4* (résultats non présentés). De façon intéressante, les Tmp *Hoxb4* semblaient montrer une augmentation de l'expression du CD62L (Figure 13). Ce marqueur, en plus de corrélérer avec un taux plus faible de cellules mortes et mourantes, identifie Tcm dont la durée de vie et le potentiel d'auto-renouvellement sont plus importants que les autres sous-types de cellules T (Obar and Lefrancois, 2010). Les Tcm sont également plus quiescentes que les Tem (Boyman et al., 2009). De plus, les Tmp *Hoxb4* montraient de plus hauts taux d'expression du Ly6C, un marqueur identifiant les Tm CD4⁺ quiescentes maintenues à long terme ainsi que la population Tcm chez les CD8⁺ (Hanninen et al., 2011; Tokoyoda et al., 2009; Walunas et al., 1995) (Figure 13). Ces marqueurs étaient par ailleurs présents chez les Tmp *Hoxb4* de la moelle osseuse des hôtes secondaires, de façon plus prononcée que dans les ganglions lymphatiques et la rate. La tendance semblait également se poursuivre dans la moelle osseuse des hôtes tertiaires, même si les résultats n'étaient pas significatifs en raison de la perte d'hôtes (diminution du n) (Figure 16). Pourtant, les Tmp des transplantations secondaires et tertiaires provenaient des ganglions lymphatiques. Il semblerait alors que le phénotype CD62L^{hi}Ly6C^{hi} soit maintenu ou même possiblement induit dans la moelle osseuse alors que les Tmp y migrent. En ce sens, il serait intéressant de déterminer le profil migratoire des Tmp en mesurant l'expression de récepteurs chimiotactiques. Au vu de ces observations, il semble que les Tm *Hoxb4* ne sont pas épuisés par mort cellulaire.

2.3.2 Hypothèse 2 : le cycle cellulaire

On peut alors considérer les autres hypothèses concernant le sort des Tmp transplantés, notamment l'effet de la surexpression de *Hoxb4* sur le cycle cellulaire. En ce sens, les études de transplantations sérielles de CSH ont démontré que ceux-ci atteignaient un état d'épuisement se traduisant par une capacité proliférative diminuée plus rapidement suite à des transplantations sérielles (Harrison et al., 1978; Orford and Scadden, 2008). Par ailleurs, il est connu que face à une infection chronique, on observe souvent un épuisement des Tm faisant en sorte que leur fonctionnalité et prolifération soient moins efficaces. Il est difficile de déterminer si la prolifération homéostatique induit une exhaustion plus marquée chez les Tmp *Hoxb4*. Ces derniers se montraient certainement moins compétitifs au niveau de la prolifération, toutefois leur fonctionnalité n'était pas affectée. En ce sens, nous avons tenté de déterminer le potentiel des Tm récupérés de la rate des hôtes à répondre à une stimulation du RCT avec un anticorps anti-CD3 *in vitro* pendant 72h. Cependant, le nombre très réduit de Tmp (venant du donneur) présents dans la rate les empêchait de répondre même aux plus hautes concentrations d'anti-CD3 et d'anti-CD28.

Les périodes de greffes duraient 8 semaines dans le but d'éliminer les cellules ayant une courte durée de vie ou une prolifération courte et non soutenue telles les Te. Cependant, ceci venait compliquer les expériences évaluant l'activité du cycle cellulaire. Les marqueurs du cycle cellulaire s'emploient difficilement dans les transferts adoptifs sériels à long terme (32 semaines), de même que les marqueurs cytoplasmiques tels le CSFE ou le CTV. Pour contourner ce problème, nous avons procédé à une expérience de transplantation en compétition à court terme, soit de seulement 7 jours. Les résultats contrastaient avec les expériences de transplantation à long terme qui montraient un déclin de la population *Hoxb4* dès la première greffe (Figures 12 et 17). Ici encore, on voyait une sous-population CD62L^{hi} chez les Tm *Hoxb4* qui se trouvait absente chez les Tm wt. De plus, cette sous-population se démarquait par son profil de prolifération lente par rapport à la population CD62L^{lo} qui présentait un profil presque entièrement négatif pour le CTV indiquant que tous les cellules ou presque s'étaient divisées. Ce résultat concorde avec une étude qui montre que suite à une déplétion subtotale des cellules T, les Tm (CD44^{hi}

CD62L^{lo}) prolifèrent amplement plus que les Tn (CD44^{lo} CD62L^{hi}) (Neujahr et al., 2006). Étant donné que des Tmp exprimant des niveaux de CD44 légèrement plus faibles que dans l'expérience de compétition à long terme furent inclus dans cette expérience, il serait tentant de conclure que cette sous-population CD62L^{hi} s'agirait de Tn qui auraient été greffés involontairement (Figure 17). Cependant, cette population n'est pas perceptible chez les Tn wt, dont les paramètres d'exclusion de cellules non-Tm étaient les mêmes lors du tri. De plus, on observe des Tmp Hoxb4 au phénotype comparable lors des expériences de compétition à long terme. De plus, il est connu qu'en situation de PIL, les Tmp CD4⁺ et les Tn CD4⁺ polyclonaux entrent en compétition pour les facteurs de survie et que les Tmp possèdent un avantage compétitif et empêchent complètement la prolifération des Tn (Bourgeois et al., 2005; Min et al., 2004). Cela suggère que l'observation des cellules CD62L^{hi} chez les Tmp Hoxb4 ne proviendrait pas d'une contamination de Tn.

Une étude a démontré que l'expression du CD62L chez les Tm était intrinsèquement liée aux divisions effectuées par ceux-ci (Schlub et al., 2010). Cette étude montrait que l'expression du CD62L, laquelle est forte chez les Tn en début de réponse immune, diminue à mesure que les cellules se divisent rapidement durant la phase effectrice. Ainsi, les Tcm qui ont une division moins robuste et plus lente que les Tem conservent leur haut niveau d'expression du CD62L, ainsi que leur quiescence et longévité accrue, ce qui permet de les distinguer. Ceci vient établir un lien solide entre la cinétique de prolifération et le phénotype Tcm.

Il serait donc envisageable que les Tmp Hoxb4 prolifèrent plus lentement que leurs homologues wt, ce qui expliquerait leur retard au niveau de la colonisation des organes lymphoïdes. Par ailleurs, il est connu que les Tcm, tout comme les CSH, sont des cellules plutôt quiescentes (Cellot et al., 2007). C'est d'ailleurs cette qualité de prolifération lente et soutenue qui assure leur maintien à long terme plutôt qu'une prolifération rapide qui mène à un épuisement prématuré (tels que les Te ou Tem). Il est intéressant de noter que pour les deux expériences les Tmp Hoxb4 ne parvenaient pas à coloniser les organes des souris durant les 3 premières transplantations (24 semaines). Toutefois, après 4 transplantations (32 semaines) 1 souris de chaque expérience montrait un regain de Tmp Hoxb4 dans leurs organes. Bien que ces résultats soient peu concluants vu le très petit nombre d'échantillons,

plus d'expériences pourraient peut-être confirmer une tendance à retarder l'épuisement des Tmp Hoxb4. Cela serait consistant avec un phénotype et une fonction Tcm chez ceux-ci.

2.3.3 Hypothèse 3 : la migration

Finalement, la réduction en Tm Hoxb4 dans les organes lymphoïdes secondaires étudiés ici pourrait s'expliquer par le fait que ces cellules auraient migré ailleurs. Les Tm ont généralement un plus fort potentiel migratoire que les Tn (Mora and von Andrian, 2006) et cette migration est médiée par plusieurs facteurs. Les Tcm sont particulièrement compétents pour migrer d'un environnement ou organe à l'autre grâce à leur expression de sélectine et de récepteur de chimiokines. En ce sens, l'augmentation de l'expression du CD62L chez les Tm Hoxb4 suggère qu'il pourrait y avoir une sélection de clones Tcm présents au début du transfert adoptif ou d'une différenciation de certains clones vers le phénotype Tcm, possiblement engendrée par les signaux présents dans l'environnement (Figure 13). On observe entre autre un maintien, ou possiblement une induction, du phénotype marqué dans la moelle osseuse des hôtes alors que les Tmp injectés y migrent et y prolifèrent durant la PIL. Il semble que les Tcm s'accumulent avec l'âge (Kang et al., 2004), toutefois la PIL ne semble pas *a priori* induire de biais vers le phénotype Tcm chez les cellules T wt. Cette population Tcm, qui n'était pas présente avant la transplantation, n'est d'ailleurs observable que chez les Tm Hoxb4, suggérant que ce facteur de transcription pourrait avoir un effet direct ou indirect sur le phénotype (Figures 13 et 16). En effet, il a été observé que les Tmp wt générés par la PIL acquièrent généralement un phénotype Tem (CD44^{hi}CD62L^{lo}) (Voehringer et al., 2008). Il se pourrait par exemple que la migration vers certains réservoirs des Tmp facilitée par le facteur *Hoxb4* cause un changement ou maintien de phénotype. En effet, la fonction, le phénotype, la localisation et la survie des cellules T sont fortement influencés par le microenvironnement où elles se trouvent (Denucci et al., 2009). Ainsi, des Tmp qui auraient migré vers certains organes ou tissus au moment de la PIL pourraient acquérir des caractéristiques différentes.

Bien que les Tmp Hoxb4 semblent acquérir un phénotype Tcm, on n'observe néanmoins pas d'accumulation majeure de ceux-ci dans les organes lymphoïdes secondaires ou la moelle osseuse (Figures 12 et 15). Les Tm sont des cellules possédant un

fort potentiel migratoire. Elles sont très sensibles aux niveaux de cytokines présentes dans l'environnement et peuvent moduler leur expression de molécules chimiotactiques en réponse aux changements. L'IL-7 est un facteur connu de l'homéostasie des Tm CD4⁺ et CD8⁺. Il a été démontré récemment que la disponibilité spécifique de l'IL-7 et l'IL-15 dans les organes affectait le profil migratoire des Tm CD4⁺ et CD8⁺ via ces récepteurs chimiotactiques. Spécifiquement, cette étude démontrait que les Tm CD8⁺ ont plutôt tendance à s'accumuler dans les organes lymphoïdes tels les ganglions lymphatiques et la rate, où les niveaux d'IL-15 sont plus élevés, alors que les Tm CD4⁺ vont plutôt migrer vers les intestins où l'IL-7 est abondant (Yang et al., 2011). L'IL-7 est un facteur limitant pour les Tm CD4⁺, qui sont moins robustes que les Tm CD8⁺, et vient réguler l'expression du récepteur chimiotactique chez les Tm CD4⁺ favorisant leur migration vers les intestins. Cette observation est valide autant pour les Tm infectieux que pour les Tmp.

Cette divergence pourrait s'expliquer par le fait que le réservoir des Tm CD4⁺ ne se trouverait peut-être pas dans les ganglions lymphatiques en périphérie mais plutôt dans les plaques de Peyer situés dans les intestins. Si *Hoxb4* avait un effet sur le phénotype et plus particulièrement la capacité migratoire des Tm plutôt que sur leur fonction ou prolifération, on pourrait imaginer que ceux-ci migreraient, de façon transitoire ou non, vers les intestins où leur changement de phénotype serait maintenu renforçant ainsi leur nécessité d'une niche distincte des Tm wt. Par exemple, en plus d'avoir un effet sur l'expression de CD62L, *Hoxb4* pourrait induire l'expression de d'autres facteurs influençant la migration ou la rétention des Tm vers d'autres organes tels les intestins. Ceci est renforcé par le fait qu'avec l'âge (> 65 semaines), on aperçoit une nette diminution des cellules T dans les organes lymphoïdes secondaires des souris Tg *Hoxb4*, suggérant qu'ils pourraient avoir quitté ces organes (Figure 8).

Si la surexpression de *Hoxb4* ne permet pas une expansion des Tmp supérieure à celles des Tmp contrôles en situation de PIL et ne permet pas l'accumulation dans les organes lymphoïdes, il est difficile d'expliquer pourquoi chez 2 souris sur 4 les Tm *Hoxb4* semblaient parvenir à supplanter les Tm wt au bout de 4 transplantations (ou 32 semaines), à l'inverse des résultats recensés plus tôt. Même si peu de peu de souris restaient à la fin

des expériences, celles qui affichaient un ratio supérieur en Tmp Hoxb4 étaient du même nombre que celles qui conservaient leur ratios précédents. Il importerait de confirmer cette tendance avec un plus grand nombre de souris. Néanmoins, on peut tenter d'expliquer pourquoi ces résultats furent trouvés. Les Tm sont susceptibles aux effets du vieillissement de façon intrinsèques et non en fonction de l'âge de l'organisme où elles se trouvent (Haynes et al., 2005). Un des effets observés chez les Tm avec l'âge est la transition des cellules T vers le phénotype Tem ce qui vient diminuer leur longévité (Kovaiou et al., 2005). Puisque les Tmp Hoxb4 semblent conserver le phénotype Tcm plus longtemps que les Tmp wt, il serait possible que ces derniers aient tendance à disparaître à long terme ou au fil des transplantations et qu'à très long-terme les Tmp Hoxb4 se voient favorisés. On pourrait ainsi imaginer que la surexpression de *Hoxb4*, de par son effet intrinsèque d'activateur ou répresseur transcriptionnel ou indirectement en affectant le profil migratoire des Tm, viendrait sélectionner quelques clones Tm CD62L^{hi} « dormants » dont leur prolifération lente serait plus soutenue que la prolifération plus rapide et moins persistante des Tmp wt. La transplantation en compétition de ces deux populations marquées au CTV pendant 7 jours laisse par ailleurs entrevoir l'existence de cette faible population CD62L^{hi} plutôt quiescente, qui affiche quelques pics de prolifération lente, par rapport aux autres Tmp ayant proliféré beaucoup et rapidement (Figure 17).

Bien que nous n'observions pas rapidement d'effet positif sur la prolifération des Tmp Hoxb4 mis en compétition, la surexpression de *Hoxb4* pourrait ainsi représenter un facteur intéressant permettant la différenciation de Tm vers le phénotype Tcm. Le développement de thérapies permettant la reconstitution du compartiment T en absence de situation d'infection dans le but d'induire une mémoire immunologique est particulièrement intéressante pour les individus immunodéprimés (Cheung et al., 2009). La prolifération spontanée induite en situation de lymphopénie est d'ailleurs reconnue pour induire des propriétés anti-tumorales accrues chez les Tmp (Dummer et al., 2002). Des thérapies de greffes autologues de Tm polyclonaux pourraient employer le facteur *Hoxb4* si celui-ci parvient à les maintenir à plus long terme en état de quiescence au sein de la niche à très long-terme tel que nous le supposons.

Conclusion

Cette étude avait pour but d'évaluer les effets de la surexpression du gène *Hoxb4* sur la mémoire immunologique. Plus particulièrement, nous cherchions à évaluer les effets de ce gène sur l'homéostasie et l'auto-renouvellement des Tm. Nous avons ainsi démontré que la surexpression de *Hoxb4* diminuait la proportion de cellules T trouvées dans les organes lymphoïdes avec l'âge mais n'affectait pas leur phénotype ou leur viabilité. En procédant à des études de transplantations sérielles en compétition dans des hôtes déficients en cellules T, nous avons démontré que *Hoxb4* ne parvenait pas à induire l'expansion rapide et supérieure des Tm CD4⁺ tel que rapporté chez les CSH. Bien que la fonctionnalité des Tm fût préservée, on pouvait observer un changement de phénotype au fil des transplantations qui n'était pas présent chez les Tm wt. Ce phénotype, soit l'expression du marqueur CD62L, est typiquement associé à une capacité de migrer vers les organes lymphoïdes. Après 4 transplantations sérielles (32 semaines), quelques souris démontraient une plus forte contribution des Tm *Hoxb4* à la reconstitution du compartiment T et que le phénotype acquis semblait se maintenir. Ces résultats démontrent que la surexpression de *Hoxb4* pourrait avoir un effet direct ou indirect (par le biais de la migration, vers les organes lymphoïdes secondaires ou vers d'autres tissus) sur les Tm en induisant un changement de phénotype. Ceci pourrait potentiellement se traduire par une meilleure capacité de survie et de maintien dans l'organisme à très long terme.

Ceci est, à notre connaissance, la première étude utilisant le gène *Hoxb4* dans le but de récapituler les propriétés de cellules souches des Tm CD4⁺ en mesurant les effets de transferts adoptifs sériels sur leur prolifération homéostatique.

Limitations de l'étude et plans futures

Ce projet novateur visait à introduire des concepts d'hématologie à des études de nature immunologique portant sur l'homéostasie de cellules T. De ce fait, plusieurs obstacles se sont présentés lors de sa réalisation.

Une des propriétés les plus importantes des Tm, et qu'elle partage avec les CSH, est sa très longue durée de vie. Ceci implique que les expériences visant à déterminer le potentiel de prolifération homéostatique des Tm à long terme pouvaient s'étendre sur de très longues périodes (jusqu'à 8 mois). De plus, les études de cinétique de prolifération et d'analyse du cycle cellulaire se prêtaient mal à ces expériences, à cause en partie de leur durée. La très faible fréquence de Tmp isolables suite à une transplantation venaient limiter le nombre d'études que l'ont pouvait exécuter sur ceux-ci par la suite. De ce fait, les études de prolifération en réponse à une stimulation anti-CD3 de 72h n'eurent que peu de succès puisque la très faible proportion des Tm retrouvés dans les rates empêchait l'établissement d'une réponse généralisée et mesurable.

Il serait intéressant de poursuivre les expériences de transplantations sérielles avec les Tmp CD4⁺ ou CD8⁺ polyclonaux dans le but de déterminer les effets de cette prolifération spontanée sur leur diversité clonale pour déterminer s'il a sélection. L'effet du vieillissement sur la sélection clonale est notoire et il semble que la surexpression de Hoxb4 puisse avoir pour effet d'induire l'expression du CD62L ou de sélectionner les clones qui l'expriment.

Également, bien que les Tm CD4⁺ présentent un modèle fort intéressant pour l'étude de Tmp polyclonaux chez notre modèle murin transgénique, celui-ci se prête mal à des expériences en modèles monoclonaux infectieux pour lesquels les réponses sont plus quantifiables. Nous employons un protocole utilisant des souris OT-I Hoxb4 double transgéniques permettant la génération de grandes quantités de Tm CD8⁺ *in vitro* disponibles pour les transferts adoptifs. De cette façon, il serait possible de transplanter un plus grand nombre de souris et éviter de perdre une grande portion de nos hôtes en cours d'expérience. De plus, ce modèle permettrait de quantifier les clones générés par prolifération homéostatique de même qu'au cours d'une réponse immune avec le peptide

OVA. Il serait alors envisageable d'établir une cinétique. Le modèle OT-I CD8 permettrait également de tester la fonctionnalité des Tmp par leur activité cytotoxique. En outre, il serait vraiment intéressant de poursuivre cette étude sur les Tm CD8 puisque nous avons démontré que l'expression du transgène était beaucoup plus forte chez ces derniers que chez les Tmp et Tn *Hoxb4*.

Finalement, un rôle plus exact du gène *Hoxb4* sur la génération et le maintien des Tm pourrait être déterminé en étudiant des souris *Hoxb4*^{-/-}. Il serait intéressant d'observer l'état des Tm endogènes avec l'âge, ainsi que de procéder à d'autres études de transplantation en compétition.

Bibliographie

- Allard, E.L., Hardy, M.P., Leignadier, J., Marquis, M., Rooney, J., Lehoux, D., and Labrecque, N. (2007). Overexpression of IL-21 promotes massive CD8⁺ memory T cell accumulation. *Eur J Immunol* 37, 3069-3077.
- 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. *Nature immunology* 4, 168-174.
- Amsellem, S., Pflumio, F., Bardinet, D., Izac, B., Charneau, P., Romeo, P.H., Dubart-Kupperschmitt, A., and Fichelson, S. (2003). Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nature medicine* 9, 1423-1427.
- Antonchuk, J., Sauvageau, G., and Humphries, R.K. (2001). HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Experimental hematology* 29, 1125-1134.
- Antonchuk, J., Sauvageau, G., and Humphries, R.K. (2002). HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* 109, 39-45.
- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118, 149-161.
- Arai, F., and Suda, T. (2007). Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1106, 41-53.
- Baaten, B.J., Li, C.R., Deiro, M.F., Lin, M.M., Linton, P.J., and Bradley, L.M. (2010). CD44 regulates survival and memory development in Th1 cells. *Immunity* 32, 104-115.
- Badovinac, V.P., Porter, B.B., and Harty, J.T. (2002). Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nature immunology* 3, 619-626.
- Bannard, O., Kraman, M., and Fearon, D. (2009). Pathways of memory CD8⁺ T-cell development. *Eur J Immunol* 39, 2083-2087.
- Beaudette-Zlatanova, B.C., Knight, K.L., Zhang, S., Stiff, P.J., Zuniga-Pflucker, J.C., and Le, P.T. (2011). A human thymic epithelial cell culture system for the promotion of lymphopoiesis from hematopoietic stem cells. *Experimental hematology* 39, 570-579.
- Becker, T.C., Coley, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2005). Bone marrow is a preferred site for homeostatic proliferation of memory CD8 T cells. *Journal of immunology* 174, 1269-1273.
- Beerman, I., Maloney, W.J., Weissmann, I.L., and Rossi, D.J. (2010). Stem cells and the aging hematopoietic system. *Current opinion in immunology* 22, 500-506.
- Bell, J.J., and Bhandoola, A. (2008). The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature* 452, 764-767.

- Berzins, S.P., Godfrey, D.I., Miller, J.F., and Boyd, R.L. (1999). A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 9787-9791.
- Beslu, N., Krosl, J., Laurin, M., Mayotte, N., Humphries, K.R., and Sauvageau, G. (2004). Molecular interactions involved in HOXB4-induced activation of HSC self-renewal. *Blood* *104*, 2307-2314.
- Bijl, J., Thompson, A., Ramirez-Solis, R., Krosl, J., Grier, D.G., Lawrence, H.J., and Sauvageau, G. (2006). Analysis of HSC activity and compensatory Hox gene expression profile in Hoxb cluster mutant fetal liver cells. *Blood* *108*, 116-122.
- Bourgeois, C., Kassiotis, G., and Stockinger, B. (2005). A major role for memory CD4 T cells in the control of lymphopenia-induced proliferation of naive CD4 T cells. *Journal of immunology* *174*, 5316-5323.
- Bourgeois, C., and Stockinger, B. (2006). T cell homeostasis in steady state and lymphopenic conditions. *Immunol Lett* *107*, 89-92.
- Boyman, O., Cho, J.H., Tan, J.T., Surh, C.D., and Sprent, J. (2006). A major histocompatibility complex class I-dependent subset of memory phenotype CD8⁺ cells. *The Journal of experimental medicine* *203*, 1817-1825.
- Boyman, O., Krieg, C., Homann, D., and Sprent, J. (2012). Homeostatic maintenance of T cells and natural killer cells. *Cell Mol Life Sci* *69*, 1597-1608.
- Boyman, O., Letourneau, S., Krieg, C., and Sprent, J. (2009). Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells. *Eur J Immunol* *39*, 2088-2094.
- Boyman, O., Purton, J.F., Surh, C.D., and Sprent, J. (2007). Cytokines and T-cell homeostasis. *Current opinion in immunology* *19*, 320-326.
- Burke, A.C., Nelson, C.E., Morgan, B.A., and Tabin, C. (1995). Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* *121*, 333-346.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringham, F.R., *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* *425*, 841-846.
- Care, A., Testa, U., Bassani, A., Tritarelli, E., Montesoro, E., Samoggia, P., Cianetti, L., and Peschle, C. (1994). Coordinate expression and proliferative role of HOXB genes in activated adult T lymphocytes. *Molecular and cellular biology* *14*, 4872-4877.
- Carrette, F., and Surh, C.D. (2012). IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis. *Seminars in immunology* *24*, 209-217.
- Cellot, S., Krosl, J., Chagraoui, J., Meloche, S., Humphries, R.K., and Sauvageau, G. (2007). Sustained in vitro trigger of self-renewal divisions in Hoxb4hiPbx1(10) hematopoietic stem cells. *Experimental hematology* *35*, 802-816.
- Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., *et al.* (2007). Asymmetric T

lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 315, 1687-1691.

Chang, J.T., and Reiner, S.L. (2008). Asymmetric division and stem cell renewal without a permanent niche: lessons from lymphocytes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 73-79.

Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M., and Scadden, D.T. (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 287, 1804-1808.

Cheshier, S.H., Morrison, S.J., Liao, X., and Weissman, I.L. (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3120-3125.

Cheung, K.P., Yang, E., and Goldrath, A.W. (2009). Memory-like CD8⁺ T cells generated during homeostatic proliferation defer to antigen-experienced memory cells. *Journal of immunology* 183, 3364-3372.

Cho, B.K., Rao, V.P., Ge, Q., Eisen, H.N., and Chen, J. (2000). Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *The Journal of experimental medicine* 192, 549-556.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14541-14546.

Ciocca, M.L., Barnett, B.E., Burkhardt, J.K., Chang, J.T., and Reiner, S.L. (2012). Cutting edge: Asymmetric memory T cell division in response to rechallenge. *Journal of immunology* 188, 4145-4148.

Coletta, P.L., Shimeld, S.M., and Sharpe, P.T. (1994). The molecular anatomy of Hox gene expression. *Journal of anatomy* 184 (Pt 1), 15-22.

Crotty, S., Johnston, R.J., and Schoenberger, S.P. (2010). Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nature immunology* 11, 114-120.

Cui, W., and Kaech, S.M. (2010). Generation of effector CD8⁺ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunological reviews* 236, 151-166.

Dalai, S.K., Khoruzhenko, S., Drake, C.G., Jie, C.C., and Sadegh-Nasseri, S. (2011). Resolution of infection promotes a state of dormancy and long survival of CD4 memory T cells. *Immunology and cell biology* 89, 870-881.

de Haan, G., Nijhof, W., and Van Zant, G. (1997). Mouse strain-dependent changes in frequency and proliferation of hematopoietic stem cells during aging: correlation between lifespan and cycling activity. *Blood* 89, 1543-1550.

Denucci, C.C., Mitchell, J.S., and Shimizu, Y. (2009). Integrin function in T-cell homing to lymphoid and nonlymphoid sites: getting there and staying there. *Crit Rev Immunol* 29, 87-109.

- Desplan, C., Theis, J., and O'Farrell, P.H. (1985). The *Drosophila* developmental gene, engrailed, encodes a sequence-specific DNA binding activity. *Nature* *318*, 630-635.
- Duboule, D. (1999). No milk today (my Hox have gone away). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 322-323.
- Dummer, W., Niethammer, A.G., Baccala, R., Lawson, B.R., Wagner, N., Reisfeld, R.A., and Theofilopoulos, A.N. (2002). T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity. *The Journal of clinical investigation* *110*, 185-192.
- Dzierzak, E. (2005). The emergence of definitive hematopoietic stem cells in the mammal. *Current opinion in hematology* *12*, 197-202.
- Dzierzak, E., and Medvinsky, A. (1995). Mouse embryonic hematopoiesis. *Trends in genetics : TIG* *11*, 359-366.
- Eklund, E. (2011). The role of Hox proteins in leukemogenesis: insights into key regulatory events in hematopoiesis. *Critical reviews in oncogenesis* *16*, 65-76.
- Ernst, B., Lee, D.S., Chang, J.M., Sprent, J., and Surh, C.D. (1999). The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* *11*, 173-181.
- Fainsod, A., Bogarad, L.D., Ruusala, T., Lubin, M., Crothers, D.M., and Ruddle, F.H. (1986). The homeo domain of a murine protein binds 5' to its own homeo box. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *83*, 9532-9536.
- Farber, D.L. (1998). Differential TCR signaling and the generation of memory T cells. *Journal of immunology* *160*, 535-539.
- Fearon, D.T., Manders, P., and Wagner, S.D. (2001). Arrested differentiation, the self-renewing memory lymphocyte, and vaccination. *Science* *293*, 248-250.
- Forrester, L.M., and Jackson, M. (2012). Mechanism of action of HOXB4 on the hematopoietic differentiation of embryonic stem cells. *Stem cells* *30*, 379-385.
- Funk, P.E., Stephan, R.P., and Witte, P.L. (1995). Vascular cell adhesion molecule 1-positive reticular cells express interleukin-7 and stem cell factor in the bone marrow. *Blood* *86*, 2661-2671.
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., *et al.* (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature medicine* *17*, 1290-1297.
- Gattinoni, L., Zhong, X.S., Palmer, D.C., Ji, Y., Hinrichs, C.S., Yu, Z., Wrzesinski, C., Boni, A., Cassard, L., Garvin, L.M., *et al.* (2009). Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8⁺ memory stem cells. *Nature medicine* *15*, 808-813.
- Gaunt, S.J. (1994). Conservation in the Hox code during morphological evolution. *The International journal of developmental biology* *38*, 549-552.

- Gekas, C., Rhodes, K.E., Van Handel, B., Chhabra, A., Ueno, M., and Mikkola, H.K. (2010). Hematopoietic stem cell development in the placenta. *The International journal of developmental biology* *54*, 1089-1098.
- Globerson, A., and Effros, R.B. (2000). Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today* *21*, 515-521.
- Goldrath, A.W., and Bevan, M.J. (1999). Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity* *11*, 183-190.
- Goldrath, A.W., Luckey, C.J., Park, R., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 16885-16890.
- Goldrath, A.W., Sivakumar, P.V., Glaccum, M., Kennedy, M.K., Bevan, M.J., Benoist, C., Mathis, D., and Butz, E.A. (2002). Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine* *195*, 1515-1522.
- Guimond, M., Fry, T.J., and Mackall, C.L. (2005). Cytokine signals in T-cell homeostasis. *J Immunother* *28*, 289-294.
- Guimond, M., Veenstra, R.G., Grindler, D.J., Zhang, H., Cui, Y., Murphy, R.D., Kim, S.Y., Na, R., Hennighausen, L., Kurtulus, S., *et al.* (2009). Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nature immunology* *10*, 149-157.
- Haluszczyk, C., Akue, A.D., Hamilton, S.E., Johnson, L.D., Pujanauski, L., Teodorovic, L., Jameson, S.C., and Kedl, R.M. (2009). The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *The Journal of experimental medicine* *206*, 435-448.
- Hamilton, S.E., and Jameson, S.C. (2012). CD8 T cell quiescence revisited. *Trends Immunol* *33*, 224-230.
- Hanninen, A., Maksimow, M., Alam, C., Morgan, D.J., and Jalkanen, S. (2011). Ly6C supports preferential homing of central memory CD8+ T cells into lymph nodes. *Eur J Immunol* *41*, 634-644.
- Hara, T., Shitara, S., Imai, K., Miyachi, H., Kitano, S., Yao, H., Tani-Ichi, S., and Ikuta, K. (2012). Identification of IL-7-Producing Cells in Primary and Secondary Lymphoid Organs Using IL-7-GFP Knock-In Mice. *Journal of immunology* *189*, 1577-1584.
- Harp, J.R., Gilchrist, M.A., and Onami, T.M. (2010). Memory T cells are enriched in lymph nodes of selectin-ligand-deficient mice. *Journal of immunology* *185*, 5751-5761.
- Harrison, D.E., Astle, C.M., and Delaittre, J.A. (1978). Loss of proliferative capacity in immunohemopoietic stem cells caused by serial transplantation rather than aging. *The Journal of experimental medicine* *147*, 1526-1531.

- Harrison, D.E., Stone, M., and Astle, C.M. (1990). Effects of transplantation on the primitive immunohematopoietic stem cell. *The Journal of experimental medicine* *172*, 431-437.
- Hataye, J., Moon, J.J., Khoruts, A., Reilly, C., and Jenkins, M.K. (2006). Naive and memory CD4⁺ T cell survival controlled by clonal abundance. *Science* *312*, 114-116.
- Haynes, L., Eaton, S.M., Burns, E.M., Randall, T.D., and Swain, S.L. (2005). Newly generated CD4 T cells in aged animals do not exhibit age-related defects in response to antigen. *The Journal of experimental medicine* *201*, 845-851.
- Helgason, C.D., Sauvageau, G., Lawrence, H.J., Largman, C., and Humphries, R.K. (1996). Overexpression of HOXB4 enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated in vitro. *Blood* *87*, 2740-2749.
- Herndler-Brandstetter, D., Landgraf, K., Tzankov, A., Jenewein, B., Brunauer, R., Laschober, G.T., Parson, W., Kloss, F., Gassner, R., Lepperdinger, G., and Grubeck-Loebenstien, B. (2012). The impact of aging on memory T cell phenotype and function in the human bone marrow. *Journal of leukocyte biology* *91*, 197-205.
- Holmes, S., He, M., Xu, T., and Lee, P.P. (2005). Memory T cells have gene expression patterns intermediate between naive and effector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 5519-5523.
- Hombria, J.C., and Lovegrove, B. (2003). Beyond homeosis--HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation; research in biological diversity* *71*, 461-476.
- Huang, H.Y., and Luther, S.A. (2012). Expression and function of interleukin-7 in secondary and tertiary lymphoid organs. *Seminars in immunology* *24*, 175-189.
- Ichii, H., Sakamoto, A., Hatano, M., Okada, S., Toyama, H., Taki, S., Arima, M., Kuroda, Y., and Tokuhisa, T. (2002). Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8⁺ T cells. *Nature immunology* *3*, 558-563.
- Ichii, H., Sakamoto, A., Kuroda, Y., and Tokuhisa, T. (2004). Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8⁺ T cells. *Journal of immunology* *173*, 883-891.
- Ivanovs, A., Rybtsov, S., Welch, L., Anderson, R.A., Turner, M.L., and Medvinsky, A. (2011). Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. *The Journal of experimental medicine* *208*, 2417-2427.
- Iwama, A., Oguro, H., Negishi, M., Kato, Y., Morita, Y., Tsukui, H., Ema, H., Kamijo, T., Katoh-Fukui, Y., Koseki, H., *et al.* (2004). Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity* *21*, 843-851.
- Jeannet, G., Boudousquie, C., Gardiol, N., Kang, J., Huelsken, J., and Held, W. (2010). Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 9777-9782.

- Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 325, 1006-1010.
- Judge, A.D., Zhang, X., Fujii, H., Surh, C.D., and Sprent, J. (2002). Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine* 196, 935-946.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature reviews. Immunology* 2, 251-262.
- Kallies, A., Hawkins, E.D., Belz, G.T., Metcalf, D., Hommel, M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2006). Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nature immunology* 7, 466-474.
- Kambayashi, T., Assarsson, E., Lukacher, A.E., Ljunggren, H.G., and Jensen, P.E. (2003). Memory CD8+ T cells provide an early source of IFN-gamma. *J Immunol* 170, 2399-2408.
- Kang, I., Hong, M.S., Nolasco, H., Park, S.H., Dan, J.M., Choi, J.Y., and Craft, J. (2004). Age-associated change in the frequency of memory CD4+ T cells impairs long term CD4+ T cell responses to influenza vaccine. *Journal of immunology* 173, 673-681.
- Karsunky, H., Inlay, M.A., Serwold, T., Bhattacharya, D., and Weissman, I.L. (2008). Flk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood* 111, 5562-5570.
- Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., *et al.* (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 191, 771-780.
- Kessel, M., and Gruss, P. (1990). Murine developmental control genes. *Science* 249, 374-379.
- Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109-1121.
- Kieper, W.C., and Jameson, S.C. (1999). Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13306-13311.
- Kim, I., He, S., Yilmaz, O.H., Kiel, M.J., and Morrison, S.J. (2006). Enhanced purification of fetal liver hematopoietic stem cells using SLAM family receptors. *Blood* 108, 737-744.
- Kittipatarin, C., and Khaled, A.R. (2009). Ex vivo expansion of memory CD8 T cells from lymph nodes or spleen through in vitro culture with interleukin-7. *J Immunol Methods* 344, 45-57.
- Klimchenko, O., Mori, M., Distefano, A., Langlois, T., Larbret, F., Lecluse, Y., Feraud, O., Vainchenker, W., Norol, F., and Debili, N. (2009). A common bipotent progenitor

generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. *Blood* *114*, 1506-1517.

Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* *91*, 661-672.

Konuma, T., Oguro, H., and Iwama, A. (2010). Role of the polycomb group proteins in hematopoietic stem cells. *Development, growth & differentiation* *52*, 505-516.

Kovaiou, R.D., Weiskirchner, I., Keller, M., Pfister, G., Cioca, D.P., and Grubeck-Loebenstein, B. (2005). Age-related differences in phenotype and function of CD4⁺ T cells are due to a phenotypic shift from naive to memory effector CD4⁺ T cells. *Int Immunol* *17*, 1359-1366.

Kroon, E., Kros, J., Thorsteinsdottir, U., Baban, S., Buchberg, A.M., and Sauvageau, G. (1998). *Hoxa9* transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with *Meis1a* but not *Pbx1b*. *The EMBO journal* *17*, 3714-3725.

Kumaravelu, P., Hook, L., Morrison, A.M., Ure, J., Zhao, S., Zuyev, S., Ansell, J., and Medvinsky, A. (2002). Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development* *129*, 4891-4899.

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

Lansdorp, P.M. (1997). Self-renewal of stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* *3*, 171-178.

Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2005). Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Current opinion in immunology* *17*, 326-332.

Lauvau, G., Vijn, S., Kong, P., Horng, T., Kerksiek, K., Serbina, N., Tuma, R.A., and Pamer, E.G. (2001). Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine. *Science* *294*, 1735-1739.

Lebert-Ghali, C.E., Fournier, M., Dickson, G.J., Thompson, A., Sauvageau, G., and Bijl, J.J. (2010). *HoxA* cluster is haploinsufficient for activity of hematopoietic stem and progenitor cells. *Experimental hematology* *38*, 1074-1086 e1071-1075.

Lee, L.K., Ueno, M., Van Handel, B., and Mikkola, H.K. (2010). Placenta as a newly identified source of hematopoietic stem cells. *Current opinion in hematology* *17*, 313-318.

Lee, M.G., Villa, R., Trojer, P., Norman, J., Yan, K.P., Reinberg, D., Di Croce, L., and Shiekhhattar, R. (2007). Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science* *318*, 447-450.

Lefrancois, L., and Marzo, A.L. (2006). The descent of memory T-cell subsets. *Nature reviews. Immunology* *6*, 618-623.

- Leignadier, J., Hardy, M.P., Cloutier, M., Rooney, J., and Labrecque, N. (2008). Memory T-lymphocyte survival does not require T-cell receptor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 20440-20445.
- Leignadier, J., and Labrecque, N. (2010). Epitope density influences CD8+ memory T cell differentiation. *PloS one* *5*, e13740.
- Leignadier, J., Rooney, J., Daudelin, J.F., and Labrecque, N. (2011). Lowering TCR expression on naive CD8+ T cells does not affect memory T-cell differentiation. *Immunology and cell biology* *89*, 322-325.
- Leitao, C., Freitas, A.A., and Garcia, S. (2009). The role of TCR specificity and clonal competition during reconstruction of the peripheral T cell pool. *Journal of immunology* *182*, 5232-5239.
- Lensch, M.W. (2012). An Evolving Model of Hematopoietic Stem Cell Functional Identity. *Stem cell reviews*.
- Lerner, A., Yamada, T., and Miller, R.A. (1989). Pgp-1hi T lymphocytes accumulate with age in mice and respond poorly to concanavalin A. *Eur J Immunol* *19*, 977-982.
- Lessard, J., Baban, S., and Sauvageau, G. (1998). Stage-specific expression of polycomb group genes in human bone marrow cells. *Blood* *91*, 1216-1224.
- Lessard, J., and Sauvageau, G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* *423*, 255-260.
- Lin, C.S., Lim, S.K., D'Agati, V., and Costantini, F. (1996). Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes & development* *10*, 154-164.
- Link, A., Vogt, T.K., Favre, S., Britschgi, M.R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J.G., and Luther, S.A. (2007). Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nature immunology* *8*, 1255-1265.
- Linton, P.J., and Dorshkind, K. (2004). Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nature immunology* *5*, 133-139.
- Linton, P.J., Li, S.P., Zhang, Y., Bautista, B., Huynh, Q., and Trinh, T. (2005). Intrinsic versus environmental influences on T-cell responses in aging. *Immunological reviews* *205*, 207-219.
- Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S., and Ma, A. (1998). IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* *9*, 669-676.
- Luckey, C.J., Bhattacharya, D., Goldrath, A.W., Weissman, I.L., Benoist, C., and Mathis, D. (2006). Memory T and memory B cells share a transcriptional program of self-renewal with long-term hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 3304-3309.

- Luis, T.C., Ichii, M., Brugman, M.H., Kincade, P., and Staal, F.J. (2012). Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 26, 414-421.
- Ma, D., Wei, Y., and Liu, F. (2011). Regulatory mechanisms of thymus and T cell development. *Dev Comp Immunol*.
- Macallan, D.C., Wallace, D., Zhang, Y., De Lara, C., Worth, A.T., Ghattas, H., Griffin, G.E., Beverley, P.C., and Tough, D.F. (2004). Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans. *The Journal of experimental medicine* 200, 255-260.
- Magli, M.C., Barba, P., Celetti, A., De Vita, G., Cillo, C., and Boncinelli, E. (1991). Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 6348-6352.
- Magnusson, M., Brun, A.C., 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.
- Malissen, M., Gillet, A., Ardouin, L., Bouvier, G., Trucy, J., Ferrier, P., Vivier, E., and Malissen, B. (1995). Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *The EMBO journal* 14, 4641-4653.
- Manjunath, N., Shankar, P., Wan, J., Weninger, W., Crowley, M.A., Hieshima, K., Springer, T.A., Fan, X., Shen, H., Lieberman, J., and von Andrian, U.H. (2001). Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation* 108, 871-878.
- Martins, G.A., Cimmino, L., Shapiro-Shelef, M., Szabolcs, M., Herron, A., Magnusdottir, E., and Calame, K. (2006). Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nature immunology* 7, 457-465.
- Masuda, K., Itoi, M., Amagai, T., Minato, N., Katsura, Y., and Kawamoto, H. (2005). Thymic anlage is colonized by progenitors restricted to T, NK, and dendritic cell lineages. *Journal of immunology* 174, 2525-2532.
- Mazo, I.B., Honczarenko, M., Leung, H., Cavanagh, L.L., Bonasio, R., Weninger, W., Engelke, K., Xia, L., McEver, R.P., Koni, P.A., *et al.* (2005). Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells. *Immunity* 22, 259-270.
- McGinnis, W., Garber, R.L., Wirz, J., Kuroiwa, A., and Gehring, W.J. (1984). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37, 403-408.
- McGrath, K.E., and Palis, J. (2005). Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Experimental hematology* 33, 1021-1028.

- McMahon, K.A., Hiew, S.Y., Hadjur, S., Veiga-Fernandes, H., Menzel, U., Price, A.J., Kioussis, D., Williams, O., and Brady, H.J. (2007). *Il7* has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell stem cell* *1*, 338-345.
- Melchionda, F., Fry, T.J., Milliron, M.J., McKirdy, M.A., Tagaya, Y., and Mackall, C.L. (2005). Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool. *The Journal of clinical investigation* *115*, 1177-1187.
- Mikkola, H.K., Gekas, C., Orkin, S.H., and Dieterlen-Lievre, F. (2005). Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. *Experimental hematology* *33*, 1048-1054.
- Miller, H.I. (1996). Bad science, bad policy? *Science* *272*, 180a.
- Min, B., Foucras, G., Meier-Schellersheim, M., and Paul, W.E. (2004). Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 3874-3879.
- Misslitz, A., Bernhardt, G., and Forster, R. (2006). Trafficking on serpentines: molecular insight on how maturing T cells find their winding paths in the thymus. *Immunological reviews* *209*, 115-128.
- Mochizuki-Kashio, M., Mishima, Y., Miyagi, S., Negishi, M., Saraya, A., Konuma, T., Shinga, J., Koseki, H., and Iwama, A. (2011). Dependency on the polycomb gene *Ezh2* distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. *Blood* *118*, 6553-6561.
- Mohtashami, M., Shah, D.K., Nakase, H., Kianizad, K., Petrie, H.T., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2010). Direct comparison of Dll1- and Dll4-mediated Notch activation levels shows differential lymphomyeloid lineage commitment outcomes. *Journal of immunology* *185*, 867-876.
- Mora, J.R., and von Andrian, U.H. (2006). T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol* *27*, 235-243.
- Morgan, B.A. (1997). Hox genes and embryonic development. *Poultry science* *76*, 96-104.
- Morgan, R., Pettengell, R., and Sohal, J. (2004). The double life of HOXB4. *FEBS letters* *578*, 1-4.
- Morrison, S.J., Hemmati, H.D., Wandycz, A.M., and Weissman, I.L. (1995a). The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 10302-10306.
- Morrison, S.J., Uchida, N., and Weissman, I.L. (1995b). The biology of hematopoietic stem cells. *Annual review of cell and developmental biology* *11*, 35-71.
- Moulton, V.R., Bushar, N.D., Leeser, D.B., Patke, D.S., and Farber, D.L. (2006). Divergent generation of heterogeneous memory CD4 T cells. *Journal of immunology* *177*, 869-876.
- Murali-Krishna, K., and Ahmed, R. (2000). Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *Journal of immunology* *165*, 1733-1737.

- Murali-Krishna, K., Lau, L.L., Sambhara, S., Lemonnier, F., Altman, J., and Ahmed, R. (1999). Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286, 1377-1381.
- Neujahr, D.C., Chen, C., Huang, X., Markmann, J.F., Cobbold, S., Waldmann, H., Sayegh, M.H., Hancock, W.W., and Turka, L.A. (2006). Accelerated memory cell homeostasis during T cell depletion and approaches to overcome it. *Journal of immunology* 176, 4632-4639.
- Nikolich-Zugich, J. (2008). Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nature reviews. Immunology* 8, 512-522.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325, 1001-1005.
- Obar, J.J., and Lefrancois, L. (2010). Early signals during CD8 T cell priming regulate the generation of central memory cells. *Journal of immunology* 185, 263-272.
- Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81, 2844-2853.
- Oliaro, J., Van Ham, V., Sacirbegovic, F., Pasam, A., Bomzon, Z., Pham, K., Ludford-Menting, M.J., Waterhouse, N.J., Bots, M., Hawkins, E.D., *et al.* (2010). Asymmetric cell division of T cells upon antigen presentation uses multiple conserved mechanisms. *Journal of immunology* 185, 367-375.
- Orford, K.W., and Scadden, D.T. (2008). Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet* 9, 115-128.
- Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2002). Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nature immunology* 3, 323-328.
- Osborne, L.C., Patton, D.T., Seo, J.H., and Abraham, N. (2011). Elevated IL-7 availability does not account for T cell proliferation in moderate lymphopenia. *Journal of immunology* 186, 1981-1988.
- Ostiguy, V., Allard, E.L., Marquis, M., Leignadier, J., and Labrecque, N. (2007). IL-21 promotes T lymphocyte survival by activating the phosphatidylinositol-3 kinase signaling cascade. *Journal of leukocyte biology* 82, 645-656.
- Palis, J., and Yoder, M.C. (2001). Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Experimental hematology* 29, 927-936.
- Park, I.K., Qian, D., Kiel, M., Becker, M.W., Pihalja, M., Weissman, I.L., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 302-305.
- Park, J.H., Yu, Q., Erman, B., Appelbaum, J.S., Montoya-Durango, D., Grimes, H.L., and Singer, A. (2004). Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* 21, 289-302.

- Pendleton, J.W., Nagai, B.K., Murtha, M.T., and Ruddle, F.H. (1993). Expansion of the Hox gene family and the evolution of chordates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 6300-6304.
- Pepper, M., and Jenkins, M.K. (2011). Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nature immunology* *12*, 467-471.
- Pereira, P., Forni, L., Larsson, E.L., Cooper, M., Heusser, C., and Coutinho, A. (1986). Autonomous activation of B and T cells in antigen-free mice. *Eur J Immunol* *16*, 685-688.
- Pulle, G., Vidric, M., and Watts, T.H. (2006). IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival. *Journal of immunology* *176*, 2739-2748.
- Purton, J.F., Sprent, J., and Surh, C.D. (2007a). Staying alive--naive CD4(+) T cell homeostasis. *Eur J Immunol* *37*, 2367-2369.
- Purton, J.F., Tan, J.T., Rubinstein, M.P., Kim, D.M., Sprent, J., and Surh, C.D. (2007b). Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent. *The Journal of experimental medicine* *204*, 951-961.
- Rabin, M., Ferguson-Smith, A., Hart, C.P., and Ruddle, F.H. (1986). Cognate homeo-box loci mapped on homologous human and mouse chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *83*, 9104-9108.
- Radtke, F., Fasnacht, N., and Macdonald, H.R. (2010). Notch signaling in the immune system. *Immunity* *32*, 14-27.
- 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.
- Rochman, Y., Spolski, R., and Leonard, W.J. (2009). New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nature reviews. Immunology* *9*, 480-490.
- Rooke, R., Waltzinger, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1997). Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity* *7*, 123-134.
- Rossi, D.J., Bryder, D., Zahn, J.M., Ahlenius, H., Sonu, R., Wagers, A.J., and Weissman, I.L. (2005). Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 9194-9199.
- Rutishauser, R.L., Martins, G.A., Kalachikov, S., Chandele, A., Parish, I.A., Meffre, E., Jacob, J., Calame, K., and Kaech, S.M. (2009). Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* *31*, 296-308.
- Sabbagh, L., Snell, L.M., and Watts, T.H. (2007). TNF family ligands define niches for T cell memory. *Trends Immunol* *28*, 333-339.

- Saran, N., Lyszkiewicz, M., Pommerencke, J., Witzlau, K., Vakilzadeh, R., Ballmaier, M., von Boehmer, H., and Krueger, A. (2010). Multiple extrathymic precursors contribute to T-cell development with different kinetics. *Blood* *115*, 1137-1144.
- Satoh, Y., Matsumura, I., Tanaka, H., Ezoe, S., Sugahara, H., Mizuki, M., Shibayama, H., Ishiko, E., Ishiko, J., Nakajima, K., and Kanakura, Y. (2004). Roles for c-Myc in self-renewal of hematopoietic stem cells. *The Journal of biological chemistry* *279*, 24986-24993.
- Sauvageau, G., Lansdorp, P.M., Eaves, C.J., Hogge, D.E., Dragowska, W.H., Reid, D.S., Largman, C., Lawrence, H.J., and Humphries, R.K. (1994). Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 12223-12227.
- Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Eaves, C.J., Lawrence, H.J., Largman, C., Lansdorp, P.M., and Humphries, R.K. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes & development* *9*, 1753-1765.
- Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Hough, M.R., Hugo, P., Lawrence, H.J., Largman, C., and Humphries, R.K. (1997). Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity* *6*, 13-22.
- Schiedlmeier, B., Santos, A.C., Ribeiro, A., Moncaut, N., Lesinski, D., Auer, H., Kornacker, K., Ostertag, W., Baum, C., Mallo, M., and Klump, H. (2007). HOXB4's road map to stem cell expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 16952-16957.
- Schlub, T.E., Badovinac, V.P., Sabel, J.T., Harty, J.T., and Davenport, M.P. (2010). Predicting CD62L expression during the CD8+ T-cell response in vivo. *Immunology and cell biology* *88*, 157-164.
- Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C., and Lefrancois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nature immunology* *1*, 426-432.
- Schluns, K.S., and Lefrancois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nature reviews. Immunology* *3*, 269-279.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells* *4*, 7-25.
- Schuster, K., Gadiot, J., Andreesen, R., Mackensen, A., Gajewski, T.F., and Blank, C. (2009). Homeostatic proliferation of naive CD8+ T cells depends on CD62L/L-selectin-mediated homing to peripheral LN. *Eur J Immunol* *39*, 2981-2990.
- Schwarz, B.A., and Bhandoola, A. (2006). Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis. *Immunological reviews* *209*, 47-57.

- Seddon, B., and Zamoyska, R. (2002). TCR and IL-7 receptor signals can operate independently or synergize to promote lymphopenia-induced expansion of naive T cells. *Journal of immunology* *169*, 3752-3759.
- Serwold, T., Ehrlich, L.I., and Weissman, I.L. (2009). Reductive isolation from bone marrow and blood implicates common lymphoid progenitors as the major source of thymopoiesis. *Blood* *113*, 807-815.
- Sharma, D., Kumar, S.S., Checker, R., Raghu, R., Khanam, S., Krishnan, S., and Sainis, K.B. (2009). Spatial distribution, kinetics, signaling and cytokine production during homeostasis driven proliferation of CD4+ T cells. *Mol Immunol* *46*, 2403-2412.
- Sprent, J., and Cho, J.H. (2008). Self/non-self discrimination and the problem of keeping T cells alive. *Immunology and cell biology* *86*, 54-56.
- Sprent, J., Cho, J.H., Boyman, O., and Surh, C.D. (2008). T cell homeostasis. *Immunology and cell biology* *86*, 312-319.
- Sprent, J., and Surh, C.D. (2011). Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nature immunology* *12*, 478-484.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology* *21*, 139-176.
- Stemberger, C., Neuenhahn, M., Gebhardt, F.E., Schiemann, M., Buchholz, V.R., and Busch, D.H. (2009). Stem cell-like plasticity of naive and distinct memory CD8+ T cell subsets. *Seminars in immunology* *21*, 62-68.
- Stockinger, B., Barthlott, T., and Kassiotis, G. (2004). The concept of space and competition in immune regulation. *Immunology* *111*, 241-247.
- Sudo, K., Ema, H., Morita, Y., and Nakauchi, H. (2000). Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine* *192*, 1273-1280.
- Sun, J.C., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2006). Augmented IL-7 signaling during viral infection drives greater expansion of effector T cells but does not enhance memory. *Journal of immunology* *177*, 4458-4463.
- Surh, C.D., and Sprent, J. (2000). Homeostatic T cell proliferation: how far can T cells be activated to self-ligands? *The Journal of experimental medicine* *192*, F9-F14.
- Surh, C.D., and Sprent, J. (2005). Regulation of mature T cell homeostasis. *Seminars in immunology* *17*, 183-191.
- Surh, C.D., and Sprent, J. (2008). Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* *29*, 848-862.
- Swain, S., Clise-Dwyer, K., and Haynes, L. (2005). Homeostasis and the age-associated defect of CD4 T cells. *Seminars in immunology* *17*, 370-377.
- Swain, S.L. (2000). CD4 T-cell memory can persist in the absence of class II. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *355*, 407-411.

- Tabin, C.J. (1992). Why we have (only) five fingers per hand: hox genes and the evolution of paired limbs. *Development* *116*, 289-296.
- Taichman, R.S., and Emerson, S.G. (1994). Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine* *179*, 1677-1682.
- Takada, K., and Jameson, S.C. (2009). Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nature reviews. Immunology* *9*, 823-832.
- Takeda, S., Rodewald, H.R., Arakawa, H., Bluethmann, H., and Shimizu, T. (1996). MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4⁺ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* *5*, 217-228.
- Takahara, Y. (2008). Role of Polycomb-group genes in sustaining activities of normal and malignant stem cells. *International journal of hematology* *87*, 25-34.
- Tan, J.T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K.I., and Surh, C.D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 8732-8737.
- Tan, J.T., Ernst, B., Kieper, W.C., LeRoy, E., Sprent, J., and Surh, C.D. (2002). Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells. *The Journal of experimental medicine* *195*, 1523-1532.
- Tanchot, C., Le Campion, A., Martin, B., Leaument, S., Dautigny, N., and Lucas, B. (2002). Conversion of naive T cells to a memory-like phenotype in lymphopenic hosts is not related to a homeostatic mechanism that fills the peripheral naive T cell pool. *Journal of immunology* *168*, 5042-5046.
- Tanchot, C., Lemonnier, F.A., Perarnau, B., Freitas, A.A., and Rocha, B. (1997). Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* *276*, 2057-2062.
- Tavassoli, M. (1991). Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood cells* *17*, 269-281; discussion 282-266.
- ter Huurne, M., Figdor, C.G., and Torensma, R. (2010). Hematopoietic stem cells are coordinated by the molecular cues of the endosteal niche. *Stem cells and development* *19*, 1131-1141.
- Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., Hough, M.R., Dragowska, W., Lansdorp, P.M., Lawrence, H.J., Largman, C., and Humphries, R.K. (1997). Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Molecular and cellular biology* *17*, 495-505.
- Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., and Humphries, R.K. (1999). Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood* *94*, 2605-2612.

- Tokoyoda, K., Zehentmeier, S., Hegazy, A.N., Albrecht, I., Grun, J.R., Lohning, M., and Radbruch, A. (2009). Professional memory CD4+ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity* 30, 721-730.
- Tough, D.F., and Sprent, J. (1994). Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *The Journal of experimental medicine* 179, 1127-1135.
- Unsinger, J., Kazama, H., McDonough, J.S., Hotchkiss, R.S., and Ferguson, T.A. (2009). Differential lymphopenia-induced homeostatic proliferation for CD4+ and CD8+ T cells following septic injury. *Journal of leukocyte biology* 85, 382-390.
- van der Lugt, N.M., Alkema, M., Berns, A., and Deschamps, J. (1996). The Polycomb-group homolog Bmi-1 is a regulator of murine Hox gene expression. *Mechanisms of development* 58, 153-164.
- van der Wath, R.C., Wilson, A., Laurenti, E., Trumpp, A., and Lio, P. (2009). Estimating dormant and active hematopoietic stem cell kinetics through extensive modeling of bromodeoxyuridine label-retaining cell dynamics. *PloS one* 4, e6972.
- van Oostveen, J., Bijl, J., Raaphorst, F., Walboomers, J., and Meijer, C. (1999). The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 13, 1675-1690.
- Varnum-Finney, B., Halasz, L.M., Sun, M., Gridley, T., Radtke, F., and Bernstein, I.D. (2011). Notch2 governs the rate of generation of mouse long- and short-term repopulating stem cells. *The Journal of clinical investigation* 121, 1207-1216.
- Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., Pear, W.S., and Bernstein, I.D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nature medicine* 6, 1278-1281.
- Venezia, T.A., Merchant, A.A., Ramos, C.A., Whitehouse, N.L., Young, A.S., Shaw, C.A., and Goodell, M.A. (2004). Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS biology* 2, e301.
- Viret, C., Wong, F.S., and Janeway, C.A., Jr. (1999). Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity* 10, 559-568.
- Viswanathan, S., and Zandstra, P.W. (2003). Towards predictive models of stem cell fate. *Cytotechnology* 41, 75-92.
- Vivien, L., Benoist, C., and Mathis, D. (2001). T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int Immunol* 13, 763-768.
- Voehringer, D., Liang, H.E., and Locksley, R.M. (2008). Homeostasis and effector function of lymphopenia-induced "memory-like" T cells in constitutively T cell-depleted mice. *Journal of immunology* 180, 4742-4753.

- von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L.A., McNeil, T., Burdach, S.E., and Murray, R. (1995). Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *The Journal of experimental medicine* *181*, 1519-1526.
- Vos, Q., Jones, L.A., and Kruisbeek, A.M. (1992). Mice deprived of exogenous antigenic stimulation develop a normal repertoire of functional T cells. *Journal of immunology* *149*, 1204-1210.
- Wakim, L.M., and Bevan, M.J. (2010). From the thymus to longevity in the periphery. *Current opinion in immunology* *22*, 274-278.
- Walunas, T.L., Bruce, D.S., Dustin, L., Loh, D.Y., and Bluestone, J.A. (1995). Ly-6C is a marker of memory CD8⁺ T cells. *Journal of immunology* *155*, 1873-1883.
- Waskow, C., Terszowski, G., Costa, C., Gassmann, M., and Rodewald, H.R. (2004). Rescue of lethal c-Kit^{W/W} mice by erythropoietin. *Blood* *104*, 1688-1695.
- Weber, J.P., Fuhrmann, F., and Hutloff, A. (2012). T-follicular helper cells survive as long-term memory cells. *Eur J Immunol* *42*, 1981-1988.
- Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2004). Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol* *78*, 5535-5545.
- Whitmire, J.K., Eam, B., and Whitton, J.L. (2009). Mice deficient in stem cell antigen-1 (Sca1, Ly-6A/E) develop normal primary and memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses to virus infection. *Eur J Immunol* *39*, 1494-1504.
- Willinger, T., Freeman, T., Hasegawa, H., McMichael, A.J., and Callan, M.F. (2005). Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. *Journal of immunology* *175*, 5895-5903.
- Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., *et al.* (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* *135*, 1118-1129.
- Wilson, A., and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature reviews. Immunology* *6*, 93-106.
- Wojciechowski, S., Tripathi, P., Bourdeau, T., Acero, L., Grimes, H.L., Katz, J.D., Finkelman, F.D., and Hildeman, D.A. (2007). Bim/Bcl-2 balance is critical for maintaining naive and memory T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine* *204*, 1665-1675.
- Yamasaki, S., Nobuhisa, I., Ramadan, A., and Taga, T. (2011). Identification of a yolk sac cell population with hematopoietic activity in view of CD45/c-Kit expression. *Development, growth & differentiation* *53*, 870-877.
- Yang, L., Yu, Y., Kalwani, M., Tseng, T.W., and Baltimore, D. (2011). Homeostatic cytokines orchestrate the segregation of CD4 and CD8 memory T-cell reservoirs in mice. *Blood* *118*, 3039-3050.

- Yang, Q., Jeremiah Bell, J., and Bhandoola, A. (2010). T-cell lineage determination. *Immunological reviews* 238, 12-22.
- Yoder, M.C., Hiatt, K., Dutt, P., Mukherjee, P., Bodine, D.M., and Orlic, D. (1997). Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. *Immunity* 7, 335-344.
- Zakany, J., and Duboule, D. (1999). Hox genes in digit development and evolution. *Cell and tissue research* 296, 19-25.
- Zakany, J., Fromental-Ramain, C., Warot, X., and Duboule, D. (1997). Regulation of number and size of digits by posterior Hox genes: a dose-dependent mechanism with potential evolutionary implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 13695-13700.
- Zehn, D., King, C., Bevan, M.J., and Palmer, E. (2012). TCR signaling requirements for activating T cells and for generating memory. *Cell Mol Life Sci* 69, 1565-1575.
- Zhang, Y., Wong, J., Klinger, M., Tran, M.T., Shannon, K.M., and Killeen, N. (2009). MLL5 contributes to hematopoietic stem cell fitness and homeostasis. *Blood* 113, 1455-1463.
- Zhao, D.M., Yu, S., Zhou, X., Haring, J.S., Held, W., Badovinac, V.P., Harty, J.T., and Xue, H.H. (2010). Constitutive activation of Wnt signaling favors generation of memory CD8 T cells. *Journal of immunology* 184, 1191-1199.
- Zhou, X., Yu, S., Zhao, D.M., Harty, J.T., Badovinac, V.P., and Xue, H.H. (2010). Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* 33, 229-240.

