

Université de Montréal

**Développement des lymphocytes T : Mécanismes de  
différentiation extrathymique**

Par

**Rafik Terra**

Centre de recherche Guy-Bernier  
Hôpital Maisonneuve Rosemont

Département de Sciences Biomédicales  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
**Philosophiae Doctor (Ph.D) en sciences biomédicales**  
**option immunologie**

Janvier 2005

© Rafik Terra, 2005



W

4

U58

2005

v.083

## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

**Développement des lymphocytes T : Mécanismes de  
différentiation extrathymique**

Présenté par :

**Rafik Terra**

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

**Eric Milot**

**Claude Perreault**

**Georges Holländer**

**Rafick-Pierre Sékaly**

## SOMMAIRE

Le thymus est la source principale des lymphocytes T. Les interactions moléculaires entre les précurseurs lymphoïdes qui colonisent le thymus et le stroma thymique sont essentielles à leur engagement vers la lignée T et au maintien de la survie et la prolifération des thymocytes. Sous l'effet de l'oncostatin M (OM), les ganglions lymphatiques se transforment en organe lymphoïde primaire capable de supporter le développement des cellules T. Notre premier objectif fut de comprendre comment la nature des cellules stromales (thymiques vs. ganglionnaires) régule les étapes précoces du développement des cellules T. Dans le thymus, les cellules T peuvent se développer à partir de deux types de précurseurs lymphoïdes  $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+$  :  $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^{\text{lo}}$  et  $\text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$ . Alors que les  $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^{\text{lo}}$  sont absents, les  $\text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$  sont abondants dans les ganglions lymphatiques. Cependant, les progéniteurs lymphoïdes dans les ganglions lymphatiques normaux subissent un arrêt du cycle cellulaire en phase  $G_{1/0}$ . Ce déficit est dû à l'incapacité du stroma ganglionnaire à "upréguler" certains gènes tels que, *c-myb*, *c-myc* et *cyclin D2* et à en réprimer d'autres tels que, *junB*, *p16<sup>INK4a</sup>* et *p21<sup>Cip1/WAF</sup>*. Nous avons pu démontrer que le stroma ganglionnaire est capable de transmettre plusieurs signaux importants pour le développement des cellules T incluant : IL-7, Kit-ligand, Delta-like 1. Parmi les transcrits candidats, les seuls qui sont absents du stroma ganglionnaire (normal et OM<sup>+</sup>) sont Wnt4 et Wnt7b. Nous avons aussi découvert que les progéniteurs  $\text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$  sont capables de générer des cellules T *in vitro*, sur des cellules stromales OP9-DL1 produisant des quantités de Wnt4 comparables à celles du thymus (Wnt4<sup>hi</sup>). Par contre, les cellules stromales Wnt4<sup>lo</sup> permettent la génération de cellules T matures à partir des progéniteurs  $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^{\text{lo}}$  et non pas  $\text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$ . In vivo, l'OM compense la déficience dans la signalisation Wnt et améliore ainsi le potentiel de différenciation en cellules T des précurseurs  $\text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$ . Nos résultats suggèrent donc deux voies de signalisation

prolifération aux progéniteurs lymphoïdes ganglionnaires de phénotype DN1 est suffisant pour transformer les ganglions lymphatiques en organes lymphoïdes primaires.

D'autre part, des études réalisées dans notre laboratoire, ont montré que des souris receveuses, thymectomisées et transplantées avec des précurseurs  $OM^+$ , présentent une accumulation de cellules  $CD4^+CD8^+$  dans les ganglions lymphatiques et génèrent des cellules T matures avec un répertoire  $V\beta$  polyclonal. Ceci suggère l'existence d'une sélection positive extrathymique totalement indépendante de l'épithélium thymique et qui prend place dans les ganglions lymphatiques. Notre deuxième objectif a été donc d'identifier les cellules responsables de la sélection extrathymique OM-dépendante, puis de voir si cette différenciation est régie par les mêmes mécanismes que dans le thymus. L'utilisation de chimères hématopoïétiques  $\beta 2m^{-/-}$  (déficientes en CMH classe I) thymectomisées, irradiées et transplantées avec des cellules de foie fœtal  $OM^+$  (donc ne possédant que des cellules hématopoïétiques CMH classe I positive) nous a permis d'établir que : 1) Les cellules T SP  $CD4^+$  et  $CD8^+$  d'origine ganglionnaire ont un phénotype mature et activé comme des cellules T ayant subi une expansion homéostatique, 2) Les cellules hématopoïétiques ganglionnaires sont suffisantes pour supporter la différenciation d'un pool quantitativement normal de cellules T  $CD8^+$  3) Ces cellules T ont un répertoire  $V\beta$  aussi diversifié que celui des cellules T d'origine thymique. De plus, l'étude des souris double transgéniques, nous a permis de démontrer que la sélection négative est efficace dans les ganglions  $OM^+$  pour les TCR transgéniques H-Y et 2C, alors que la sélection positive n'est efficace que pour le TCR 2C. Nos résultats suggèrent ainsi que sous l'influence de l'OM, les cellules hématopoïétiques ganglionnaires sont suffisantes pour sélectionner positivement un répertoire diversifié de progéniteurs T et que l'efficacité de cette sélection est influencée par la nature du récepteur T et obéit à des règles différentes de celles de la voie thymique classique.

Le fait que les ganglions lymphatiques  $OM^+$  fonctionnent comme un organe lymphoïde "primaire et secondaire", nous a permis d'avoir un outil exceptionnel pour comprendre comment la séparation entre un organe lymphoïde primaire et secondaire

(un dispositif universel chez les vertébrés à mâchoire) influence le répertoire et le niveau d'activation des lymphocytes T. La compréhension des mécanismes de régulation de la voie lymphopoïétique découverte chez ces souris transgéniques pour l'OM, peut avoir un grand intérêt thérapeutique pour les individus ayant une hypoplasie thymique ou déficients en cellules T périphériques.

**Mot-clés :** Thymus, développement, lymphocytes T, oncostatin M, ganglions lymphatiques, récepteur de cellules T, progéniteurs lymphoïdes, signalisation, cellules stromales.

## ABSTRACT

Separation between primary and secondary lymphoid organs is a universal feature in jawed vertebrates. Surprisingly, oncostatin M transgenic mice (LckOM) present a massive extrathymic T cell development, localized strictly in the lymph nodes (LNs). The goal of our first study was to elucidate how stromal cells regulate crucial early steps in T cell development and why the wild-type (wt) LN cannot support T cell development while the OM<sup>+</sup> LN can do so. In the thymus, T cell can develop from two types of lin<sup>-</sup>Scal<sup>+</sup> lymphoid progenitors: c-Kit<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>lo</sup> and c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>. Although c-Kit<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>lo</sup> cells are absent, c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> cells are abundant in the LN. Compared to thymus DN1 cells (Lin<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), wt LN DN1 cells undergo abortive T cell commitment and get arrested in G1 phase of the cell cycle. As a result, wt LN cells failed to acquire a DN2 phenotype and accumulated at an intermediate CD44<sup>+</sup>CD25<sup>lo</sup> stage (preDN2). These DN1 cells fail to upregulate *c-myb*, *c-myc*, and *cyclin D2* and to repress *junB*, *p16<sup>INK4a</sup>* and *p21<sup>Cip1/WAF</sup>*. Blockade of T cell differentiation in the LN appears to be hampered solely by lack of Wnt signals, because LN stroma can provide key signals for T cell development including IL-7, Kit-ligand, Delta-like 1 and Wnt1, but lacks Wnt4 and Wnt7b transcripts. In line with this, we found that LN c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> progenitors could generate mature T cells when cultured in vitro with stromal cells producing thymus-like amounts of Wnt4 (Wnt4<sup>hi</sup>). In contrast, Wnt4<sup>lo</sup> stromal cells supported generation of mature T cells by c-Kit<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>lo</sup> but not by c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> progenitors. However, because OM signaling pathway intersects with Wnt, OM amplifies the T cell generation potential of LN c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> progenitors and thereby compensates for the lack of Wnt signals. We thus conclude that rescuing cell cycle progression by provision of proliferation signals is sufficient to transform the LN into a primary T lymphoid organ.

These data provide unique insights into the essence of a primary T lymphoid organ, and into how a cryptic extrathymic T cell development pathway can be amplified.



The purpose of our second project was to study the TCR-dependent stage of extrathymic T cell development. The fact that OM can transform the LN into a “primary” lymphoid organ whose ability to support T cell development and to seed secondary lymphoid organs is similar to that of a normal thymus raises two fundamental questions. Do positive and negative selection in the LN follow the same rules as in the thymus and which LN cell type can replace thymic epithelial cells in supporting positive selection of extrathymic T cell progenitors? T cell differentiation was assessed in irradiated adult-thymectomized recipients transplanted with OM-transgenic fetal liver cells. Chimeras were engineered to express MHC class I molecules on hematopoietic and/or non hematopoietic cells. We found that hematopoietic cells were sufficient to support positive selection of a polyclonal repertoire of extrathymic T cells. Studies of double-transgenic mice revealed that negative selection of T cells bearing the H-Y and the 2C TCR proceeded normally in the OM<sup>+</sup> LN but that only the latter was positively selected with high efficiency. These data demonstrate that positive selection in the OM<sup>+</sup> LN does not follow the same rules as in the thymus. The second report also demonstrates that most extrathymic T lymphocytes undergo extensive post-selection expansion probably because they live in the microenvironment where they were positively selected.

In view of the fact that the OM<sup>+</sup> LN functions as a “primary and secondary” lymphoid organ, this work shows how separation between primary and secondary lymphoid organs, a universal feature in jawed vertebrates, influences the repertoire and activation level of T lymphocytes.

**Key words:** Thymus, cellular differentiation, spleen and lymph nodes, T cell receptor, T lymphocytes, lymphoid progenitors, signaling pathways, stromal cell lines.

## TABLE DES MATIÈRES

Sommaire en Français.....	III
Sommaire en Anglais.....	VI
Table des matières .....	VIII
Liste des tableaux.....	XI
Liste des figures.....	XII
Liste des abréviations.....	XIV
Remerciements.....	XVI

## INTRODUCTION

<b>1. LE THYMUS.....</b>	<b>2</b>
1.1. Organogenèse thymique.....	3
1.1.1. Ontogénie de l'épithélium thymique .....	3
1.2. Colonisation du thymus : Précurseurs de la moelle osseuse .....	5
1.3. Développement des lymphocytes T.....	6
1.3.1. La phase précoce : TCR-independante.....	7
1.3.1.1. Les signaux du microenvironnement.....	8
a) L'engagement vers la lignée T.....	8
b) La prolifération et la survie.....	9
1.3.2. La phase tardive : TCR-dépendante.....	14
1.3.2.1. La sélection positive et négative.....	14
<b>2. HOMÉOSTASIE DES LYMPHOCYTES T.....</b>	<b>19</b>
2.1. Homéostasie durant le développement thymique.....	19
2.2. Exportation thymique et Homéostasie périphérique.....	20

<b>3. THYMUS ET VIEILLISSEMENT</b> .....	24
3.1. Rôle des progéniteurs de la moelle osseuses.....	25
3.2. Rôle du stroma thymique.....	26
3.3. Association des facteurs intrinsèques et extrinsèques.....	27
<b>4. DÉVELOPPEMENT DES CELLULES T EXTRATHYMIQUES</b> .....	28
4.1. L'oncostatin M et le développement extrathymique des cellules T.....	30
4.1.1. La souris LckOM.....	32
<b>5. OBJECTIFS DE CETTE THÈSE</b> .....	33
A. Étude des étapes précoces du développement extrathymique.....	33
B. Étude des étapes tardives du développement extrathymique.....	34

## **RÉSULTATS**

<b>ARTICLE # 1</b> .....	37
--------------------------	----

<b>ARTICLE # 2</b> .....	38
--------------------------	----

<b>RESULTATS ADDITIONNELS</b> .....	39
-------------------------------------	----

## **DISCUSSION**

<b>1. Étapes précoces du développement T extrathymique</b> .....	43
1.1. Nature des précurseurs qui colonisent les ganglions lymphatiques.....	43

1.2. Présence de sous-populations DN $\alpha$ s engagées vers la lignée T dans les ganglions lymphatiques .....	45
1.3. Stroma ganglionnaire vs. stroma thymique.....	47
1.3.1. Déficit du stroma ganglionnaire en signalisation Wnt.....	48
2. <b>Étapes tardives du développement T extrathymique</b> .....	54
2.1. La sélection positive.....	54
2.2. La sélection négative.....	57
2.3. Phénotype activé/mémoire et homéostasie des cellules T extrathymiques.....	58
<b>CONCLUSIONS</b> .....	60
<b>REFERENCES</b> .....	65
<b>FIGURE ANNEXE</b> .....	85

**Liste des tableaux****Article 2 :**

Tableau I : Numbers of H-Y TCR<sup>+</sup> and 2C TCR<sup>+</sup> T cells in lymphoid organs  
following thymic versus extrathymic development .....2-41

Tableau II : Numbers of Thy1.2<sup>+</sup> cells in single- and double-transgenic mice.....2-42

## Liste des figures

### Article 1 :

- Figure 1-1 : Surface phenotype of Lin<sup>-</sup> cell subsets in the wt thymus, wt LN, and OM<sup>+</sup> LN.....1-37
- Figure 1-2 : T cell commitment of lymphoid progenitors in the LNs.....1-38
- Figure 1-3 : Survival and proliferation of DN cells are impaired in wt LN.....1-39
- Figure 1-4 : Quantitative real time PCR analysis on thymic and lymph node stromas and OP9 DL-1 cells.....1-40
- Figure 1-5 : Wnt and LIF/OM signaling pathways in DN cells..... 1-41
- Figure 1-6 : c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> and c-Kit<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> progenitors display different differentiation potential when grown on OP9 and OP9-DL1 cells..... 1-42
- Figure 1-7 : LN c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> progenitors can complete T cell development when grown on OP9-DL1-Wnt4 cells.....1-43

### Article 2 :

- Figure 2-1 : The role of hematopoietic and non hematopoietic cells in the OM-dependent extrathymic positive selection of MHC class I-restricted T cells.....2-43
- Figure 2-2 : Positive and negative selection of H-Y TCR bearing (T3.70<sup>+</sup>) T cells in the thymus of single-transgenic (H-Y TCR) mice and in the LN of double-transgenic mice (H-Y TCR and OM).....2-44
- Figure 2-3 : Positive and negative selection of 2C TCR transgenic T lymphocytes (1B2<sup>+</sup>) in the thymus of 2C<sup>+</sup> mice and in the LN of 2C<sup>+</sup>OM<sup>+</sup> mice of H2<sup>b</sup> or H2<sup>b/d</sup> genotype.....2-45
- Figure 2-4 : Development of OM<sup>+</sup> 2C TCR<sup>+</sup> T lymphocytes in the LN is thymus independent.....2-46

Figure 2-5 : CD5 expression on thymic and extrathymic T lymphocytes.....2-47

Figure 2-6 : Expression of differentiation/activation markers by T lymphocytes of  
thymic and extrathymic origins.....2-48

## Liste des abréviations

- AGM** : Aorta -gonad-mesenephros  
**AIRE** : Autoimmune regulator  
**APC** :Adenomatous polyposis coli  
**BrdU** : 5-bromo-2'-deoxyuridine  
**CD** : Cellule dendritique  
**CEM** : Cellule épithéliale médullaire  
**CET** : Cellule épithéliale thymique  
**CLP** :Common lymphoid progenitor  
**CMH**: Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
**CMV** : Cytomégalovirus  
**CPA** : Cellule présentatrice d'antigène  
**DN** : Double négatif  
**DKK** : Dickkopf  
**DP** : Double positif  
**Dsh** : Dishevelled  
**ETP** : Early thymus progenitor  
**FTOC** : Fetal thymus organ culture  
**FRP** : Frizzled-related protein  
**Frz** : Frizzled  
**GM-CSF**: Granulocyte-macrophages colony-stimulating factor  
**GSK3** : Glycogen synthase kinase 3  
**Hes** : Hairy enhancer of split  
**Hi** : High  
**HSC** : Hematopoïetic stem cell  
**HEV** : High endothelial venule  
**IEL** : Lymphocytes T intra épithéliaux  
**IL-7**: Interleukine-7



**int**: Intermédiaire  
**ISP**: Immature simple positive  
**i.v.** : injection intraveineuse  
**K.O** : Knock-out  
**LEF** : lymphoid enhancer factor  
**LIF** : Leukemia inhibitory factor  
**LPR** : Low-density lipoprotein receptor-related  
**Lo** : Low  
**M.O.** : Moelle osseuse  
**NK T** : Cellules T "Natural Killer"  
**OM** : Oncostatin M  
**OMb**: OM bovin  
**OMh** : OM humain  
**OMm**: OM murin  
**Rag** : Recombination-activating genes  
**RTE** : Recent thymic emigrant  
**RTOC** : Reaggregate thymus organ culture  
**SCF** : Stem cell factor  
**SDF-1** : Stromal cell-derived factor-1  
**SP** : Simple positif  
**TCF** : T-cell factor  
**TCR** : T cell receptor. Récepteur des lymphocytes T  
**TECK** : Thymus expressed chemokine  
**TREC** : T-cell receptor gene excision circles  
**WIF-1** : Wnt-inhibitory factor-1

## Remerciements

*Mes remerciements les plus sincères s'adressent à mon directeur de recherche, le Dr Claude Perreault. Il m'a accordé la chance de travailler sur des projets stimulants et a toujours été disponible dans les moments les plus cruciaux. Enfin j'ai eu le privilège d'avoir un directeur qui sait valoriser ses étudiants en leur accordant assez d'importance afin de les motiver et leur donner confiance en soi.*

*Je remercie également, tout particulièrement, Nathalie Labrecque qui a été présente en tant qu'amie et qui a participé activement à ma formation. Je n'oublierai pas Isabelle Louis que j'ai appris à connaître au fil des jours et avec laquelle j'ai eu le grand plaisir de travailler sur un de mes projets de doctorat. Un merci également à toutes les personnes du laboratoire et du centre de recherche Guy Bernier qui m'ont aidé techniquement et intellectuellement afin de finaliser mes projets de recherches.*

*Finalement, je remercie mon épouse Radia comme je ne l'ai jamais fait auparavant, pour TOUT.*

*À mes parents et à mon épouse Radia*

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Pendant des siècles, le thymus est resté un organe énigmatique dont les fonctions étaient inconnues. L'origine du mot thymus vient du grec thúmos, «excroissance charnue». Cet organe a été très conservé au cours de l'évolution, d'ailleurs il présente peu de variations histologiques dans toute la phylogénie des vertébrés, à l'exception des poissons osseux de l'ordre des téléostéens. Les anciens Grecs, qui exécutaient des sacrifices rituels sur des animaux très jeunes, ont noté une grande masse de tissu dans la poitrine au-dessus du cœur et qui se prolongeait jusqu'au cou. Ils ont ainsi considéré cette masse comme étant le siège de l'âme. Longtemps considéré comme le reliquat d'un organe embryonnaire, il a fallu attendre l'année 1960 pour que le mystère du thymus soit élucidé (Miller, 2002a). En effet, le rôle du thymus en tant que source principale de cellules T a été observé pour la première fois après des études de thymectomies chez des souris nouveau nées (Miller, 1961). Ces souris présentaient une déficience marquée en lymphocytes T dans la circulation et dans les tissus lymphoïdes. Nous sommes encore loin de résoudre le mystère entourant cet organe malgré 44 ans de recherche scientifique. La question principale posée est : **Pourquoi le THYMUS est le seul organe capable de supporter la différenciation des cellules T ?**

### 1. LE THYMUS

Chez la plupart des vertébrés le thymus est formé de deux lobes entourés d'une fine capsule de tissu conjonctif. Chaque lobe est constitué de deux parties : la partie corticale externe (cortex thymique) où se trouvent en général les lymphocytes immatures qui prolifèrent très vite et la médulla interne qui contient les lymphocytes matures à très faible division cellulaire. Les deux parties sont séparées par une jonction cortico-médullaire. L'identification par Boehm et ses collègues d'un gène localisé sur le locus nude murin a permis une avancée importante dans la compréhension des mécanismes du développement de cet organe lymphoïde primaire. Ce gène code pour un nouveau facteur de transcription winged-helix/forkhead,

Foxn1/Whn (Nehls et al., 1994). Chez les animaux déficients en Foxn1, les cellules précurseurs CD45<sup>+</sup> ont été identifiées à la périphérie du thymus rudimentaire au jour 11,5 de l'état embryonnaire (E11.5). Ces dernières sont incapables d'entrer dans l'organe en développement, suggérant certaines déficiences pour des molécules nécessaires au "homing" des précurseurs lymphoïdes. Ces molécules semblent régulées par Foxn1, et incluent SDF-1/CXCL12 (stromal cell-derived factor-1) et TECK/CCL25 (thymus expressed chemokine) (Boehm et al., 2003; Campbell et al., 2003).

## **1.1. Organogenèse thymique**

Le développement d'un organisme multicellulaire à partir de l'oeuf fécondé est un processus complexe, nécessitant l'expression différentielle de gènes selon un profil spatio-temporel précis. De ce fait, un microenvironnement thymique adéquat semble indispensable à la différenciation des lymphocytes T. Le thymus est un organe composé de cellules stromales épithéliales et non épithéliales (macrophages, fibroblastes et cellules réticulaires interdigitées).

### **1.1.1. Ontogénie de l'épithélium thymique**

Les études morphologiques et fonctionnelles ont démontré une grande hétérogénéité parmi les cellules épithéliales thymiques (CET). Il a été suggéré que le cortex se développe à partir des cellules souches d'origine ectodermique et que la médulla dérive de l'endoderme de la troisième poche pharyngienne (Cordier and Haumont, 1980). D'autres études suggèrent que les deux lignées de CET dérivent exclusivement de précurseurs communs dans l'épithélium endodermique indépendamment de l'ectoderme de surface (Le Douarin and Jotereau, 1975; Gordon et al., 2004). En effet, chez la souris, l'analyse de l'ontogénie précoce du thymus a démontré qu'à partir de E10.5 à E11.5 du développement embryonnaire, l'épithélium thymique paraissait phénotypiquement et morphologiquement homogène (Gill et al., 2002). En effet, l'étude de Gill et al. avec une autre étude suggèrent fortement que

tous les types de cellules épithéliales thymique dérivent de cellules progéniteurs commun MTS24<sup>+</sup> ou MTS20<sup>+</sup>MTS24<sup>+</sup> respectivement (Bennett et al., 2002; Gill et al., 2002).

À E11.5, les cellules épithéliales du primordium thymique sont encore incompetentes pour supporter le développement T (Itoi et al., 2001; Amagai et al., 1995). Cette capacité est dépendante de l'activation transcriptionnelle du gène *Foxn1* dans l'épithélium thymique. Une étude récente a démontré que l'expression de *Foxn1* est régulée de façon autocrine (par les CET) et paracrine (par les thymocytes) par la signalisation via les glycoprotéines Wnt sécrétées (Balciunaite et al., 2002). Par ailleurs, cette étude suggère que la signalisation via Wnt et l'expression de *Foxn1* sont nécessaires à la fonction et l'intégrité des CET au delà de l'organogenèse. L'absence fonctionnelle de *Foxn1* cause une athymie avec des CET bloquées au stade immature et incapables d'attirer les progéniteurs hématopoïétiques dans le primordium thymique (Itoi et al., 2001). Après E12.5, les précurseurs lymphoïdes migrent dans le rudiment épithélial thymique et vers E14.5, ils se différencient pour l'engagement vers la lignée des cellules T. Cet engagement cellulaire nécessite des interactions dans le thymus entre le ligand Delta-like-1, exprimé par les cellules épithéliales, et son récepteur Notch exprimé sur les précurseurs lymphoïdes. La présence de cette interaction, démontrée *in vitro* par l'utilisation de cellules stromales OP9 de la moelle osseuse transfectées avec Deltat-like 1, est suffisante pour supporter la différenciation des cellules T (Schmitt and Zuniga-Pflucker, 2002). Contrairement à la différenciation initiale des CET, les étapes tardives du développement thymique (stade fœtal E15.5 et post natal) requièrent des interactions avec les thymocytes (Klug et al., 2002; Su et al., 2003) pour permettre une organisation normale du compartiment épithéliale médullaire et cortical. Dans les mutants thymiques où le développement des thymocytes est complètement bloqué (*c-Kit*<sup>-/-</sup>/*γ*<sup>-/-</sup>) (Rodewald et al., 1997b) et ceux avec un blocage au stade DN1 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) (souris transgéniques hCD3ε26) (Hollander et al., 1995), le microenvironnement thymique reste indifférencié et ressemble à celui de l'embryon au stade E12.5, sans ségrégation cortico-médullaire.

## 1.2. Colonisation du thymus : Précurseurs de la moelle osseuse

Les précurseurs des cellules T doivent migrer de la moelle osseuse (M.O.) vers un thymus fonctionnel pour pouvoir se développer. Il a été démontré que l'injection intrathymique ou i.v. de thymocytes résulte en une thymopoïèse transitoire. De la même manière l'injection des précurseurs de la M.O. de façon intrathymique donne des résultats similaires. Par contre, seul le transfert i.v. de la M.O. permet une thymopoïèse continue (Goldschneider et al., 1986; Scollay et al., 1986). Ces résultats démontrent donc que l'origine des précurseurs thymiques est la M.O., et que le thymus n'est pas capable d'offrir un environnement propice à l'autorenouvellement. L'apport des progéniteurs de la M.O. au thymus est indispensable pour maintenir la thymopoïèse au cours de la vie adulte (Goldschneider et al., 1986; Scollay et al., 1986). Cependant, le thymus est périodiquement réceptif pour les progénitures issus du sang périphériques, ce qui suggère un nombre limité de niches dans cet organe (Foss et al., 2001). En effet, une étude récente a mis en évidence une compétition pour les niches stromales, impliquant les cellules CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (Prockop and Petrie, 2004). D'autres études ont suggéré un nombre très faible de progéniteurs qui colonisent le thymus, avec 100-300 niches occupées, et une moyenne de remplacement des progéniteurs de 2-3% par jour (Donskoy and Goldschneider, 1992; Spangrude and Scollay, 1990).

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) avec le phénotype Lin<sup>-</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> Sca1<sup>hi</sup>c-Kit<sup>hi</sup> sont le premier maillon de la chaîne de différenciation des cellules hématopoïétiques. Toutes les lignées lymphoïdes, érythroïdes et myéloïdes se développent à partir des HSC. Weissman et ses collègues (Kondo et al., 1997) ont isolé à partir de la M.O., des progéniteurs lymphoïdes communs (T et B) en aval des HSC, sur la base d'expression de marqueurs de surfaces. Ces cellules appelées CLP ont le phénotype Lin<sup>-</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>c-Kit<sup>lo</sup>Sca-1<sup>lo</sup>. L'engagement des CLP vers différentes lignées lymphoïdes dépend de l'action de facteurs de transcription (tel que : Pax-5 ou GATA-3) (Nutt et al., 1999; Ting et al., 1996), de ligands transmembranaires ou de récepteurs (tel que : Notch et ses ligands) (Pui et al., 1999; Radtke et al., 1999) et de signalisation via des cytokines (tel que : IL7 ou IL15) (Di Santo et al., 2000; Peschon



et al., 1994). Les CLP n'ont jamais été démontrés comme étant une population capable de coloniser le sang périphérique et le thymus (Kondo et al., 1997; Ceredig and Rolink, 2002; Allman et al., 2003; Schwarz and Bhandoola, 2004). Ainsi, les CLP ne semblent pas nécessaires au développement des lymphocytes T. Néanmoins, une autre étude très élégante utilisant des souris transgéniques pour le gène rapporteur hCD25 sous le contrôle de la région régulatrice de la chaîne pT $\alpha$  (composant essentiel du pré-TCR) a mis en évidence une nouvelle population CLP-2 capable de coloniser le thymus et de générer des cellules T (Martin et al., 2003). Les CLP semblent être la source des CLP-2, caractérisés par leur phénotype Lin<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>c-Kit<sup>-</sup>CD44<sup>hi</sup>. Par contre, l'équipe de Bhandoola n'a pas réussi à identifier les CLP-2 (ainsi que les CLP) dans le sang périphérique (Schwarz and Bhandoola, 2004), ce qui remet en question le lien direct entre les CLP et les cellules T thymiques. Cette même équipe a mis en évidence une autre population de progéniteurs plus immature que les CLP qui est présente dans la M.O. (Allman et al., 2003) et dans le sang périphérique (Schwarz and Bhandoola, 2004) appelée LSKFlt3<sup>+</sup>. Ces cellules sont à l'origine des ETP, les précurseurs les plus précoces de la lignée T, identifiés dans le thymus (Allman et al., 2003). Un lien direct entre les ETP et les CLP a été exclu d'après les résultats obtenus avec la souris Ikaros<sup>-/-</sup>. En effet, cette souris possède des ETP mais elle est déficiente en CLP (Allman et al., 2003). Tous ces résultats suggèrent que les ETP, les précurseurs thymiques à l'origine des cellules T, se développeraient via une voie CLP indépendante. Cette voie serait liée directement aux LSKFlt3<sup>+</sup> issus eux même des HSC (LSKFlt3<sup>-</sup>) de la M.O.. Ces LSKFlt3<sup>+</sup> passeraient par le sang périphérique pour atteindre le thymus.

### 1.3. Développement des lymphocytes T

Après la colonisation du thymus, le développement des cellules T exige des événements clés incluant : l'engagement vers la lignée T, les processus de sélections et la migration thymique. Ces différentes étapes nécessitent chez la souris adulte environ 4 semaines. Les 2 premières semaines sont indépendantes du TCR et l'autre moitié est complètement dépendante de l'interaction avec le TCR. La différenciation TCR-

indépendante concerne l'étape où l'engagement vers la lignée T est décidé, i.e. au stade double négatif (DN), avant l'expression des corécepteurs CD4 et CD8. La différenciation TCR-dépendante concerne les cellules complètement engagées dans la lignée T, les cellules double positives (DP) qui expriment CD4 et CD8 et qui vont subir la sélection positive et négative.

### 1.3.1. La phase précoce : TCR-indépendante

Le développement des thymocytes n'est pas un processus "strictement autonome". La transition d'une étape à l'autre requiert des interactions avec les cellules stromales thymiques. Ces interactions vont permettre l'engagement vers la lignée T, la prolifération et la différenciation des thymocytes. Les stades de différenciation des thymocytes immatures DN ou triple négatif (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>), en référence aux corécepteurs, sont caractérisés par l'expression de marqueurs de surface comme la molécule d'adhésion CD44 (p<sub>gp</sub>-1) et la chaîne α du récepteur de l'interleukine 2 (IL-2), CD25. Quatre stades ont été identifiés : DN1 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), DN2 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), DN3 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) et DN4 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) (Godfrey et al., 1993) (FIGURE ANNEXE). Les cellules DN représentent environ 2-5% du nombre total des thymocytes. D'autres marqueurs sont nécessaires pour la ségrégation des différentes sous-populations: c-Kit (CD117) (le récepteur du stem cell ou steel factor) ainsi que l'IL-7Rα (la chaîne α du récepteur de l'IL-7). Malgré les divergences concernant la nature des progéniteurs colonisant le thymus chez l'adulte, via la jonction cortico-médullaire, il est bien établi que la sous-population DN1 contient des précurseurs lymphoïdes multipotents avec un potentiel de différenciation en cellules T αβ, cellules T γδ, cellules B, cellules NK, macrophages et cellules dendritiques (FIGURE ANNEXE). Parmi cette sous-population DN1, on retrouve aussi des précurseurs précoces engagés vers la lignée T (ETP) ayant le phénotype Lin<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>IL-7Rα<sup>-</sup>c-Kit<sup>hi</sup>. Ces précurseurs vont migrer à travers le cortex thymique, prolifèrent rapidement et acquièrent de nouveaux marqueurs de surfaces (HSA et CD25) pendant qu'elles continuent à exprimer CD44 et c-Kit pour atteindre le stade DN2 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>c-Kit<sup>hi</sup>). Le réarrangement de la chaîne β du TCR commence à ce

stade DN2. Ce réarrangement, sous le contrôle de deux enzymes recombinases appelées Rag-1 et Rag-2 (Recombination-activating genes), s'effectue en deux étapes initié en premier lieu par un réarrangement D→J, suivie par V→DJ. Les premiers produits du réarrangement, les protéines du TCRβ intracellulaires, sont détectables au stade DN3 quand les cellules ont réprimé l'expression de c-Kit et CD44. À ce stade, la chaîne β du TCR est exprimée à la surface en association avec la chaîne pTα et les molécules du complexe CD3, pour former le pré-TCR. Si le réarrangement de la chaîne β du TCR est productif, la cellule reçoit un signal de survie via le pré-TCR pour proliférer et se différencier en cellules DN4. Ce processus de sélection est appelé la "β-sélection". Ces cellules vont ensuite enclencher le réarrangement de la chaîne α du TCR, pour se différencier en cellules DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) exprimant un TCRαβ à la surface, mais à faible niveau (TCR<sup>lo</sup>). À partir de ce moment, le processus de sélection TCR-dépendant (i.e. la sélection positive et négative) est engagé, afin de générer des cellules T matures (TCR<sup>hi</sup>) capables de discriminer entre le soi et le non-soi.

### 1.3.1.1. Les signaux du microenvironnement :

Comment les cellules épithéliales corticales thymiques vont-elles influencer la différenciation des précurseurs lymphoïdes en cellules T? Deux phases importantes sont à considérer: l'engagement vers la lignée T et la phase de survie/prolifération des progéniteurs lymphoïdes et des sous-populations DN.

#### a) L'engagement vers la lignée T

Plusieurs études ont démontré le rôle essentiel de la molécule transmembranaire **Notch-1** dans l'engagement des précurseurs lymphoïdes vers la lignée T (Robey, 1999; Deftos and Bevan, 2000). Quatre récepteurs Notch (Notch 1-4), et cinq ligands transmembranaires (**Jagged 1 et 2 et Delta-like 1, 3, et 4**) ont été décrits chez la souris (Allman et al., 2002a). L'inactivation de Notch-1 provoque un blocage dans la différenciation des lymphocytes T au stade DN1 (Radtke et al., 1999).

Par contre, une surexpression de la forme constitutivement active de Notch-1 dans les cellules hématopoïétiques génère des cellules DP dans la M.O., alors que le développement des cellules B est bloqué à un stade précoce (Pui et al., 1999). Une autre étude a démontré qu'en absence de Notch-1, les progéniteurs de la M.O. rentrent dans le thymus et se développent en cellules B (Wilson et al., 2001). Ce qui indique que Notch-1 "éduque" les progéniteurs lymphoïdes précoces à suivre la voie de différenciation des cellules T en bloquant la différenciation des cellules B. Le même résultat a été récemment obtenu par l'inactivation du facteur de transcription CSL, facteur important pour la signalisation Notch (Han et al., 2002). Les gènes cibles de la signalisation Notch dans les cellules T incluent : Hairy enhancer of split (Hes)1, Hes5 et Deltex1 (Bhandoola et al., 2003; Radtke et al., 2004). pT $\alpha$  est aussi une cible potentielle de Notch (Radtke et al., 2004). La surexpression rétrovirale de Hes1 ou Hes5 dans les précurseurs de la M.O. altère aussi le développement des cellules B. Ceci indique que la signalisation via Notch doit être absente ou négativement régulée pour permettre la différenciation vers la lignée B (Kawamata et al., 2002). Les souris déficientes en Hes1 présentent une altération partielle dans le développement précoce des cellules T (Tomita et al., 1999). Ces données suggèrent que l'une des caractéristiques cruciales, mais pas unique, du microenvironnement thymique est la transmission d'un signal Notch aux progéniteurs lymphoïdes qui colonisent le thymus, grâce aux ligands exprimés par les cellules épithéliales thymiques (Anderson et al., 2001). Mis à part l'engagement vers la lignée T versus la lignée B, Notch a été décrit comme étant impliqué dans d'autres processus intrathymiques, comme la différenciation des cellules TCR $\alpha\beta$  *versus*  $\gamma\delta$  (Washburn et al., 1997), le réarrangement de la chaîne  $\beta$  du TCR (Wolfer et al., 2002), ainsi que le développement des cellules T CD4 *versus* CD8 (Robey et al., 1996).

### **b) La prolifération et la survie**

Les évaluations concernant le nombre de cellules progénitrices qui rentrent dans le thymus chaque jour (10-100) et le nombre de cellules qui sont exportées ou qui meurent chaque jour, ont estimées que chaque précurseur peut générer

approximativement un million de thymocytes pendant les deux premières semaines du développement des thymocytes (Shortman et al., 1990; Petrie, 2002). D'autres études utilisant l'incorporation du 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) pour visualiser la division cellulaire, ont démontré deux stades de division importants au sein des sous-populations DN incluant les DN2 et les DN4 (Penit et al., 1995) (FIGURE ANNEXE). Ces résultats montrent que les cellules qui rentrent dans le thymus majoritairement quiescentes, une fois à l'intérieur, subissent deux phases d'expansions prolifératives, séparées par une période de quiescence au stade DN3. Une telle prolifération cellulaire, implique forcément une variété de facteurs thymiques qui induisent et soutiennent la division des cellules, y compris des facteurs et des cytokines de croissance. La première phase de prolifération (DN2) implique deux cytokines produites par le stroma thymique, **SCF** (Stem cell Factor) et l'**IL-7** (Wiles et al., 1992; Moore et al., 1993). Leur rôle dans le développement précoce des lymphocytes T a été démontré dans les souris **IL-7<sup>-/-</sup>** chez lesquelles on observe une réduction importante du nombre de thymocytes (Freedman-Jeffry et al., 1995). De la même manière, le développement des thymocytes est complètement bloqué dans les souris néonatales, double déficientes pour **c-Kit** (le récepteur au SCF), et pour la chaîne  $\gamma_c$  du récepteur à l'**IL-7** (**c-Kit<sup>w/w</sup>  $\gamma_c^{-/-}$** ) (Rodewald et al., 1997a). D'autre part, les souris **c-Kit<sup>w/w</sup>** viables, appelées (vickid) montrent un blocage du développement des cellules T au stade DN1 avec une accumulation de cette sous-population et une absence quasi totale des cellules DN2 et DN3 (Waskow et al., 2002). La signalisation via le **pré-TCR** (**TCR $\beta$ /pT $\alpha$** ) contrôle la deuxième phase de prolifération au stade DN4 (Borowski et al., 2004; Michie and Zuniga-Pflucker, 2002). En effet, les souris déficientes pour la chaîne  $\beta$  (**Rag-1** ou **Rag-2** Knock-out) subissent un arrêt dans la transition DN3 vers DN4 avec une diminution du nombre de thymocytes (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992).

L'interaction du récepteur **Flt3** avec son ligand **Flt3L** semble jouer un rôle important dans le développement précoce des lymphocytes T (Moore and Zlotnik, 1997) et dans la reconstitution immune thymus dépendante (Fry et al., 2004). Cependant, le rôle de cette interaction dans la thymopoïèse n'a pas pu être confirmé avec les souris **Flt3<sup>-/-</sup>** (Mackarehtschian et al., 1995) et **Flt3L<sup>-/-</sup>** (Sitnicka et al., 2002).

Les proportions des thymocytes sont normales et seulement une faible diminution dans la sous-population DN2 a été observée dans les deux souris knock-out respectivement (Mackarehtschian et al., 1995; Sitnicka et al., 2002). On peut expliquer l'absence d'effet dans ces deux souris Knock out par le fait que des mécanismes compensatoires pourraient masquer le déficit causé par la délétion du ligand Flt3L ou de son récepteur Flt3.

### **Voies de signalisations Wnt :**

Les protéines Wnt constituent une famille de 18 glycoprotéines sécrétées. Ces protéines sont impliquées dans l'embryogenèse, la prolifération cellulaire et l'autorenouvellement des progéniteurs (Miller, 2002b; Reya et al., 2003). Plusieurs gènes *Wnt* ont été mutés chez la souris, provoquant ainsi des déficits spécifiques au cours du développement (Miller, 2002b). Les modèles actuels de la signalisation via Wnt, stipulent que ces protéines sécrétées se fixent à des récepteurs serpentins transmembranaires de la famille Frizzled (Fz). Ces récepteurs Fz avec leurs corécepteurs LPR-5 et -6 (low-density lipoprotein receptor-related) s'associent aux ligands Wnt pour former une unité tripartite permettant l'initiation de la voie de signalisation Wnt (Miller, 2002b). Cette signalisation est modulée par l'association à la surface de la cellule de diverses protéines sécrétées telles que Wnt-inhibitory factor-1 (WIF-1), Dickkopf (DKK), Cerberus ou la famille des Frizzled-related protein (FRP ou FrzB) (Miller, 2002b). La transduction de signal Wnt s'effectue à travers au moins trois voies de signalisation intracellulaire incluant, la voie canonique 'Wnt/b-caténine' et la voie non canonique 'Wnt/Ca<sup>2+</sup> et Wnt/polarity pathway'. La fonction principale de la voie canonique s'observe durant le développement. La  $\beta$ -caténine joue un rôle clé dans cette voie de signalisation. Le modèle actuel proposé est le suivant : le pool de b-caténine libre est finement contrôlé, les facteurs Wnt favorisent son accumulation, et le gène suppresseur de tumeur APC (Adenomatous Polyposis Coli) participe à sa dégradation. Lorsque la b-caténine libre s'accumule, elle est capable, en association avec les facteurs de transcription de la famille TCF (T-cell factor)/LEF (lymphoid enhancer factor), de contrôler l'expression de gènes cibles impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. Le contrôle du taux de  $\beta$ -

caténine libre est post-traductionnel, impliquant le complexe de destruction, composé de l'APC et de l'Axin, qui va faciliter la phosphorylation du domaine amino-terminal de la  $\beta$ -caténine par la kinase GSK3 (Glycogen Synthase kinase3). Lorsque la protéine est phosphorylée, elle est prise en charge par le système ubiquitine/protéasome puis est dégradée par le protéasome. En présence d'un signal Wnt, l'activité de la kinase GSK3 est inhibée par la protéine cytoplasmique Dsh (Dishevelled), la  $\beta$ -caténine n'est pas phosphorylée, elle s'accumule et permet donc, par l'induction de TCF/LEF (après sa translocation dans le noyau), l'émission du signal de prolifération (Varas et al., 2003).

La voie de signalisation Wnt a été démontrée comme étant impliquée dans la régulation du développement des thymocytes. Les facteurs de transcription TCF-1 et LEF-1 sont exprimés dans le thymus (Hattori et al., 1996; Verbeek et al., 1995). La  $\beta$ -caténine est aussi présente dans les thymocytes, mais à cause de sa durée de vie très courte, seulement de faibles quantités de la protéine ont été détectées par cytométrie en flux dans les sous-populations DN1 et DN2 (Gounari et al., 2001). L'équipe de Hollander a démontré récemment que les sous-populations DN3, DN4, DP et les thymocytes SP matures expriment plusieurs gènes *Wnt*, incluant *Wnt3*, *Wnt4*, *Wnt5b* et *Wnt10b* (Balciunaite et al., 2002). Les CETs immatures (MTS24<sup>+</sup>) et mature (MTS24<sup>-</sup>) expriment aussi des niveaux variables d'ARNm de ces mêmes molécules *Wnt*, incluant aussi *Wnt1* (Balciunaite et al., 2002). Différents isoformes du récepteur Frz sont aussi exprimés dans le thymus (Staal et al., 2001). Cette étude a démontré *in vitro* que l'interaction de la  $\beta$ -caténine avec TCF-1 est nécessaire au développement des thymocytes et que le signal Wnt est capable d'activer la transcription médiée par TCF-1 dans ces cellules. Ces résultats suggèrent ainsi que la voie canonique pourrait être active dans le thymus (Staal et al., 2001). Une autre équipe a mis en évidence des transcrits de plusieurs molécules Wnt et leur récepteurs Frz sur les cellules épithéliales et les thymocytes respectivement (Staal et al., 2001; Pongracz et al., 2003). Une prédominance de l'expression de l'ARNm de *Wnt4* sur les cellules épithéliales et de *Frz6* sur les thymocytes a été observée (Pongracz et al., 2003). Les études de gain et de perte de fonction ont permis d'établir que la signalisation Wnt contrôle la cellularité thymique aussi bien que différents stades de différenciation des thymocytes. Plusieurs modèles expérimentaux déficients pour la signalisation Wnt présentent une réduction

importante dans le nombre des thymocytes (Verbeek et al., 1995; Schilham et al., 1998; Okamura et al., 1998; Mulroy et al., 2002). Les souris  $Wnt1^{-/-}Wnt4^{-/-}$  présentent une réduction de 50-70% à E15-16 et de 40-50% à la naissance (Mulroy et al., 2002). Dans les souris  $TCF-1^{-/-}$ , on observe aussi une diminution de la cellularité thymique avec l'âge (Verbeek et al., 1995; Schilham et al., 1998). Par contre, sous l'effet de  $Wnt1$  et  $Wnt4$ , dans un système de culture *in vitro*, le nombre des thymocytes fœtaux est sept fois plus élevé que le contrôle (Staal et al., 2001). La survie et la prolifération semblent être les deux paramètres affectés après l'altération de la voie de signalisation  $Wnt$ . L'analyse du cycle cellulaire dans les souris adultes  $TCF-1$  déficientes a démontré une diminution de la prolifération dans les sous-population DN et ISP (immature simple positive) (Ioannidis et al., 2001) et plus précisément dans les sous-populations DN1 et DN4 (Schilham et al., 1998). L'inhibition de la voie de signalisation  $Wnt$  chez la souris, par la surexpression inductible de l'axin, provoque une diminution de la taille du thymus et une apoptose massive des thymocytes corticaux (Hsu et al., 2001), ce qui renforce l'idée que l'activation de la b-caténine favorise la survie des thymocytes.

À la différence des souris  $TCF-1^{-/-}$  (Verbeek et al., 1995; Schilham et al., 1998), la différenciation des thymocytes n'est pas altérée dans les souris  $Wnt1^{-/-}Wnt4^{-/-}$  (Mulroy et al., 2002). Les souris  $TCF-1^{-/-}$  (6 mois) présentent un blocage avec une accumulation des progéniteurs au stade DN1, une absence de la sous-population DN2 et une réduction de la proportion des cellules DN4 (Schilham et al., 1998). Dans les expérience de FTOC (Fetal Thymus Organ culture) à partir des souris  $TCF-1^{-/-}LEF-1^{-/-}$ , la différenciation des thymocytes est bloquée au stade DN3 (Okamura et al., 1998). La nécessité de la b-caténine pour la fonction intrathymique de  $TCF-1$  et par conséquent pour son lien avec la cascade  $Wnt$  a été démontrée par Ioannidis et al. (Ioannidis et al., 2001). Cependant l'utilisation de souris knock-out pour démontrer le rôle de la b-caténine et de ce fait le rôle de la voie canonique dans la thymopoïèse, a soulevé plus de questions que de réponses. Alors que les souris knock-out pour la b-caténine dans le thymus, montrent qu'elle est indispensable pour le développement des thymocytes et la transition DN3-DN4 (Xu et al., 2003), les souris ayant une délétion



inductible dans la M.O. montrent que la signalisation Wnt via la b-caténine n'est pas indispensable au développement des lymphocytes T (Cobas et al., 2004).

### **1.3.2. La phase tardive : TCR-dépendante**

Cette phase, qui vient à la suite du développement précoce des thymocytes pendant lequel un répertoire TCR diversifié a été généré, est caractérisée par des processus de sélection positive et négative. Elle va aboutir, à partir des cellules doubles positives  $CD4^+CD8^+$ , aux lymphocytes T matures simples positifs  $CD4$  et  $CD8$  capables de discriminer entre les antigènes du soi et les antigènes étrangers du non-soi.

#### **1.3.2.1. La sélection positive et négative**

Les thymocytes DP vont subir l'un de ces trois sorts : La mort par négligence, la sélection positive ou la sélection négative. La nature de l'interaction du TCR avec les complexes CMH/peptides va déterminer le destin des cellules DP. Si le  $TCR\alpha\beta$  n'interagit pas avec les complexes CMH-peptides présents sur les cellules du cortex thymiques, les cellules DP vont mourir par négligence. Ces cellules ne reçoivent donc pas de signal de survie (pour permettre la sélection positive) et meurent. Approximativement 90% des thymocytes DP meurent pour cette raison.

**La sélection positive** est due à une interaction de faible affinité entre le  $TCR\alpha\beta$  et le complexe CMH-peptide, qui résulte en un signal de transduction de survie et de différenciation. Les premières études utilisant des souris TCR-transgéniques ont démontré la nécessité de l'interaction avec les complexes CMH-peptide exprimés dans le thymus pour générer des cellules SP  $CD4^+$  ou  $CD8^+$  (Hugo et al., 1993a; von Boehmer et al., 1988). En effet, l'engagement des complexes CMH classe I-peptide va aboutir à la sélection positive des cellules cytotoxiques  $CD8^+$ , alors que la reconnaissance des complexes CMH classe II-peptide va permettre le développement des cellules T "helpers"  $CD4^+$ . La sélection positive est dépendante des cellules

épithéliales corticales et des complexes CMH-peptide exprimés à leur surface (Vukmanovic et al., 1992; Anderson et al., 1999; Chidgey and Boyd, 2001). Les raisons pour lesquelles les cellules épithéliales corticales sont les seules cellules capables d'effectuer une sélection positive efficace ne sont pas encore connues. Deux hypothèses peuvent être soulevées: 1) des événements de signalisations, médiés préférentiellement si ce n'est exclusivement par les cellules épithéliales corticales, 2) une localisation favorisant l'accès aux thymocytes à des étapes de développements appropriées pour la sélection positive. Autrement dit, la capacité des cellules épithéliales corticales à transmettre le bon signal au bon endroit (Chidgey and Boyd, 2001). Les premières études démontrant l'importance des cellules épithéliales ont procédé comme suit : utilisation de souris transgéniques exprimant des molécules de CMH classe II exclusivement sur les cellules épithéliales thymiques (Benoist and Mathis, 1989; Bill and Palmer, 1989; Laufer et al., 1996), utilisation d'une approche *in vitro* dans un système de RTOC (Reaggregate Thymus Organ Cultures) avec des cellules épithéliales purifiées (Jenkinson et al., 1992), et enfin, par injection intrathymique de lignées épithéliales thymiques exprimant des molécules de CMH sélectionnées (Vukmanovic et al., 1992; Hugo et al., 1992).

Cependant, d'autres approches ont tenté de démontrer l'implication d'autres types cellulaires, tels que les fibroblastes et les cellules hématopoïétiques, dans la sélection positive. Certaines études ont réussi à démontrer un rôle des fibroblastes dans ce processus par injection intrathymique (Pawlowski et al., 1993; Hugo et al., 1993b). Une autre étude utilisant un système de coculture *in vitro* dépourvue de stroma thymique ou avec un stroma non sélectif, a permis de conclure que les fibroblastes seuls sont incapables de supporter la sélection positive. Cependant, la combinaison de cellules fibroblastiques avec un stroma non sélectif permet une sélection positive peu efficace (Chidgey et al., 1998). Ces résultats suggèrent que la sélection positive est un événement multicellulaire nécessitant d'une part des cellules qui apportent les complexes CMH-peptides et d'autre part des cellules (épithélium cortical) qui apportent des signaux supplémentaires indispensables à une maturation complète.

D'autre part, les études utilisant des chimères tétraparentales, des chimères hématopoïétiques ainsi que des systèmes *in vitro* (comme les RTOC) ont démontré que des cellules hématopoïétiques (telles que les cellules dendritiques (CD)) pouvaient sélectionner positivement des thymocytes (Martinic et al., 2003; Zerrahn et al., 1999; Yasutomo et al., 2000; Zinkernagel and Althage, 1999). Il a aussi été démontré que la sélection positive sur ces mêmes cellules pouvait être inefficace (Bix and Raulet, 1992). Cependant, ce rôle semble être dépendant de la nature du TCR impliqué et de son avidité pour les ligands présentés. L'utilisation des souris transgéniques pour le TCR restreint pour CMH classe I, montre que les cellules hématopoïétiques sont capables de présenter les complexes CMH-peptide, appropriés pour la sélection positive des lymphocytes CD8<sup>+</sup> exprimant le TCR 2C mais non pour ceux exprimant le TCR H-Y (Zerrahn et al., 1999). *In vivo*, dans des conditions normales, la sélection positive sur les cellules hématopoïétiques semble être déterminante pour les cellules T restreintes pour les molécules de CMH classe Ib non classique (tel que : H2-M3, Qa-1, Qa-2 et CD1d) par opposition aux cellules T restreintes pour les CMH classe Ia (Urdahl et al., 2002). Par contre, la sélection positive sur les cellules hématopoïétiques, des cellules T restreintes pour le CMH classe Ib, ne peut pas générer un répertoire CD8 quantitativement normal (Perarnau et al., 1999). Une autre sous-population de cellules T, les NKT (CD1d restreinte), est sélectionnée dans le thymus par les cellules DP plutôt que les cellules épithéliales (Bendelac, 1995). La sélection positive sur les cellules hématopoïétiques reste néanmoins un processus thymus-dépendant (elle est pratiquement absente chez des souris athymiques) (Zerrahn et al., 1999), incapable de reproduire l'efficacité des cellules épithéliales corticales. Ceci suggère que la sélection positive n'est pas la fonction principale des cellules hématopoïétiques *in vivo*, sans pour autant exclure leur contribution à ce processus.

Nous pouvons imaginer le scénario suivant. Les cellules épithéliales corticales, contrairement aux cellules hématopoïétiques, sont capables de fournir (en plus des complexes CMH-peptides), d'autres signaux indispensables à l'accomplissement de la sélection positive (Anderson et al., 1994). En d'autres termes, une cellule doit être capable d'initier (avec l'apport des complexes CMH-peptides) et de maintenir (avec

des molécules accessoires nécessaires) ce processus de sélection pour qu'il soit complètement efficace.

**La sélection négative**, qui concerne environ 1% des cellules DP, résulte d'un engagement du complexe CMH-peptide avec une forte affinité, ce qui va provoquer la mort par apoptose des thymocytes DP (Starr et al., 2003). Ceci induira l'élimination des cellules T potentiellement autoréactives pour permettre la génération d'un répertoire périphérique largement tolérant pour le soi (von Boehmer et al., 1988; Sprent and Kishimoto, 2001). Pour les cellules qui échappent à la sélection négative dans le thymus, il y a un mécanisme régulateur en périphérie, impliquant des cellules régulatrices  $CD4^+CD25^+$  qui ont pour fonction de contrôler les cellules T autoréactives (Sakaguchi et al., 2001). Contrairement à la sélection positive, la sélection négative a été décrite comme pouvant se produire soit dans le cortex (Murphy et al., 1990; Baldwin et al., 1999) ou dans la médulla (Surh and Sprent, 1994). Cependant, plusieurs études ont indiqué le fait que le cortex ne soit pas le site idéal pour la sélection négative. Ainsi, les souris exprimant le CMH classe II seulement au niveau des cellules épithéliales corticales, génèrent des cellules T  $CD4^+$  autoréactives (Laufer et al., 1996). En outre, les cellules épithéliales dans le cortex n'expriment pas les molécules de costimulation telles que B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) décrites comme étant exprimées sur les cellules épithéliales médullaires et importantes pour la sélection négative (Degermann et al., 1994). La médulla thymique étant le site principal de la sélection négative, est riche en cellules présentatrices d'antigènes (CPA), incluant les cellules dendritiques (CD) et les cellules épithéliales médullaires (CEM). En effet, ces deux types cellulaires sont capables d'induire la sélection négative (Matzinger and Guerder, 1989; Webb and Sprent, 1990; Burkly et al., 1993). Cependant, l'efficacité de la sélection négative médiée par les CEM n'est pas comparables à celle induite par les CD, d'où une tolérance au soi qualifiée de "split tolerance" (Hoffmann et al., 1992; Hoffmann et al., 1995). Une autre évidence de l'efficacité de la sélection négative par les CD est la proportion relativement faible des CD, nécessaires à une sélection négative efficace dans le système de RTOC (Anderson et al., 1998).

La sélection négative sur les CD comme sur les CEM dépend de l'interaction de forte avidité des cellules T avec les épitopes exprimés à leurs surfaces (Matzinger and Guerder, 1989; Hoffmann et al., 1995). L'épithélium thymique est capable aussi d'induire la tolérance via l'anergie plutôt que la délétion (Schonrich et al., 1992). Ce mécanisme pourrait être enclenché si l'avidité de l'interaction du CMH-TCR est faible. Ceci suggère des mécanismes multiples, durant l'induction de la tolérance, qui seraient influencés par le type de cellules stromales impliquées.

Les cellules épithéliales médullaires expriment une variété de gènes qui sont normalement exprimés en périphérie (par exemple : insuline, thyroglobuline, MBP etc) (Klein and Kyewski, 2000; Derbinski et al., 2001; Heath et al., 1998). Ceci permettra d'éliminer les cellules T capables de reconnaître des épitopes tissu-spécifiques retrouvés sur les cellules épithéliales périphériques. Un aspect important des cellules épithéliales médullaires, est l'expression du facteur de transcription AIRE (autoimmune regulator). Ce facteur de transcription semble nécessaire pour l'expression ectopique des antigènes périphériques par les CEM (Anderson et al., 2002). De plus, les souris déficientes pour AIRE dans la médulla thymique développent des maladies autoimmunes. Ces dernières sont similaires au syndrome humain (syndrome polyendocrinien autoimmun de type 1) observé chez les patients exprimant une forme altérée du facteur de transcription AIRE (Anderson et al., 2002; Peterson et al., 1998). Ce syndrome se caractérise par la perte de la tolérance du soi dans multiples organes. Ces éléments soulignent donc l'importance des CEM dans la sélection négative et par conséquent dans la tolérance du soi.

### **Est ce que la sélection positive et négative sont des événements séquentiels ?**

Plusieurs hypothèses ont été émises concernant l'ordre d'avènement des processus de sélection positive et négative. Il est possible que les thymocytes reçoivent en premier un signal de sélection positive dans le cortex ensuite un signal de sélection négative dans la médulla (Palmer, 2003). D'après l'étude de McGargill et al., le cortex thymique semble inefficace pour permettre la sélection négative (McGargill et al., 2000). Un tel model suggère que le même TCR peut recevoir un premier signal de sélection positive et plus tard un second signal de sélection négative. Les études

utilisant des souris transgéniques indiquent que la sélection négative peut se produire avant ou après la sélection positive (Ohashi et al., 1990; Spain and Berg, 1992). L'utilisation des tétramères CMH-peptide par Baldwin et al. a démontré que tous les stades de développement (DN, DP et SP) peuvent subir la sélection négative (Baldwin et al., 1999). Par conséquent, la sélection positive et négative pourraient être deux événements indépendants et non séquentiels. Cependant, la controverse persiste toujours et la réponse nécessite encore plus de travaux.

## **2. HOMÉOSTASIE DES LYMPHOCYTES T**

La taille du pool lymphocytaire a une importance cruciale dans le système immunitaire adaptatif. Ce pool doit être suffisamment diversifié pour détecter et détruire une large variété de pathogènes. Ceci nécessite une exportation thymique suffisante et des signaux de survie périphérique pour le maintien du pool lymphocytaire (naïf ou mémoire) en attente d'une stimulation antigénique à la suite d'une agression.

### **2.1. Homéostasie durant le développement thymique**

L'existence d'un mécanisme régulant le nombre de thymocytes dans le thymus demeure controversée. Cette notion de contrôle du nombre de thymocytes est remise en question par le fait que le thymus s'atrophie avec l'âge. Néanmoins, on pourrait imaginer que les phases de sélection et d'expansion durant le développement thymique pourraient être la cible de processus de régulation homéostatique. Ceci dans le cas où le nombre de thymocytes est contrôlé durant l'une des étapes de développement. Un groupe a évalué cette hypothèse (i.e. l'existence de mécanismes régulant le nombre des thymocytes) en utilisant des chimères mixtes où la majorité des thymocytes sont bloqués au stade  $CD4^+CD8^+$  (TCR $\alpha$  déficient). L'augmentation de l'efficacité de développement des  $CD8^+$  SP "wild-type" a permis de conclure que les thymocytes matures  $CD8^+$  SP mais non pas les thymocytes  $CD4^+$  SP, sont sous contrôle homéostatique (van Meerwijk et al., 1998). Cependant, cette compensation

homéostatique intrathymique de 1.5 fois pour les CD8<sup>+</sup> SP n'est pas jugée significative. La notion d'homéostasie intrathymique peut aussi être attribuée à la disponibilité d'espaces "niches" pour la sélection positive, i.e. la disponibilité d'un nombre limité de cellules stromales pour la sélection positive des thymocytes (Huesmann et al., 1991; Merckenschlager et al., 1994; Merckenschlager, 1996). Ceci impose un nombre limité de thymocytes sélectionnés. Par contre, ce mécanisme de régulation du nombre de thymocytes n'a pas pu être confirmé par l'étude de Almeida et al. (Almeida et al., 2001). En effet, cette étude qui utilise un système de dilution des précurseurs compétents, a démontré qu'une régénération complète des compartiments DP et SP est strictement déterminée par la disponibilité d'une fraction suffisante de précurseurs DN compétents. Ceci suggère l'absence de mécanismes homéostatiques compensatoire qui pourrait palier au déficit du nombre de précurseurs au départ par l'augmentation de la prolifération et de la survie des cellules DP et SP dans le thymus. Ces résultats suggèrent que le nombre de thymocyte dans le thymus est contrôlé par deux paramètres distincts : le nombre de précurseurs qui rentrent dans le thymus et le nombre limité de niches disponibles pour la sélection positive.

## **2.2. Exportation thymique et Homéostasie périphérique**

Après les processus de différenciation qui durent environ quatre semaines (chez la souris), les thymocytes matures quittent le thymus à travers les vaisseaux lymphatiques et sanguins de la médulla. Cette migration a été évaluée au taux de 1-2%, du nombre total de thymocytes, par jour (Berzins et al., 1999). Le processus d'exportation n'est pas bien défini, mais il est établi que seulement 6% des RTE (Recent Thymic Emigrant) ressemblent aux cellules SP de la médulla thymique, en terme de phénotype. Ceci suggère que des processus de maturation au sein de cette population SP sont nécessaires et se produisent avant l'exportation du thymus (Gabor et al., 1997). Cette exportation semble ignorer la taille du pool de cellules T en périphérie (Berzins et al., 1999; Berzins et al., 1998).

Un nombre élevé de RTE engendré à la suite de la transplantation de multiples thymus, n'empêche pas l'ajout au pool périphérique, de cellules T additionnelles au

lieu de les exclure ou d'éliminer les cellules T préexistantes pour maintenir un équilibre (Berzins et al., 1999). Ces résultats suggèrent que les RTE sont exemptés de la prolifération homéostatique (pour une période de trois semaines) ce qui souligne le rôle très important de l'“output” thymique pour maintenir un renouvellement continu du répertoire T à travers la vie adulte (Berzins et al., 1999). Les RTE quittent alors le thymus avec un répertoire TCR diversifié, engendrant un pool périphérique capable de répondre à n'importe quel pathogène. Par contre, en absence d'une exportation thymique (donc lymphopénie), l'expansion homéostatique prend le relais à partir des cellules T résiduelles ou transplantées, ce qui va diminuer de façon progressive la diversité du pool de cellules T naïves et provoquer l'expansion des cellules T mémoires. L'atrophie thymique entraîne une diminution des RTE. Le taux d'exportation des cellules T est alors insuffisant pour remplacer le pool T naïf perdu quotidiennement en périphérie. Ceci va provoquer le rétrécissement du compartiment périphérique naïf et l'intervention de l'homéostasie périphérique par l'expansion du pool de cellules T mémoire et des cellules T naïves qui acquièrent à ce moment un phénotype mémoire (Haynes et al., 2000; Goldrath et al., 2004). L'homéostasie périphérique est alors accompagnée par un changement de phénotype (naïf vers mémoire) caractérisé par l'augmentation de l'expression du marqueur CD44 et Ly6C (Ernst et al., 1999; Kieper and Jameson, 1999; Goldrath and Bevan, 1999a; Goldrath et al., 2004). Il a été suggéré que ce changement de phénotype se produit sans l'acquisition de la fonction effectrice, suggérant ainsi un état de pré activation (Kieper and Jameson, 1999; Goldrath and Bevan, 1999a; Goldrath et al., 2004).

La chimio- ou radiothérapie (causant une lymphopénie) peuvent aussi provoquer le même phénomène. Bien que la restauration proliférative du nombre de cellules T améliore le système immunitaire, un rétablissement complet n'est observé qu'avec un “output” thymique élevé de nouveaux RTE (Mackall et al., 1997; Mackall and Gress, 1997). En effet, il a été démontré que l'homéostasie périphérique génère donc un répertoire restreint (limité) (La Gruta et al., 2000).

On peut énumérer quelques unes des stratégies utilisées pour étudier l'“output” thymique et son impact sur l'homéostasie périphérique 1) L'évaluation de l'effet de la thymectomie sur le nombre de cellules T en périphérie (Rocha et al., 1983;



Mackall et al., 1993; Miller, 1965); **2)** La capacité des cellules T à subir une expansion en périphérie à la suite du transfert dans un hôte athymique (Rocha et al., 1989; Tanchot and Rocha, 1995); **3)** L'évaluation de l'impact de l'augmentation de la masse thymique (ou de l'exportation thymique) sur le nombre de cellules T périphériques (Berzins et al., 1999; Berzins et al., 1998; Metcalf, 1965); **4)** La mesure directe du nombre de cellules T exportées à la suite d'injection intrathymique de colorants fluorescents (Graziano et al., 1998; Scollay et al., 1980) ou par la quantification des TREC (T-cell receptor gene excision circles) (Douek et al., 1998; Kong et al., 1999; Poulin et al., 1999; Dion et al., 2004).

Les TREC sont formés quand les cellules T en développement réarrangent les gènes du TCR. Ce réarrangement cause l'excision, de fragments d'ADN inutilisés, entre les boîtes V, D et J (Takeshita et al., 1989). Les TREC SJ (Signal-joint) sont générées à la suite du réarrangement de la chaîne  $\alpha$  du TCR ( $\delta\text{Rec-}\Psi\text{J}\alpha$ ) alors que les TREC DJ sont générés à la suite du réarrangement de la chaîne  $\beta$  ( $D\beta(\text{J}\beta 2.1 - \text{J}\beta 2.7)$ ). Ces cercles sont relativement stables, ne se répliquent pas pendant les divisions cellulaires, et sont dilués entre les cellules filles à la suite de la prolifération (Hazenberg et al., 2000b). Les TREC persistent au sein des RTE, ce qui permet d'avoir au niveau de ces populations nouvellement exportés des niveaux élevés de cercles d'excisions comparés aux cellules T qui ont subi une seule ou plusieurs divisions périphériques (Douek et al., 1998; Poulin et al., 1999). Les TREC SJ ont été étudiés de façon très large dans les cellules T du sang comme marqueur de la fonction thymique (Hazenberg et al., 2001; Poulin et al., 2003; Geenen et al., 2003). Cependant, cette mesure reste approximative puisque la concentration des TREC est mesurée dans une population hétérogène (bien qu'enrichie en cellules cibles), plutôt que des cellules individuelles. Les TREC sont présents dans toutes les sous-populations de cellules T à différents niveaux (les RTE, les cellules T naïves et les cellules T mémoires). Par conséquent les changements dans les concentrations des TREC en périphérie n'impliquent pas forcément des changements dans les niveaux des RTE, mais peuvent être dû à des variations dans la prolifération, la survie ou la distribution de n'importe quelle autre sous-population T, surtout dans les conditions pathologiques tel que l'infection par le HIV (Hazenberg et al., 2000b; Hazenberg et

al., 2001). Une autre complication est que les thymocytes subissent de multiples cycles de prolifération après la formation des TREC mais avant l'exportation thymique. Néanmoins, malgré ces précautions à prendre, les TREC restent le meilleur moyen pour quantifier l'exportation thymique chez l'humain. De plus, leur mesure peut donner une idée intéressante sur le taux de prolifération des cellules T dans le thymus et en périphérie.

Cependant, une étude récente utilisant les TREC SJ et DJ, a décrit une nouvelle méthode, tenant compte du ratio SJ/ $\beta$ TREC dans le sang périphérique, afin de mesurer des aspects importants de la fonction thymique (prolifération intrathymique et "output" thymique). Avec cette méthode les résultats obtenus ne peuvent être ni biaisés ni confondu avec la prolifération des cellules T périphériques puisque ce ratio est une signature qui se maintient durant toute la vie (Dion et al., 2004).

Dans notre étude, nous avons tiré profit des TREC SJ et DJ pour estimer le taux de prolifération dans le thymus (cellules DP et SP) ainsi que la prolifération périphérique (cellules SP) qui serait due par exemple à l'expansion homéostatique.

Le pool de cellules T périphériques est composé de cellules T mémoires et naïves. Ces deux types cellulaires semblent occuper des niches homéostatiques séparées donc devraient être régulés séparément (Goldrath and Bevan, 1999b). L'intérêt de cette séparation est de maintenir d'une part, un répertoire diversifié au sein du pool naïf, nécessaire à la réponse contre des pathogènes inconnus et d'autre part, un pool mémoire capable de répondre rapidement aux antigènes préalablement rencontrés. À la suite de la reconstitution immune de souris déficientes avec des cellules T mémoires, les cellules transférées subissent une expansion pour atteindre le même nombre retrouvés dans une souris normale (Tanchot and Rocha, 1995). Il n'est pas possible d'augmenter la taille du pool mémoire en transférant un grand nombre de cellules, indiquant une régulation du nombre de cellules T mémoire même en absence du pool de cellules T naïves (Tanchot and Rocha, 1995). Une compétition pour les signaux de survie entre les deux populations pourrait engendrer une perte de la diversité par l'expansion du pool mémoire. Elle pourrait aussi induire une perte de la mémoire immunitaire par l'installation des cellules T nouvellement exportées en périphérie au détriment des cellules T mémoires (Tanchot et al., 1997b).

Chez la souris, les cellules T naïves en périphérie ont une durée de vie de l'ordre de quelques mois (Jameson, 2002). Cette survie nécessite une exposition à des signaux du soi. Une étude a démontré que les cellules T CD4<sup>+</sup> requièrent un contact avec des molécules CMH-ligand du soi pour survivre en périphérie (Takeda et al., 1996). Une autre étude de Tanchot et al. a souligné l'importance de l'interaction avec les molécules de CMH classe I de soi pour la survie des cellules T CD8<sup>+</sup> TCR transgénique (Tanchot et al., 1997a). Ces résultats suggèrent que la reconnaissance du soi (CMH-peptide du soi) par le TCR est une composante nécessaire pour la survie des cellules T naïves. La spécificité de cette interaction est analogue à celle de la sélection positive où une interaction de faible affinité avec les molécules du soi est nécessaire à la survie des thymocytes, comme le démontre les modèles de souris TCR transgéniques (H-Y et OT-II) (Tanchot et al., 1997a; Ernst et al., 1999). Les peptides impliqués dans la survie ne sont pas nécessairement les mêmes que ceux impliqués dans la sélection positive mais peuvent être des ligands différents mais reconnus avec la même affinité. D'autres éléments ont conforté cette hypothèse, comme l'association constitutive de la kinase ZAP-70 à la chaîne CD3- $\zeta$  du TCR ainsi que l'état de phosphorylation partiel de cette dernière (forme p21), au niveau des thymocytes et des cellules T naïves en périphérie (Nakayama et al., 1989; Witherden et al., 2000; van Oers et al., 1994).

### 3. THYMUS ET VIEILLISSEMENT

L'involution thymique et la diminution de l'output des lymphocytes T sont les conséquences du vieillissement que ce soit chez l'humain ou chez la souris. Cette involution graduelle avec l'âge corrèle avec le déclin du système immunitaire, reflété par l'augmentation de la susceptibilité aux infections et des incidences des maladies autoimmunes. La capacité de reconstitution d'un pool lymphocytaire chez un individu, après une déplétion périphérique corrèle inversement avec l'âge. Les patients et les animaux les plus jeunes ont une capacité de reconstitution plus efficace que les plus âgés (Mackall and Gress, 1997). Chez l'humain, la réduction de la masse thymique commence à l'âge de 1 an (quand l'organe atteint sa taille maximale) et aboutit à une

réduction importante de la taille du thymus à la puberté (George and Ritter, 1996). Chez la souris, le déclin dans la prolifération des thymocytes a été noté dès la 2<sup>ème</sup> semaine après la naissance (Hirokawa et al., 1994) et la réduction de la taille du thymus est visible à partir de la 6<sup>ème</sup> semaine (Hirokawa and Makinodan, 1975). Cependant, les enfants de plus de 15 ans et les souris de 3-4 mois sont encore capables de régénérer un pool de cellules T périphérique à sa taille normale. Ceci a amené à penser que l'involution thymique commence à la puberté. Cette hypothèse a été abandonnée par la suite (George and Ritter, 1996; Steinmann et al., 1985).

Chez l'humain, la diminution de la taille du thymus est masquée par des changements dans l'architecture de l'organe. L'augmentation du gras, du tissu conjonctif, et de l'espace périvasculaire comble la diminution des zones lymphoépithéliales du thymus et la taille globale de l'organe reste constante durant toute de la vie. Chez la souris, ceci ne se produit pas et la taille du thymus diminue avec l'âge. Dans un thymus d'une vieille souris de 24 mois, la production des cellules T a été estimée à 0.7% du nombre de cellules T produites par les souris nouveaux nées (George and Ritter, 1996).

Chez la souris et l'humain, deux types de facteurs influencent la sénescence thymique : des facteurs intrinsèques au système immunitaire ou des facteurs extrinsèques. Ces deux facteurs se résument en une déficience dans l'apport de précurseurs à partir de la M.O. et en une altération du stroma thymique respectivement. Une troisième possibilité est que les facteurs intrinsèques et extrinsèques (M.O. et stroma) agissent en même temps. Ceci a été testé avec des chimères hématopoïétiques en greffant de la M.O. de vieilles souris dans des souris jeunes irradiées ou en greffant de la M.O. de jeunes souris dans des vieilles receveuses irradiées (Hirokawa et al., 1994).

### **3.1. Rôle des progéniteurs de la moelle osseuse**

Le thymus ne contient pas des précurseurs endogènes avec une capacité d'auto-renouvellement perpétuelle. Il doit alors être "alimenté" de façon périodique avec des précurseurs dérivés de la M.O. incluant les HSC ou des progéniteurs dérivés

de cette population. Les cellules de la M.O. ou les HSC purifiés à partir de souris âgées ne génèrent pas des cellules T de façon efficace après transfert dans des jeunes receveuses (Hirokawa et al., 1986; Sudo et al., 2000). Ces résultats indiquent des déficits intrinsèques aux progéniteurs, qui doivent s'accumuler avec l'âge pour affecter leur potentiel de différenciation. Ces déficits peuvent être associés à des défauts génétiques, affectant des gènes qui contrôlent la prolifération et la taille du compartiment HSC (Geiger and Van Zant, 2002). Deux types de progéniteurs sont susceptibles d'être la cible d'altérations génétiques, les ETP (Allman et al., 2003) et les CLP-2 (Martin et al., 2003). Le lien entre ces deux types de précurseurs n'est pas encore connu, mais il serait intéressant de déterminer comment ces deux populations sont affectées avec l'âge pour mieux comprendre l'effet du vieillissement sur les précurseurs thymiques les plus immatures (Linton and Dorshkind, 2004).

### 3.2. Rôle du stroma thymique

L'environnement thymique semble aussi avoir un rôle très important dans l'involution thymique (Aspinall and Andrew, 2000). D'ailleurs, dans des vieilles souris irradiées et reconstituées avec de la M.O. de jeunes donneurs, les anomalies thymiques sont irréversibles et la taille thymique ainsi que la cellularité restent réduites (Mackall et al., 1998). Par contre, lorsque de vieilles souris reçoivent un transplant thymique néonatal et sont ensuite irradiées et reconstituées avec de la M.O. de souris nouveaux nées, une capacité régénérative thymique normale a été observée (Mackall and Gress, 1997). Tous les résultats obtenus sont en accord pour une contribution plus significative du stroma thymique dans l'atrophie thymique (Hirokawa et al., 1994; Mackall and Gress, 1997). Une diminution de l'expression de gènes associées aux cellules épithéliales, comme l'IL-7 (Andrew and Aspinall, 2002), la keratine-8 et Foxn1 (Ortman et al., 2002), a été observée avec l'âge. Les niveaux d'ARNm de cytokines telles que (LIF, IL-6, oncostatin M et SCF) augmentent par contre avec l'âge (Sempowski et al., 2000). En effet, l'administration *in vivo* de ces cytokines à des souris, induit une atrophie thymique avec une perte des thymocytes

corticaux CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Sempowski et al., 2000). Ces résultats démontrent le rôle des cytokines associées au stroma thymique dans le processus de sénescence.

### **3.3. Association des facteurs intrinsèques et extrinsèques**

On peut aussi penser à une association des deux facteurs dans ce processus. En effet plusieurs études ont démontré que ces deux paramètres (stroma thymique et progéniteurs de la M.O.) sont interdépendants pour leur développement et leur fonction (Klug et al., 2002; Anderson and Jenkinson, 2001; Blackburn et al., 2002).

Le milieu extrathymique peut exercer certaines influences sur l'involution thymique. Les thymocytes en développement et le stroma thymique peuvent être sensibles aux changements dans le système endocrinien. Que ce soit les thymocytes ou les cellules stromales, ils expriment des récepteurs aux hormones de croissance, IGF-I et des hormones stéroïdes sexuelles. Ainsi, des changements dans les concentrations relatives de ces hormones (par exemple à la puberté) peuvent avoir un effet néfaste sur le développement des thymocytes et/ou la fonction des cellules stromales thymique, ce qui va aggraver l'involution thymique. L'administration des hormones de croissance ou de l'IGF-I à de vieilles souris peut stimuler la thymopoïèse (Montecino-Rodriguez et al., 1998). Le traitement de patients atteints du HIV, avec des hormones de croissance peut aussi augmenter la masse thymique (Napolitano et al., 2002).

Cependant, si on observe ces facteurs individuellement, on réalise que l'involution thymique n'est pas un processus monofactoriel. Par exemple, l'administration de l'IGF-I n'est pas capable de restaurer une cellularité comparable à celle d'un jeune animal (Montecino-Rodriguez et al., 1998). L'administration de l'IL-7 dans des vieilles souris est quand à elle, capable aussi d'améliorer la cellularité thymique mais pas de la rétablir au même niveau des jeunes souris (Andrew and Aspinall, 2001).

Donc, l'involution thymique semble être un processus multifactoriel, ce qui rend très difficile la possibilité de corriger ce problème. Si le traitement d'un seul paramètre a des résultats assez mitigés, pourquoi ne pas penser alors à détourner le

problème en essayant de générer des lymphocytes T extrathymiques en même temps que les traitements cités ci-dessus. Le seul bémol est que pour atteindre cet objectif, il faudrait mieux comprendre les mécanismes de différenciation des lymphocytes T intrathymique ainsi que les particularités qui font du stroma thymique le seul microenvironnement capable de supporter le développement des cellules T.

#### 4. DÉVELOPPEMENT DES CELLULES T EXTRATHYMIQUES :

Il est bien établi que le thymus est l'organe principal pour supporter la différenciation des cellules T. Cependant, quelques cellules T sont générées à l'extérieur du thymus. Les sites majeurs proposés, sont les intestins, le foie et les ganglions lymphatiques (Abo, 2001b; Abo, 2001a; Guy-Grand et al., 2003; Guy-Grand and Vassalli, 2002; Allen et al., 1995). D'autres sites ont été rapportés tels que l'utérus et les glandes exocrines. La nature de ces sites de différenciation et la faible quantité de cellules T générées rendent difficile la comparaison des deux mécanismes de différenciation thymique et extrathymique. Les cellules T extrathymiques comprennent des cellules  $T\alpha\beta$  ainsi que des cellules  $T\gamma\delta$  (Abo, 2001b).

Dans **le foie**, les cellules T ainsi que les cellules NKT expriment des niveaux intermédiaires du complexe TCR-CD3 ( $TCR^{int}$ ) et sont  $IL-2R\alpha\beta^+$  (TCR de faible affinité) contrairement aux cellules T conventionnelles  $TCR^{hi}$  et  $IL-2R\alpha\beta^-$  ( $IL-2R\alpha\beta^+$  à l'état activé) (Seki et al., 1991). Le foie contient des cellules  $T\alpha\beta$  et des cellules  $T\gamma\delta$  avec un ratio de 4:1. Les cellules  $T\alpha\beta$  sont de type DN ( $CD4^-CD8^-$ ), SP ( $CD4^+$ ) et SP ( $CD8^+$ ), la population  $CD4^+$  étant la plus abondante (Abo, 2001b). On note aussi l'absence de DP.

Dans **les intestins** les lymphocytes T intra épithéliaux (IELs) comprennent aussi des cellules  $T\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  avec un ratio de 1:1 qui augmente avec le vieillissement. Les cellules  $T\alpha\beta$  sont des SP ( $CD8^+$ ) ou DP ( $CD4^+CD8^+$ ). La plupart, si ce n'est la totalité des IELs, sont  $CD8\alpha\alpha$  (homodimères de  $CD8\alpha$ ) par opposition aux cellules T conventionnelles qui sont des hétérodimères  $CD8\alpha\beta$ . Chez la souris, à 6 semaines, on

a seulement 5% des IELs qui sont des DP. Par la suite, c'est à 22 semaines que le maximum de DP est observé i.e. 32 % (Poussier and Julius, 1994), donc une proportion qui n'égale jamais la proportion des DP thymiques. Contrairement à l'avis de Poussier P. sur la thymo-indépendance des IELs (Poussier and Julius, 1994), leur génération est considérée comme étant fortement influencée par la présence du thymus. En effet les souris nude et les souris néonatales thymectomisées montrent une réduction importante du nombre des IELs dans l'intestin (Lefrancois, 1991; Guy-Grand and Vassalli, 2002).

L'analyse des souris nude et des souris thymectomisées à la naissance a permis d'identifier une voie de différenciation extrathymique dans **les ganglions mésentériques** et une autre voie de moindre importance dans **les plaques de Peyer** (Guy-Grand et al., 2003). Cette voie contient des cellules DN, DP et SP, avec des proportions plus faibles concernant les cellules DP (1%) et SP, en comparaison avec les proportions thymiques.

Plusieurs études ont rapporté que la **sélection négative** des cellules T extrathymiques par les antigènes du soi, est incomplète (Hodes et al., 1989; Murosaki et al., 1991; Kawachi et al., 1995). Les cellules T CD8 $\alpha\alpha$  sont donc ignorées et cela pour plusieurs raisons qui peuvent être liées d'une part au niveau d'expression intermédiaire du TCR, et d'autre part à l'homodimère  $\alpha\alpha$  des antigènes CD8, ou encore à l'absence d'expression des corécepteurs CD4 et CD8 sur certaines sous-populations (Abo, 2001b). Une autre possibilité est que l'environnement extrathymique est un milieu inadéquat pour la sélection négative. Alors que les cellules T intrathymique sont éliminées par les antigènes du soi, les cellules T extrathymiques ne le sont pas. Ceci a été démontré avec des souris TCR transgéniques spécifiques pour les peptides antigéniques mâle H-Y (Dans le thymus, ces cellules T sont sélectionnées positivement chez la femelle sur fond H-2D<sup>b</sup> et négativement chez le mâle (Kisielow et al., 1988)). Dans ces souris, les cellules T extrathymiques de l'intestin ne sont pas éliminées en présence de l'antigène H-Y. Par contre, contrairement au thymus, la **sélection positive** extrathymique semble nécessiter les antigènes du soi pour son efficacité. Ceci a été démonté avec les études de B. Rocha



(Rocha et al., 1992) et H. Yamada (Yamada et al., 1998) où les cellules T extrathymiques TCR H-Y<sup>+</sup> ne sont sélectionnées positivement que chez le mâle (présence du peptide H-Y). Par conséquent, l'ensemble de ces études démontre que la sélection extrathymique est ; soit inefficace ou alors elle suit des mécanismes différents de ceux de la sélection intrathymique.

#### **4.1. L'oncostatin M et le développement extrathymique des cellules T**

La différenciation extrathymique peut aussi être induite (souvent de façon inattendue) dans des modèles expérimentaux murins. Ceci est le cas à la suite de l'expression constitutive du gène homéobox *HLx* dans les lymphocytes (apparition de cellules DP thymodépendants dans les ganglions lymphatiques et la rate) (Allen et al., 1995), la surexpression de l'oncostatin M (OM) (Clegg et al., 1996; Boileau et al., 2000) et celle du facteur inhibiteur de leucémie (LIF) (Shen et al., 1994). En sachant que la souris LIF transgénique possède le même phénotype que la souris OM transgénique, nous nous sommes intéressés particulièrement à cette dernière (modèle utilisé dans mes travaux de thèse).

L'**OM** est une cytokine pléïotropique faisant partie de la famille de l'IL-6 incluant : IL-6, OM, LIF, IL-11, CNTF et CT-1. Découverte en 1986, l'OM est une glycoprotéine de 28 kDa qui a la capacité d'inhiber la prolifération de plusieurs lignées de cellules cancéreuses et de stimuler la croissance de fibroblastes normaux (Zarling et al., 1986). L'ARNm de l'OM a été détecté dans diverses cellules, incluant les cellules T activées, les cellules endothéliales, les hépatocytes, les macrophages et la région AGM (aorta-gonad-mesenephros) embryonnaire (site du développement hématopoïétique primaire). De plus l'OM est aussi induite dans les cellules lymphoïdes et myéloïdes lorsque ces cellules sont stimulées avec du GM-CSF, IL-3 ou IL-2.

Cette cytokine a donc une variété de fonctions communes avec les autres membres de la famille de l'IL-6 (Malik et al., 1989), incluant des effets sur les tissus hématopoïétiques, hépatocytes, neurones et un rôle dans l'inflammation. Les

principaux effets de l'OM sont : l'induction de la prolifération et de la différenciation des cellules endothéliales vasculaires (Wijelath et al., 1997); l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques pluripotents dans la région AGM (Mukoyama et al., 1998); le maintien de la capacité d'auto renouvellement des cellules souches embryonnaires (Rose et al., 1994); l'homéostasie des progéniteurs hématopoïétiques (Broxmeyer et al., 2002); l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésions incluant TIMP-1, ICAM-1 et VCAM-1; l'augmentation de la prolifération et de la différenciation des cellules T (Clegg et al., 1996); une action anti-inflammatoire avec réparation des dommages tissulaires dans le cas de l'arthrite rhumatoïdes et la sclérose en plaque (Wallace et al., 1999). Le niveau d'ARNm de l'OM dans le thymus augmente avec l'âge et est associé à l'atrophie thymique chez la souris et l'humain (Sempowski et al., 2000).

La particularité de l'OM est qu'il se fixe sur un récepteur composé de la chaîne gp130, une sous unité de transduction de signal commune aux cytokines de la famille de l'IL-6 (LIF, IL-11, CNTF, IL-6). Les récepteurs pour ces cytokines contiennent la sous unité spécifique du ligand (sous unité  $\alpha$ ) mais partagent une chaîne  $\beta$  commune qui est la chaîne gp130. De façon surprenante la chaîne  $\alpha$  de l'OM est la gp130, associée à une chaîne  $\beta$  nécessaire pour une signalisation efficace. Deux complexes récepteurs différents peuvent transmettre la signalisation via l'OM. Le premier complexe est composé de la chaîne gp130 et de la chaîne LIFR $\beta$  (gp130/LIFR $\beta$ ). L'OM se fixe avec une faible affinité sur ce complexe, contrairement au deuxième complexe où la chaîne LIFR $\beta$  est remplacée par l'OMR $\beta$  (gp130/OMR $\beta$ ). En terme d'acide aminé, l'OM humain (OMh) et bovin (OMb) n'ont que 48% et 42% d'homologie respectivement, avec l'OM murin (OMm). Par conséquent, l'OMh et l'OMb semblent incapables de se fixer au récepteur murin, ce qui suggère que leur action est médiée via le LIFR murin (Lindberg et al., 1998; Ichihara et al., 1997). De plus l'OMh et LIF ont un gène ancestral commun et des similitudes au niveau de la séquence protéique supposément importantes pour la fixation au récepteur (Jeffery et al., 1993). La fixation de l'OM sur la gp130 active la voie JAK-STAT ou induit la phosphorylation et l'activation de la voie Shc, Gab-1, Grb2, SOS, MAPK et Ras (Korzus et al., 1997; Fukada et al., 1998; Fukada et al., 1996; Boulton et al., 1995;

Auguste et al., 1997). La signalisation via la gp130, peut activer STAT3 et STAT5 (Yoshimura et al., 1996; Boulton et al., 1995; Auguste et al., 1997). Dans certaines lignées STAT3 est nécessaire à l'induction de la prolifération via la gp130 et empêche l'apoptose. Elle permet la progression du cycle cellulaire (stade G1 vers S) par la suppression des inhibiteurs des cyclines dépendantes des kinases p21 et p27 et par l'activation des cyclines D, cyclines A et cdc25A (Fukada et al., 1998; Fukada et al., 1996).

#### 4.1.1. La souris LckOM

La souris LckOM a été générée en 1996 à l'institut pharmaceutique Bristol-Myers Squibb à Seattle. Cette souris surexprime l'OMb sous le promoteur proximal p56<sup>Lck</sup> régulé spécifiquement au niveau des lymphocytes T, d'où le nom de la souris "LckOM". Inopinément, l'OM induit une accumulation massive de lymphocytes T et un développement extrathymique au niveau des ganglions lymphatiques, et de façon plus importante dans les ganglions mésentériques. En outre, aucun développement n'est observé au niveau de la rate, de la moelle, de l'intestin et du foie (Clegg et al., 1996; Boileau et al., 2000). Cette différenciation extrathymique est complètement indépendante du thymus comme le démontrent les études dans les souris nude (Clegg et al., 1996) et les souris thymectomisées (Boileau et al., 2000). On peut ainsi, induire un développement T extrathymique par des injections répétées d'OM sur plusieurs semaines dans des souris athymiques. D'autres études ont souligné la nécessité de l'IL-7R mais non pas de l'IL-6 pour l'induction du développement induit par l'OM. Ceci a été démontré à la suite du croisement de la souris LckOM avec des souris IL-7R<sup>-/-</sup> et IL-6<sup>-/-</sup> (Clegg et al., 1999). À l'inverse des lymphocytes T retrouvés dans le foie, l'intestin et les ganglions lymphatiques normaux, la proportion des cellules T DN, DP et SP ainsi que le ratio CD4/CD8 dans les ganglions lymphatiques OM<sup>+</sup> sont comparables à ceux du thymus. De plus le répertoire TCR V $\beta$  est aussi diversifié que celui des cellules T thymiques (Clegg et al., 1996; Boileau et al., 2000). Ces cellules T extrathymiques sont CD8 $\alpha\beta$  et non pas CD8 $\alpha\alpha$  contrairement aux IEL des intestins.

Le phénotype des cellules DP extrathymiques est donc Thy1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup>CD3<sup>lo</sup>HSA<sup>+</sup>. Une fois que ces cellules T sont matures, elles acquièrent, en majorité, un phénotype mémoire/activé: CD44<sup>hi</sup>CD45RB<sup>lo</sup>CD62<sup>lo</sup>IL2R-β<sup>lo</sup> pour les cellules CD4<sup>+</sup> et CD44<sup>hi</sup>CD45RB<sup>hi</sup>CD62<sup>hi</sup>IL2R-β<sup>hi</sup> pour les CD8<sup>+</sup>. Ceci suggère une activation préalable de ces cellules par des antigènes non déterminés (Boileau et al., 2000).

L'OM induit une angiogenèse des "High endothelial venule" (HEV) qui est COX-2 dépendante dans les ganglions lymphatiques de la souris LckOM. Ceci pourrait expliquer les mécanismes d'action de l'OM pour permettre le développement extrathymique (Louis et al., 2003). Les études d'immunohistochimie ont démontré une absence de cellules épithéliales et une absence d'une ségrégation cortico-médullaire dans les ganglions lymphatiques OM<sup>+</sup> (Louis et al., 2003).

Ainsi, ce modèle de souris LckOM dans lequel on observe un développement extrathymique des cellules T ressemblant (au moins en terme de proportions de sous-populations T) au développement thymique, représente un outil unique pour l'étude de la différenciation des cellules T dans un environnement complètement différent de l'environnement thymique. Ce microenvironnement OM<sup>+</sup> nous permettra d'étudier les mécanismes de différenciation extrathymique et de déceler les éléments nécessaires et suffisants pour la différenciation des cellules T, en sachant bien sûr que les ganglions lymphatiques sont dépourvus de deux éléments caractérisant le thymus : des cellules épithéliales et une ségrégation cortico-médullaire.

## 5. OBJECTIFS DE CETTE THÈSE

### A. Étude des étapes précoces du développement extrathymique

Quels sont les signaux nécessaires et suffisants, transmis par le stroma thymiques permettant le développement T ?

Pour répondre à cette question nous avons tiré profit de deux modèles très intéressants : 1) La découverte d'une voie de différenciation extrathymique dans les

ganglions lymphatiques de souris sous l'effet de OM ou LIF. 2) Le développement d'un modèle de culture *in vitro* sur une monocouche stromale (OP9-DL1), permettant une différenciation des lymphocytes T en absence d'une organisation thymique tridimensionnelle (Schmitt and Zuniga-Pflucker, 2002).

Comme les ganglions lymphatiques ne partagent pas tous les attributs du thymus, et que sous l'effet de l'OM, ils se transforment en un organe lymphoïde primaire capable de supporter les étapes précoces du développement T, deux questions s'imposent :

1. Pourquoi les ganglions lymphatiques normaux ne sont-ils pas capables de supporter les étapes précoces de la différenciation des cellules T ?
2. Comment l'OM peut-il pallier à cette incapacité et transformer un organe lymphoïde secondaire en un organe lymphoïde primaire ?

Répondre à ces questions, nous permettra de comprendre l'essence même d'un organe lymphoïde primaire, i.e. comment la nature des cellules stromales (thymiques vs. ganglionnaires) régulent les étapes précoces du développement des cellules T.

## **B. Étude des étapes tardives du développement extrathymique**

En absence d'une organisation histologique comparable à celle du thymus, deux questions sont soulevées concernant les étapes de différenciation TCR dépendante :

1. En absence de cellules épithéliales corticales et d'une ségrégation cortico-médullaire, quelles sont les cellules responsables de la sélection positive dans les ganglions lymphatiques ?

2. Est ce que les mécanismes de sélection positive et négative extrathymiques sont les mêmes que ceux du thymus ?

Le ganglion lymphatique OM<sup>+</sup> est à la fois un organe primaire et secondaire. Cette caractéristique nous permettra d'évaluer jusqu'à quel point la séparation physique d'un organe primaire et secondaire peut influencer le développement des cellules T ainsi que leur homéostasie.

**À partir de là, peut-être pourrions-nous comprendre en partie les raisons qui font du thymus l'organe unique capable de supporter la différenciation des cellules T.**

**RÉSULTATS**  
**RESULTS**

# ARTICLE # 1

## **T cell generation by lymph node resident progenitor cells**

Rafik Terra<sup>1,2,3</sup>, Isabelle Louis<sup>1,2,3</sup>, Richard Le Blanc<sup>4</sup>, Sophie Ouellet<sup>2</sup>,  
Juan Carlos Zúñiga-Pflücker<sup>5</sup> & Claude Perreault<sup>1,2,6</sup>

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

<sup>2</sup>Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec,  
Canada H1T 2M4

<sup>4</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Fleurimont, Quebec, Canada J1H  
5N4

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

<sup>3</sup>R.T. and I.L. contributed equally to this work

*Blood, 2005 (in press)*



## ARTICLE # 2

### **Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules**

Rafik Terra\*, Nathalie Labrecque\*, and Claude Perreault\*

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

*The Journal of Immunology*, 2002, 169: 684-692

## RESULTATS ADDITIONNELS

### TRECs quantification to assess the T cells proliferation state

In our study, T cell development in the thymus and the OM<sup>+</sup> LN appeared to be similar: they proceed through DN as well as DP stages and the end result is a functional SP progeny. However, we found notable differences between thymic and extrathymic T cells: 1) the phenotype, turnover and behavior of SP thymic vs. extrathymic T cells are different (Boileau et al., 2000; Terra et al., 2002; Blais et al., 2004). Extrathymic SP T cells undergo hyperactive homeostatic proliferation 2) in collaboration with G. Dulude and R.P. Sékaly, we recently found that, though they were similar at the DP stage, proportions of DJ and SJ TRECs were considerably decreased in extrathymic SP T cells relative to thymus derived SP T cells (Figure 1A, B). This begs the question of the efficacy of the DP→SP transition in extrathymic T cells (i.e., the number of SP T cells produced by DP cells per unit of time). Indeed, low TREC levels mean deficient production of new SP T cells and/or dilution due to increased T cell proliferation (Sodora et al., 2002; Douek et al., 2001; Hazenberg et al., 2000a).

**Major finding:** Proportions of SJ and DJ TRECs were considerably decreased in extrathymic SP T cells compared to intrathymic SP T cells. These low TRECs levels mean deficient production of new T cells and/or dilution due to increased T cell proliferation in the OM<sup>+</sup> Lymph Node and OM<sup>+</sup> spleen.

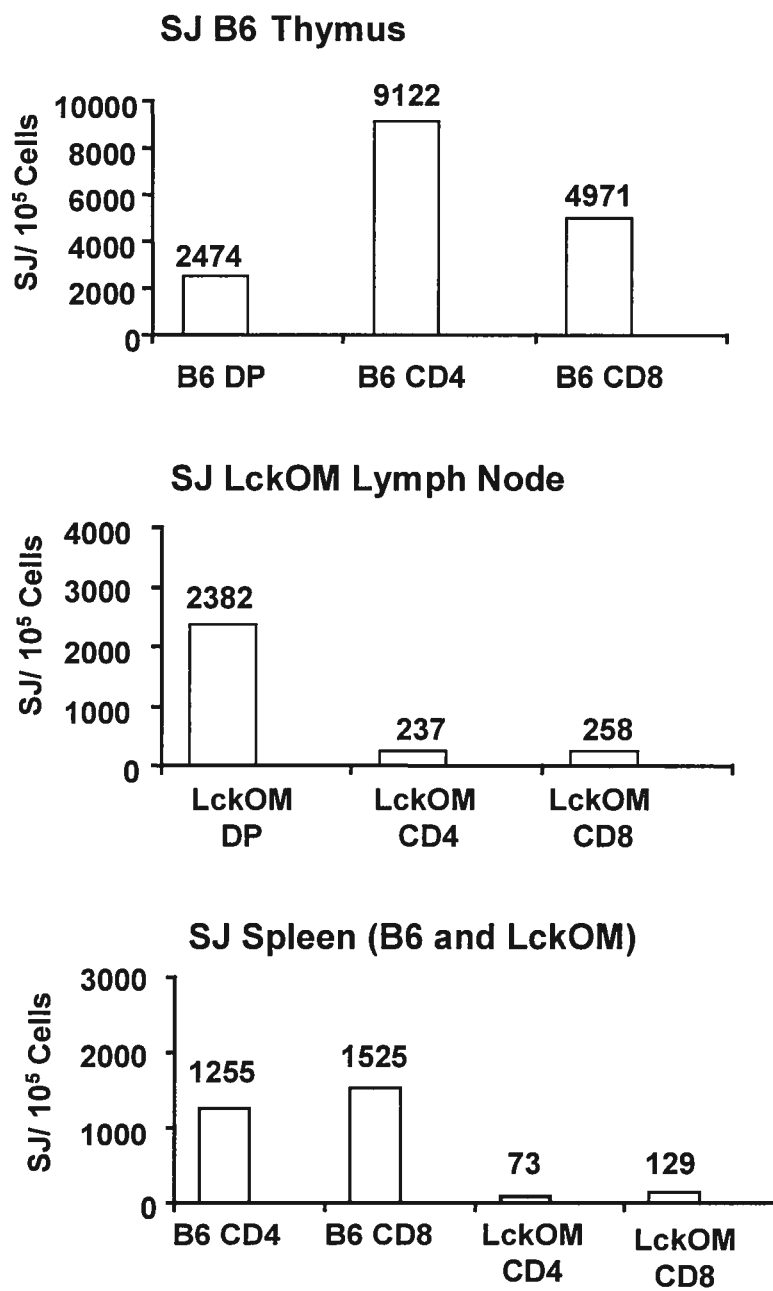
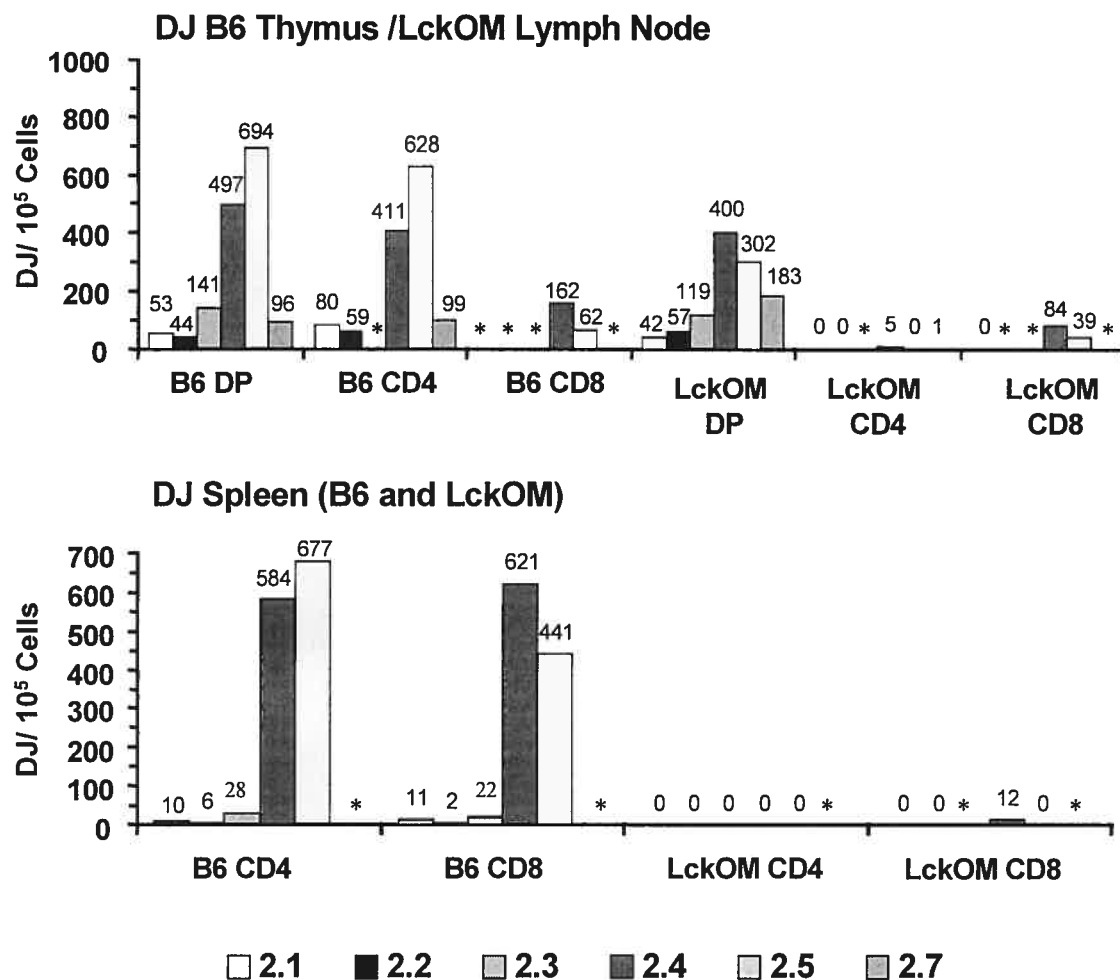


Figure 1.A.



**Figure 1.B.**

**Figure 1. Quantification of SJ and DJ TRECs within extrathymic vs. intrathymic T cells.**

$\delta$ Rec- $\Psi$ J $\alpha$  Signal-joint (SJ) (A) and D $\beta$ (J $\beta$ 2.1- J $\beta$ 2.7) (DJ) (B) TRECs were quantified in sorted CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) T cells isolated from B6 thymus, LckOM Lymph Node and spleen (B6 and LckOM). Stained and sorted cells were lysed in proteinase K, and then real-time quantitative PCR was performed. The results represent the absolute number of SJ and D $\beta$ J $\beta$  TCR excision circles per 10<sup>5</sup> cells. Results are from one of three independent experiments performed with similar results. \* : not done

## **DISCUSSION**

## DISCUSSION

### 1. Étapes précoces du développement T extrathymique

Le but des travaux effectués sur les étapes précoces de différenciation des cellules T dans les ganglions lymphatiques OM<sup>+</sup>, était de comprendre comment la nature des cellules stromales régule les étapes cruciales du développement précoce des lymphocytes T. Ce point a été abordé en répondant aux questions suivantes : 1) quelle est la nature des progéniteurs qui colonisent les ganglions lymphatiques ? 2) Est ce que le stroma ganglionnaire est capable de transmettre les signaux nécessaires, d'une part à l'engagement vers la lignée T et d'autre part à la survie et la prolifération de ces précurseurs lymphoïdes ? 3) Comment l'OM arrive à amplifier ou à débloquent le développement extrathymique au niveau des ganglions lymphatiques ?

#### 1.1. Nature des précurseurs qui colonisent les ganglions lymphatiques :

Plusieurs travaux ont tenté d'identifier les progéniteurs précoces des cellules T dans la moelle, le sang et le thymus (Goldschneider et al., 1986; Scollay et al., 1986; Kondo et al., 1997; Allman et al., 2003; Schwarz and Bhandoola, 2004; Martin et al., 2003). Néanmoins, la tendance était d'assumer que les cellules T et B produites dans le thymus et dans la moelle osseuse respectivement possèdent des progéniteurs lymphoïdes communs appelés CLP, et cela, même si l'existence des CLP dans le thymus et dans le sang n'avait jamais été confirmée. Tout récemment, Allman et al. ont réussi à démontrer que les précurseurs précoces des cellules T retrouvés dans le thymus ne sont ni des CLP ni ne proviennent des CLP présents dans la M.O. (Allman et al., 2003). Ces résultats nient donc l'implication des CLP dans la génération des cellules T et proposent de façon convaincante l'existence d'une nouvelle population de progéniteurs dans la M.O., plus immature que les CLP, appelée LSK. Cette population serait liée directement au HSC et est à l'origine des ETP (c-Kit<sup>hi</sup> IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup>) présents

dans le thymus (Allman et al., 2003). Martin et al. ont ensuite mis en évidence de façon aussi convaincante (sans rejeter les résultats d'Allman) la présence d'une population CLP-2 (c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>) dans le thymus contenant des précurseurs pour les cellules T et B (Martin et al., 2003). Si l'on considère la présence de ces deux populations (ETP et CLP) dans le thymus, quel est donc le lien entre elles ? Et s'il n'y a aucun lien entre ces deux types de progéniteurs, est-ce que l'une ou l'autre de ces deux populations est capable de générer des cellules T de façon indépendante ?

Dans notre étude, nous avons démontré que le développement extrathymique des cellules T se produit en absence de ETP, puisque cette population est absente dans les ganglions lymphatiques normaux et OM<sup>+</sup>. Ces résultats suggèrent que les progéniteurs identifiées dans les ganglions lymphatiques OM<sup>+</sup> ayant un phénotype CLP (c-Kit<sup>lo</sup> IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>) sont capables de générer *in vivo* des cellules T en absence de ETP (du moins dans un contexte OM<sup>+</sup>). Par contre, l'inaptitude des ganglion normaux à générer des cellules T est due soit à leur incapacité d'attirer des précurseurs ETP (si on ne se base que sur les résultats d'Allman et al.), soit à l'incapacité de leur stroma à transmettre le signal nécessaire pour l'augmentation du niveau d'expression de c-Kit, pour différencier les c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> en c-Kit<sup>hi</sup> IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup>. Ceci est envisageable si on considère que les ETP proviennent des CLP. D'ailleurs, avec des expériences d'injection i.v. de la population CLP-2, Martin et al. ont permis d'identifier une population intermédiaire c-Kit<sup>+</sup> entre les CLP-2 (c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>) et les cellules T (Martin et al., 2003).

Néanmoins, malgré l'absence de ETP, nos résultats démontrent que les ganglions lymphatiques ne sont pas déficients en progéniteurs lymphoïdes. Les cellules c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> sont abondantes dans les ganglions normaux et encore plus dans les ganglions OM<sup>+</sup> en comparaison avec le thymus. Aucune augmentation de la proportion des CLP n'a été observée dans la M.O. OM<sup>+</sup> (résultats non montrés). Contrairement au groupe de Bhandoola (Schwarz and Bhandoola, 2004) nous avons pu identifier une population CLP (Lin<sup>-</sup> c-Kit<sup>lo</sup>Sca-1<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>) dans le sang. La même population a été mise en évidence dans le sang par le groupe de Petrie (poster congrès). On peut attribuer cette différence dans les résultats aux différents marqueurs utilisés pour identifier ce type de progéniteurs. Les résultats préliminaires dans notre

laboratoire montrent aussi une augmentation de la proportion de ces progéniteurs dans le sang  $OM^+$ . Ces résultats suggèrent que la surexpression de OM induit une accumulation de la population  $Lin^- c\text{-Kit}^{lo} Sca-1^{lo} IL-7R\alpha^+$  dans le sang et les ganglions lymphatiques mais pas dans la M.O., suite à un effet direct sur les progéniteurs. Cet effet localisé de l'OM pourrait s'expliquer par la nature du promoteur qui contrôle sa surexpression (promoteur régulé seulement dans les cellules T qui circulent continuellement dans les ganglions lymphatiques et dans la circulation sanguine mais qui sont en faible nombre dans la M.O.). Un effet indirect de l'OM sur l'induction du développement extrathymique, est aussi envisageable. En effet, l'OM induit la prolifération des HEV dans les ganglions lymphatiques (Louis et al., 2003), ce qui pourrait expliquer l'accumulation massive des cellules  $Lin^- c\text{-Kit}^{lo} Sca-1^{lo} IL-7R\alpha^+$  dans ces derniers. Cette accumulation serait due à l'expression d'un ligand unique au niveau des HEV, encore inconnu, et qui serait important pour l'attraction de ces progéniteurs.

## **1.2. Présence de sous-populations DN engagées vers la lignée T dans les ganglions lymphatiques**

L'étude de Guy-Grand a identifié un développement extrathymique dans les ganglions mésentériques des souris nude et des souris néonatales thymectomisées à la différence des souris normales (euthymiques) (Guy-Grand et al., 2003). Pour expliquer l'inhibition du développement extrathymique et l'absence de sous-populations DN et DP dans les ganglions mésentériques d'une souris normale, Guy-Grand et al. ont proposé une compétition des progéniteurs extrathymiques avec les cellules T classiques pour certaines cytokines indispensables à leur survie et à leur prolifération (Guy-Grand et al., 2003). Notre analyse dans les ganglions mésentériques normaux a révélé la présence de trois sous-populations : **a)** la sous-population DN1 qui contient les progéniteurs lymphoïdes ( $c\text{-Kit}^{lo} IL-7R\alpha^+$ ) que l'on retrouve aussi dans le thymus et dans les ganglions  $OM^+$ , **b)** l'apparition d'une nouvelle sous-population transitoire entre les DN1 et les DN2 qu'on a appelé pré-DN2. Cette dernière témoigne d'un



blochage dans la transition DN1 vers DN2 puisqu'il y a absence des sous-populations DN2 et DN3 dans les ganglions normaux, c) Et, de façon surprenante, la présence d'une sous-population DN4.

Les sous-populations DN1 et pré-DN2 des ganglions normaux montrent des signes d'engagement vers la lignée T au niveau de l'ARNm. De plus, une proportion (20%) des DN4 "illégitimes" montrent aussi des signes d'engagement vers la lignée T. En effet, le modèle de différenciation *in vitro* (OP9-DL1) a permis de démontrer que les DN4 sont capables de générer des cellules DP et SP TCR $\alpha\beta^+$  après seulement 7 jours de culture. Ces résultats démontrent qu'on peut retrouver des cellules ayant un potentiel de différenciation vers la lignée T dans les ganglions lymphatiques normaux. L'équipe de Guy-Grand a identifié ces cellules seulement dans le cas où il y a absence de cellules T d'origine thymique. Cette différence dans les résultats peut s'expliquer par le modèle et la méthodologie utilisée par Guy-Grand et al., qui identifient seulement les cellules GFP<sup>hi</sup> (sous le contrôle du promoteur Rag-2). Ainsi, les cellules qui expriment la GFP à des niveaux très faibles peuvent ne pas être détectables par cytométrie en flux ou par immunohistochimie. De plus, par RT-PCR nous avons pu identifier, dans les cellules "CLP-like" des ganglions normaux, plusieurs gènes spécifiques de la lignée T en plus du gène *Rag*, tel que le facteur de transcription *HES-1*, *Deltex1*, la chaîne  $\gamma_c$  et *CD3 $\epsilon$* . L'analyse par cytométrie en flux des sous-populations DN dans l'étude de Guy-Grand et al., ne permet de visualiser la sous-population DN4 ni dans les ganglions mésentériques ni dans le thymus. La présence des DN4 est incontournable dans un thymus et cela malgré l'ajout de l'anticorps anti CD3 $\epsilon$  dans le cocktail d'élimination des cellules matures (argument d'absence des DN4 avancée par Guy-Grand et al.) (Guy-Grand et al., 2003). Ces résultats avec l'argument avancé ci-dessus, utilisant le modèle OP9-DL1, nous ont ainsi permis de confirmer le potentiel T des progéniteurs lymphoïdes présents dans les ganglions lymphatiques.

Les DN4 présents dans les ganglions mésentériques normaux sont différents des DN4 thymiques et de ceux provenant des ganglions mésentériques OM<sup>+</sup>. Ils subissent un arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1/0</sub>, 80% de ces cellules n'expriment pas le TCR $\beta$ , l'ARNm du préT $\alpha$  n'est pas détectable et le niveau d'ARNm des gènes *Rag-1* et *HES-1* est plus faible que dans le thymus et les ganglions mésentériques

OM<sup>+</sup>. Ces DN4 “illégitimes” peuvent être issus soit de rares DN3 indétectables par cytométrie en flux, soit directement à partir des DN1. D’ailleurs, l’existence des DN4 en absence de DN2 et de DN3 est un phénomène tout à fait possible dans le thymus dès qu’il y a altération de la trame épithéliale thymique ou en absence d’un signal de survie, comme c’est le cas dans les souris mutées dans le domaine N-terminal pour *Foxn1* et dans les souris *c-kit* déficientes (*Vickid*) (Su et al., 2003; Waskow et al., 2002).

Dans notre modèle de souris *LckOM*, l’OM semble jouer un rôle significatif dans la voie de différenciation extrathymique. Les souris *LckOM* présentent une hypoplasie thymique qui peut effectivement contribuer au développement des cellules T dans les ganglions mésentériques comme dans le cas des souris *nude* ou des souris thymectomisées (Guy-Grand et al., 2003). Néanmoins, cette différenciation demeure à un niveau très faible dans les souris *nude* en comparaison au thymus *wt* et aux ganglions OM<sup>+</sup> ; 1% de cellules DP dans les ganglions mésentériques des souris *nude* vs. 80% dans les souris *LckOM*. Ainsi, l’OM semble contribuer fortement, en débloquent ou en amplifiant d’avantage cette voie de différenciation.

Malgré l’apparition des sous-populations DN2 et DN3 dans les ganglions OM<sup>+</sup>, on peut noter que la population pré-DN2, qui témoigne du blocage dans les ganglions normaux, est toujours présente. Ceci suggère que le blocage dans la transition DN1 vers DN2 n’est que partiellement corrigé par l’OM. Cependant ce déblocage partiel a permis : 1) l’apparition des sous-populations DN2 et DN3 identiques à celles du thymus, 2) un rétablissement du cycle cellulaire (de 0% à 20%) et du niveau d’expression de la chaîne TCRβ intracellulaire (de 19% à 46.5%) au sein de la population DN4. Cette amélioration partielle, en comparaison avec les cellules DN4 thymiques, est tout de même suffisante pour générer des cellules DP identiques aux cellules DP thymiques (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>HSA<sup>+</sup>CD3<sup>lo</sup>CD69<sup>-</sup>CD5<sup>+</sup>) (Terra et al., 2002).

### 1.3. Stroma ganglionnaire vs. stroma thymique

Certains modèles de souris déficientes, (souris *nude* “pas de trame épithéliales”, souris *Foxn1*<sup>ΔΔ</sup> “CET bloquées au stade de progéniteurs”, souris

Vickid “signal de survie c-Kit absent”) (Su et al., 2003; Waskow et al., 2002; Guy-Grand et al., 2003), montrent un profil de cellules DN (CD44/CD25) semblable à celui des ganglions mésentériques normaux. Le point commun entre ces souris est une déficience d’un ou de plusieurs signaux transmis spécifiquement par les cellules épithéliales thymiques qui seraient importants pour la survie et la prolifération des progéniteurs lymphoïdes. Une corrélation simple entre les ganglions mésentériques normaux et ces souris nous a permis d’émettre l’hypothèse suivante : étant donné que l’absence de cellules épithéliales dans les ganglions mésentériques a été démontrée par immunohistochimie dans notre laboratoire (Louis et al., 2003), l’hypothèse proposée est donc un déficit en signaux de survie et de prolifération transmis par ces cellules épithéliales. Les expériences *in vivo* d’incorporation de BrdU et 7AAD ont démontré un arrêt du cycle cellulaire des sous-populations DN (DN1, pré-DN2 et DN4) dans les ganglions mésentériques. Cet arrêt de prolifération corrèle avec une proportion de cellules apoptotiques plus élevée par rapport au thymus et aux ganglions mésentériques OM<sup>+</sup>. Ces résultats renforcent notre hypothèse et témoignent de l’incapacité du stroma ganglionnaire (en absence de cellules épithéliales) à transmettre un ou des signaux nécessaires à la survie et la prolifération des précurseurs T. Le stroma ganglionnaire serait donc incapable d’assurer la survie et la différenciation des précurseurs de cellules T. Quelle est la donc la nature de ces signaux ?

### **1.3.1. Déficit du stroma ganglionnaire en signalisation Wnt**

L’accumulation de la sous-population pré-DN2, l’arrêt du cycle cellulaire et le niveau plus élevé d’apoptose nous ont amené à comparer le stroma des ganglions mésentériques au stroma thymique. Nous avons donc mesuré par Real time RTPCR les niveaux d’ARNm des gènes importants, pour l’engagement des précurseurs lymphoïdes vers la lignée T (ligands Delta-like du récepteur Notch-1) (Harman et al., 2003; Radtke et al., 2004) ainsi que pour la survie et la prolifération des thymocytes, plus précisément la transition DN1 vers DN2 (IL-7, ligand kit et les protéines Wnt) (Akashi et al., 1998; Agosti et al., 2004; Staal et al., 2004; Staal et al., 2001). De la même manière nous nous sommes intéressés aux signaux importants pour la

prolifération des DN4 incluant les signaux Wnt et le signal via le pré-TCR (Borowski et al., 2004; Chi et al., 2003; Schilham et al., 1998; Xu et al., 2003; Michie and Zuniga-Pflucker, 2002). Ceci a été effectué au niveau des trois organes (Thymus, ganglions normaux et ganglions OM<sup>+</sup>). Nos résultats démontrent que tous les ligands sont présents (au niveau des transcrits) dans le stroma ganglionnaire au même niveau que le stroma thymique sauf pour deux ligands, Wnt4 et Wnt7b, exprimés seulement dans le thymus. Ceci suggère que 1) Le stroma ganglionnaire est capable de transmettre les signaux d'engagement vers la lignée T, ceci ayant aussi été démontré au niveau des progéniteurs par RTPCR pour le signal HES-1 et Deltex (cibles transcriptionnelles de Notch-1), et les signaux de survie et prolifération via IL-7R et c-Kit, 2) La présence de Wnt4 et Wnt7b dans le thymus et leur absence dans les ganglions lymphatiques suggèrent un déficit de la signalisation Wnt dans les ganglions mésentériques, qui serait responsable du blocage dans le développement T. Ce blocage ne semble pas être compensé par la présence des protéines Wnt1, Wnt7a, Wnt10a et Wnt10b au niveau du stroma ganglionnaire, 3) La différenciation des cellules T dans les ganglions OM<sup>+</sup> n'est due ni à un rétablissement du niveau d'expression des protéines Wnt déficientes dans les ganglions normaux (Wnt4 et Wnt7) ni à une augmentation sous l'effet de l'OM (du moins au niveau de l'ARNm) des autres gènes Wnts déjà présents.

Le blocage DN1 vers DN2 et l'arrêt du cycle cellulaire au stade DN4 notés dans les ganglions lymphatiques normaux, pourraient être les conséquences de cette déficience. Effectivement, il existe des modèles de souris déficientes en signalisation Wnt : les souris TCF1<sup>-/-</sup> et Brg-déficiente montrent un déficit dans le cycle cellulaire de la sous-population DN4 (Chi et al., 2003; Schilham et al., 1998). Les souris TCF-1<sup>-/-</sup> présentent aussi un blocage dans la transition vers la sous-population DN2 avec un arrêt du cycle cellulaire et une accumulation des cellules DN1 (Schilham et al., 1998). L'accumulation de la sous-population pré-DN2 a aussi été observée dans des souris déficientes pour la Rho GTPase et Gfi1 (signalisation via c-Kit) (Costello et al., 2000; Yucel et al., 2003). Toutes ces molécules ont un point en commun : leur implication dans la voie de signalisation Wnt (Habas et al., 2001; Barker et al., 2001; Staal and Clevers, 2003).

Avant d'incriminer le blocage de la différenciation T au stroma ganglionnaire, il est inévitable de se poser la question sur la capacité des progéniteurs  $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^+$  (seul type de progéniteurs présent dans les ganglions mésentériques) à se différencier en cellules T. Les CLP ( $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^+$ ) de la M.O. sont capables, à la suite d'injection iv. ou intrathymique, de générer des cellules DP et SP dans le thymus au bout de 2 semaines (Allman et al., 2003; Kondo et al., 1997; Allman et al., 2002b). La seule différence entre les CLP de la M.O. et les ETP concerne la cinétique de différenciation, reflétée par une disparition graduelle des cellules DP générées par les CLPs qui est beaucoup plus rapide en comparaison avec celle des ETPs (Allman et al., 2003). Par contre, les études avec les progéniteurs thymiques ne sont pas concluantes. L'injection intrathymique et iv. des progéniteurs thymiques ayant un phénotype ressemblant aux CLP n'a pas permis de générer des cellules DP et SP dans le thymus, contrairement au CLP de la M.O. (Allman et al., 2003; Porritt et al., 2004). Il est difficile de conclure à partir de ces études, sur la capacité de différenciation des cellules  $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^+$  thymiques. La raison est que la population utilisée est soit un mélange entre des  $c\text{-kit}^{\text{lo}}$  et  $c\text{-kit}^{\text{lo}}$  ( $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^+$ ) (Allman et al., 2003), soit que la population  $c\text{-Kit}^{\text{lo}}$  triée n'exprime pas CD127 (IL-7R $\alpha$ ) (Porritt et al., 2004), ce qui n'est pas le cas des CLP de la M.O. et des  $c\text{-Kit}^{\text{lo}}$  thymiques ( $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^+$ ) utilisés dans notre étude (Allman et al., 2003) (Article 1. Figure 1). De plus, contrairement à notre étude sur les cellules OP9 *in vitro*, utilisant les cellules  $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^+$  (Article 1. Figure 6A), les progéniteurs  $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^-$  ont un faible potentiel de différenciation en cellules B avec le même modèle d'expérience (Porritt et al., 2004). Donc, nous avons décidé d'étudier le potentiel de différenciation des progéniteurs  $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^+$  thymiques, sur des cellules OP9 (potentiel de différenciation en cellules B) et OP9-DL1 (potentiel de différenciation en cellules T). Les résultats démontrent que les cellules  $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^+$  provenant des trois organes (thymus, ganglions mésentériques normaux et OM<sup>+</sup>) ressemblent aux CLP de la M.O., puisqu'elles génèrent des cellules CD19<sup>+</sup> et ont une capacité d'expansion faible en comparaison avec les cellules  $c\text{-Kit}^{\text{hi}}\text{IL-7R}\alpha^-$  identifiées comme des ETP par Allman et al. (Allman et al., 2003; Porritt et al., 2004) (Article 1. Figure 6B). Sur les cellules OP9-DL1, les progéniteurs  $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^+$  sont bloqués au

stade DN3 et ne génèrent pas de cellules DP et SP. Les souris surexprimant l'OM ou LIF (agissant via le LIFR) (Shen et al., 1994; Clegg et al., 1996; Boileau et al., 2000) sont le seul modèle *in vivo* qui démontre une différenciation des cellules T en absence de progéniteurs c-Kit<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> et en présence seulement de c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>. Donc les progéniteurs "CLP-like" nécessiteraient un ou plusieurs signaux importants, qui seraient absents *in vivo* dans les ganglions normaux et *in vitro* sur le stroma OP9-DL1. Ce déficit semble être compensé dans les souris transgéniques pour LIF et OM. Cependant, la question qui demeure : est-ce que les progéniteurs c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> génèrent des cellules T dans le thymus ou pas ?

Plusieurs raisons peuvent expliquer l'incapacité des cellules c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R<sup>+</sup> à générer des cellules T dans notre modèle d'étude *in vitro* 1) les c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> sont incapables de se différencier en cellules T quelque soit le microenvironnement dans lequel ils se développent (Thymus ou ganglions lymphatiques). Cette hypothèse est peu probable du fait que la différenciation de ces progéniteurs en cellules T, est observée dans la souris LckOM 2) une fois les cellules c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> extraites de leur microenvironnement thymique, elles perdent le signal Wnt4 et/ou Wnt7b transmis exclusivement par le stroma thymique. Sur les cellules OP9-DL1, ces signaux Wnt sont soit absents (Wnt7b), soit exprimés très faiblement (Wnt4).

Pour évaluer l'hypothèse du déficit de la signalisation Wnt dans les ganglions mésentériques, nous avons effectué des études de Real Time RTPCR sur les gènes impliqués en même temps, dans le développement T et dans la signalisation Wnt. Les résultats confirment un déficit dans cette voie de signalisation (Wnt) au niveau des cellules DN1 et DN4 (Article 1. Figure 5A, E). Ces deux sous-populations ont été décrites comme étant une cible de la signalisation Wnt par l'arrêt du cycle cellulaire dans les souris TCF1<sup>-/-</sup> et Brg-déficiente (Chi et al., 2003; Schilham et al., 1998). Nous avons donc apporté une évidence supplémentaire sur le rôle potentiel de la voie de signalisation Wnt dans le développement T, en agissant spécifiquement sur les sous-populations DN1 et DN4.

Ensuite, nous avons cherché à déterminer si le gain de fonction dans les ganglions lymphatique était dû à un effet direct de l'OM sur les sous-populations DN. Nous avons en premier lieu démontré un rétablissement du cycle cellulaire au niveau

des sous- populations DN1, pré-DN2 et DN4 dans les ganglions OM<sup>+</sup>. Étant donné que l'OMb agit seulement via le LIFR (Malik et al., 1989; Lindberg et al., 1998; Shen et al., 1994), la signalisation via ce récepteur devrait être la cause de ce gain de fonction. Les progéniteurs c-Kit<sup>lo</sup> et la sous-population DN1 expriment le récepteur LIFR (résultats non montrés). En effet, par l'analyse des gènes cibles du LIFR, la signalisation via ce dernier semble être la cause de ce gain de fonction. Les niveaux d'ARNm (*c-myc*, *c-fos* et *bcl-x<sub>L</sub>*) et de protéines (bcl-2, P-Stat3, et CD44) exprimées au niveau des sous-populations DN dans les ganglions OM<sup>+</sup> sont "uprégulés" par rapport à ceux des ganglions normaux (Article 1. Figure 5). Nos résultats suggèrent que la signalisation Wnt via les récepteurs Frz ainsi que la signalisation de l'OMb via le LIFR peuvent cibler les mêmes gènes, d'où la compensation fonctionnelle (partielle) dans les ganglions OM<sup>+</sup>. Ceci laisse entrevoir des fonctions similaires ou complémentaires entre les deux voies de signalisation. Ce concept a d'abord été proposé par Sato et al. qui ont démontré que l'autorenouvellement des cellules ES murines peut être supporté par LIF ou par Wnt (Sato et al., 2004). Une autre étude a démontré que LIF et Wnt4 (avec FGF-2, TGFbeta, Notch, and Jagged) participent au développement d'une même structure "le néphron" (Davies, 2002).

L'action de l'OM sur les sous-populations DN1, pré-DN2 et éventuellement DN4 a donc permis le développement des cellules DN2 et DN3 et le rétablissement du cycle cellulaire au niveau des cellules DN4, d'où l'apparition de cellules DP et SP. La persistance d'une accumulation de pré-DN2 et le rétablissement incomplet de la prolifération au niveau des DN4 (20% vs. 45% dans le thymus) (Article 1. Figure 3), démontrent une compensation seulement partielle de la déficience en Wnt. Néanmoins, ceci est suffisant pour permettre la génération des cellules DP et SP.

Les progéniteurs c-Kit<sup>lo</sup>IL-7Rα<sup>+</sup> ne sont pas capables de générer des cellules T sur le modèle OP9-DL1, contrairement au progéniteurs c-Kit<sup>hi</sup>IL-7Rα<sup>-</sup>. Les cellules stromales OP9-DL1 n'expriment pas Wnt7b et expriment très faiblement Wnt4. Nous avons donc décidé de tester notre hypothèse (l'importance de la signalisation Wnt pour le développement des cellules T à partir des progéniteurs c-Kit<sup>lo</sup>IL-7Rα<sup>+</sup> des ganglions normaux) en transfectant les cellules OP9-DL1 avec Wnt4. Avec des niveaux élevés de Wnt4, exprimés par le stroma OP9-DL1, les progéniteurs c-Kit<sup>lo</sup>IL-

$7R\alpha^+$  génèrent des cellules SP  $CD4^+$  et  $CD8^+$   $TCR\beta^+$ . Ces résultats suggèrent que la signalisation Wnt4 (et éventuellement Wnt7b) est nécessaire aux progéniteurs  $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^+$  pour générer des cellules T. *In vitro*, avec des niveaux faibles de Wnt4, on n'observe pas la sous-population pré-DN2 existante *in vivo*, et les progéniteurs  $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^+$  arrivent à atteindre le stade DN3 avec un blocage apparent dans la transition vers la sous-population DN4. L'expansion des DN4 et la génération de cellules SP ne sont donc possibles qu'avec des niveaux plus élevés de Wnt4. Pour appuyer *in vivo* ces résultats, on pourrait penser à la génération d'une souris transgénique pour Wnt4, d'une part pour confirmer le rôle *in vivo* de Wnt4 dans le développement T au niveau des ganglions lymphatiques et, d'autre part, la possibilité d'avoir des souris avec différents nombres de copie (donc des souris avec des niveaux plus ou moins élevés de Wnt4) nous permettra de tester si différents niveaux de Wnt4 influencent le développement des cellules T à différents stades.

Les progéniteurs  $c\text{-Kit}^{\text{hi}}\text{IL-7R}\alpha^-$  thymiques ne nécessitent pas des niveaux élevés de Wnt4 *in vitro*, contrairement aux progéniteurs  $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^+$  (Article 1. Figure 6 et 7). Ceci suggère qu'en fonction du type de progéniteurs lymphoïdes, différentes molécules Wnt peuvent être impliquées. Ces résultats peuvent expliquer pourquoi les fœtus ayant une délétion en Wnt4, ont seulement une diminution faible de la cellularité thymique (Mulroy et al., 2002). Ceci pourrait s'expliquer par une expression différentielle des récepteurs Frz en fonction du type cellulaire. Une étude qui va dans ce sens, a rapporté que Fz7 est impliqué au stade DN alors que Fz8 l'est au stade ISP vers DP. Fz7 semble aussi plus impliqué dans le développement des cellules T au niveau des progéniteurs du foie fœtal qu'au niveau des thymocytes fœtaux (Staal et al., 2001). Tous ces éléments confortent l'idée que Wnt4 peut bien être indispensable pour les  $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^+$  mais de façon moindre pour les  $c\text{-Kit}^{\text{hi}}\text{IL-7R}\alpha^-$ . Il serait donc intéressant de tester la capacité des  $c\text{-Kit}^{\text{hi}}\text{IL-7R}\alpha^-$  à se différencier *in vivo* dans les ganglions lymphatiques. Les données sur le développement des reins qui est Wnt4 dépendant, suggèrent que Wnt4 peut interagir avec Frz7 (Kispert et al., 1998). Le même type d'interaction pourrait avoir lieu entre Wnt4 et les DN1 ou les DN4 exprimant Frz7.



## 2. Étapes tardives du développement T extrathymique

Nous avons éclairé plusieurs points concernant l'incapacité des ganglions lymphatiques normaux à supporter la différenciation des lymphocytes T. On sait maintenant que les ganglions lymphatiques sont incapables de supporter les étapes précoces du développement T. Cette incapacité est due au blocage de la transition DN1 vers DN2 probablement causé par la déficience en signalisation Wnt.

Grâce à la souris LckOM, nous avons un modèle unique dans lequel le blocage au niveau des étapes précoces du développement T a été surmonté. Ceci représente une opportunité inespérée pour étudier la capacité d'un organe périphérique à supporter les étapes tardives du développement T, i.e. la sélection positive et négative. Ce modèle nous permettra aussi d'étudier l'impact d'une architecture différente de l'architecture thymique sur les mécanismes de sélection positive et négative et sur l'homéostasie des cellules T.

### 2.1. La sélection positive

En absence de cellules épithéliales au niveau des ganglions lymphatiques, quelles sont les cellules responsables de la sélection positive extrathymique? Deux types de cellules peuvent être impliqués: les cellules hématopoïétiques et/ou les cellules non hématopoïétiques (fibroblastes ou cellules endothéliales). Deux études ont démontré la capacité des cellules hématopoïétiques thymiques à sélectionner deux types de cellules : la sous-population T CD8<sup>+</sup> "naïve" restreinte par les molécules de CMH classe Ib non classique et la sous-population de cellules T CD4<sup>+</sup> (NKT) CD1d restreintes (Urdahl et al., 2002; Bendelac, 1995). D'autres études, utilisant des chimères hématopoïétiques et des souris TCR transgéniques, ont conclu que la sélection positive sur les cellules hématopoïétiques est inefficace (Bix and Raulet, 1992) soit que l'efficacité de cette sélection est dépendante du thymus (pas de cellules T développées dans les chimères athymiques) et de la nature du TCR impliqué (avidité du TCR transgénique utilisé) (Zerrahn et al., 1999; Zinkernagel and Althage, 1999). Chez la souris LckOM et dans un contexte complètement indépendant du thymus, on

observe des cellules DP et SP CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, suggérant ainsi un processus de sélection positive. L'utilisation des chimères hématopoïétiques thymectomisées, nous a permis de conclure que les cellules hématopoïétiques sont suffisantes pour la sélection positive d'un répertoire V $\beta$  polyclonal de cellules SP CD8<sup>+</sup>. Pour la première fois, nous avons donc démontré que les cellules hématopoïétiques sont capables de supporter la sélection positive de façon indépendante du thymus.

Les études concernant le rôle des cellules non hématopoïétiques et plus précisément les fibroblastes démontrent le faible potentiel de ces cellules à supporter la sélection positive. En effet, dans notre modèle d'étude, la sélection positive sur les cellules non hématopoïétiques semble inefficace. Cependant la présence de 1-3% de cellules hématopoïétiques résiduelles dans les souris receveuses, nous empêche de tirer une conclusion définitive. Ces cellules résiduelles peuvent participer à la sélection positive des cellules CD8<sup>+</sup> et, par conséquent, masquer l'incapacité des cellules non hématopoïétiques à supporter la sélection positive. L'utilisation de souris receveuses Rag1/2 Knock out nous permettrait de trancher sur ce point si les seules cellules résiduelles sont des cellules T et B.

Pour quantifier et mesurer l'efficacité de cette sélection positive effectuée par les cellules hématopoïétiques extrathymiques, nous avons généré des souris où des TCR transgéniques tels que H-Y et 2C sont sélectionnés dans un environnement OM<sup>+</sup>. De façon similaire aux études précédentes, nous avons confirmé que le TCR 2C est sélectionné plus efficacement sur les cellules hématopoïétiques que le TCR H-Y (Zerrahn et al., 1999; Robey et al., 1992). Le nouvel élément apporté par notre étude est que cette sélection dans les ganglions lymphatiques est complètement thymus indépendant, contrairement aux résultats de Zerrahn et al. (Zerrahn et al., 1999) (Article 2. Figure 4). D'après les études effectuées sur le TCR 2C, démontrant sa capacité d'interagir avec les molécules de CMH classe Ia et Ib (contrairement au TCR H-Y), on ne peut pas exclure la contribution de cette double spécificité à l'efficacité de la sélection positive du TCR 2C (Zerrahn et al., 1999; Maurice et al., 2001). Cependant, l'avidité plus forte du TCR 2C pour ses ligands pourrait expliquer l'efficacité de la sélection positive en comparaison avec le TCR H-Y. L'avidité semble essentielle au succès de la sélection positive sur les cellules hématopoïétiques. Ceci a

été confirmé pour les cellules T CD8<sup>+</sup> TCR H-Y<sup>+</sup>, pour lesquelles la sélection positive a été améliorée de 10x à la suite de l'expression par les cellules souches du donneur, sous le contrôle du promoteur CD2, d'un transgène CD8.1 augmentant l'avidité (Zerrahn et al., 1999). L'utilisation du marqueur de surface CD5 pour mesurer l'avidité d'interaction des cellules T sélectionnées conforte cette hypothèse. Effectivement, les cellules CD8<sup>+</sup> TCR 2C<sup>+</sup> expriment un niveau plus élevé de CD5 comparées aux cellules CD8<sup>+</sup> TCR H-Y<sup>+</sup> (Article 2. Figure 5). Une autre explication serait que les complexes CMH-peptides nécessaires à la sélection positive du TCR H-Y sont moins représentés à la surface des cellules hématopoïétiques. Par contre, la sélection positive des cellules CD8<sup>+</sup> transgéniques semble plus efficace dans le thymus (cellules épithéliales) que dans les ganglions lymphatiques (cellules hématopoïétiques), en se basant sur le niveau d'expression de CD5 qui est plus élevé dans le thymus (Article 2. Figure 5A et B). On peut expliquer ces résultats par le fait que les complexes CMH-peptides, nécessaires à la sélection des TCR 2C et H-Y, sont moins abondants dans les ganglions lymphatiques par rapport au thymus. Cependant, le faible niveau d'expression de CD5 n'est pas une caractéristique générale de toutes les cellules T qui se développent dans les ganglions lymphatiques OM<sup>+</sup>. L'expression de CD5 sur les cellules T polyclonales TCR H-Y transgénique est plus élevée dans les ganglions lymphatiques OM<sup>+</sup> que dans le thymus (Article 2. Figure 5A). Ceci suggère des complexes CMH-peptides différents à la surface de ces deux types cellulaires (cellules épithéliales vs. cellules hématopoïétiques), d'où une avidité différente pour divers TCR, qui va dicter l'efficacité de la sélection positive.

La différence entre les cellules épithéliales et les cellules hématopoïétiques ne serait pas nécessairement l'apport de complexes CMH-peptides différents mais pourrait être aussi l'incapacité des cellules hématopoïétiques à transmettre un second signal nécessaire à l'efficacité de la sélection positive et à la maturation des cellules SP (Anderson et al., 1994).

En absence donc de cellules épithéliales corticales, la sélection positive est possible mais générerait un répertoire de cellules T diversifié et différent du répertoire de cellules T thymiques. En effet, ce répertoire extrathymique semble être

immunocompétent pour rejeter une tumeur allogénique (Clegg et al., 1996), par contre il est moins efficace contre une agression virale (Blais et al., 2004).

## 2.2 La sélection négative

L'absence de ségrégation cortico-médullaire dans les ganglions lymphatiques  $OM^+$  ne semble pas affecter l'efficacité de la sélection négative. Les TCR transgéniques H-Y et 2C ont subi une sélection négative aussi efficace que celle du thymus (Article 2. Figures 2 et 3). Le stroma ganglionnaire exprimerait donc les mêmes complexes CMH-peptide que la médulla thymique, au moins concernant la sélection des TCR H-Y et 2C. Ceci suggère que le stroma ganglionnaire est riche en CPA nécessaires à la sélection négative (Matzinger and Guerder, 1989; Webb and Sprent, 1990; Burkly et al., 1993). Il n'est peut être pas étonnant de voir une sélection négative extrathymique efficace, puisqu'il a été rapporté que les cellules hématopoïétiques (telles que les cellules dendritiques) sont efficaces pour cette fonction en ayant des interactions de forte avidité avec les cellules T (Matzinger and Guerder, 1989). Cependant, on sait que le stroma ganglionnaire est dépourvu de cellules épithéliales, ce qui implique l'absence de certaines propriétés caractérisant les cellules épithéliales médullaires. Les ganglions lymphatiques  $OM^+$  seraient donc incapables d'éliminer les cellules T spécifiques pour les gènes normalement exprimés en périphérie. Si la sélection négative des cellules T "TCR transgéniques" semble efficace, celle du répertoire T polyclonal le serait moins. L'argument appuyant cette hypothèse, sont les signes d'autoimmunités développés par les souris LckOM âgées (Clegg et al., 1999). Il serait donc intéressant de comparer les mécanismes d'autoimmunités dans les souris LckOM et les souris déficientes pour le facteur de transcription AIRE dans la médulla thymique (Peterson et al., 1998; Anderson et al., 2002).

### 2.3. Phénotype activé/mémoire et homéostasie des cellules T extrathymiques

Le phénotype activé des cellules T extrathymiques  $OM^+$  est une caractéristique partagée par les cellules T sélectionnées positivement par les cellules hématopoïétiques ( $CD44^{hi}$   $HSA^{lo}$   $CD5^+$  pour les cellules  $CD8^+$  CMH Ib restreints et  $CD44^{hi}CD69^+CD122^{hi}$  pour les cellules NKT  $V_{\alpha}14^+\alpha$ -GalCer) (Urdahl et al., 2002; Gapin et al., 2001). Les expériences de BrdU *in vivo*, ont démontré une prolifération rapide des cellules T extrathymiques de la souris LckOM (Boileau et al., 2000). De la même manière *in vitro*, sous l'effet de l'anti-CD3, ces cellules ont une expansion plus rapide que les cellules thymiques, secrètent plus d'IFN- $\gamma$  et subissent une apoptose plus élevée (Blais et al., 2004). Ainsi, les cellules T extrathymiques partagent plusieurs caractéristiques avec les cellules  $CD8^+$  CMH Ib restreintes. L'absence de cellules T SP  $CD8^+$  et  $CD4^+$  immatures ( $HSA^+$ ) dans les ganglions lymphatiques  $OM^+$  en comparaison avec le thymus, peut s'expliquer par le fait que : 1) la sélection positive sur les cellules hématopoïétique provoque la diminution de l'expression du marqueur HSA, comme c'est le cas pour les cellules CMH classe Ib restreintes 2) la prolifération rapide des cellules T  $HSA^-$  va diluer les cellules T  $HSA^+$  3) la sélection positive du répertoire polyclonal est inefficace, d'où une expansion périphérique de ce répertoire limité et l'acquisition du phénotype mature et activé. Les cellules T TCR H-Y $^+$   $OM^+$  expriment aussi un phénotype activé/mémoire. Par contre les cellules T TCR 2C $^+$   $OM^+$  sélectionnées positivement de façon efficace font exception à la règle. En effet, la majorité de ces cellules ont un phénotype naïf. L'une des explications est que la sélection positive des cellules T TCR 2C $^+$  génère assez de cellules pour occuper les niches périphériques sans avoir besoin d'une expansion homéostatique. Ce phénotype naïf démontre que le phénotype activé/mémoire n'est pas une conséquence directe de l'action de l'OM mais dépend plutôt de la nature du TCR. Du fait de l'absence de ce phénotype activé/mémoire pour le TCR 2C, on peut spéculer sur la nature du répertoire polyclonal extrathymique qui se rapprocherait plus du TCR H-Y que du TCR 2C.

Pour confirmer l'état de prolifération des cellules T extrathymiques et leur "turnover" accéléré, nous avons mesuré la quantité de TREC SJ (chaîne  $\alpha$ ) et DJ (chaîne  $\beta$ ) au niveau des SP des ganglions et de la rate  $OM^+$  en comparaison avec le thymus et la rate normale. Les résultats démontrent clairement un nombre de TREC plus faible concernant les cellules T extrathymiques SP  $CD4^+$  et  $CD8^+$  dans les deux organes (Résultats additionnels. Figures 1A et B). Ce nombre faible de TREC est certainement dû à leur prolifération importante, d'où alors ce phénotype activé/mémoire. On pourrait aussi penser à une transition des cellules DP vers SP peu efficace.

Donc, l'interaction avec les cellules hématopoïétiques semble être l'élément crucial qui détermine l'acquisition du phénotype activé/mémoire. Il reste à savoir pourquoi et comment les cellules hématopoïétiques induisent ce phénotype ?

## CONCLUSION

Depuis la découverte du thymus en tant qu'organe capable de supporter le développement des lymphocytes T, il n'a cessé de susciter l'intérêt des biologistes et diverses questions et hypothèses se sont donc posées. Nous avons tenté dans mon projet de thèse de répondre à quelques unes de ces questions. Si le thymus est le seul organe capable de supporter la différenciation des cellules T, c'est qu'il possède forcément des caractéristiques uniques, absentes des organes périphériques.

Notre approche a consisté à comparer le thymus avec un organe périphérique : le ganglion lymphatique. Ceci a été possible grâce au modèle de la souris LckOM. Chez cette souris, les ganglions lymphatiques sont transformés en organes primaires, capables de supporter le développement des cellules T tout en préservant leurs propriétés d'organe secondaire. Ce modèle, fut alors une opportunité inespérée nous permettant de comprendre l'essence même d'un organe lymphoïde primaire tel que le thymus.

Nous avons pu démontrer clairement que le stroma thymique possède incontestablement des caractéristiques uniques. En effet, les progéniteurs ETP ( $c\text{-Kit}^{\text{hi}}\text{IL-7R}\alpha^{-}$ ) sont présents exclusivement dans le thymus, mais de façon surprenante les progéniteurs CLP ( $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^{+}$ ) sont plus abondants dans les ganglions lymphatiques (normaux ou OM<sup>+</sup>). Ces progéniteurs lymphoïdes extrathymiques sont bloqués en phase G1 du cycle cellulaire et sont incapables de générer des cellules DN2, d'où un blocage au niveau des étapes précoces du développement T. Cependant, le stroma ganglionnaire partage certaines caractéristiques avec le thymus, tel que la transmission de signaux d'engagement vers la lignée T ainsi que certains signaux de survie et de prolifération. Par contre, la présence de ces signaux n'est pas suffisante pour générer des lymphocytes T. Nos résultats suggèrent que la génération des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques dépendrait de deux paramètres au niveau des étapes précoces du développement: la nature des progéniteurs lymphoïdes (ETP vs CLP) et la signalisation via Wnt (Wnt4 et Wnt7b). Autrement dit, en absence de ETP, la génération des cellules T à partir des progéniteurs "CLP like" présents

dans les ganglions lymphatiques, nécessiteraient une signalisation Wnt spécifique, absente dans cet organe. Le seul détail non éclairci jusqu'à présent reste le lien entre les progéniteurs ETP ( $c\text{-Kit}^{\text{hi}}\text{IL-7R}\alpha^{-}$ ) et CLP ( $c\text{-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^{+}$ ). Les CLP étant les seuls progéniteurs présents dans les ganglions lymphatiques, le stroma ganglionnaire serait soit incapable d'attirer les ETP, soit incapable d'en générer à partir des CLP par "l'uprégulation" du marqueur de surface  $c\text{-Kit}$ . L'incapacité de ces CLP à générer des cellules T SP peut être corrigée par l'addition de Wnt4 *in vitro* ou par l'exposition à l'OM *in vivo* (action via le LIFR). Nos résultats suggèrent ainsi un recoupement entre ces deux voies de signalisations.

Cependant, il reste à démontrer que l'apport *in vivo* de Wnt4 est capable à lui seul de débloquent la différenciation des cellules T dans les ganglions lymphatiques. De la même manière, si les progéniteurs ETP ne nécessitent pas Wnt4, ces progéniteurs devraient être capables de générer des cellules T dans les ganglions lymphatiques. Les ganglions lymphatiques possèdent donc des progéniteurs engagés vers la lignée T et l'apport d'un signal de survie à ces progéniteurs *in vivo* est suffisant pour permettre la génération de cellules T DP et SP. Nous avons ainsi un modèle unique, capable de générer des cellules T *in vivo* en absence de ETP.

La souris LckOM est aussi un modèle unique pour l'étude des mécanismes de sélection ainsi que l'homéostasie des cellules T extrathymiques. Nos travaux démontrent qu'en absence de cellules épithéliales, les mécanismes de sélections extrathymiques dictés par les cellules hématopoïétiques sont différents des mécanismes intrathymiques. Malgré le fait que les cellules hématopoïétiques semblent être suffisantes pour sélectionner des cellules CD8 extrathymiques ayant un répertoire  $V\beta$  polyclonal, l'efficacité de la sélection positive semble dépendre de la nature du TCR et générerait un répertoire de cellules T différent du répertoire thymique. Il serait donc intéressant d'étudier plus en détail les régions CDR3 des TCR exprimées par ces cellules T extrathymiques dans un contexte infectieux. En effet, ces cellules T extrathymiques sont incapables de soutenir une réponse antivirale efficace (Blais et al., 2004), par contre elles sont capables d'inhiber la croissance des cellules tumorales allogéniques (Clegg et al., 1996). Les cellules CD8 retraits par le CMH classe Ib partagent plusieurs caractéristiques avec les cellules T générées dans les ganglions



lymphatiques OM<sup>+</sup> (sélection positive sur des cellules hématopoïétiques, phénotype activé, production rapide d'IFN- $\gamma$ ), et sont efficaces contre des bactéries sensibles à l'IFN- $\gamma$ , telles que *Listeria monocytogenese* ou *Mycobactérium tuberculosis* (Urdahl et al., 2002). Il serait donc intéressant de vérifier l'efficacité des cellules extrathymiques à répondre contre ce type de pathogènes.

L'absence de ségrégation cortico-médullaire, de cellules épithéliales et d'une barrière empêchant la recirculation des cellules T (comme dans un thymus), n'empêchent pas le développement des cellules T dans les ganglions lymphatiques. Ceci démontre q'un organe primaire T ne doit pas forcément partager tous les attributs thymiques.

Par contre, ce qui ressort de notre étude, c'est qu'il est difficile de remplacer le thymus. Cet organe primaire est très complexe est rassemble en même temps tous les paramètres nécessaire pour générer des cellules T naïves, tolérantes vis à vis du soi, diversifiées et capables de lutter contres tous les types de pathogènes. Cependant, le thymus présente un seul défaut (à nos yeux) qui est l'atrophie thymique progressive avec l'âge. De plus, le thymus est incapable d'augmenter l'exportation des cellules T à la suite de déplétions périphériques dans le cas de transplantations de cellules souches hématopoïétiques, de chimiothérapie ou d'infection par le HIV et EBV. L'expansion homéostatique, prend alors le relais pour compenser le déficit en cellules T périphériques mais engendre une diminution de la diversité du répertoire T. Ce déclin dans la diversité va augmenter la susceptibilité aux infections et va diminuer la capacité à répondre contre les pathogènes.

Une meilleure compréhension de la fonction thymique, à l'aide de la souris LckOM, nous permettrait de mettre au point une stratégie de développement de lymphocytes T. l'utilisation de l'OM n'étant pas possible à cause de ses effets secondaires importants, l'utilisation de molécules clés induisant la prolifération et l'expansion des progéniteurs lymphoïdes extrathymiques et ainsi la génération de cellules T, serait une alternative. On pourrait imaginer une approche thérapeutique incluant des traitements avec des hormones de croissance ou des cytokines, pour augmenter la cellularité thymique, associée à l'apport de cellules T générées en grandes quantités dans des systèmes de cultures *ex vivo* en tirant profit de molécules

importantes pour la survie et la prolifération des progéniteurs lymphoïdes extrathymiques.

Enfin, le plus grand défi serait de pouvoir régénérer la capacité du thymus à générer des cellules T. Ce défi serait possible en agissant sur deux éléments interdépendants et indissociables : le stroma thymique et les progéniteurs lymphoïdes provenant de la M.O.. Une combinaison d'études sur les mécanismes qui contrôlent l'induction et le maintien de l'architecture thymique (organogenèse) aussi bien que l'autorenouvellement et la prolifération des progéniteurs lymphoïdes (dans la M.O. et le thymus) nous aideraient à atteindre cet objectif. Les nouvelles technologies telles que la bioinformatique, la génomique et la protéomique seraient incontournables. Ceci aurait un grand impact sur notre état de santé et de ce fait sur notre espérance de vie.

## **REFERENCES**

## Reference List

- Abo, T. (2001a). Extrathymic pathways of T cell differentiation. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz. )* 49, 81-90.
- Abo, T. (2001b). Extrathymic pathways of T-cell differentiation and immunomodulation. *Int. Immunopharmacol.* 1, 1261-1273.
- Agosti, V., Corbacioglu, S., Ehlers, I., Waskow, C., Sommer, G., Berrozpe, G., Kissel, H., Tucker, C.M., Manova, K., Moore, M.A., Rodewald, H.R., and Besmer, P. (2004). Critical role for Kit-mediated Src kinase but not PI 3-kinase signaling in pro T and pro B cell development. *J. Exp. Med.* 199, 867-878.
- Akashi, K., Kondo, M., and Weissman, I.L. (1998). Role of interleukin-7 in T-cell development from hematopoietic stem cells. *Immunol. Rev.* 165, 13-28.
- Allen, J.D., Harris, A.W., Bath, M.L., Strasser, A., Scollay, R., and Adams, J.M. (1995). Perturbed development of T and B cells in mice expressing an Hlx homeobox transgene. *J. Immunol.* 154, 1531-1542.
- Allman, D., Punt, J.A., Izon, D.J., Aster, J.C., and Pear, W.S. (2002b). An invitation to T and more: notch signaling in lymphopoiesis. *Cell* 109 *Suppl*, S1-11.
- Allman, D., Punt, J.A., Izon, D.J., Aster, J.C., and Pear, W.S. (2002a). An invitation to T and more: notch signaling in lymphopoiesis. *Cell* 109 *Suppl*, S1-11.
- Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J.P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., and Bhandoola, A. (2003). Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat. Immunol.* 4, 168-174.
- Almeida, A.R., Borghans, J.A., and Freitas, A.A. (2001). T cell homeostasis: thymus regeneration and peripheral T cell restoration in mice with a reduced fraction of competent precursors. *J. Exp. Med.* 194, 591-599.
- Amagai, T., Itoi, M., and Kondo, Y. (1995). Limited development capacity of the earliest embryonic murine thymus. *Eur. J. Immunol.* 25, 757-762.
- Anderson, G., Hare, K.J., and Jenkinson, E.J. (1999). Positive selection of thymocytes: the long and winding road. *Immunol. Today* 20, 463-468.
- Anderson, G. and Jenkinson, E.J. (2001). Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 31-40.
- Anderson, G., Owen, J.J., Moore, N.C., and Jenkinson, E.J. (1994). Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro. *J. Exp. Med.* 179, 2027-2031.

- Anderson,G., Partington,K.M., and Jenkinson,E.J. (1998). Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus. *J. Immunol.* *161*, 6599-6603.
- Anderson,G., Pongracz,J., Parnell,S., and Jenkinson,E.J. (2001). Notch ligand-bearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3349-3354.
- Anderson,M.S., Venanzi,E.S., Klein,L., Chen,Z., Berzins,S.P., Turley,S.J., von Boehmer,H., Bronson,R., Dierich,A., Benoist,C., and Mathis,D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* *298*, 1395-1401.
- Andrew,D. and Aspinall,R. (2001). Il-7 and not stem cell factor reverses both the increase in apoptosis and the decline in thymopoiesis seen in aged mice. *J. Immunol.* *166*, 1524-1530.
- Andrew,D. and Aspinall,R. (2002). Age-associated thymic atrophy is linked to a decline in IL-7 production. *Exp. Gerontol.* *37*, 455-463.
- Aspinall,R. and Andrew,D. (2000). Thymic atrophy in the mouse is a soluble problem of the thymic environment. *Vaccine* *18*, 1629-1637.
- Auguste,P., Guillet,C., Fourcin,M., Olivier,C., Veziers,J., Pouplard-Barthelaix,A., and Gascan,H. (1997). Signaling of type II oncostatin M receptor. *J. Biol. Chem.* *272*, 15760-15764.
- Balciunaite,G., Keller,M.P., Balciunaite,E., Piali,L., Zuklys,S., Mathieu,Y.D., Gill,J., Boyd,R., Sussman,D.J., and Hollander,G.A. (2002). Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat. Immunol.* *3*, 1102-1108.
- Baldwin,K.K., Trenchak,B.P., Altman,J.D., and Davis,M.M. (1999). Negative selection of T cells occurs throughout thymic development. *J. Immunol.* *163*, 689-698.
- Barker,N., Hurlstone,A., Musisi,H., Miles,A., Bienz,M., and Clevers,H. (2001). The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J.* *20*, 4935-4943.
- Bendelac,A. (1995). Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J. Exp. Med.* *182*, 2091-2096.
- Bennett,A.R., Farley,A., Blair,N.F., Gordon,J., Sharp,L., and Blackburn,C.C. (2002). Identification and characterization of thymic epithelial progenitor cells. *Immunity.* *16*, 803-814.
- Benoist,C. and Mathis,D. (1989). Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell* *58*, 1027-1033.

- Berzins,S.P., Boyd,R.L., and Miller,J.F. (1998). The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. *J. Exp. Med.* *187*, 1839-1848.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 9787-9791.
- Bhandoola,A., Sambandam,A., Allman,D., Meraz,A., and Schwarz,B. (2003). Early T lineage progenitors: new insights, but old questions remain. *J. Immunol.* *171*, 5653-5658.
- Bill,J. and Palmer,E. (1989). Positive selection of CD4+ T cells mediated by MHC class II-bearing stromal cell in the thymic cortex. *Nature* *341*, 649-651.
- Bix,M. and Raulet,D. (1992). Inefficient positive selection of T cells directed by haematopoietic cells. *Nature* *359*, 330-333.
- Blackburn,C.C., Manley,N.R., Palmer,D.B., Boyd,R.L., Anderson,G., and Ritter,M.A. (2002). One for all and all for one: thymic epithelial stem cells and regeneration. *Trends Immunol.* *23*, 391-395.
- Blais,M.E., Gerard,G., Martinic,M.M., Roy-Proulx,G., Zinkernagel,R.M., and Perreault,C. (2004). Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses? *Blood* *103*, 3102-3110.
- Boehm,T., Bleul,C.C., and Schorpp,M. (2003). Genetic dissection of thymus development in mouse and zebrafish. *Immunol. Rev.* *195*, 15-27.
- Boileau,C., Houde,M., Dulude,G., Clegg,C.H., and Perreault,C. (2000). Regulation of extrathymic T cell development and turnover by oncostatin M. *J. Immunol.* *164*, 5713-5720.
- Borowski,C., Li,X., Aifantis,I., Gounari,F., and von Boehmer,H. (2004). Pre-TCRalpha and TCRalpha are not interchangeable partners of TCRbeta during T lymphocyte development. *J. Exp. Med.* *199*, 607-615.
- Boulton,T.G., Zhong,Z., Wen,Z., Darnell,J.E., Jr., Stahl,N., and Yancopoulos,G.D. (1995). STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a secondary modification requiring an H7-sensitive kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 6915-6919.
- Broxmeyer,H.E., Bruns,H.A., Zhang,S., Cooper,S., Hangoc,G., McKenzie,A.N., Dent,A.L., Schindler,U., Naeger,L.K., Hoey,T., and Kaplan,M.H. (2002). Th1 cells regulate hematopoietic progenitor cell homeostasis by production of oncostatin M. *Immunity.* *16*, 815-825.

- Burkly,L.C., Degermann,S., Longley,J., Hagman,J., Brinster,R.L., Lo,D., and Flavell,R.A. (1993). Clonal deletion of V beta 5+ T cells by transgenic I-E restricted to thymic medullary epithelium. *J. Immunol.* *151*, 3954-3960.
- Campbell,D.J., Kim,C.H., and Butcher,E.C. (2003). Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol. Rev.* *195*, 58-71.
- Ceredig,R. and Rolink,T. (2002). A positive look at double-negative thymocytes. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 888-897.
- Chi,T.H., Wan,M., Lee,P.P., Akashi,K., Metzger,D., Chambon,P., Wilson,C.B., and Crabtree,G.R. (2003). Sequential roles of Brg, the ATPase subunit of BAF chromatin remodeling complexes, in thymocyte development. *Immunity.* *19*, 169-182.
- Chidgey,A.P. and Boyd,R.L. (2001). Thymic stromal cells and positive selection. *APMIS* *109*, 481-492.
- Chidgey,A.P., Pircher,H., MacDonald,H.R., and Boyd,R.L. (1998). An adult thymic stromal-cell suspension model for in vitro positive selection. *Dev. Immunol.* *6*, 157-170.
- Clegg,C.H., Rulffes,J.T., Wallace,P.M., and Haugen,H.S. (1996). Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature* *384*, 261-263.
- Clegg,C.H., Haugen,H.S., Rulffes,J.T., Friend,S.L., and Farr,A.G. (1999). Oncostatin M transforms lymphoid tissue function in transgenic mice by stimulating lymph node T-cell development and thymus autoantibody production. *Exp. Hematol.* *27*, 712-725.
- Cobas,M., Wilson,A., Ernst,B., Mancini,S.J., MacDonald,H.R., Kemler,R., and Radtke,F. (2004). Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J. Exp. Med.* *199*, 221-229.
- Cordier,A.C. and Haumont,S.M. (1980). Development of thymus, parathyroids, and ultimo-branchial bodies in NMRI and nude mice. *Am. J. Anat.* *157*, 227-263.
- Costello,P.S., Cleverley,S.C., Galandrini,R., Henning,S.W., and Cantrell,D.A. (2000). The GTPase rho controls a p53-dependent survival checkpoint during thymopoiesis. *J. Exp. Med.* *192*, 77-85.
- Davies,J.A. (2002). Morphogenesis of the metanephric kidney. *ScientificWorldJournal.* *2*, 1937-1950.
- Defetos,M.L. and Bevan,M.J. (2000). Notch signaling in T cell development. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 166-172.
- Degermann,S., Surh,C.D., Glimcher,L.H., Sprent,J., and Lo,D. (1994). B7 expression on thymic medullary epithelium correlates with epithelium-mediated deletion of V beta 5+ thymocytes. *J. Immunol.* *152*, 3254-3263.

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

Di Santo,J.P., Radtke,F., and Rodewald,H.R. (2000). To be or not to be a pro-T? *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 159-165.

Dion,M.L., Poulin,J.F., Bordi,R., Sylvestre,M., Corsini,R., Kettaf,N., Dalloul,A., Boulassel,M.R., Debre,P., Routy,J.P., Grossman,Z., Sekaly,R.P., and Cheynier,R. (2004). HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity.* *21*, 757-768.

Donskoy,E. and Goldschneider,I. (1992). Thymocytopoiesis is maintained by blood-borne precursors throughout postnatal life. A study in parabiotic mice. *J. Immunol.* *148*, 1604-1612.

Douek,D.C., Betts,M.R., Hill,B.J., Little,S.J., Lempicki,R., Metcalf,J.A., Casazza,J., Yoder,C., Adelsberger,J.W., Stevens,R.A., Baseler,M.W., Keiser,P., Richman,D.D., Davey,R.T., and Koup,R.A. (2001). Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J. Immunol.* *167*, 6663-6668.

Douek,D.C., McFarland,R.D., Keiser,P.H., Gage,E.A., Massey,J.M., Haynes,B.F., Polis,M.A., Haase,A.T., Feinberg,M.B., Sullivan,J.L., Jamieson,B.D., Zack,J.A., Picker,L.J., and Koup,R.A. (1998). Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* *396*, 690-695.

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.

Foss,D.L., Donskoy,E., and Goldschneider,I. (2001). The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J. Exp. Med.* *193*, 365-374.

Freedon-Jeffry,U., Vieira,P., Lucian,L.A., McNeil,T., Burdach,S.E., and Murray,R. (1995). Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* *181*, 1519-1526.

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

Fukada,T., Hibi,M., Yamanaka,Y., Takahashi-Tezuka,M., Fujitani,Y., Yamaguchi,T., Nakajima,K., and Hirano,T. (1996). Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity.* *5*, 449-460.



- Fukada,T., Ohtani,T., Yoshida,Y., Shirogane,T., Nishida,K., Nakajima,K., Hibi,M., and Hirano,T. (1998). STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *EMBO J.* 17, 6670-6677.
- Gabor,M.J., Godfrey,D.I., and Scollay,R. (1997). Recent thymic emigrants are distinct from most medullary thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 27, 2010-2015.
- Gapin,L., Matsuda,J.L., Surh,C.D., and Kronenberg,M. (2001). NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat. Immunol.* 2, 971-978.
- Geenen,V., Poulin,J.F., Dion,M.L., Martens,H., Castermans,E., Hansenne,I., Moutschen,M., Sekaly,R.P., and Cheynier,R. (2003). Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. *J. Endocrinol.* 176, 305-311.
- Geiger,H. and Van Zant,G. (2002). The aging of lympho-hematopoietic stem cells. *Nat. Immunol.* 3, 329-333.
- George,A.J. and Ritter,M.A. (1996). Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol. Today* 17, 267-272.
- Gill,J., Malin,M., Hollander,G.A., and Boyd,R. (2002). Generation of a complete thymic microenvironment by MTS24(+) thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* 3, 635-642.
- Godfrey,D.I., Kennedy,J., Suda,T., and Zlotnik,A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol.* 150, 4244-4252.
- Goldrath,A.W. and Bevan,M.J. (1999a). Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity.* 11, 183-190.
- Goldrath,A.W. and Bevan,M.J. (1999b). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, 255-262.
- Goldrath,A.W., Luckey,C.J., Park,R., Benoist,C., and Mathis,D. (2004). The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 16885-16890.
- Goldschneider,I., Komschlies,K.L., and Greiner,D.L. (1986). Studies of thymocytopoiesis in rats and mice. I. Kinetics of appearance of thymocytes using a direct intrathymic adoptive transfer assay for thymocyte precursors. *J. Exp. Med.* 163, 1-17.

Gordon,J., Wilson,V.A., Blair,N.F., Sheridan,J., Farley,A., Wilson,L., Manley,N.R., and Blackburn,C.C. (2004). Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat. Immunol.* 5, 546-553.

Gounari,F., Aifantis,I., Khazaie,K., Hoeflinger,S., Harada,N., Taketo,M.M., and von Boehmer,H. (2001). Somatic activation of beta-catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development. *Nat. Immunol.* 2, 863-869.

Graziano,M., St Pierre,Y., Beauchemin,C., Desrosiers,M., and Potworowski,E.F. (1998). The fate of thymocytes labeled in vivo with CFSE. *Exp. Cell Res.* 240, 75-85.

Guy-Grand,D., Azogui,O., Celli,S., Darche,S., Nussenzweig,M.C., Kourilsky,P., and Vassalli,P. (2003). Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J. Exp. Med.* 197, 333-341.

Guy-Grand,D. and Vassalli,P. (2002). Gut intraepithelial lymphocyte development. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 255-259.

Habas,R., Kato,Y., and He,X. (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* 107, 843-854.

Han,H., Tanigaki,K., Yamamoto,N., Kuroda,K., Yoshimoto,M., Nakahata,T., Ikuta,K., and Honjo,T. (2002). Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int. Immunol.* 14, 637-645.

Harman,B.C., Jenkinson,E.J., and Anderson,G. (2003). Microenvironmental regulation of Notch signalling in T cell development. *Semin. Immunol.* 15, 91-97.

Hattori,N., Kawamoto,H., Fujimoto,S., Kuno,K., and Katsura,Y. (1996). Involvement of transcription factors TCF-1 and GATA-3 in the initiation of the earliest step of T cell development in the thymus. *J. Exp. Med.* 184, 1137-1147.

Haynes,B.F., Markert,M.L., Sempowski,G.D., Patel,D.D., and Hale,L.P. (2000). The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 529-560.

Hazenberg,M.D., Hamann,D., Schuitemaker,H., and Miedema,F. (2000a). T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4<sup>+</sup> T cells go out of stock. *Nature Immunol.* 1, 285-289.

Hazenberg,M.D., Otto,S.A., Cohen Stuart,J.W., Verschuren,M.C., Borleffs,J.C., Boucher,C.A., Coutinho,R.A., Lange,J.M., Rinke de Wit,T.F., Tsegaye,A., van Dongen,J.J., Hamann,D., de Boer,R.J., and Miedema,F. (2000b). Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat. Med.* 6, 1036-1042.

- Hazenbergh, M.D., Verschuren, M.C., Hamann, D., Miedema, F., and van Dongen, J.J. (2001). T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J. Mol. Med.* *79*, 631-640.
- Heath, V.L., Moore, N.C., Parnell, S.M., and Mason, D.W. (1998). Intrathymic expression of genes involved in organ specific autoimmune disease. *J. Autoimmun.* *11*, 309-318.
- Hirokawa, K., Kubo, S., Utsuyama, M., Kurashima, C., and Sado, T. (1986). Age-related change in the potential of bone marrow cells to repopulate the thymus and splenic T cells in mice. *Cell Immunol.* *100*, 443-451.
- Hirokawa, K. and Makinodan, T. (1975). Thymic involution: effect on T cell differentiation. *J. Immunol.* *114*, 1659-1664.
- Hirokawa, K., Utsuyama, M., Kasai, M., Kurashima, C., Ishijima, S., and Zeng, Y.X. (1994). Understanding the mechanism of the age-change of thymic function to promote T cell differentiation. *Immunol. Lett.* *40*, 269-277.
- Hodes, R.J., Sharrow, S.O., and Solomon, A. (1989). Failure of T cell receptor V beta negative selection in an athymic environment. *Science* *246*, 1041-1044.
- Hoffmann, M.W., Allison, J., and Miller, J.F. (1992). Tolerance induction by thymic medullary epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 2526-2530.
- Hoffmann, M.W., Heath, W.R., Ruschmeyer, D., and Miller, J.F. (1995). Deletion of high-avidity T cells by thymic epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 9851-9855.
- Hollander, G.A., Wang, B., Nichogiannopoulou, A., Platenburg, P.P., van Ewijk, W., Burakoff, S.J., Gutierrez-Ramos, J.C., and Terhorst, C. (1995). Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature* *373*, 350-353.
- Hsu, W., Shakya, R., and Costantini, F. (2001). Impaired mammary gland and lymphoid development caused by inducible expression of Axin in transgenic mice. *J. Cell Biol.* *155*, 1055-1064.
- Huesmann, M., Scott, B., Kisielow, P., and von Boehmer, H. (1991). Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell* *66*, 533-540.
- Hugo, P., Kappler, J.W., Godfrey, D.I., and Murrack, P.C. (1992). A cell line that can induce thymocyte positive selection. *Nature* *360*, 679-682.
- Hugo, P., Kappler, J.W., and Murrack, P.C. (1993a). Positive selection of TcR alpha beta thymocytes: is cortical thymic epithelium an obligatory participant in the

presentation of major histocompatibility complex protein? *Immunol. Rev.* 135, 133-155.

Hugo,P., Kappler,J.W., McCormack,J.E., and Marrack,P. (1993b). Fibroblasts can induce thymocyte positive selection in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10335-10339.

Ichihara,M., Hara,T., Kim,H., Murate,T., and Miyajima,A. (1997). Oncostatin M and leukemia inhibitory factor do not use the same functional receptor in mice. *Blood* 90, 165-173.

Ioannidis,V., Beermann,F., Clevers,H., and Held,W. (2001). The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nat. Immunol.* 2, 691-697.

Itoi,M., Kawamoto,H., Katsura,Y., and Amagai,T. (2001). Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitors into the early thymus anlage. *Int. Immunol.* 13, 1203-1211.

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

Jeffery,E., Price,V., and Gearing,D.P. (1993). Close proximity of the genes for leukemia inhibitory factor and oncostatin M. *Cytokine* 5, 107-111.

Jenkinson,E.J., Anderson,G., and Owen,J.J. (1992). Studies on T cell maturation on defined thymic stromal cell populations in vitro. *J. Exp. Med.* 176, 845-853.

Kawachi,Y., Watanabe,H., Moroda,T., Haga,M., Iiai,T., Hatakeyama,K., and Abo,T. (1995). Self-reactive T cell clones in a restricted population of interleukin-2 receptor beta+ cells expressing intermediate levels of the T cell receptor in the liver and other immune organs. *Eur. J. Immunol.* 25, 2272-2278.

Kawamata,S., Du,C., Li,K., and Lavau,C. (2002). Overexpression of the Notch target genes Hes in vivo induces lymphoid and myeloid alterations. *Oncogene* 21, 3855-3863.

Kieper,W.C. and Jameson,S.C. (1999). Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13306-13311.

Kisielow,P., Teh,H.S., Bluthmann,H., and von Boehmer,H. (1988). Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335, 730-733.

Kispert,A., Vainio,S., and McMahon,A.P. (1998). Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* 125, 4225-4234.

- Klein,L. and Kyewski,B. (2000). Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 179-186.
- Klug,D.B., Carter,C., Gimenez-Conti,I.B., and Richie,E.R. (2002). Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. *J. Immunol.* *169*, 2842-2845.
- Kondo,M., Weissman,I.L., and Akashi,K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* *91*, 661-672.
- Kong,F.K., Chen,C.L., Six,A., Hockett,R.D., and Cooper,M.D. (1999). T cell receptor gene deletion circles identify recent thymic emigrants in the peripheral T cell pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 1536-1540.
- Korzus,E., Nagase,H., Rydell,R., and Travis,J. (1997). The mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT signaling pathways are required for an oncostatin M-responsive element-mediated activation of matrix metalloproteinase 1 gene expression. *J. Biol. Chem.* *272*, 1188-1196.
- La Gruta,N.L., Driehl,I.R., and Gleeson,P.A. (2000). Peripheral T cell expansion in lymphopenic mice results in a restricted T cell repertoire. *Eur. J. Immunol.* *30*, 3380-3386.
- Laufer,T.M., DeKoning,J., Markowitz,J.S., Lo,D., and Glimcher,L.H. (1996). Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* *383*, 81-85.
- Le Douarin,N.M. and Jotereau,F.V. (1975). Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J. Exp. Med.* *142*, 17-40.
- Lefrancois,L. (1991). Extrathymic differentiation of intraepithelial lymphocytes: generation of a separate and unequal T-cell repertoire? *Immunol. Today* *12*, 436-438.
- Lindberg,R.A., Juan,T.S., Welcher,A.A., Sun,Y., Cupples,R., Guthrie,B., and Fletcher,F.A. (1998). Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M. *Mol. Cell Biol.* *18*, 3357-3367.
- Linton,P.J. and Dorshkind,K. (2004). Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.* *5*, 133-139.
- Louis,I., Dulude,G., Corneau,S., Brochu,S., Boileau,C., Meunier,C., Cote,C., Labrecque,N., and Perreault,C. (2003). Changes in the lymph node microenvironment induced by oncostatin M. *Blood* *102*, 1397-1404.
- Mackall,C.L., Granger,L., Sheard,M.A., Cepeda,R., and Gress,R.E. (1993). T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* *82*, 2585-2594.

- Mackall,C.L. and Gress,R.E. (1997). Thymic aging and T-cell regeneration. *Immunol. Rev.* 160, 91-102.
- Mackall,C.L., Hakim,F.T., and Gress,R.E. (1997). T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunol. Today* 18, 245-251.
- Mackall,C.L., Punt,J.A., Morgan,P., Farr,A.G., and Gress,R.E. (1998). Thymic function in young/old chimeras: substantial thymic T cell regenerative capacity despite irreversible age-associated thymic involution. *Eur. J. Immunol.* 28, 1886-1893.
- Mackarechtschian,K., Hardin,J.D., Moore,K.A., Boast,S., Goff,S.P., and Lemischka,I.R. (1995). Targeted disruption of the *flk2/flt3* gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity.* 3, 147-161.
- Malik,N., Kallestad,J.C., Gunderson,N.L., Austin,S.D., Neubauer,M.G., Ochs,V., Marquardt,H., Zarling,J.M., Shoyab,M., Wei,C.M., and . (1989). Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol. Cell Biol.* 9, 2847-2853.
- Martin,C.H., Aifantis,I., Scimone,M.L., von Andrian,U.H., Reizis,B., von Boehmer,H., and Gounari,F. (2003). Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. *Nat. Immunol.* 4, 866-873.
- Martinic,M.M., Rulicke,T., Althage,A., Odermatt,B., Hochli,M., Lamarre,A., Dumrese,T., Speiser,D.E., Kyburz,D., Hengartner,H., and Zinkernagel,R.M. (2003). Efficient T cell repertoire selection in tetraparental chimeric mice independent of thymic epithelial MHC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 1861-1866.
- Matzinger,P. and Guerder,S. (1989). Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* 338, 74-76.
- Maurice,M.M., Gould,D.S., Carroll,J., Vugmeyster,Y., and Ploegh,H.L. (2001). Positive selection of an MHC class-I restricted TCR in the absence of classical MHC class I molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 7437-7442.
- McGargill,M.A., Derbinski,J.M., and Hogquist,K.A. (2000). Receptor editing in developing T cells. *Nat. Immunol.* 1, 336-341.
- Merkenschlager,M. (1996). Tracing interactions of thymocytes with individual stromal cell partners. *Eur. J. Immunol.* 26, 892-896.
- Merkenschlager,M., Benoist,C., and Mathis,D. (1994). Evidence for a single-niche model of positive selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 11694-11698.
- Metcalf,D. (1965). Multiple thymus grafts in aged mice. *Nature* 208, 87-88.

- Michie,A.M. and Zuniga-Pflucker,J.C. (2002). Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. *Semin. Immunol.* *14*, 311-323.
- Miller,J.F. (1961). Immunological function of the thymus. *Lancet* *2*, 748-749.
- Miller,J.F. (1965). Effect of thymectomy in adult mice on immunological responsiveness. *Nature* *208*, 1337-1338.
- Miller,J.F. (2002a). The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunol. Rev.* *185*, 7-14.
- Miller,J.R. (2002b). The Wnts. *Genome Biol.* *3*, REVIEWS3001.
- Mombaerts,P., Iacomini,J., Johnson,R.S., Herrup,K., Tonegawa,S., and Papaioannou,V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* *68*, 869-877.
- Montecino-Rodriguez,E., Clark,R., and Dorshkind,K. (1998). Effects of insulin-like growth factor administration and bone marrow transplantation on thymopoiesis in aged mice. *Endocrinology* *139*, 4120-4126.
- Moore,N.C., Anderson,G., Smith,C.A., Owen,J.J., and Jenkinson,E.J. (1993). Analysis of cytokine gene expression in subpopulations of freshly isolated thymocytes and thymic stromal cells using semiquantitative polymerase chain reaction. *Eur. J. Immunol.* *23*, 922-927.
- Moore,T.A. and Zlotnik,A. (1997). Differential effects of Flk-2/Flt-3 ligand and stem cell factor on murine thymic progenitor cells. *J. Immunol.* *158*, 4187-4192.
- Mukouyama,Y., Hara,T., Xu,M., Tamura,K., Donovan,P.J., Kim,H., Kogo,H., Tsuji,K., Nakahata,T., and Miyajima,A. (1998). In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity*. *8*, 105-114.
- Mulroy,T., McMahon,J.A., Burakoff,S.J., McMahon,A.P., and Sen,J. (2002). Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur. J. Immunol.* *32*, 967-971.
- Murosaki,S., Yoshikai,Y., Ishida,A., Nakamura,T., Matsuzaki,G., Takimoto,H., Yuuki,H., and Nomoto,K. (1991). Failure of T cell receptor V beta negative selection in murine intestinal intra-epithelial lymphocytes. *Int. Immunol.* *3*, 1005-1013.
- Murphy,K.M., Heimberger,A.B., and Loh,D.Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science* *250*, 1720-1723.
- Nakayama,T., Singer,A., Hsi,E.D., and Samelson,L.E. (1989). Intrathymic signalling in immature CD4+CD8+ thymocytes results in tyrosine phosphorylation of the T-cell receptor zeta chain. *Nature* *341*, 651-654.

- Napolitano,L.A., Lo,J.C., Gotway,M.B., Mulligan,K., Barbour,J.D., Schmidt,D., Grant,R.M., Halvorsen,R.A., Schambelan,M., and McCune,J.M. (2002). Increased thymic mass and circulating naive CD4 T cells in HIV-1-infected adults treated with growth hormone. *AIDS* 16, 1103-1111.
- Nehls,M., Pfeifer,D., Schorpp,M., Hedrich,H., and Boehm,T. (1994). New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* 372, 103-107.
- Nutt,S.L., Vambrie,S., Steinlein,P., Kozmik,Z., Rolink,A., Weith,A., and Busslinger,M. (1999). Independent regulation of the two Pax5 alleles during B-cell development. *Nat. Genet.* 21, 390-395.
- Ohashi,P.S., Pircher,H., Burki,K., Zinkernagel,R.M., and Hengartner,H. (1990). Distinct sequence of negative or positive selection implied by thymocyte T-cell receptor densities. *Nature* 346, 861-863.
- Okamura,R.M., Sigvardsson,M., Galceran,J., Verbeek,S., Clevers,H., and Grosschedl,R. (1998). Redundant regulation of T cell differentiation and TCRalpha gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity.* 8, 11-20.
- Ortman,C.L., Dittmar,K.A., Witte,P.L., and Le,P.T. (2002). Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *Int. Immunol.* 14, 813-822.
- Palmer,E. (2003). Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 383-391.
- Pawlowski,T., Elliott,J.D., Loh,D.Y., and Staerz,U.D. (1993). Positive selection of T lymphocytes on fibroblasts. *Nature* 364, 642-645.
- Penit,C., Lucas,B., and Vasseur,F. (1995). Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J. Immunol.* 154, 5103-5113.
- Perarnau,B., Saron,M.F., San Martin,B.R., Bervas,N., Ong,H., Soloski,M.J., Smith,A.G., Ure,J.M., Gairin,J.E., and Lemonnier,F.A. (1999). Single H2Kb, H2Db and double H2KbDb knockout mice: peripheral CD8+ T cell repertoire and anti-lymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses. *Eur. J. Immunol.* 29, 1243-1252.
- Peschon,J.J., Morrissey,P.J., Grabstein,K.H., Ramsdell,F.J., Maraskovsky,E., Gliniak,B.C., Park,L.S., Ziegler,S.F., Williams,D.E., and Ware,C.B. (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180, 1955-1960.



Peterson,P., Nagamine,K., Scott,H., Heino,M., Kudoh,J., Shimizu,N., Antonarakis,S.E., and Krohn,K.J. (1998). APECED: a monogenic autoimmune disease providing new clues to self-tolerance. *Immunol. Today* *19*, 384-386.

Petrie,H.T. (2002). Role of thymic organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production. *Immunol. Rev.* *189*, 8-19.

Pongracz,J., Hare,K., Harman,B., Anderson,G., and Jenkinson,E.J. (2003). Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. *Eur. J. Immunol.* *33*, 1949-1956.

Porritt,H.E., Rumfelt,L.L., Tabrizifard,S., Schmitt,T.M., Zuniga-Pflucker,J.C., and Petrie,H.T. (2004). Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity.* *20*, 735-745.

Poulin,J.F., Sylvestre,M., Champagne,P., Dion,M.L., Kettaf,N., Dumont,A., Lainesse,M., Fontaine,P., Roy,D.C., Perreault,C., Sekaly,R.P., and Cheynier,R. (2003). Evidence for adequate thymic function but impaired naive T-cell survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the absence of chronic graft-versus-host disease. *Blood* *102*, 4600-4607.

Poulin,J.F., Viswanathan,M.N., Harris,J.M., Komanduri,K.V., Wieder,E., Ringuette,N., Jenkins,M., McCune,J.M., and Sekaly,R.P. (1999). Direct evidence for thymic function in adult humans. *J. Exp. Med.* *190*, 479-486.

Poussier,P. and Julius,M. (1994). Thymus independent T cell development and selection in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 521-553.

Prockop,S.E. and Petrie,H.T. (2004). Regulation of thymus size by competition for stromal niches among early T cell progenitors. *J. Immunol.* *173*, 1604-1611.

Pui,J.C., Allman,D., Xu,L., DeRocco,S., Karnell,F.G., Bakkour,S., Lee,J.Y., Kadesch,T., Hardy,R.R., Aster,J.C., and Pear,W.S. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity.* *11*, 299-308.

Radtke,F., Wilson,A., Stark,G., Bauer,M., van Meerwijk,J., MacDonald,H.R., and Aguet,M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity.* *10*, 547-558.

Radtke,F., Wilson,A., Mancini,S.J., and MacDonald,H.R. (2004). Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.* *5*, 247-253.

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.

- Robey,E. (1999). Regulation of T cell fate by Notch. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 283-295.
- Robey,E., Chang,D., Itano,A., Cado,D., Alexander,H., Lans,D., Weinmaster,G., and Salmon,P. (1996). An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell* *87*, 483-492.
- Robey,E.A., Ramsdell,F., Kioussis,D., Sha,W., Loh,D., Axel,R., and Fowlkes,B.J. (1992). The level of CD8 expression can determine the outcome of thymic selection. *Cell* *69*, 1089-1096.
- Rocha,B., Dautigny,N., and Pereira,P. (1989). Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *Eur. J. Immunol.* *19*, 905-911.
- Rocha,B., Freitas,A.A., and Coutinho,A.A. (1983). Population dynamics of T lymphocytes. Renewal rate and expansion in the peripheral lymphoid organs. *J. Immunol.* *131*, 2158-2164.
- Rocha,B., von Boehmer,H., and Guy-Grand,D. (1992). Selection of intraepithelial lymphocytes with CD8 alpha/alpha co-receptors by self-antigen in the murine gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 5336-5340.
- Rodewald,H.R., Ogawa,M., Haller,C., Waskow,C., and DiSanto,J.P. (1997b). Prothymocyte expansion by c-kit and the common cytokine receptor gamma chain is essential for repertoire formation. *Immunity.* *6*, 265-272.
- Rodewald,H.R., Ogawa,M., Haller,C., Waskow,C., and DiSanto,J.P. (1997a). Prothymocyte expansion by c-kit and the common cytokine receptor gamma chain is essential for repertoire formation. *Immunity.* *6*, 265-272.
- Rose,T.M., Weiford,D.M., Gunderson,N.L., and Bruce,A.G. (1994). Oncostatin M (OSM) inhibits the differentiation of pluripotent embryonic stem cells in vitro. *Cytokine* *6*, 48-54.
- Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Shimizu,J., Yamazaki,S., Sakihama,T., Itoh,M., Kuniyasu,Y., Nomura,T., Toda,M., and Takahashi,T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* *182*, 18-32.
- Sato,N., Meijer,L., Skaltsounis,L., Greengard,P., and Brivanlou,A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* *10*, 55-63.

- Schilham, M.W., Wilson, A., Moerer, P., Benaissa-Trouw, B.J., Cumano, A., and Clevers, H.C. (1998). Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. *J. Immunol.* *161*, 3984-3991.
- Schmitt, T.M. and Zuniga-Pflucker, J.C. (2002). Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity.* *17*, 749-756.
- Schonrich, G., Momburg, F., Hammerling, G.J., and Arnold, B. (1992). Anergy induced by thymic medullary epithelium. *Eur. J. Immunol.* *22*, 1687-1691.
- Schwarz, B.A. and Bhandoola, A. (2004). Circulating hematopoietic progenitors with T lineage potential. *Nat. Immunol.* *5*, 953-960.
- Scollay, R., Smith, J., and Stauffer, V. (1986). Dynamics of early T cells: prothymocyte migration and proliferation in the adult mouse thymus. *Immunol. Rev.* *91*, 129-157.
- Scollay, R.G., Butcher, E.C., and Weissman, I.L. (1980). Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur. J. Immunol.* *10*, 210-218.
- Seki, S., Abo, T., Ohteki, T., Sugiura, K., and Kumagai, K. (1991). Unusual alpha beta-T cells expanded in autoimmune lpr mice are probably a counterpart of normal T cells in the liver. *J. Immunol.* *147*, 1214-1221.
- Sempowski, G.D., Hale, L.P., Sundy, J.S., Massey, J.M., Koup, R.A., Douek, D.C., Patel, D.D., and Haynes, B.F. (2000). Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. *J. Immunol.* *164*, 2180-2187.
- Shen, M.M., Skoda, R.C., Cardiff, R.D., Campos-Torres, J., Leder, P., and Ornitz, D.M. (1994). Expression of LIF in transgenic mice results in altered thymic epithelium and apparent interconversion of thymic and lymph node morphologies. *EMBO J.* *13*, 1375-1385.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* *68*, 855-867.
- Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G.J., and Scollay, R. (1990). The generation and fate of thymocytes. *Semin. Immunol.* *2*, 3-12.
- Sitnicka, E., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Buza-Vidas, N., Adolfsson, J., and Jacobsen, S.E. (2002). Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity.* *17*, 463-472.
- Sodora, D.L., Milush, J.M., Ware, F., Wozniakowski, A., Montgomery, L., McClure, H.M., Lackner, A.A., Marthas, M., Hirsch, V., Johnson, R.P., Douek, D.C., and

- Koup,R.A. (2002). Decreased levels of recent thymic emigrants in peripheral blood of simian immunodeficiency virus-infected macaques correlate with alterations within the thymus. *J. Virol.* 76, 9981-9990.
- Spain,L.M. and Berg,L.J. (1992). Developmental regulation of thymocyte susceptibility to deletion by "self"-peptide. *J. Exp. Med.* 176, 213-223.
- Spangrude,G.J. and Scollay,R. (1990). Differentiation of hematopoietic stem cells in irradiated mouse thymic lobes. Kinetics and phenotype of progeny. *J. Immunol.* 145, 3661-3668.
- Sprent,J. and Kishimoto,H. (2001). The thymus and central tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 356, 609-616.
- Staal,F.J. and Clevers,H.C. (2003). Wnt signaling in the thymus. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 204-208.
- Staal,F.J., Meeldijk,J., Moerer,P., Jay,P., van de Weerd,B.C., Vainio,S., Nolan,G.P., and Clevers,H. (2001). Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur. J. Immunol.* 31, 285-293.
- Staal,F.J., Weerkamp,F., Baert,M.R., van den Burg,C.M., van Noort,M., de Haas,E.F., and van Dongen,J.J. (2004). Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34+ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion. *J. Immunol.* 172, 1099-1108.
- Starr,T.K., Jameson,S.C., and Hogquist,K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 139-176.
- Steinmann,G.G., Klaus,B., and Muller-Hermelink,H.K. (1985). The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand. J. Immunol.* 22, 563-575.
- Su,D.M., Navarre,S., Oh,W.J., Condie,B.G., and Manley,N.R. (2003). A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat. Immunol.* 4, 1128-1135.
- Sudo,K., Ema,H., Morita,Y., and Nakauchi,H. (2000). Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 192, 1273-1280.
- Surh,C.D. and Sprent,J. (1994). T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372, 100-103.
- 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.

- Takeshita,S., Toda,M., and Yamagishi,H. (1989). Excision products of the T cell receptor gene support a progressive rearrangement model of the alpha/delta locus. *EMBO J.* 8, 3261-3270.
- Tanchot,C., Lemonnier,F.A., Perarnau,B., Freitas,A.A., and Rocha,B. (1997a). Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276, 2057-2062.
- Tanchot,C. and Rocha,B. (1995). The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8+ T cell pools. *Eur. J. Immunol.* 25, 2127-2136.
- Tanchot,C., Rosado,M.M., Agenes,F., Freitas,A.A., and Rocha,B. (1997b). Lymphocyte homeostasis. *Semin. Immunol.* 9, 331-337.
- Terra,R., Labrecque,N., and Perreault,C. (2002). Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules. *J. Immunol.* 169, 684-692.
- Ting,C.N., Olson,M.C., Barton,K.P., and Leiden,J.M. (1996). Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 384, 474-478.
- Tomita,K., Hattori,M., Nakamura,E., Nakanishi,S., Minato,N., and Kageyama,R. (1999). The bHLH gene *Hes1* is essential for expansion of early T cell precursors. *Genes Dev.* 13, 1203-1210.
- Urdahl,K.B., Sun,J.C., and Bevan,M.J. (2002). Positive selection of MHC class Ib-restricted CD8(+) T cells on hematopoietic cells. *Nat. Immunol.* 3, 772-779.
- van Meerwijk,J.P., Marguerat,S., and MacDonald,H.R. (1998). Homeostasis limits the development of mature CD8+ but not CD4+ thymocytes. *J. Immunol.* 160, 2730-2734.
- van Oers,N.S., Killeen,N., and Weiss,A. (1994). ZAP-70 is constitutively associated with tyrosine-phosphorylated TCR zeta in murine thymocytes and lymph node T cells. *Immunity.* 1, 675-685.
- Varas,A., Hager-Theodorides,A.L., Sacedon,R., Vicente,A., Zapata,A.G., and Crompton,T. (2003). The role of morphogens in T-cell development. *Trends Immunol.* 24, 197-206.
- Verbeek,S., Izon,D., Hofhuis,F., Robanus-Maandag,E., te,R.H., van de,W.M., Oosterwegel,M., Wilson,A., MacDonald,H.R., and Clevers,H. (1995). An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* 374, 70-74.
- von Boehmer,H., Bluethmann,H., Staerz,U., Steinmetz,M., and Kisielow,P. (1988). Developmental biology of T lymphocytes. Deletion of autoreactive T cells and impact of the alpha, beta receptor on the CD4/CD8 phenotype. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 546, 104-108.

- Vukmanovic,S., Grandea,A.G., III, Faas,S.J., Knowles,B.B., and Bevan,M.J. (1992). Positive selection of T-lymphocytes induced by intrathymic injection of a thymic epithelial cell line. *Nature* 359, 729-732.
- Wallace,P.M., MacMaster,J.F., Rouleau,K.A., Brown,T.J., Loy,J.K., Donaldson,K.L., and Wahl,A.F. (1999). Regulation of inflammatory responses by oncostatin M. *J. Immunol.* 162, 5547-5555.
- Washburn,T., Schweighoffer,E., Gridley,T., Chang,D., Fowlkes,B.J., Cado,D., and Robey,E. (1997). Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* 88, 833-843.
- Waskow,C., Paul,S., Haller,C., Gassmann,M., and Rodewald,H. (2002). Viable c-Kit(W/W) mutants reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity.* 17, 277-288.
- Webb,S.R. and Sprent,J. (1990). Tolerogenicity of thymic epithelium. *Eur. J. Immunol.* 20, 2525-2528.
- Wijelath,E.S., Carlsen,B., Cole,T., Chen,J., Kothari,S., and Hammond,W.P. (1997). Oncostatin M induces basic fibroblast growth factor expression in endothelial cells and promotes endothelial cell proliferation, migration and spindle morphology. *J. Cell Sci.* 110 ( Pt 7), 871-879.
- Wiles,M.V., Ruiz,P., and Imhof,B.A. (1992). Interleukin-7 expression during mouse thymus development. *Eur. J. Immunol.* 22, 1037-1042.
- Wilson,A., MacDonald,H.R., and Radtke,F. (2001). Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J. Exp. Med.* 194, 1003-1012.
- Witherden,D., van Oers,N., Waltzinger,C., Weiss,A., Benoist,C., and Mathis,D. (2000). Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* 191, 355-364.
- Wolfer,A., Wilson,A., Nemir,M., MacDonald,H.R., and Radtke,F. (2002). Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes. *Immunity.* 16, 869-879.
- Xu,Y., Banerjee,D., Huelsken,J., Birchmeier,W., and Sen,J.M. (2003). Deletion of beta-catenin impairs T cell development. *Nat. Immunol.* 4, 1177-1182.
- Yamada,H., Ninomiya,T., Hashimoto,A., Tamada,K., Takimoto,H., and Nomoto,K. (1998). Positive selection of extrathymically developed T cells by self-antigens. *J. Exp. Med.* 188, 779-784.

Yasutomo,K., Lucas,B., and Germain,R.N. (2000). TCR signaling for initiation and completion of thymocyte positive selection has distinct requirements for ligand quality and presenting cell type. *J. Immunol.* *165*, 3015-3022.

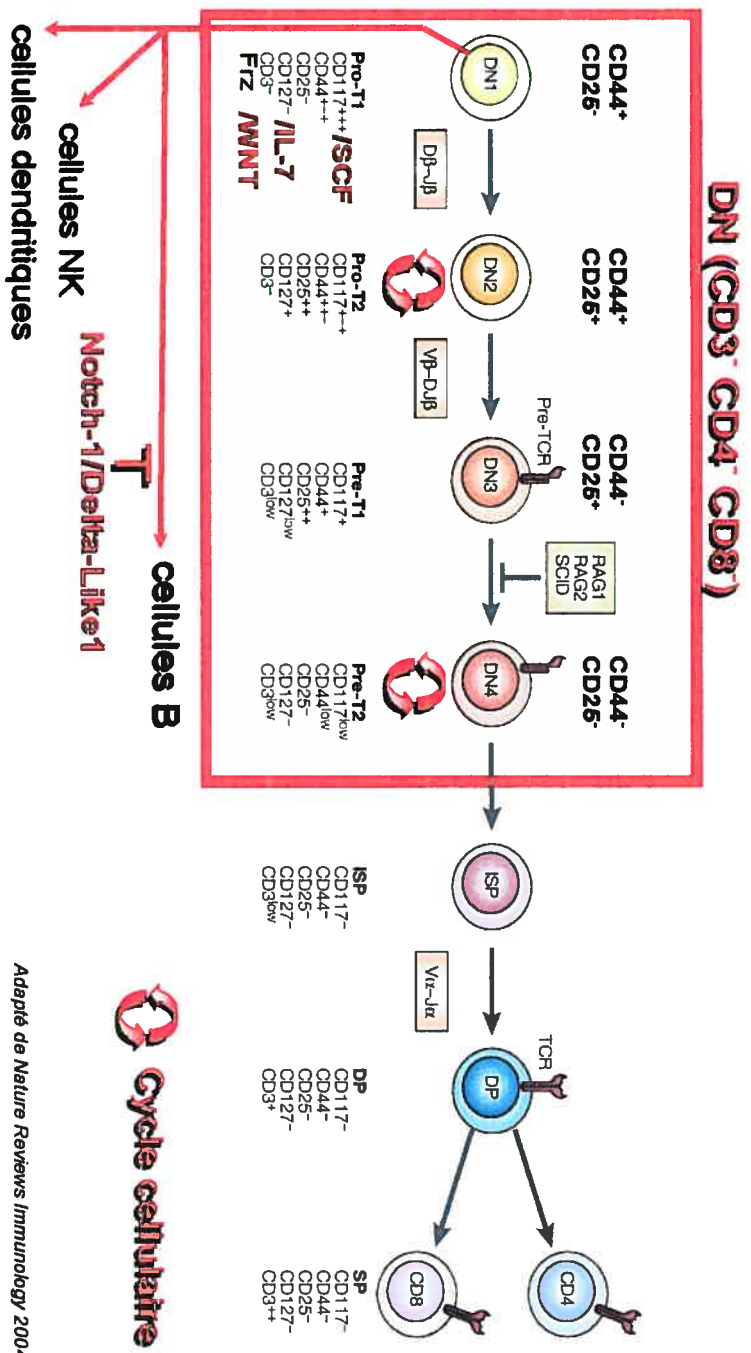
Yoshimura,A., Ichihara,M., Kinjyo,I., Moriyama,M., Copeland,N.G., Gilbert,D.J., Jenkins,N.A., Hara,T., and Miyajima,A. (1996). Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *EMBO J.* *15*, 1055-1063.

Yucel,R., Karsunky,H., Klein-Hitpass,L., and Moroy,T. (2003). The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit<sup>+</sup> T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *J. Exp. Med.* *197*, 831-844.

Zarling,J.M., Shoyab,M., Marquardt,H., Hanson,M.B., Lioubin,M.N., and Todaro,G.J. (1986). Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *83*, 9739-9743.

Zerrahn,J., Volkmann,A., Coles,M.C., Held,W., Lemonnier,F.A., and Raulet,D.H. (1999). Class I MHC molecules on hematopoietic cells can support intrathymic positive selection of T cell receptor transgenic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 11470-11475.

Zinkernagel,R.M. and Althage,A. (1999). On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 8092-8097.



Adapté de Nature Reviews Immunology 2004

FIGURE ANNEXE



**ABSTRACT**

Separation between primary and secondary lymphoid organs is a universal feature in jawed vertebrates. Strikingly, Oncostatin M (OM)-transgenic mice present massive extrathymic T cell development, localized exclusively in the lymph nodes (LN). According to the prevailing paradigm, the thymus is the main source of T lymphocytes in gnathostomes mainly because thymic epithelial cells have a unique ability to support early steps in T cell development. It is therefore remarkable that productive T cell development occurs in the OM<sup>+</sup> LN despite the absence of epithelial cells. The present report shows that in the OM<sup>+</sup> LN, (a) MHC class I expression strictly on hematopoietic cells is sufficient to support the development of a diversified repertoire of CD8 T cells, (b) the efficiency of positive selection of specific TCR transgenic T cells is not the same as in the thymus, (c) negative selection is very effective despite the lack of an organized thymic-like medulla. Furthermore, our data suggest that extrathymic T lymphocytes developing in the OM<sup>+</sup> LN undergo extensive post-selection expansion because they live in the microenvironment where they were positively selected. This work illustrates how the division of labor between primary and secondary lymphoid organs influences the repertoire and homeostasis of T lymphocytes.

The T cell repertoire is shaped by discrete central and peripheral events: positive and negative selection in the thymus and differential survival/expansion of post-thymic T cells in the secondary lymphoid organs (1,2). According to the strength of signal paradigm, thymocyte positive selection results from a weak TCR signal whereas no signal results in death by neglect and a strong signal results in negative selection (1,3). Studies in transplantation chimeras and *in vitro* thymus culture suggest that thymocytes are positively selected mainly on MHC-peptide complexes expressed by thymic cortical epithelial cells (4-6). Nevertheless, a small subset of T cells stands as an exception to this rule: CD1d-dependent NKT cells expressing a semi-invariant TCR composed of a V $_{\alpha}$ 14-J $_{\alpha}$ 18 rearrangement are positively selected on double-positive (DP) thymocytes rather than thymus epithelial cells (7). Furthermore, studies using relatively constrained models have shown that fibroblasts and hematopoietic cells can support positive selection of mainstream thymocytes when they were located in the thymus environment (8-11). Importantly, positive selection of T lymphocytes by hematopoietic cells is largely thymus-dependent since practically no T lymphocytes developed in athymic hosts (10,11).

In contrast to positive selection, thymocyte negative selection is initiated by strong TCR signals triggered by MHC-restricted interactions mainly with dendritic cells and to a lesser extent with thymic medullary epithelial cells (12,13). Although cortical epithelial cells can induce deletion of some thymocytes (14,15), this negative selection is probably limited to a subset of DP thymocytes that bind with high avidity to the most abundant self-peptides expressed by cortical epithelial cells (13,16-18). Teleologically,

one highly controversial issue with regard to the shaping of the T cell repertoire is whether there is any reason for the division of labor between discrete subsets of cortical and medullary stromal cells (13,19). In other terms, if the strength of the TCR signal dictates whether thymocytes will be positively or negatively selected, is there any advantage in positive and negative selection being induced mainly by interactions with cortical epithelial cells and medullary dendritic cells, respectively?

Following export from the thymus, naïve T cells require continued engagement by MHC molecules to survive in the periphery and for homeostatic expansion (1,20-22). Notably, T cells with different TCRs display major discrepancies in their ability to undergo homeostatic expansion (reviewed in 23). Thus, the T cell repertoire shaped in the thymus is subject to further molding in the peripheral lymphoid organs (2). The nature of the specific peptides involved in peripheral survival/expansion remains controversial. Some studies suggest that peptides involved in peripheral expansion may be identical to those that support intrathymic positive selection while other studies suggest that they are structurally different but share the same affinity or avidity (24-26). However, one indisputable point has unclear implications: the postselection T cell repertoire is anatomically secluded from the site where it has been positively selected. Because of the blood-thymus barrier, mature T lymphocytes never reenter the thymus cortex (27,28).

Two cytokines of the IL-6 family, leukemia inhibitory factor (LIF) and oncostatin M (OM) can cause thymic involution. *In vivo* administration of LIF and OM by i.p. injection to mice over 3 days is sufficient to induce profound thymic atrophy with loss of

cortical thymocytes (29). Accordingly, LIF- and OM-transgenic mice present a profound thymic atrophy (30,31). Unexpectedly however, LIF- and OM-transgenic mice were shown to develop massive extrathymic T cell development, localized exclusively in the LNs (30-32). Thus, abundant pT $\alpha$  transcripts are detectable in the LNs of OM-transgenic mice but not in their wild-type counterparts (32). Furthermore, about  $215 \times 10^6$  Thy1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells are present in the mesenteric LNs of 12-week-old OM-transgenic mice (31). Studies of adult thymectomized recipients of fetal liver grafts have shown that the lymphopoietic pathway modulated by OM is truly thymus-independent (31). The paracrine influence of OM is sufficient to induce T cell development in the LNs: non-transgenic fetal liver derived progenitors generate CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells as well as mature T cells in the LNs of non-transgenic recipients whereupon OM is supplied in a paracrine manner by co-injected OM-transgenic hematopoietic cells (31). The OM-dependent extrathymic pathway generates both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells which are diverse in terms of V $\beta$  usage and show a more rapid turnover rate (5-bromo-2'-deoxyuridine pulse-chase assays) than thymus-derived T lymphocytes in wild-type mice (31). Of note, the mature progeny (CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> and CD4<sup>-</sup>8<sup>+</sup> T cells) of the OM-dependent extrathymic pathway shares properties of classical mainstream T lymphocytes: i) CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> elements are NK1.1<sup>-</sup> (31), unlike NK1.1<sup>+</sup> T cells that are positively selected by interactions with hematopoietic cells in normal mice (33), ii) the CD8<sup>+</sup> T cells express  $\alpha\beta$  CD8 heterodimers (Terra R, unpublished observation), as opposed to CD8 $\alpha\alpha$  T cells which have been reported to differentiate extrathymically in the intestines and liver (34).

OM can transform the LN into a “primary” lymphoid organ whose ability to support T cell development and to seed peripheral compartments is similar to that of a normal thymus (31,32). This fact raises fundamental questions for two reasons. The OM<sup>+</sup> LN is devoid of thymic epithelial cells and DP T lymphocytes are admixed with single-positive (SP) T cells without any thymus-like cortico-medullary segregation (Louis, I. and Perreault, C., manuscript in preparation). Moreover, mature SP T cells such as those from the spleen readily recirculate from the blood to the OM<sup>+</sup> LN (31). We address two pressing issues. In the OM-conditioned LN, which cell type can replace thymic epithelial cells in supporting the positive selection of T cell progenitors? Do positive and negative selection in the LN follow the same rules as in the thymus and will the T cell repertoires generated in the thymus and the LN be similar? The need to investigate these queries is compelling for at least two reasons. The extrathymic T cell differentiation pathway that emerges following chronic exposure to OM has potential therapeutic interest for individuals with impaired thymus function. Moreover, because the OM<sup>+</sup>LN functions as a “primary and secondary” lymphoid organ, these studies should allow us to evaluate to which extent the canonical separation between primary and secondary lymphoid organs influences T lymphocyte development and homeostasis.

## MATERIALS AND METHODS

### *Mice*

C57BL/6J (B6), B10.D2-*H2<sup>d</sup>H2-T18<sup>c</sup>Hc<sup>l</sup>/nSnJ* (B10.D2), B6.SJL-*Ptprc<sup>a</sup>Pep3<sup>b</sup>/BoyJ* (Ly5<sup>a</sup>) (B6.SJL; Ly 5.1<sup>+</sup>), and MHC class I-deficient (B6.129-*B2m<sup>tml</sup>*) (35) mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). H-Y TCR transgenic mice [C57BL/10AiTac-*Rag<sup>tml</sup>*-TgN (TCRHY)N11]36 were obtained from Taconic Farms (Germantown, NY). 2C-TCR transgenic mice on a C57BL/6 background were from Dr. D. Y. Loh (Washington University School of Medicine, St-Louis) (37). OM-transgenic mice on a C57BL/6 background have been previously described (31,31,32). HY TCR/LckOM, 2C TCR/LckOM and LckOM  $\beta 2m^{-/-}$  transgenic mice were obtained by breeding heterozygous LckOM males with heterozygous HY TCR, 2C TCR and homozygous  $\beta 2m^{-/-}$  female mice, respectively. The genotype was confirmed by PCR assay using 200 ng of genomic tail DNA and the following primers: (LckOM 5' to 3': AGTCCCGTACTGCAGGAACA and GCTCACACCATTAAAGTGC), (HY TCR 5' to 3': GAGCCTCCAGTTTCTCCTCA and AAAGATGAGCTTCGCAGACC), (2C TCR 5' to 3': GTGACACAGCCCGATGCTCG and TCCAAATGTCAGCGCACTTG) and ( $\beta 2m^{-/-}$ , a mixture of three primers 5' to 3': (a) GCTATTCGGCTATGACTGGG, (b) TATCAGTCTCAGTGGGGGTG and (c) CTGAGCTCTGTTTTTCGTCTG). Mice were bred at the Guy-Bernier Research Center, maintained in autoclaved microisolator cages and provided with autoclaved food and water according to the standards of the Canadian Council on Animal Care.

### *Thymectomy and fetal liver cell transplantation*

At 4- to 5-weeks of age, mice were anesthetized by intraperitoneal (i. p.) injection of 75 mg/kg sodium pentobarbital (Somnotol, MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON, Canada), and the thymus was removed with a suction cannula introduced over the suprastrenal notch. Visual inspection at the time of sacrifice verified completeness of thymectomy in each animal. Cell transplantation was performed at least 2 weeks after surgery. Hemopoietic chimeras were created by intravenous injection of  $5 \times 10^6$  fetal liver cells, collected on day 13 postcoitum, into irradiated (12 Gy) recipients. MHC I<sup>+</sup> recipients of  $\beta_2m^{-/-}$  fetal liver cells were injected i. p. with 200  $\mu$ g of anti-NK1.1 Ab (PK136; Pharmingen, Mississauga, ON Canada) on day -2 and -1 to prevent NK cell mediated rejection of MHC class I-deficient donor cells (38). Chimeras were analyzed 80 to 90 days after transplantation.

### *Antibodies and flow cytometry*

For each sample,  $10^6$  cells were stained with antibodies and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer using CELLQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA). The following antibodies obtained from Pharmingen were used: PerCP anti-CD4 (RM4-5), APC anti-CD8 $\alpha$  (53-6.7), biotinylated anti-V $\beta$ 3 TCR (KJ25) detected with FITC-streptavidin, FITC anti-V $\beta$ 5.1,2 TCR (MR9-4), FITC anti-V $\beta$ 6 TCR (RR4-7), FITC anti-V $\beta$ 7 TCR (TR310), FITC anti-V $\beta$ 8.1,2 TCR (MR5-2), FITC anti-V $\beta$ 9 TCR (MR10-2),

FITC anti-V $\beta$ 10<sup>b</sup> TCR (B21.5), FITC anti-V $\beta$ 11 TCR( RR3-15), FITC anti-V $\beta$ 13 TCR (MR12-3), FITC anti-V $\beta$ 14 TCR (14-2), FITC anti-V $\beta$ 17<sup>a</sup> TCR (KJ23), FITC anti-Thy1.2, FITC anti-Ly5.1, FITC anti-Ly5.2, FITC anti-CD44 (IM7), FITC anti-CD122 (5H4), FITC anti-HSA, FITC anti-1B11(CD43), FITC anti-CD25, FITC and PE anti-CD62L (Mel-14), FITC anti-CD5 (53-7.3), FITC anti-TCR $\alpha/\beta$ , FITC and PE anti-CD3 $\epsilon$ , biotinylated anti-Ly5.2 detected with PE-streptavidin and PE anti-CD69. Rat IgG2a, $\kappa$  was used as control antibody. Anti-HY TCR (T3.70) and anti-2C TCR (1B2) mAb (kind gifts from Dr H.S. Teh and J. Wu, respectively) were detected with rat anti-mouse IgG1 PE.



## RESULTS

### *Positive Selection of CD8 T Lymphocytes in the OM-Conditioned LN*

We wished to determine whether extrathymic positive selection in the OM-conditioned LN is supported by hematopoietic or non-hematopoietic cells (that is, fibroblasts or endothelial cells). Our study of T cell differentiation used four types of hematopoietic chimeras in which adult-thymectomized lethally irradiated (12 Gy) Ly5-congenic recipients were transplanted with OM-transgenic fetal liver cells. Chimeras differed in that MHC class I expression was either i) normal (MHC I<sup>+</sup> → MHC I<sup>+</sup>); ii) deficient on both hematopoietic (donor-derived) and nonhematopoietic (recipient) cells ( $\beta_2m^{-/-}$  →  $\beta_2m^{-/-}$ ), or selectively deficient on either iii) hematopoietic ( $\beta_2m^{-/-}$  → MHC I<sup>+</sup>) or iv) nonhematopoietic (MHC I<sup>+</sup> →  $\beta_2m^{-/-}$ ) cells. While the first two groups served as positive and negative controls, the last two groups allowed us to estimate the role of nonhematopoietic versus hematopoietic cells in positive selection of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. OM-dependent extrathymic T cell development involves all LNs but is particularly massive in the mesenteric LNs. Thus, all analyses of LN cells in this work were performed on mesenteric LNs. As expected, positive selection of CD8 T cells was defective in ( $\beta_2m^{-/-}$  →  $\beta_2m^{-/-}$ ) chimeras (Fig. 1A, B). A key finding was that positive selection of CD8 T cells proceeded normally in (MHC I<sup>+</sup> →  $\beta_2m^{-/-}$ ) chimeras (Fig. 1A, B) and generated a TCR repertoire with a diversified V $\beta$  profile (Fig. 1C). Thus, expression of MHC I molecules on hematopoietic cells is sufficient for positive selection of OM<sup>+</sup> T cells. At face value, the presence of significant proportions of SP CD8 T cells in ( $\beta_2m^{-/-}$

→ MHC I<sup>+</sup>) chimeras suggested that nonhematopoietic cells can also support positive selection albeit with reduced efficiency (Fig. 1A, B). However, these results must be regarded as inconclusive because expression of Ly5.1 and Ly5.2 markers showed that 1 to 3% of LN hematopoietic cells were of recipient type (data not shown). Since residual host hematopoietic cells in the latter group were MHC I<sup>+</sup>, they could have supported positive selection of CD8 T cells.

#### *Extrathymic Differentiation of H-Y TCR Transgenic T lymphocytes*

To study the process of positive and negative selection during extrathymic T cell differentiation we analyzed T lymphocyte populations in single- (H-Y TCR) and double-transgenic (H-Y TCR and OM) male and female mice (Fig. 2, Tables I and II). These mice possessed a C57BL/6 background and were not RAG-deficient. Note that the fact that the OM<sup>+</sup> LN is both a primary and secondary lymphoid organ complicates the interpretation. In contrast to SP T cells in the thymus, SP T cells in the OM<sup>+</sup> LN are a combination of cells generated *in situ* admixed with recirculating T cells.

*Positive selection in female mice.* In single-transgenic (H-Y TCR) female mice the proportion of CD8 single-positive (SP) T cells expressing the H-Y TCR (T3.70<sup>+</sup>) was ~97% in the thymus and ~36% in the spleen (Fig. 2A). In addition, the CD8/CD4 ratio dropped from ~3 in the thymus to ~0.6 in the spleen. This is consistent with previous reports that in H2<sup>b</sup> female mice, T cells bearing the transgenic H-Y TCR are positively selected in the thymus but expand poorly in the periphery (39,40). In contrast, in double-

transgenic (H-Y TCR and OM) mice, the proportion of T3.70<sup>+</sup> cells among CD8 SP T cells was only ~25% in the LNs (the site where T cells develop) and ~6% in the spleen (Fig. 2B). When estimating the proportion of T3.70<sup>+</sup> cells among CD8 SP T cells in the OM<sup>+</sup> LN, one caveat is that the repertoire generated *in situ* is admixed with recirculating SP T cells. Nevertheless, the reduction in the proportion of T3.70<sup>+</sup> cells was also conspicuous in LN DP T cells of OM-transgenic mice, though less marked than at the SP stage (Fig. 2A versus 2B). Moreover, in contrast with that found in the thymus of single-transgenic mice, no T3.70<sup>hi</sup> cells were present among LN DP T cells from OM<sup>+</sup> mice (see inserts of Fig. 2A, B). In addition, when compared to the thymus, the OM<sup>+</sup> LN was unable to generate a “normal” pool size of CD8 T cells in secondary lymphoid organs. The number of T3.70<sup>+</sup> SP CD8 T cells in the spleen of double-transgenic female mice was decreased nine-fold relative to single-transgenic mice (Table I). These data indicate that in female mice, irrespective of their origin, H-Y TCR<sup>+</sup> T cells do not thrive well in secondary lymphoid organs: positive selection is poor in the OM-transgenic LN and T3.70<sup>+</sup> SP T cells of thymic or extrathymic origin do not expand well in the periphery. The phenotype of T3.70<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in the OM-transgenic LN also differed from that of their thymic-derived counterparts (Fig. 2A versus 2B). In the OM<sup>+</sup> LN only a small proportion of these cells were HSA<sup>+</sup> while the proportion of CD44<sup>hi</sup> and CD122<sup>+</sup> cells was much increased.

*Negative selection in male mice.* As previously reported (41), we confirmed that T3.70<sup>+</sup> T cells are negatively selected at the DP stage in the thymus of H2<sup>b</sup> male mice (Fig. 2C). The number of DP T cells and the ratio of CD8/CD4 T cells in the thymus are severely

decreased, and the expression of CD8 is decreased on SP T cells. Yet, consistent with observations by Rocha and von Boehmer (40), SP CD8<sup>lo</sup> H-Y TCR<sup>+</sup> T cells that escaped intra-thymic negative selection expanded well in the periphery where ~97% of CD8 T cells were T3.70<sup>+</sup>. In fact, the absolute numbers of spleen T3.70<sup>+</sup> CD8 T cells, greater in male than female mice (Table I), illustrates how extensively homeostatic expansion can remold the postselection repertoire. Similarly, the number of DP T cells was drastically decreased in the LN of OM<sup>+</sup> male mice, yet CD8<sup>lo</sup> SP T cells that escaped negative selection expanded well in the periphery (spleen) (Fig. 2D and Table I). Thus, negative selection of H-Y TCR<sup>+</sup> T cells takes place very efficiently in the LN of OM<sup>+</sup> mice. In comparison with T3.70<sup>+</sup> CD8 T cells originating from the thymus of single-transgenic female mice, those found in single- and double-transgenic male mice showed an upregulation of CD44 and CD122 and a paucity of HSA<sup>+</sup> cells. The latter findings were more marked in T cells of LN than those of thymus origin (Fig. 2C and 2D).

#### *Extrathymic Differentiation of 2C TCR Transgenic T lymphocytes*

During intrathymic development the 2C TCR is positively selected by H2K<sup>b</sup> and negatively selected by H2L<sup>d</sup> (42,43). To evaluate whether the development of 2C<sup>+</sup> T lymphocytes obeys the same rules in the LN as in the thymus, we analyzed T lymphocyte populations in single- (2C TCR) and double-transgenic (2C TCR and OM) H2<sup>b</sup> and H2<sup>b/d</sup> RAG-competent mice (Fig. 3, Tables I and II).

*Positive selection in  $H2^b$  mice.* In both the thymus of  $2C^+$  mice and the LN of  $2C^+OM^+$  mice, the majority of SP T lymphocytes were  $CD8^+$  of which practically all expressed the 2C TCR ( $1B2^+$ ) (Fig. 3). Hence, positive selection of  $2C^+$  T lymphocytes is very efficient in the  $OM^+$  LN, which is indeed at least as effective as the thymus in maintaining the size of the spleen  $CD8$  T cell compartment (Table I). Compared to the thymus, few  $1B2^+CD8^+$  T cells were  $HSA^+$  in the  $OM^+$  LN (Fig. 3), similar to our observations on  $T3.70^+$  T cells (Fig. 2). Yet,  $CD44$  and  $CD122$  activation markers were not upregulated on  $OM^+2C^+$  LN  $CD8$  T cells (Fig. 3B) as they were on  $OM^+H-Y$  TCR $^+$   $CD8$  T cells (Fig. 2B). We showed previously that development of non TCR-transgenic T cells in the  $OM^+$  LN was thymus independent (Fig. 1 and ref. 31). That this is also the case for 2C TCR transgenic T lymphocytes was revealed by analyses of T lymphocyte populations in irradiated adult-thymectomized  $Ly5.1^+$  recipients reconstituted with fetal liver cells from  $Ly5.2^+$  double-transgenic (2C TCR and OM) donors (Fig. 4). Our observation of efficient selection of  $2C^+$  T cells in these chimeras confirmed their thymic independent generation.

*Negative selection in  $H2^{b/d}$  mice.* T cells bearing 2C TCR were negatively selected in  $H2^{b/d}$  mice, both in the thymus of OM-nontransgenic mice and in the LN of  $OM^+$  mice. Indeed, in both cases, the proportion of  $CD4^+CD8^+$  and of SP  $CD8^+$  T lymphocytes was drastically decreased, and the percentage of  $CD8^+$  T cells which were  $1B2^+$  was significantly lower than in  $H2^b$  mice (Fig. 3C and 3D). Furthermore, the size of the spleen  $1B2^+$   $CD8$  T cells pool was drastically reduced in both single- and double-transgenic  $H2^{b/d}$  mice (Fig. 3C-D and Table I).

*Development of DN TCR-transgenic T cells*

Double chain  $\alpha\beta$ TCR transgenes expressed at the DN stage alter early ontogeny especially when affinity of the TCR for its ligand is strong, that is, conditions of negative selection. In this situation, increased numbers of DN cells are exported in the periphery. These  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  DN T cells have properties of  $\gamma\delta$  T cells and their development is MHC-independent (44-46). This prompted us to evaluate whether a similar expansion of  $\text{TCR}^+$  DN T cells was present in OM-transgenic mice. We indeed detected  $\text{TCR}^+$  DN T cells in  $\text{OM}^+$  mice. Some differences were observed between the numbers of  $\text{TCR}^+$  DN T cells in the thymus of  $\text{OM}^-$  mice vs. the LN of  $\text{OM}^+$  mice (Table I). However, it is difficult to speculate about the significance of these data because the LN of  $\text{OM}^+$  mice contains not only cells generated *in situ* but also recirculating cells. Nonetheless, comparing the numbers of H-Y and 2C  $\text{TCR}^+$  DN T cells in the spleen of  $\text{OM}^-$  and  $\text{OM}^+$  mice was more informative and allowed us to make three points (Table I). In both  $\text{OM}^+$  and  $\text{OM}^-$  mice, DN  $\text{TCR}^+$  T cells were more abundant when the mice expressed the nominal antigen recognized by the TCR (H-Y TCR male and 2C TCR  $\text{H2}^{\text{b/d}}$ ). This is consistent with previous reports in  $\text{OM}^-$  mice (44,45). In mice lacking the nominal antigen (H-Y TCR female and 2C TCR  $\text{H2}^{\text{b}}$ ) the number of splenic  $\text{TCR}^+$  DN T cells was greater for the 2C than the H-Y TCR. Finally, the number of splenic  $\text{TCR}^+$  DN T cells was of similar magnitude in  $\text{OM}^-$  and  $\text{OM}^+$  mice. Indeed, among the four groups of mice (H-Y TCR female and male, 2C TCR  $\text{H2}^{\text{b}}$  and  $\text{H2}^{\text{b/d}}$ ), numbers of  $\text{TCR}^+$  DN T cells in  $\text{OM}^+$  mice corresponded to 38-130% of those in  $\text{OM}^-$  mice. Thus, no dramatic differences were found in the  $\text{TCR}^+$  DN T cell development in  $\text{OM}^+$  relative to  $\text{OM}^-$  mice.

*CD5 expression on T lymphocytes of thymic versus extrathymic origin*

CD5 is a cell surface glycoprotein that functions as a negative regulator of TCR-mediated signalling (47). CD5 is upregulated at crucial points during thymocyte development by pre-TCR and TCR engagement and the level of CD5 surface expression is directly related to pre-TCR and TCR signaling intensity. Thus, CD5 surface levels were found to vary considerably among mature SP thymocytes and peripheral T cells that express distinct TCRs. The level of CD5 expression paralleled the avidity of the positively selecting TCR-MHC-ligand interaction (48,49). Our data imply that positive selection in the OM<sup>+</sup> LN is much more effective for lymphocytes bearing the 2C TCR than the H-Y TCR. Thus, by measuring CD5 expression, we sought to estimate the strength of the signals transmitted by these two types of TCR during thymic versus extrathymic development.

Expression of CD5 was decreased on DP and SP CD8 T3.70<sup>+</sup> T lymphocytes developing in the OM<sup>+</sup> LN relative to intrathymic T3.70<sup>+</sup> T cells (Fig. 5A). This is consistent with the idea that H-Y specific T cells receive TCR signals of lesser intensity in the periphery than in the thymus. Notably, low expression of CD5 was not a general characteristic of all T cells that matured in the OM<sup>+</sup> LN: T3.70-negative T cells present in the LNs of H-Y TCR<sup>+</sup>OM<sup>+</sup> female mice expressed high levels of CD5 (Fig. 5A). Following development in the thymus or in the OM<sup>+</sup> LN, DP and CD8 SP T cells bearing the 2C TCR expressed higher levels of CD5 than H-Y TCR<sup>+</sup> T cells. When compared

with thymic T lymphocytes, 2C TCR<sup>+</sup> T lymphocytes in the OM<sup>+</sup> LN expressed barely or substantially decreased levels of CD5 at the DP and the CD8 SP stage, respectively. In sum, two major findings emerged from evaluation of CD5 expression. First, in the OM<sup>+</sup> LN, expression of CD5 and presumably the strength of TCR signals, were greater on 2C TCR<sup>+</sup> than on H-Y TCR<sup>+</sup> T lymphocytes (Fig. 5C). Data on both the efficacy of positive selection (Fig. 2) and CD5 expression (Fig. 5) suggest that for T lymphocytes bearing the H-Y TCR, the efficacy of positive selection in the OM<sup>+</sup> LN is low because they receive only weak TCR signals. Second, T lymphocytes bearing the 2C or the H-Y TCR express lower levels of CD5 when they develop in the OM<sup>+</sup> LN than in the thymus.

*Expression of differentiation/activation markers by extrathymic T lymphocytes*

Naïve T lymphocytes do not normally recirculate into the thymus. Only a few activated/memory T cells in the S phase of the cell cycle re-enter the thymus medulla (but not the cortex) at time of infection (28,50). In the LNs of OM-transgenic mice however, SP T lymphocytes live in the environment where their differentiation/selection took place. Thus, one fundamental difference between T lymphocytes developing in the thymus versus the OM<sup>+</sup> LN is that in the latter case, the post-selection T cell compartment is steadily confronted with the very cells that induced positive selection.

The phenotype of DP T cells found in the OM<sup>+</sup> LN was similar to that of DP thymocytes of wild type mice concerning expression of HSA, CD3, CD4, CD5, CD8 and CD44 (Fig. 6A). When compared to wild type thymocytes, SP T cells in the OM<sup>+</sup> LN



showed several distinctive features: expression of CD3 was decreased while that of CD44 was upregulated, few CD4 or CD8 cells were HSA<sup>+</sup> and few CD8 cells were CD69<sup>+</sup> (Fig. 6A). In addition, the intensity of CD5 staining was not decreased on polyclonal populations of CD4 and CD8 T lymphocytes found in the OM<sup>+</sup> LN (Fig. 6A) as it was on transgenic T cells bearing the HY and 2C TCR (Fig. 5). In fact, the mean CD5 labeling intensity was increased on CD8 SP T cells, being ~151 in the OM<sup>+</sup> LN and ~118 in the wild-type thymus (Fig. 6A).

The CD44<sup>hi</sup> phenotype of SP T cells in the OM<sup>+</sup> LN, confirmation of a previous report (31), suggests previous TCR interaction with heretofore unidentified ligands. This concept was supported by the fact that spleen SP T cells in OM<sup>+</sup> mice showed other features typical of previous antigen encounter: i) CD122 expression was strikingly increased on CD8 T cells and ii) CD4 T cells showed decreased levels of CD62L and upregulation of CD69 and of O-glycans recognized by 1B11 antibody (Fig. 6B).

All these results indicate that two inferences are possible regarding extrathymic T lymphocytes that develop in the OM<sup>+</sup> LN. First, SP T cells steadily confronted with cells that display the MHC-peptide mixture that was instrumental in their positive selection have a phenotype similar to that of T lymphocytes undergoing homeostatic expansion (24,51). Second, the intensity of TCR signals (CD5 levels) received during the DP → SP transition are normal (CD4) to high (CD8) even though CD3 levels (and those of  $\alpha\beta$ TCR, not shown) of SP T cells are relatively low. Decreased CD3 expression could represent a compensatory mechanism either to decrease the strength of the TCR signal at the time of

selection or to dampen the ongoing stimulation of post-selection SP T lymphocytes by self epitopes.

## DISCUSSION

The present study shows that notwithstanding the lack of both thymic epithelial cells and a thymus like cortico-medullary partition, the OM<sup>+</sup> LN is able to support positive and negative selection of T lymphocytes. Interestingly, seminal experiments from Scollay's lab have demonstrated that i) when CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> thymocytes harvested from the thymus of fetal or adult donors are injected intravenously into irradiated athymic recipients, some of these cells lodge in lymph nodes and develop into both DP and SP T lymphocytes, ii) this process does not occur in the spleen, iii) no T cell development is found in the LN when fetal liver cells rather than CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> thymocytes are injected (52). Accordingly, what prevents the normal LN from sustaining T cell development must be its failure either to attract T cell progenitors or to support some early event at the CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> stage. Otherwise, the LN would be able to support differentiation events downstream of this early step (productive seeding). How can OM transform the LN into a primary T lymphoid organ that can positively select a diversified repertoire of T lymphocytes? This challenging question has yet to be answered. A plausible hypothesis at this point is that the crucial effect of OM is to induce productive seeding of the LN by immature T cell progenitors, the same early limiting event delineated by Antica and Scollay (49).

### *Positive selection*

One salient finding emerging from our experiments in hematopoietic chimeras is that MHC I<sup>+</sup> hematopoietic cells were sufficient to support positive selection of a polyclonal

repertoire of extrathymic CD8 T cells (Fig. 1). It has been shown that hematopoietic cells can support intrathymic positive selection though, with the exception of CD1d-dependent NKT cells, the importance of intrathymic positive selection by hematopoietic cells (as opposed to epithelial cells) is still a matter of debate (10,11). Clearly however, extrathymic hematopoietic cells do not normally support any significant level of T cell positive selection (10,11). That OM allows LN hematopoietic cells to induce positive selection of developing T lymphocytes is remarkable.

Positive selection did not proceed in the same fashion in the thymus and the OM<sup>+</sup> LN, at least for CD8 SP T cells. Indeed, taking CD5 expression as a surrogate marker for the avidity of the positively selecting TCR-MHC-ligand interactions we found a discrepancy between T cells bearing a transgenic TCR versus polyclonal T cells (Fig. 5 and Fig. 6). CD8 SP T lymphocytes bearing the 2C or the H-Y TCR expressed lower levels of CD5 when they developed in the OM<sup>+</sup> LN than in the thymus (Fig. 5). In contrast, in the case of non TCR transgenic polyclonal CD8 SP T cells, the CD5 staining intensity was superior for those developing in the OM<sup>+</sup> LN than in the thymus (Fig. 5 and 6). In general, there is no reason why the OM<sup>+</sup> LN would select polyclonal T cells more efficiently than TCR transgenic T cells. The most straightforward explanation is that expression of relevant MHC-peptide complexes by cells supporting positive selection dictates the efficacy of positive selection and that the MHC-peptide complexes that positively select the H-Y and 2C TCR are less abundant in the LN than in the thymus cortex. Yet, other MHC-peptide ligands expressed in the LN do generate TCR signals of optimal quality for proper positive selection of a diverse repertoire. Thus, the inference is

that positive selection is supported by different sets of MHC-peptide complexes in the thymus versus the LN and that the two post-selection repertoires are different even though they may overlap. We also note that when T cells develop in a thymus where MHC class I expression is limited to hematopoietic cells, 2C<sup>+</sup> but not H-Y TCR<sup>+</sup> CD8 T cells, are positively selected (10,11). This observation also supports the concept that epithelial cells and hematopoietic cells express different sets of MHC I-associated peptides and that the peptide mixture of hematopoietic cells better supports selection of 2C than H-Y TCR<sup>+</sup> T cells.

### *Negative selection*

Negative selection of extrathymic T lymphocytes bearing the H-Y or 2C TCR was very effective in the OM<sup>+</sup> LN (Fig. 2 and 3). If anything, depletion of H-Y TCR<sup>+</sup> DP T cells was more drastic in the OM<sup>+</sup> LN than in the thymus (Fig. 2). This finding provides proof of principle for the concept that negative selection does not require a dedicated antigen presenting cell (APC) (53). While thymus stromal cells have a unique ability to promote positive selection, their capacity to induce negative selection is shared by peripheral APCs. Put simply, negative selection occurs in the thymus because immature T lymphocytes are produced there. It could possibly occur in any organ, though it may require a certain abundance of hematopoietic APCs. We note that following negative selection, the fate of CD8 T cells bearing the 2C and the H-Y TCR were different. Irrespective of their thymic or extrathymic origin, the few H-Y TCR<sup>+</sup> T cells that escaped negative selection (in male mice) expanded considerably in the periphery whereas 2C

TCR<sup>+</sup> T cells did not (in H2<sup>b/d</sup> mice) (Table I). This demonstrates how extensively peripheral homeostatic mechanisms can remold the postselection repertoire by inducing a major expansion of T cells specific for some but not all self epitopes.

*The activated/memory phenotype of extrathymic T cells*

One salient characteristic of SP extrathymic T lymphocytes that developed under the influence of OM is their phenotype which is typical of antigen-experienced or “memory” T lymphocytes (Fig. 6). This idea fits well with our previous reports using *in vivo* 5-bromodeoxyuridine (BrdU) pulse-chase experiments in (non TCR-transgenic) LckOM mice: their extrathymic T cells proliferate very rapidly and have a high turnover rate (31), as would be expected for T cells with a “memory” phenotype (54). However, BrdU labeling experiments have not been performed in TCR-transgenic OM<sup>+</sup> mice. Therefore, we could not formally evaluate the peripheral survival and expansion of T cells bearing the H-Y and 2C TCR in OM<sup>+</sup> mice. Interestingly, while the vast majority of our extrathymic T cells displayed a memory phenotype (Fig. 2 and 6), we observed one noticeable exception: most extrathymic CD8 T cells bearing the 2C TCR had a naïve phenotype (Fig. 3). This means that acquisition of the memory phenotype was not a direct consequence of exposure to OM, but was dependent on the TCR clonotype. Collectively, these data suggest that, with a few possible exceptions (e.g., the 2C TCR), extrathymic T cells in the OM<sup>+</sup> LN have a memory phenotype and a high turnover rate because they undergo homeostatic expansion induced by chronic exposure to the LN MHC/peptide mixture that entailed their positive selection. That being the case, we recently observed

that SP T cells derived from the OM<sup>+</sup> LN behave functionally like memory T cells following *in vitro* and *in vivo* antigen priming (Blais, M.E., Gérard, G., Perreault, C., manuscript in preparation). Nevertheless, that most 2C<sup>+</sup> T cells in OM<sup>+</sup> mice did not display an activated phenotype was surprising since 2C T cells can undergo homeostatic peripheral expansion (24). One explanation would be that the OM<sup>+</sup> LN produces enough 2C<sup>+</sup> T cells to fill peripheral niches without the need for peripheral expansion.

Aside from their memory phenotype, it is remarkable that the vast majority of extrathymic SP LN T lymphocytes were HSA<sup>lo</sup> (Fig. 6). To some extent, this is because the OM<sup>+</sup> LN contains recirculating T cells in addition to T cells generated *in situ* (31). Interestingly, in the thymus of wild-type mice, the CD44<sup>hi</sup> HSA<sup>lo</sup> phenotype is shared by the single subset of thymocyte positively selected on hematopoietic cells:  $\alpha$ -GalCer-CD1d-reactive T cells (55). These data lead us to propose that the CD44<sup>hi</sup> HSA<sup>lo</sup> phenotype is characteristic of T lymphocytes positively selected on hematopoietic cells. We envision at least two non-mutually exclusive explanations for the low proportion of HSA<sup>+</sup> SP T cells in the OM<sup>+</sup> LN. Expression of HSA, which was high on DP T lymphocytes, might be downmodulated more rapidly following positive selection on hematopoietic cells. Alternatively, HSA<sup>+</sup> T cells may simply be diluted by rapidly proliferating HSA<sup>-</sup> T lymphocytes because the latter cells undergo vigorous post-selection proliferation. A parallel with studies of T cell receptor excision circles (TREC) illustrates the latter mechanism. T cell division was indeed identified as the most important factor for decreasing TREC content (56). Thus, in the presence of normal thymic output, chronic antigen stimulation leads to low TREC levels (57,58).

Another important feature of extrathymic SP LN T lymphocytes was their low levels of TCR/CD3. Strong TCR ligation by peptide/MHC complexes leads to TCR downregulation whose probable role is to protect T cells from overstimulation (59,60). TCR downmodulation which is mediated by the intracellular retention and degradation of ligated complexes (61), is an effective means of tolerance to extrathymic antigens. Thus, in transgenic mice expressing low levels of the H2-K<sup>b</sup> antigen exclusively on hepatocytes, tolerance of antigen reactive CD8 T cells was induced by TCR downmodulation (62). Interestingly, extrathymic T cells (whose site of development is unclear) found in nude mice or in irradiated adult-thymectomized hosts reconstituted with hematopoietic progenitors are indeed TCR<sup>lo/int</sup> (63). We therefore propose that TCR/CD3 downmodulation found in SP T cells developing in the OM<sup>+</sup> LN is a general characteristic of extrathymic T cells. This TCR/CD3 downmodulation is required to prevent overstimulation of T lymphocytes that live in the microenvironment where their positive selection took place.

Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules. Extrathymic T cells that develop along the OM-dependent LN pathway are different from classic T cells in terms of repertoire selection, turnover kinetics and expression of activation/maturation markers. These findings beg the question: what is the functionality of these extrathymic T cells? Athymic mice reconstituted with OM<sup>+</sup> hematopoietic stem cells can reject allogeneic cancer cells (32) and do not show increased incidence of infections (at least when housed in a specific pathogen-free environment). In addition, we



recently obtained evidence that they can generate protective anti-viral responses (Blais, M.E., Gérard, G., Perreault, C., manuscript in preparation). Hence, OM-induced extrathymic T cells appear to be quite functional. The thymus constitutes the primary T lymphoid organ in all jawed vertebrates and in evolutionary terms is much more ancient than the LN. The thymus appeared in Chondrichthyes, the first vertebrates known to elicit adaptive immune responses, while LNs occur strictly in endothermic vertebrates and reach their full development only in eutherian mammals (64). The fact that extrathymic T cells generated in the LN under the influence of OM can replace the mainstream thymic T lymphocytes without any obvious disadvantage means that several features unique to the thymus are not essential to generate a functional T cell repertoire (e. g., thymic epithelial cells, cortico-medullary segregation, blood-thymus barrier preventing the reentry of mature T lymphocytes). In other words, a primary T lymphoid organ does not have to share all the features of the thymus. This concept will lead us to further studies of the OM-dependent pathway and its potential medical relevance for the treatment of congenital and acquired immune deficiencies.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We are indebted to Nathalie Beaudoin and the animal caretakers of the Guy-Bernier Research Center for their invaluable help during the course of these studies. We thank Drs. H.S. Teh and J. Wu for kindly providing T3.70 and 1B2 hybridomas, respectively, and J.A. Kashul for editorial assistance.

## REFERENCES

1. Goldrath, A. W. and M. J. Bevan. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402:255-262.
2. Correia-Neves, M., C. Waltzinger, D. Mathis, and C. Benoist. 2001. The shaping of the T cell repertoire. *Immunity* 14:21-32.
3. Sebzda, E., S. Mariathasan, T. Ohteki, R. Jones, M. F. Bachmann, and P. S. Ohashi. 1999. Selection of the T cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* 17:829-874.
4. Vukmanovic, S., A. G. Grandea, III, S. J. Faas, B. B. Knowles, and M. J. Bevan. 1992. Positive selection of T-lymphocytes induced by intrathymic injection of a thymic epithelial cell line. *Nature* 359:729-732.
5. Anderson, G., K. J. Hare, and E. J. Jenkinson. 1999. Positive selection of thymocytes: the long and winding road. *Immunol. Today* 20:463-468.
6. Benoist, C. and D. Mathis. 1999. T-lymphocyte differentiation and biology. In *Fundamental Immunology*. W. E. Paul, ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 367-409.
7. Coles, M. C. and D. H. Raulet. 2000. NK1.1<sup>+</sup> T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells. *J. Immunol.* 164:2412-2418.

8. Hugo, P., J. W. Kappler, J. E. McCormack, and P. Murrack. 1993. Fibroblasts can induce thymocyte positive selection in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:10335-10339.
9. Pawlowski, T., J. D. Elliott, D. Y. Loh, and U. D. Staerz. 1993. Positive selection of T lymphocytes on fibroblasts. *Nature* 364:642-645.
10. Zinkernagel, R. M. and A. Althage. 1999. On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:8092-8097.
11. Zerrahn, J., A. Volkmann, M. C. Coles, W. Held, F. A. Lemonnier, and D. H. Raulet. 1999. Class I molecules on hematopoietic cells can support intrathymic positive selection of T cell receptor transgenic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:11470-11475.
12. Laufer, T. M., J. DeKoning, J. S. Markowitz, D. Lo, and L. H. Glimcher. 1996. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 383:81-85.
13. Klein, L. and B. Kyewski. 2000. Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr. Opin. Immunol.* 12:179-186.
14. Pircher, H., K. Brduscha, U. Steinhoff, M. Kasai, T. Mizuochi, R. M. Zinkernagel, H. Hengartner, B. Kyewski, and K. P. Muller. 1993. Tolerance induction by clonal deletion of CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> thymocytes in vitro does not require dedicated antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* 23:669-674.

15. Volkman, A., T. Zal, and B. Stockinger. 1997. Antigen-presenting cells in the thymus that can negatively select MHC class II-restricted T cells recognizing a circulating self antigen. *J. Immunol* 158:693-706.
16. Hoffmann, M. W., W. R. Heath, D. Ruschmeyer, and J. F. Miller. 1995. Deletion of high-avidity T cells by thymic epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92:9851-9855.
17. Baldwin, K. K., B. P. Trenchak, J. D. Altman, and M. M. Davis. 1999. Negative selection of T cells occurs throughout thymic development . *J. Immunol.* 163:689-698.
18. Capone, M., P. Romagnoli, F. Beerman, H. R. MacDonald, and J. P. M. van Meerwijk. 2001. Dissociation of thymic positive and negative selection in transgenic mice expressing major histocompatibility complex class I molecules exclusively on thymic cortical epithelial cells. *Blood* 97:1336-1342.
19. Laufer, T. M., L. H. Glimcher, and D. Lo. 1999. Using thymus anatomy to dissect T cell repertoire selection. *Semin. Immunol* 11:65-70.
20. Tanchot, C., F. A. Lemonnier, B. Perarnau, A. A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276:2057-2062.
21. Nestic, D. and S. Vukmanovic. 1998. MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8<sup>+</sup> thymic emigrants. *J. Immunol.* 160:3705-3712.

22. Labrecque, N., L. S. Whitfield, R. Obst, C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis. 2001. How much TCR does a T cell need? *Immunity* 15:71-82.
23. Ge, Q., V. P. Rao, B. K. Cho, H. N. Eisen, and J. Chen. 2001. Dependence of lymphopenia-induced T cell proliferation on the abundance of peptide/ MHC epitopes and strength of their interaction with T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98:1728-1733.
24. Ernst, B., D. S. Lee, J. M. Chang, J. Sprent, and C. D. Surh. 1999. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 11:173-181.
25. Viret, C., F. S. Wong, and C. A. Janeway. 1999. Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity*. 10:559-568.
26. Bender, J., T. Mitchell, J. Kappler, and P. Marrack. 1999. CD4<sup>+</sup> T cell division in irradiated mice requires peptides distinct from those responsible for thymic selection. *J. Exp. Med.* 190:367-373.
27. Naparstek, Y., J. Holoshitz, S. Eisenstein, T. Reshef, S. Rappaport, J. Chemke, A. Ben-Nun, and I. R. Cohen. 1982. Effector T lymphocyte line cells migrate to the thymus and persist there. *Nature* 300:262-264.
28. Agus, D. B., C. D. Surh, and J. Sprent. 1991. Reentry of T cells to the adult thymus is restricted to activated T cells. *J. Exp. Med.* 173:1039-1046.

29. Sempowski, G. D., L. P. Hale, J. S. Sundy, J. M. Massey, R. A. Koup, D. C. Douek, D. D. Patel, and B. F. Haynes. 2000. Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. *J. Immunol.* 164:2180-2187.
30. Shen, M. M., R. C. Skoda, R. D. Cardiff, J. Campos-Torres, P. Leder, and D. M. Ornitz. 1994. Expression of LIF in transgenic mice results in altered thymic epithelium and apparent interconversion of thymic and lymph node morphologies. *EMBO J.* 13:1375-1385.
31. Boileau, C., M. Houde, G. Dulude, C. H. Clegg, and C. Perreault. 2000. Regulation of extrathymic T cell development and turnover by Oncostatin M. *J. Immunol.* 164:5713-5720.
32. Clegg, C. H., J. T. Rulffes, P. M. Wallace, and H. S. Haugen. 1996. Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature* 384:261-263.
33. Bendelac, A. 1995. Positive selection of mouse NK1<sup>+</sup> T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J. Exp. Med.* 182:2091-2096.
34. Abo, T., H. Watanabe, T. Iiai, M. Kimura, K. Ohtsuka, K. Sato, M. Ogawa, H. Hirahara, S. Hashimoto, and H. Sekikawa. 1994. Extrathymic pathways of T-cell differentiation in the liver and other organs. *Int. Rev. Immunol.* 11:61-102.

35. Zijlstra, M., M. Bix, N. E. Simister, J. M. Loring, D. H. Raulet, and R. Jaenisch. 1990.  $\beta$ 2-microglobulin deficient mice lack CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> cytolytic T cells. *Nature* 344:742-746.
36. Teh, H. S., P. Kisielow, B. Scott, H. Kishi, Y. Uematsu, H. Bluthmann, and B. H. Von. 1988. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 335:229-233.
37. Sha, W. C., C. A. Nelson, R. D. Newberry, D. M. Kranz, J. H. Russell, and D. Y. Loh. 1988. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 336:73-76.
38. Bix, M., N. S. Liao, M. Zijlstra, J. Loring, R. Jaenisch, and D. Raulet. 1991. Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature* 349:329-331.
39. Kisielow, P., H. S. Teh, H. Bluthmann, and H. von Boehmer. 1988. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335:730-733.
40. Rocha, B. and H. von Boehmer. 1991. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 251:1225-1228.
41. Teh, H. S., H. Kishi, B. Scott, and H. von Boehmer. 1989. Deletion of autospecific T cells in T cell receptor (TCR) transgenic mice spares cells with



- normal TCR levels and low levels of CD8 molecules. *J. Exp. Med.* 169:795-806.
42. Sykulev, Y., A. Brunmark, T. J. Tsomides, S. Kageyama, M. Jackson, P. A. Peterson, and H. N. Eisen. 1994. High-affinity reactions between antigen-specific T-cell receptors and peptides associated with allogeneic and syngeneic major histocompatibility complex class I proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:11487-11491.
43. Udaka, K., K. H. Wiesmuller, S. Kienle, G. Jung, and P. Walden. 1996. Self-MHC-restricted peptides recognized by an alloreactive T lymphocyte clone. *J. Immunol.* 157:670-678.
44. Bruno, L., H. J. Fehling, and H. von Boehmer. 1996. The  $\alpha\beta$  T cell receptor can replace the  $\gamma\delta$  receptor in the development of  $\gamma\delta$  lineage cells. *Immunity.* 5:343-352.
45. Terrence, K., C. P. Pavlovich, E. O. Matechak, and B. J. Fowlkes. 2000. Premature expression of T cell receptor (TCR) $\alpha\beta$  suppresses TCR $\gamma\delta$  gene rearrangement but permits development of  $\gamma\delta$  lineage T cells. *J. Exp. Med.* 192:537-548.
46. Guy-Grand, D., N. Pardigon, S. Darche, O. Lantz, P. Kourilsky, and P. Vassalli. 2001. Contribution of double-negative thymic precursors to CD8 $\alpha\alpha^+$  intraepithelial lymphocytes of the gut in mice bearing TCR transgenes. *Eur. J. Immunol.* 31:2593-2602.

47. Tarakhovsky, A., S. B. Kanner, J. Hombach, J. A. Ledbetter, W. Muller, N. Killeen, and K. Rajewsky. 1995. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* 269:535-537.
48. Azzam, H. S., A. Grinberg, K. Lui, H. Shen, E. W. Shores, and P. E. Love. 1998. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.* 188:2301-2311.
49. Sosinowski, T., N. Killeen, and A. Weiss. 2001. The src-like adaptor protein downregulates the T cell receptor on CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes and regulates positive selection. *Immunity* 15:457-466.
50. Reinhardt, R. L., A. Khoruts, R. Merica, T. Zell, and M. K. Jenkins. 2001. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 401:101-105.
51. Goldrath, A. W. and M. J. Bevan. 1999. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8<sup>+</sup> T cells in lymphopenic hosts. *Immunity* 11:183-190.
52. Antica, M. and R. Scollay. 1999. Development of T lymphocytes at extrathymic sites. *J. Immunol.* 163:206-211.
53. Matzinger, P. and S. Guerder. 1989. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* 338:74-76.

54. Tough, D. F. and J. Sprent. 1994. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J. Exp. Med.* 179:1127-1135.
55. Gapin, L., J. L. Matsuda, C. D. Surh, and M. Kronenberg. 2001. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat. Immunol.* 2:971-978.
56. Hazenberg, M. D., D. Hamann, H. Schuitemaker, and F. Miedema. 2000. T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4<sup>+</sup> T cells go out of stock. *Nat. Immunol.* 1:285-289.
57. Hazenberg, M. D., S. A. Otto, J. W. Stuart, M. C. Verschuren, J. C. Borleffs, C. A. Boucher, R. A. Coutinho, J. M. Lange, T. F. de Wit, A. Tsegaye, J. J. van Dongen, D. Hamann, R. J. de Boer, and F. Miedema. 2000. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat. Med.* 6:1036-1042.
58. Douek, D. C., M. R. Betts, B. J. Hill, S. J. Little, R. Lempicki, J. A. Metcalf, J. Casazza, C. Yoder, J. W. Adelsberger, R. A. Stevens, M. W. Baseler, P. Keiser, D. D. Richman, R. T. Davey, and R. A. Koup. 2001. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J. Immunol.* 167:6663-6668.

59. Valitutti, S., S. Muller, M. Cella, E. Padovan, and A. Lanzavecchia. 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375:148-151.
60. Cai, Z., H. Kishimoto, A. Brunmark, M. R. Jackson, P. A. Peterson, and J. Sprent. 1997. Requirements for peptide-induced T cell receptor downregulation on naive CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 185:641-651.
61. Liu, H., M. Rhodes, D. L. Wiest, and D. A. A. Vignali. 2000. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 13:665-675.
62. Ferber, I., G. Schonrich, J. Schenkel, A. L. Mellor, G. J. Hammerling, and B. Arnold. 1994. Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* 263:674-676.
63. Sato, K., K. Ohtsuka, K. Hasegawa, S. Yamagiwa, H. Watanabe, H. Asakura, and T. Abo. 1995. Evidence for extrathymic generation of intermediate T cell receptor cells in the liver revealed in thymectomized, irradiated mice subjected to bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* 182:759-767.
64. Zapata, A. and C. T. Amemiya. 2000. Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 248:67-107.

**FOOTNOTES**

<sup>1</sup> This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research.

<sup>2</sup>Corresponding author: Claude Perreault


Guy-Bernier Research Center

Maisonneuve-Rosemont Hospital

5415 de l'Assomption Blvd.

Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

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



<sup>3</sup>*Abbreviations used in this paper:* BrdU, 5-bromodeoxyuridine; DN, double-negative; DP, double-positive; LN, Lymph node; OM, Oncostatin M; SP, single-positive.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** The role of hematopoietic and non hematopoietic cells in the OM-dependent extrathymic positive selection of MHC class I-restricted T cells. **(A)** CD4/CD8 profile of LN lymphoid cells in LckOM mice and adult-thymectomized lethally irradiated (12 Gy) Ly5-congenic recipients transplanted with OM-transgenic fetal liver cells. Chimeras were analyzed on day 80 posttransplant. They differed in that MHC class I expression was either i) normal (+ → +), ii) deficient on both hematopoietic (donor-derived) and non hematopoietic (recipient) cells (- → -), or selectively deficient on either iii) hematopoietic (- → +) or iv) non hematopoietic (+ → -) cells. MHC I<sup>+</sup> recipients of  $\beta_2m^{-/-}$  fetal liver cells were injected i. p. with 200  $\mu$ g of anti-NK1.1 Ab on day -2 and -1 to prevent NK cell mediated rejection of MHC class I-deficient donor cells 38. Acquisitions were gated on lymphoid cells. The analysis is one representative experiment out of three to six. **(B)** Mean  $\pm$  SD proportion of DP and SP T cells in the LN and spleen of the above described chimeras (3 to 6 mice per group). **(C)** V $\beta$  profile of CD4 and CD8 SP T cells in the spleen of B6 mice and hematopoietic chimeras (3 to 5 mice per group).

**Figure 2.** Positive and negative selection of H-Y TCR bearing (T3.70<sup>+</sup>) T cells in the thymus of single-transgenic (H-Y TCR) mice and in the LN of double-transgenic mice (H-Y TCR and OM). CD4/CD8 profiling depicted in the left-most panels was performed on lymphoid cells in the thymus and spleen, and on gated Thy1.2<sup>+</sup> cells in the LN. Histograms in the second column show the proportion of T3.70<sup>+</sup> T cells among SP or DP

T cell populations. Expression of HSA, CD44 and CD122 was evaluated on CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T3.70<sup>+</sup> T cells. The data is one representative experiment out of three.

**Figure 3.** Positive and negative selection of 2C TCR transgenic T lymphocytes (1B2<sup>+</sup>) in the thymus of 2C<sup>+</sup> mice and in the LN of 2C<sup>+</sup>OM<sup>+</sup> mice of H2<sup>b</sup> or H2<sup>b/d</sup> genotype. CD4/CD8 profiling depicted in the left-most panels was performed on lymphoid cells in the thymus and spleen, and on gated Thy1.2<sup>+</sup> cells in the LN. Histograms in the second column show the proportion of 1B2<sup>+</sup> T cells among CD8 T cells. Expression of HSA, CD44 and CD122 was evaluated on CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T3.70<sup>+</sup> T cells. The analysis is of one representative experiment out of three.

**Figure 4.** Development of OM<sup>+</sup> 2C TCR<sup>+</sup> T lymphocytes in the LN is thymus independent. (A) LN of double-transgenic mice (2C TCR and OM). Acquisitions were gated on lymphoid cells. (B) Irradiated adult-thymectomized B6.SJL (Ly5.1) mice were reconstituted with fetal liver cells from double-transgenic (OM and 2C TCR) B6 (Ly5.2) donors and chimeras were analyzed on day 80 posttransplant. Acquisitions were gated on Ly5.2<sup>+</sup> lymphoid cells. Histogram on the right-hand side shows the proportion of 1B2<sup>+</sup> T cells among CD8 SP T cells. These data are from one representative experiment out of three.

**Figure 5.** CD5 expression on thymic and extrathymic T lymphocytes. Overlay histograms depict the CD5 labeling intensity of DP and of CD8 SP T lymphocytes bearing the 2C TCR (1B2<sup>+</sup>) or the H-Y TCR (T3.70<sup>+</sup>). Cells were from the thymus of

TCR single-transgenic mice or from the LN of double-transgenic (TCR and OM) H2<sup>b</sup> mice. **(A)** H-Y TCR<sup>+</sup> versus H-Y TCR<sup>+</sup>OM<sup>+</sup> female mice. **(B)** 2C TCR<sup>+</sup> versus 2C TCR<sup>+</sup>OM<sup>+</sup> mice. **(C)** 2C TCR<sup>+</sup>OM<sup>+</sup> versus H-Y TCR<sup>+</sup>OM<sup>+</sup> female mice.

**Figure 6.** Expression of differentiation/activation markers by T lymphocytes of thymic and extrathymic origins. **(A)** DP, CD8 SP and CD4 SP T cell populations from LckOM LN and C57BL/6 thymus were assayed for surface expression of HSA, CD3, CD8, CD4, CD5, CD44 and CD69. **(B)** CD8 SP and CD4 SP T cell populations from the spleen of LckOM and C57Bl/6 mice were assayed for surface expression of CD62L, CD69, CD122, CD25, and 1B11. Data, depicted as overlaid histograms, are representative of three experiments.



**Table I :** Numbers of H-Y TCR<sup>+</sup> and 2C TCR<sup>+</sup> T cells in lymphoid organs following thymic versus extrathymic development.

<b>A</b>	H-Y TCR female	H-Y TCR /LckOM female	H-Y TCR male	H-Y TCR /LckOM male
<b>T3.70<sup>+</sup> cells</b>	<b>Thymus</b>	<b>Lymph Node</b>	<b>Thymus</b>	<b>Lymph Node</b>
<b>DN</b>	18.3 ± 4.7	15.7 ± 2.9	9.8 ± 2.3	24.5 ± 17.6
<b>DP</b>	63.0 ± 26.9	22.9 ± 12.7	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2
	<b>Spleen</b>	<b>Spleen</b>	<b>Spleen</b>	<b>Spleen</b>
<b>DN</b>	1.9 ± 0.8	2.6 ± 2	30 ± 15.5	11.4 ± 5.4
<b>SP CD8</b>	5.1 ± 0.9	0.6 ± 0.5	19.3 ± 3.9	16.3 ± 2.9
<b>B</b>	2C TCR H2 <sup>b</sup>	2C TCR /LckOM H2 <sup>b</sup>	2C TCR H2 <sup>b/d</sup>	2C TCR /LckOM H2 <sup>b/d</sup>
<b>1B2<sup>+</sup> cells</b>	<b>Thymus</b>	<b>Lymph Node</b>	<b>Thymus</b>	<b>Lymph Node</b>
<b>DN</b>	8.6 ± 3.9	23.0 ± 2.6	6.6 ± 1.3	17.7 ± 6.1
<b>DP</b>	4.7 ± 3.2	31.4 ± 22.1	<0.1	<0.1
	<b>Spleen</b>	<b>Spleen</b>	<b>Spleen</b>	<b>Spleen</b>
<b>DN</b>	12.3 ± 5.7	6.6 ± 4.3	20.4 ± 9.2	15.7 ± 8.8
<b>SP CD8</b>	28.3 ± 10.3	35.3 ± 22.4	1.4 ± 1.1	8.0 ± 5.1

(A) Absolute numbers (mean x 10<sup>6</sup> ± SD) of H-Y TCR bearing (T3.70<sup>+</sup>) DN, DP and SP CD8 T cells in the lymphoid organs of single-transgenic (H-Y TCR) and double-transgenic (H-Y TCR and OM) mice.

(B) Absolute numbers of 2C TCR bearing (1B2<sup>+</sup>) DN, DP and SP CD8 T cells in the lymphoid organs of single-transgenic (2C TCR) and double-transgenic mice (2C TCR and OM). Three to four mice per group.

**Table II:** Numbers of Thy1.2<sup>+</sup> cells in single- and double-transgenic mice (three to four mice per group).

<b>Mice</b>	<b>Organ</b>	<b>Cells (mean x 10<sup>6</sup> ± SD)</b>
LckOM	LN	194 ± 79.2
H-Y TCR female	Thymus	130 ± 39.4
H-Y TCR/LckOM female	LN	78.2 ± 15.7
H-Y TCR male	Thymus	13.2 ± 3.2
H-Y TCR/LckOM male	LN	94.9 ± 38.1
2C TCR H2 <sup>b</sup>	Thymus	28.3 ± 10.6
2C TCR/LckOM H2 <sup>b</sup>	LN	155.5 ± 80.9
2C TCR H2 <sup>b/d</sup>	Thymus	12.1 ± 2.6
2C TCR/LckOM H2 <sup>b/d</sup>	LN	46.3 ± 12.4

Figure 2-1

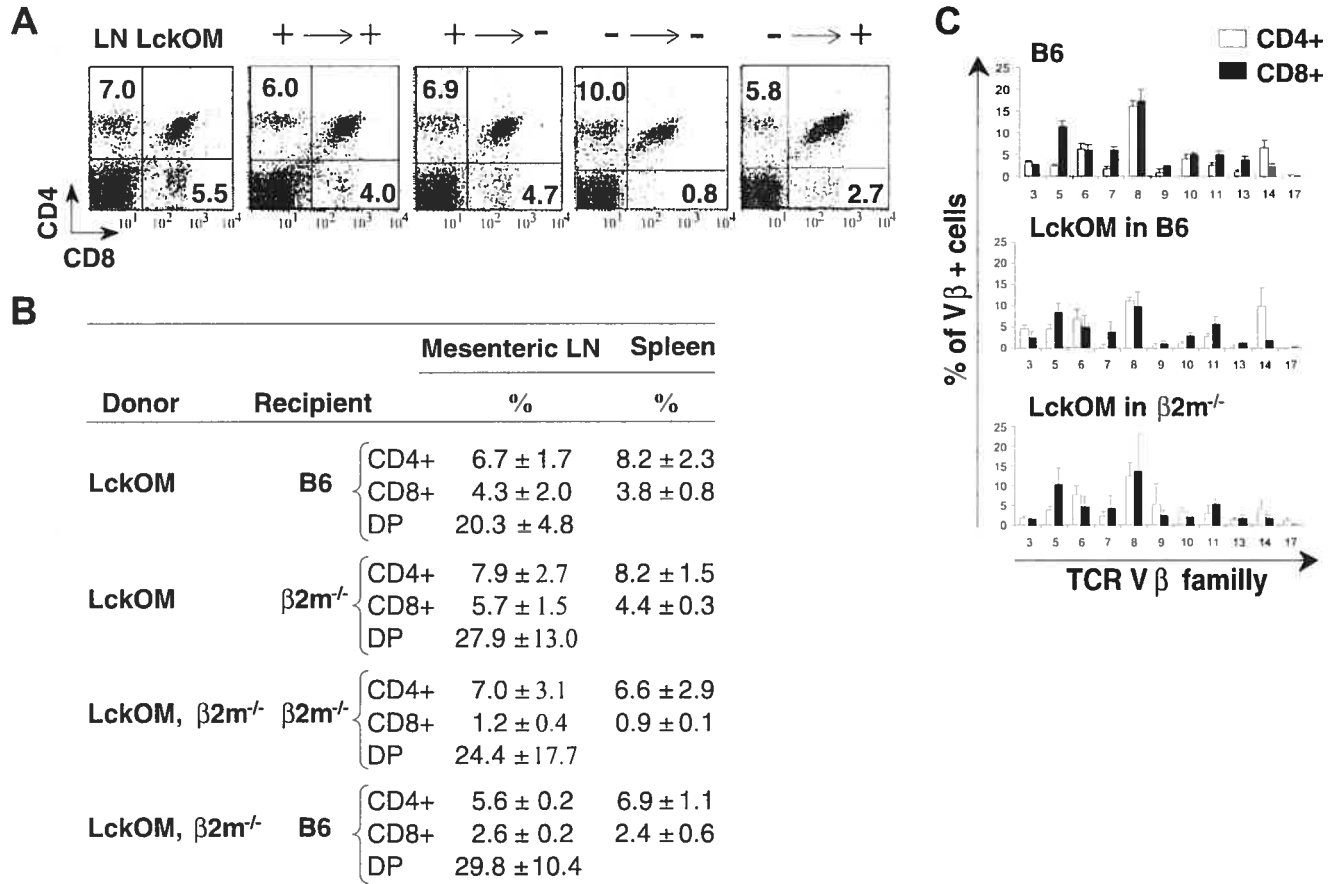


Figure 2-2

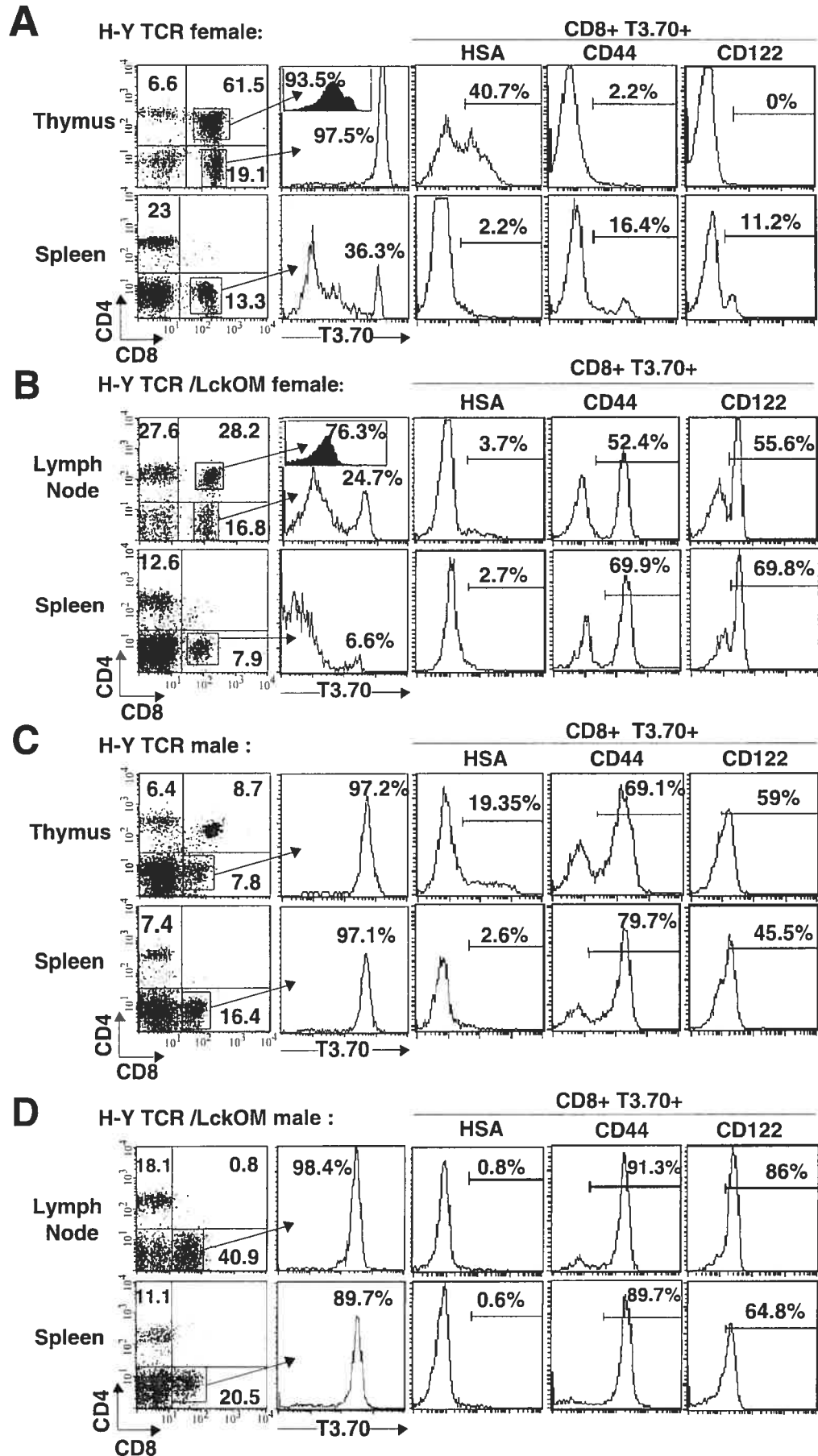


Figure 2-3

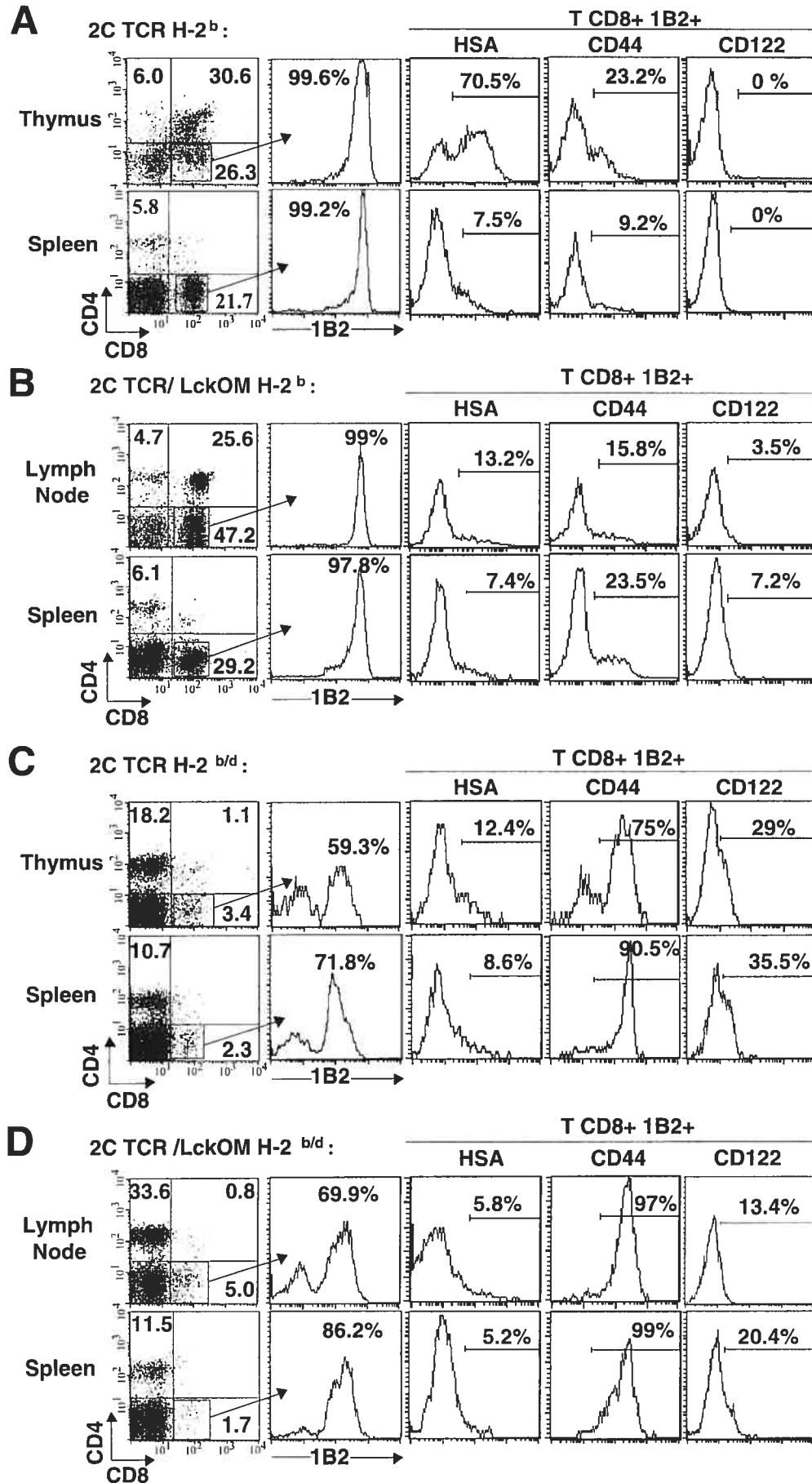


Figure 2-4

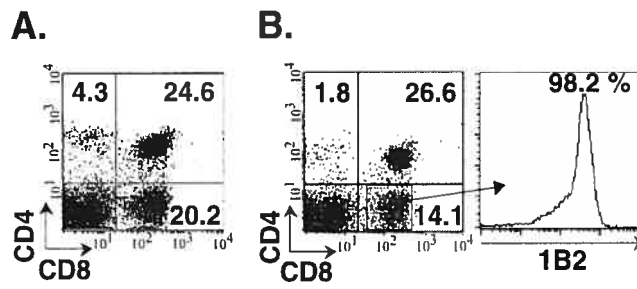


Figure 2-5

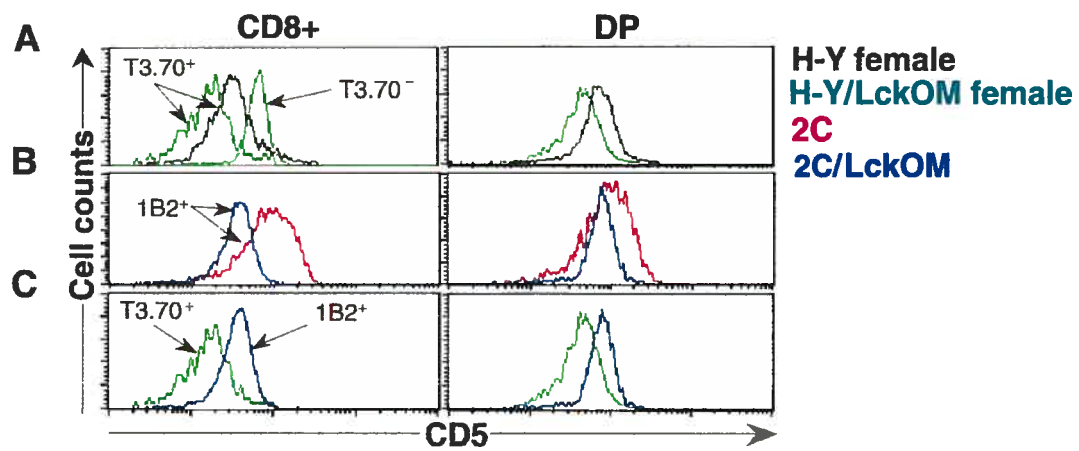
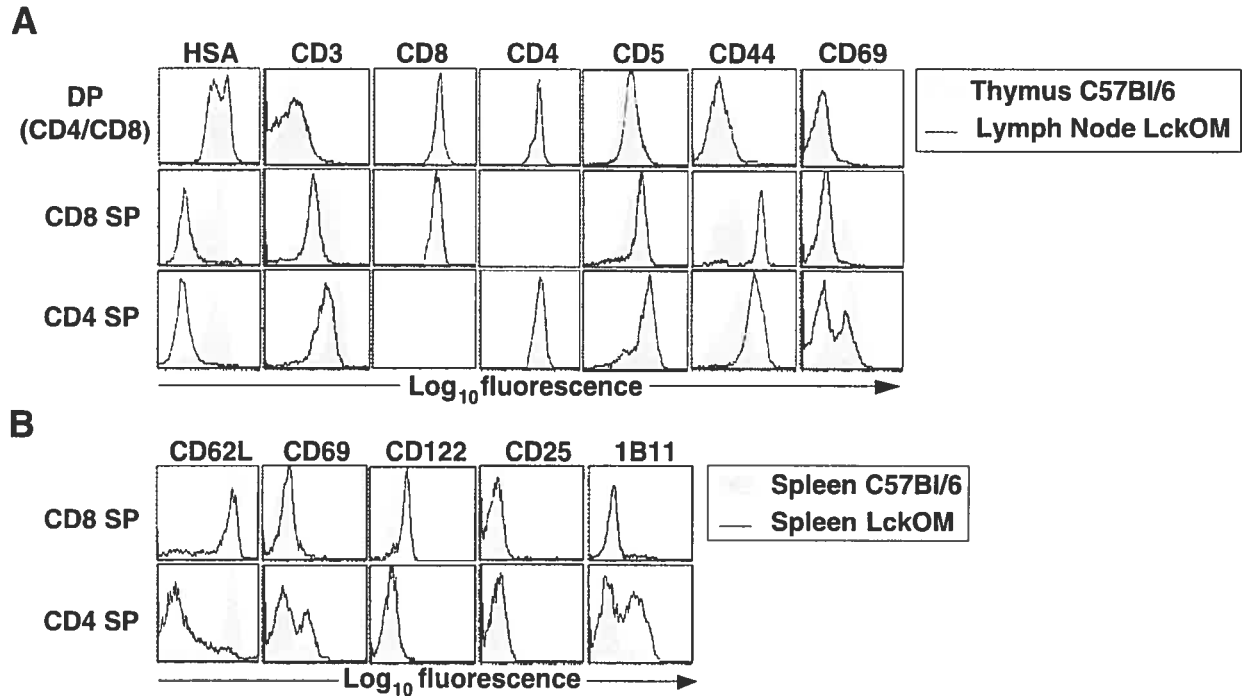


Figure 2-6





## Abstract

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

## Introduction

In all animals with an adaptive immune system, the thymus is the primary lymphoid organ for T cell development and no other organ can compensate for defective thymic function.<sup>1</sup> This is problematic considering that progressive thymus atrophy ultimately affects all ageing subjects and can even impinge on younger subjects affected by several serious illnesses.<sup>3-5</sup> A key question that has baffled immunologists for forty years is the nature of the signals provided by thymic stromal cells that are necessary and sufficient for T cell development.<sup>6</sup>

Strikingly, recent studies have shown that a bone marrow stromal cell line ectopically expressing the Notch ligand Delta-like-1 (OP9-DL1) acquired the capacity to induce the differentiation of hematopoietic progenitors into functional T cells *in vitro*.<sup>7,8</sup> A startling and important implication is that the three-dimensional thymic microenvironment and the presence of thymic epithelial cells are not essential for T cell development.<sup>7</sup> Thymus-independent T cell development can also take place *in vivo*.<sup>9-11</sup> Thus, using transgenic mice bearing a green fluorescent protein gene placed under the control of the RAG2 promoter, Guy-Grand *et al.* showed that T lymphopoiesis occurred in lymph nodes (LN) and less in the Peyer's patches of athymic mice.<sup>10</sup> This cryptic T cell development pathway however generates only limited numbers of mature T cells.<sup>10</sup> Unexpectedly, signals transmitted by the leukemia inhibitory factor (LIF) receptor following prolonged exposure to mouse LIF or bovine oncostatin M (OM), amplify the cryptic LN T lymphopoietic pathway and transform the mouse LNs into primary T

lymphoid organs.<sup>12-17</sup> Thus, about  $215 \times 10^6$  Thy1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells are present in the mesenteric LNs of 12-week-old lckOM transgenic mice that express the OM transgene under the control of the proximal lck promoter.<sup>16</sup> Studies of OM-transgenic mice showed that this extrathymic pathway is thymus independent, generates functional T lymphocytes and is regulated by a cyclooxygenase-2 dependent proliferation of high endothelial venules.<sup>17-20</sup> The goal of our work was to determine why LNs are normally unable to support T cell development and how OM can alleviate this defect. We surmised that such knowledge would provide invaluable information on the essence of a primary T lymphoid organ, that is, how stromal cells regulate crucial early steps in T cell development.

## Materials and Methods

### Mice

C57BL/6J (B6) mice were purchased from The Jackson laboratory (Bar Harbor, ME). LckOM transgenic mice on a C57BL/6J background have been previously described.<sup>15,16</sup>

### Flow cytometry analysis and cell sorting

The following antibodies were used: biotin and PE-Cy7 anti-CD8 $\alpha$  (53-6.7), biotin anti-CD8 $\beta$  (53-5.8), APC-Cy7 anti-CD4, biotin anti-NK1.1 (PK136), biotin, APC and FITC anti-TCR $\beta$  (H57), biotin anti-TCR $\gamma\delta$  (GL-3), FITC and PE anti-CD44 (IM7), biotin, APC-Cy7, PE and APC anti-CD25 (PC61), biotin mouse lineage panel [CD3 $\epsilon$ , CD11b, CD45R/B220, Ly6C, Ly6G (GR-1), TER-119/erythroid cells (Ly-76)], purified anti-CD127 (IL-7R $\alpha$ , A7R34) detected with goat anti-rat FITC, APC anti-CD117 (c-Kit, 2B8), FITC anti-CD24 (HSA), Pe-Cy5 and PE anti-Sca-1 (E13-161.7), FITC anti-BrdU (3D4) with its isotype control (MOPC-21), FITC anti-Bcl-2 (3F11) with its isotype control (A19-3). Biotinylated antibodies were detected with streptavidin percp or PE-Cy7. Anti-CD127 was purchased from eBioscience (San Diego, CA) and other antibodies mentioned above as well as Annexin V-FITC were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA) and Cedarlane Laboratories (Hornby, ON, Canada). Polyclonal purified anti Phospho-Stat3 (Tyr705) (Signaling Technology; Beverly, MA) was detected with FITC goat anti-rabbit IgG F(ab)2 (Abcam; Cambridge, MA). Intracellular staining was done as previously described for BrdU<sup>21</sup>, TCR $\beta$  and Bcl-2<sup>22</sup>, and Phospho-Stat3<sup>23</sup>. Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software and sorted on a

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

### RT-PCR analysis

RNA was prepared from cells sorted in trizol reagent (Invitrogen; Burlington, ON, Canada) followed by chloroform extraction and RNA precipitation following the manufacturer's instructions. We performed RT-PCR with Qiagen OneStep RT-PCR Kit. Previously described RT-PCR conditions and primers were used for *Hprt*, *Rag-1*,  $\gamma_c$ , *preT $\alpha$* , and *CD3 $\epsilon$* <sup>24</sup>. Primers and annealing temperatures were for *HES-1*: (forward) 5'-GCCAGTGTCAACACGACACCGG-3', (reverse) 5'-TCACCTCGTTCATGCACTCG3' (66°C); and for *Deltex1*: (forward) 5'-CACTGGCCCTGTCCACCCAGCCTTGGCAGG-3', (reverse) 5'-GGGAAGGCGGGCAACTCAGGCCTCAGG-3' (55°C). Negative controls were performed in all assays (water and no RT).

### Quantitative RT-PCR

Lymphoid cells were separated from stromal cells by mechanical mashing of lymphoid organs through a cell strainer as described.<sup>19,25</sup> Real-Time RT-PCR was performed with an ABI Prism Sequence Detection System 7700 (Applied Biosystems; Foster City, CA), using TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit for lymphoid progenitors and TaqMan Universal PCR Master Mix for stromal cells (Applied Biosystems). mRNA from stromal cells was extracted in trizol reagent and reverse transcription was carried out

using SuperScript II RNaseH Reverse Transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Triplicate wells were averaged and the target gene values were normalized for *Hprt* content. We used specific primers and probes (TaqMan gene expression assays) from Applied Biosystems.

### **T cell progenitors and OP9 cell cocultures**

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

## Results

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

The least mature thymocytes are termed double-negative 1 (DN1) cells and express a  $\text{Lin}^- \text{CD44}^+ \text{CD25}^-$  surface phenotype. Following *in vivo* adoptive transfer or *in vitro* culture,  $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^-$  cells represent the DN1 subset that displays, on a per-cell basis, the most effective T precursor potential.<sup>26-28</sup> The relation between  $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^-$  DN1 cells and the thymus seeding cells is however still a matter of controversy. According to one paradigm, the development sequence starts with bone marrow  $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$  common lymphoid progenitors (CLP)-1 that gives rise to a  $\text{B220}^+ \text{c-Kit}^- \text{IL-7R}\alpha^+$  CLP-2 population which enters the thymus and subsequently acquires the  $\text{B220}^- \text{c-Kit}^+ \text{IL-7R}\alpha^-$  phenotype.<sup>27,29,30</sup> An alternative model posits that thymic  $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^-$  DN1 cells (referred to as ETPs, early thymic progenitors) are not derived from CLPs but instead arise from an early bone marrow derived  $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^- \text{Flt3}^+$  hematolymphoid progenitors.<sup>26,31</sup> Thymocytes subsequently go through DN2 ( $\text{CD44}^+ \text{CD25}^+$ ), DN3 ( $\text{CD44}^- \text{CD25}^+$ ), and DN4 ( $\text{CD44}^- \text{CD25}^-$ ) stages before giving rise to  $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$  double-positive T cells.

LNs can support *in situ* generation of mature single-positive (SP) T cells following i.v. injection of DN thymocytes but not of hematopoietic stem cells into athymic hosts.<sup>32</sup> This means that the lack of T cell development in the LNs under normal conditions is due to the failure of LNs to attract T cell progenitors or to support some early event at the DN stage. To discover the early step in T cell development that occurs in the thymus and the OM-transgenic LN but not the wild-type (wt) LN, we first analyzed

populations of lineage-negative ( $\text{Lin}^-$ ) cells in these organs. All analyses of LN cells in this work were performed on mesenteric LNs. We discriminated three subsets of DN1 phenotype cells according to the level of c-Kit expression (negative, low or high) because previous reports showed that this marker identifies cell subsets with different T cell progenitor potential.<sup>26-28,33</sup> Among thymic DN1 cells, the vast majority of c-Kit<sup>-</sup> cells were IL-7R $\alpha^+$ , CD24(HSA)<sup>-</sup>, and Sca-1<sup>+</sup>, whereas c-Kit<sup>lo</sup> cells were IL-7R $\alpha^+$ CD24<sup>+/-</sup>Sca-1<sup>+/-</sup>, and c-Kit<sup>hi</sup> cells were largely IL-7R $\alpha^-$ CD24<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> (Figure 1C,E). Overall, DN1 phenotype cells were present in similar numbers in the thymus and wt LN and were more abundant in the OM<sup>+</sup> LN (Figure 1A,B). However, notable discrepancies were found among DN1 cell subsets in the three organs. Strikingly, c-Kit<sup>hi</sup> DN1 cells were present exclusively in the thymus (Figure 1C,D). In contrast, c-Kit<sup>-</sup> and c-Kit<sup>lo</sup> DN1 phenotype cells were more abundant in the wt LN than the thymus, and even more so in the OM<sup>+</sup> LN (Figure 1D). Furthermore, among c-Kit<sup>lo</sup> DN1 cells, the percentage of Sca-1<sup>+</sup> elements was lower in the wt and OM<sup>+</sup> LN (~ 19%) than in the thymus (~ 38%) (Figure 1C).

Relative to the thymus, wt and OM<sup>+</sup> LN showed an increased proportion of cells bearing a pre-DN2 phenotype (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>lo</sup>) (Figure 1A). Detection of *HES-1*, *Deltex1*, *Rag-1* and *CD3 $\epsilon$*  transcripts indicates that DN1 and pre-DN2 subsets in wt and OM<sup>+</sup> LN contain cells committed to the T lineage (Figure 2A,B). DN2 and DN3 cells were practically undetectable in wt LN, yet cells with a DN4 phenotype were present (Figure 1A,B). At the population level, the transcriptome of “illegitimate” wt LN DN4 phenotype cells was not identical to that of genuine thymic DN4 cells, as shown by differences in



levels of *Rag-1*, *pre-T $\alpha$* , and *HES-1* transcripts (Figure 2E). However, at least some of the “illegitimate” DN4 phenotype cells in the wt LN were committed to the T lineage: i) they contained *CD3 $\epsilon$*  transcripts (Figure 2E), ii) about 19% expressed intracytoplasmic TCR $\beta$  chains (Figure 2F), and iii) when cultured for 7 days in the presence of OP9-DL1 stromal cells, which can support all stages of T cell development, wt LN-derived DN4 cells generated CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and single-positive TCR $\beta$ <sup>+</sup> T cells (Figure 2G). In contrast to the wt LN, the numbers of cells with DN2, DN3, and DN4 phenotype were similar in OM<sup>+</sup> LN and thymus (Figure 1B). Furthermore, DN2, DN3, and DN4 cells in the OM<sup>+</sup> LN were similar to those in the thymus with regard to the levels of several transcripts and expression of the c-Kit protein (Figure 2C-E). The sole difference between thymic and OM<sup>+</sup> LN DN cells was the lower proportion of DN4 cells with rearranged TCR $\beta$  chains in the the OM<sup>+</sup> LN (Figure 2F).

Two major points can be made from these data. First, Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> DN1 cells, whose phenotype corresponds to that of ETPs<sup>26</sup>, are present exclusively in the thymus. A corollary is that, at least in the OM<sup>+</sup> LN, mature T cells can be produced in the absence of c-Kit<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> DN1 cells. This extrathymic pathway is truly thymus independent as shown in athymic mice reconstituted with OM transgenic fetal liver or injected with OM.<sup>15,16,19</sup> Second, accumulation of pre-DN2 cells in wt and OM<sup>+</sup> LNs, and emergence of DN2 and DN3 cells in OM<sup>+</sup> but not wt LN suggest that failure of wt LN to support T cell development is due to a blockade of the DN1 to DN2 transition that is alleviated in the OM<sup>+</sup> LN.

### Proliferation of DN cells

In the thymus, DN cells proliferate extensively, particularly at the DN2 and DN4 stages.<sup>21</sup> To analyze the proliferation of DN cell subsets in the thymus and LNs, BrdU was injected i.p., mice sacrificed 40 min later, and cell cycle status was determined by staining with anti-BrdU Ab and 7AAD.<sup>34</sup> In addition, the proportion of apoptotic cells was estimated by Annexin V labeling. As opposed to their thymic counterparts, all DN phenotype cells in the wt LN were arrested at the G1 phase of the cell cycle with virtually no cells in S phase (Figure 3A). In the OM<sup>+</sup> LN, the percentage of cells in S phase was similar to thymocytes for DN1, DN2, and DN3 cells, but significantly lower for the pre-DN2 and DN4 subsets (Figure 3A). Among DN cells in the wt LN, lack of proliferation was correlated with higher proportion of apoptotic cells compared to the thymus and the OM<sup>+</sup> LN (Figure 3C).

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

thymus suggests that the LN stroma fails to provide either Kit ligand or another signal that promotes proliferation of c-Kit<sup>lo</sup> DN1 cells in the thymus.

In the absence of DN2 and DN3 cells, the presence in the wt LN of DN4 phenotype cells displaying evidence of T lineage commitment (Figure 1A, 2E-G) could be due to extensive proliferation of rare (undetectable) DN3 cells that escaped blockade at the pre-DN2 stage. The practical absence of cycling DN4 cells in the wt LN (Figure 3A) argues against this assumption and suggests rather that a cryptic pathway generates illegitimate DN4 cells directly from DN1 cells.

#### **Key differences between thymus and LN stroma involve Wnt proteins**

The above data show that failure of wt LN to support T cell development is due to an inability to complete the DN1 to DN2 transition. This defect is largely alleviated in OM<sup>+</sup> LN. T cell development is however not entirely thymus-like in the OM<sup>+</sup> LN where accumulation of pre-DN2 cells and relatively low proliferation of DN4 phenotype cells were found. Signals required for the development of thymocytes at the DN1-DN2 stage are initiated by key ligands that control proliferation and survival (IL-7, kit ligand, and possibly Wnt proteins)<sup>35-40</sup> and T cell lineage commitment (Delta-like Notch-1 ligands)<sup>41,42</sup>. Expansion of the DN4 cell subset depends on expression of the pre-TCR (at the DN3 stage), which has no ligand, and is probably enhanced by Wnt signals.<sup>34,40,43-46</sup> We therefore performed quantitative real-time RT-PCR on the stroma of lymphoid organs to evaluate the expression profile of IL7, Kit ligand, Delta-like proteins, and 6 Wnt proteins which are normally present in the thymus.<sup>47,48</sup> We also assessed expression

of the fms-like tyrosine kinase-3 ligand (*flt3L*) cytokine gene, because, although it is not essential for T cell development, it may influence the proliferation and survival of lymphoid progenitors.<sup>49,50</sup>

We found no deficit of the following transcripts in the wt LN relative to the thymus: *IL-7*, *Kit ligand*, *flt3L*, *Delta-like-1* and *-4*, *Wnt1*, *Wnt7a*, *Wnt10a* and *Wnt10b* (Figure 4A). Furthermore, none of these transcripts was more abundant in the OM<sup>+</sup> compared to wt LN (Figure 4A). However, two salient differences were observed between the thymus and LNs: *Wnt4* and *Wnt7b* transcripts were present in the thymus [as previously reported<sup>47,48</sup>] but absent in the LN ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.005$ , respectively). Though we cannot formally exclude that lack of *Wnt7b* in the LN may be biologically relevant, we elected to focus our attention (and culture experiments described below) on *Wnt4* for the following reasons: i) *Wnt4*, which regulates FoxN1 expression, is the most abundantly expressed Wnt family member in both embryonic thymic epithelium as well as mature thymic cortical epithelium<sup>47,48</sup>; ii) aside from *Wnt1*, *Wnt4* is the only Wnt protein for which a role in thymopoiesis is supported by experimental evidence<sup>37,51</sup>, and iii) OP9-DL1 stromal cells which can support all steps of T cell development express *Wnt4* but not *Wnt7b* (Figure 4A). Stromal fractions may be contaminated by a few adherent lymphoid cells.<sup>19,25</sup> Evaluation by quantitative RT-PCR of *Wnt4* transcripts in thymus lymphoid and stromal fractions confirmed that stromal cells were the main if not the sole site of *Wnt4* transcription in the thymus (Figure 4B). Lack of *Wnt4* in the LN could be pivotal since T cell development in the LNs (Figure 1A, 3A) is impaired at two stages where Wnt signals have been proposed to influence thymocyte development<sup>40,43,44</sup>.

expansion of the DN2 and of the DN4 compartments. Lack of Wnt4 protein in the LN could provide a parsimonious explanation for both defects.

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

Wnt signaling is complex: there are 18 Wnt proteins in the mouse, and their target genes differ among various cell types.<sup>52,53</sup> The transcriptional response specifically elicited by discrete Wnt proteins, particularly Wnt4, has not been fully characterized in immature T cells. To discover whether and how lack of Wnt signals could hamper T cell development, we used quantitative PCR to study the expression of genes that have been both implicated in thymocyte development<sup>38,54-56</sup> and shown to be regulated by Wnt signals in various cell types<sup>38,57-59</sup>. We performed these studies in the two subsets of DN phenotype cells that are present in significant numbers in both the thymus and wt LN, that is, DN1 and DN4 cells (Figure 1A,B). Wnt signaling promotes cell proliferation by increasing transcription of *c-myb*, *c-myc*, and *c-fos*, and decreasing that of *junB*. Key downstream events include induction of *cyclin D2* by *c-myc*<sup>60</sup>, and repression of two cyclin-dependent kinase inhibitors (*p16<sup>INK4a</sup>* and *p21<sup>Cip1/WAF1</sup>*) that are induced by *junB* and repressed by *c-fos*<sup>61,62</sup>. In line with this, transcript levels of *c-myb*, *c-myc*, and *cyclin D2* were lower while those of *junB*, *p16<sup>INK4a</sup>* and *p21<sup>Cip1/WAF1</sup>* were higher in wt LN compared to thymus DN cells (Figure 5A,E). However, *c-fos* levels were not deficient in the wt LN relative to thymus DN1 cells (Figure 5A). Thus, aside from *c-fos* levels, transcript profiles point to a dearth of Wnt signals in DN cells from the wt LN relative to the thymus. This suggests that in DN cells, Wnt4 (and possibly Wnt7b, see above) signals

may have a non redundant effect on genes such as *c-myb*, *c-myc*, and *junB*, but are not essential for induction of *c-fos*.

Bovine OM binds only to the LIF receptor in mouse.<sup>12-14</sup> While extrathymic T cell development in OM-transgenic mice must therefore be induced by OM binding to the LIF receptor, it has not been determined whether this interaction occurs specifically in immature T cells. To address this, we studied the three subsets of DN phenotype cells present in both the wt and OM<sup>+</sup> LNs (DN1, pre-DN2, and DN4; cf. Figure 1A,B). Signals from the LIF receptor partially overlap with those induced by Wnt signaling<sup>63</sup> and have a similar impact on transcription of *c-fos*, *junB*, *p16<sup>INK4a</sup>*, *p21<sup>Cip1/WAF1</sup>* and *c-myc*<sup>64-66</sup>. Comparison of transcript levels in the OM<sup>+</sup> relative to wt LN supports the idea that OM signals in DN cells from the OM<sup>+</sup> LN compensate for the lack of Wnt signaling: levels of *c-fos* and *c-myc* were higher while those of *junB*, *p16<sup>INK4a</sup>*, and *p21<sup>Cip1/WAF1</sup>* were decreased in DN cells from the OM<sup>+</sup> relative to the wt LN (Figure 5A,C,E). Supplementary evidence for OM signaling<sup>67-69</sup> in DN cells from the OM<sup>+</sup> LN included upregulation of CD44 in DN1 cells (Figure 5A), of *bcl-2* in DN1 and pre-DN2 cells (Figure 5B,D), of *bcl-x<sub>L</sub>* in pre-DN2 cells (Figure 5C), and of phosphoSTAT3 in pre-DN2 and DN4 cells (Figure 5D,F).

### **In vitro differentiation of c-Kit<sup>lo</sup> and c-Kit<sup>hi</sup> progenitors**

We next asked whether culture with stromal cells expressing *Wnt4* could allow DN1 phenotype cells from the LNs to undergo T lineage differentiation. OP9-DL1 express *Wnt4*, albeit at lower levels than thymic stromal cells (Figure 4). Thus, we cultured the

following subsets of DN1 phenotype cells in the presence of OP9-DL1 stromal cells: c-Kit<sup>hi</sup> (Sca-1<sup>+</sup>) cells from the thymus, as well as the Sca-1<sup>-</sup> and Sca-1<sup>+</sup> subsets of c-Kit<sup>-</sup> and c-Kit<sup>lo</sup> cells from the thymus, wt LN, and OM<sup>+</sup> LN. As expected, for all cell subsets tested no development toward the T lineage was observed in presence of OP9 cells, that is, in the absence of the Notch ligand Delta-like 1 (data not shown). In presence of OP9-DL1 cells, T cell differentiation was observed with thymic c-Kit<sup>hi</sup> cells, and c-Kit<sup>lo</sup>Sca-1<sup>+</sup> cells from the three lymphoid organs (Figure 6B). In contrast, no T cell differentiation (appearance of DN2 phenotype cells) was observed with c-Kit<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>, c-Kit<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>, and c-Kit<sup>lo</sup>Sca-1<sup>-</sup> subsets (data not shown). Interestingly, the behavior in culture of c-Kit<sup>-</sup> and c-Kit<sup>lo</sup> cell subsets was not influenced by their site of origin (thymus, wt LN or OM<sup>+</sup>LN) (Figure 6). Consistent with previous studies<sup>28</sup>, c-Kit<sup>hi</sup> (thymic) DN1 cells cultured with OP9-DL1 cells proliferated extensively, generated DN4 cells after 12 days (Figure 6B) and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> as well as single positive T cells after 18 days (data not shown). In comparison with c-Kit<sup>hi</sup> DN1 cells, c-Kit<sup>lo</sup>Sca-1<sup>+</sup>DN1 cells (from the thymus or LNs) showed two deficits: i) in terms of absolute numbers, they accumulated to lower levels on day 7 and 12; and ii) their progeny showed a very low proportion of DN4 cells on day 12 (Figure 6B). Furthermore, c-Kit<sup>lo</sup>Sca-1<sup>+</sup> differed from c-Kit<sup>hi</sup> DN1 thymic cells in that only the former generated substantial numbers of CD19<sup>+</sup> B cells when cultured on OP9 cells (Figure 6A). Thus, when cultured with OP9-DL1 cells, c-Kit<sup>lo</sup>Sca-1<sup>+</sup> DN1 cells from the thymus and LN progress well up to the DN3 stage, but expansion of their DN4 cell progeny is limited.

The OM transgene is under the control of the *lck* proximal promoter in *lckOM* mice. Expression of the *lck* proximal promoter is upregulated in DN3 cells and remains substantial in DN4, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and SP T cells.<sup>70</sup> Thus, a plethora of T lineage cells produce OM in the *lckOM* LN.<sup>16,18</sup> In contrast, when *c-Kit*<sup>lo</sup>*Sca-1*<sup>+</sup> DN1 cells from *lckOM* LNs were plated on OP9-DL1 cells, their initial development took place in the absence of OM producing cells. Thus, they did not fare better than *c-Kit*<sup>lo</sup>*Sca-1*<sup>+</sup> DN1 cells derived from wt LNs (Figure 6B).

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



## Discussion

It has previously been shown that two types of  $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+$  progenitors can generate T cells in the thymus:  $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^-$  and  $\text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$ .<sup>26,27,29</sup> We report herein that these progenitors fail to generate T cells in the wt LN for different reasons:  $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^-$  are absent in the LNs, while  $\text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$  are present but cell cycle arrested (Figure 1D). Considering that the relation between  $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^-$  and  $\text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$  DN1 cells is unclear<sup>26,27</sup>, the absence of  $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^-$  DN1 cells in the wt and  $\text{OM}^+$  LN means that LNs either fail to attract these progenitors or fail to support their *in situ* generation from  $\text{c-Kit}^-$  or  $\text{c-Kit}^{\text{lo}}$  cells. On the contrary,  $\text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$  are more abundant in the wt LN than the thymus and even more so in the  $\text{OM}^+$  LN (Figure 1D). Nevertheless, full differentiation of  $\text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$  progenitors cannot take place in the wt LN because of the absence of signals that may be provided by Wnt4 (and possibly Wnt7b) in the thymus and by OM in the OM-transgenic LN. Accumulation of  $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$  cells in  $\text{OM}^+$  LNs appears to be a local phenomenon because we found no increase of  $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$  cell numbers in the bone marrow of  $\text{OM}^+$  mice (data not shown). It is tempting to speculate that accumulation of  $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$  cells may be related to the proliferation of high endothelial venules found in  $\text{OM}^+$  LNs.<sup>19</sup> A corollary warranting further investigation is that LN high endothelial venules might express a unique ligand important for homing of  $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$  progenitors.

This work strongly suggests that in the wt LN the T lineage differentiative potential of  $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$  cells is thwarted by the absence of Wnt signaling. First,

Lin<sup>-</sup> DN cell subsets in the wt LN are characterized by three features reported in the thymus of mutant mice with disruption of the Wnt signaling pathway: blockade of DN1→DN2 transition with accumulation of pre-DN2 cells (Figure 1), presence of "illegitimate" DN4 cells in absence of DN2 and DN3 cells (Figure 1), and cell cycle arrest of DN4 cells (Figure 3). Indeed, transcription factor Tcf-1 is essential for DN1 thymocyte to reach the DN2 stage, and accumulation of pre-DN2 cells has been reported in the thymus of mice with impaired GTPase Rho or c-Kit signaling (*Gfi1*<sup>-/-</sup>).<sup>71,72</sup> Moreover, illegitimate DN4 cells were found in the thymus of c-Kit deficient (*Vickid*) and FoxN1-mutant mice, and non cycling DN4 cells were reported in Brg-deficient mice.<sup>24,34,73</sup> The common link among Tcf-1, GTPase Rho, c-Kit, Brg, and FoxN1 is that they are involved in Wnt signaling.<sup>47,53,58,74</sup> Second, among key ligands that are produced by stromal cells and that can regulate early steps of T cell development, *Wnt4* and *Wnt7b* were the sole transcripts that were deficient in the LNs relative to the thymus (Figure 4A). Third, expression profiling (Figure 5) incriminates deficient Wnt signaling as a plausible explanation for the proliferative defect of wt LN relative to thymus DN cells (Figure 3). Fourth, *in vivo* exposure to high levels of LIF receptor-binding cytokines (OM and LIF) amplifies tremendously the T lineage differentiative potential of LN Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> cells.<sup>14,16,18</sup> These cytokines lead to downstream events that significantly overlap with those induced by Wnt signaling [<sup>63</sup> and Figure 5]. Fifth, when cultured with OP9-DL1 stromal cells expressing thymus-like levels of *Wnt4*, wt LN Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>lo</sup>Sca-1<sup>+</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> progenitors generate single-positive T cells (Figure 7). Nevertheless, generation of Wnt transgenic mice will be essential to directly evaluate whether T cell development in the LN is normally hampered solely by the lack of Wnt signals.

In contrast to c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> cells, thymic c-Kit<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> cells did not require high levels of Wnt4 to generate T cells *in vitro* (Figure 6). Two possibilities could explain this unexpected discrepancy between the two types of progenitors: c-Kit<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> cells do not require Wnt signals or they can use Wnt ligands other than Wnt4. Considering the great controversy over the involvement of Wnt signaling in T cell development<sup>39,40,51,53</sup>, both scenarios must be considered perfectly plausible. Notably, our *in vitro* culture data support the growing consensus that the proliferation rate and T cell generation potential of thymic c-Kit<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> are unmatched by other DN1 cell subsets.<sup>26,28</sup> Major questions are why c-Kit<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> cells are found only in the thymus and whether these cells could generate T cells as efficiently in the LN as in the thymus. Nonetheless, one concept emerging from our work is that, in stark contrast with what is seen in the thymus, T cells production in the LNs occurs in the absence of c-Kit<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> cells. This raises the interesting question of whether progenitor type (c-Kit<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> vs. c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>) influences the behaviour and function of their T cell progeny.

Whether they were from the thymus or LNs, c-Kit<sup>lo</sup>Sca-1<sup>+</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> populations had the same behavior when cultured *in vitro* (Figure 6). Their phenotype and their ability to generate T and B cells suggest that they are closely related to bone marrow common lymphoid progenitors (CLP)<sup>27,29</sup>, though clonogenic assays would be required to formally demonstrate that these populations contain bipotent precursors of T and B cells. Of note, CLPs injected to athymic hosts were recently shown to rapidly generate functional CD8 T in elusive extrathymic sites.<sup>75</sup> The present study suggests that the LN is

a primary (if not the sole) site where CLPs can generate T cells. Furthermore, coupled to the present work, demonstration that high numbers of extrathymic CD4 SP cells are produced in the OM<sup>+</sup> LNs<sup>15-17</sup> indicates that CLP-phenotype cells can generate not only CD8, but also CD4 T cells in a thymus-independent fashion. Demonstration that the T cell generation potential of CLP-phenotype cells is dramatically amplified by Wnt4 could be relevant for treatment of subjects with T cell lymphopenia considering the recent demonstration that CLP-derived T cells can protect against lethal murine cytomegalovirus infection.<sup>75</sup> Caution is always warranted when extrapolating data on mouse hemato-lymphoid precursors to human.<sup>76</sup> Nevertheless, the high level of conservation of the Wnt pathway and the 98% amino acid identity between mouse and human Wnt4 suggest that our data on Wnt4 may apply to human. The use of Wnt4 protein could therefore have a pivotal role in developing *ex vivo* culture systems for generating therapeutically relevant numbers of T lymphocytes from extrathymic lymphoid progenitors.

## **Acknowledgements**

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

## References

- 1 Zapata A, Amemiya CT. Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;248:67-107.
- 2 Porritt HE, Gordon K, Petrie HT. Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J Exp Med*. 2003;198:957-901.
- 3 Dulude G, Brochu S, Fontaine P et al. Thymic and extrathymic differentiation and expansion of T lymphocytes following bone marrow transplantation in irradiated recipients. *Exp Hematol*. 1997;25:992-1004.
- 4 Dulude G, Roy DC, Perreault C. The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J Exp Med*. 1999;189:1329-1342.
- 5 Mackall CL, Gress RE. Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol Rev*. 1997;157:61-72.
- 6 Gill J, Malin M, Sutherland J et al. Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev*. 2003;195:28-50.
- 7 Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by Delta-like-1 in vitro. *Immunity*. 2002;17:749-756.

- 8 Schmitt TM, de Pooter RF, Gronski MA et al. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated *in vitro*. *Nat Immunol*. 2004;5:410-417.
- 9 Dejbakhsh-Jones S, Garcia-Ojeda ME, Chatterjea-Matthes D, Zeng D, Strober S. Clonable progenitors committed to the T lymphocyte lineage in the mouse bone marrow; use of an extrathymic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:7455-7460.
- 10 Guy-Grand D, Azogui O, Celli S et al. Extrathymic T cell lymphopoiesis: Ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J Exp Med*. 2003;197:333-341.
- 11 Blais ME, Louis I, Corneau S et al. Extrathymic T cell development. *Exp Hematol*. 2003;31:349-354.
- 12 Lindberg RA, Juan TS, Welcher AA et al. Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M. *Mol Cell Biol*. 1998;18:3357-3367.
- 13 Malik N, Haugen HS, Modrell B, Shoyab M, Clegg CH. Developmental abnormalities in mice transgenic for bovine oncostatin M. *Mol Cell Biol*. 1995;15:2349-2358.
- 14 Shen MM, Skoda RC, Cardiff RD et al. Expression of LIF in transgenic mice results in altered thymic epithelium and apparent interconversion of thymic and lymph node morphologies. *EMBO J*. 1994;13:1375-1385.

- 15 Clegg CH, Rulffes JT, Wallace PM, Haugen HS. Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature*. 1996;384:261-263.
- 16 Boileau C, Houde M, Dulude G, Clegg CH, Perreault C. Regulation of extrathymic T cell development and turnover by Oncostatin M. *J Immunol*. 2000;164:5713-5720.
- 17 Terra R, Labrecque N, Perreault C. Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules. *J Immunol*. 2002;169:684-692.
- 18 Clegg CH, Haugen HS, Rulffes JT, Friend SL, Farr AG. Oncostatin M transforms lymphoid tissue function in transgenic mice by stimulating lymph node T-cell development and thymus autoantibody production. *Exp Hematol*. 1999;27:712-725.
- 19 Louis I, Dulude G, Corneau S et al. Changes in the lymph node microenvironment induced by Oncostatin M. *Blood*. 2003;102:1397-1404.
- 20 Blais ME, Gérard G, Martinic MM et al. Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses? *Blood*. 2004;103:3102-3110.
- 21 Pénit C, Lucas B, Vasseur F. Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4<sup>-</sup>8<sup>-</sup>) to immature (CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J Immunol*. 1995;154:5103-5113.



- 22 Labrecque N, Whitfield LS, Obst R et al. How much TCR does a T cell need? *Immunity*. 2001;15:71-82.
- 23 Cavallo F, Quaglino E, Cifaldi L et al. Interleukin 12-activated lymphocytes influence tumor genetic programs. *Cancer Res*. 2001;61:3518-3523.
- 24 Waskow C, Paul S, Haller C, Gassmann M, Rodewald HR. Viable c-Kit<sup>w/w</sup> mutants reveal pivotal role for c-Kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity*. 2002;17:277-288.
- 25 Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, Cyster JG. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:12694-12699.
- 26 Allman D, Sambandam A, Kim S et al. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol*. 2003;4:168-174.
- 27 Martin CH, Aifantis I, Scimone ML et al. Efficient thymic immigration of B220<sup>+</sup> lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential . *Nat Immunol*. 2003;4:866-873.
- 28 Porritt HE, Rumfelt LL, Tabrizifard S et al. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity*. 2004;20:735-745.
- 29 Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997;91:661-672.

- 30 Akashi K, Reya T, Dalma-Weiszhausz D, Weissman IL. Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:144-150.
- 31 Schwarz BA, Bhandoola A. Circulating hematopoietic progenitors with T lineage potential. *Nat Immunol.* 2004;5:953-960.
- 32 Antica M, Scollay R. Development of T lymphocytes at extrathymic sites. *J Immunol.* 1999;163:206-211.
- 33 Ceredig R, Rolink T. A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:888-897.
- 34 Chi TH, Wan M, Lee PP et al. Sequential roles of Brg, the ATPase subunit of BAF chromatin remodeling complexes, in thymocyte development. *Immunity.* 2003;19:169-182.
- 35 Akashi K, Kondo M, Weissman IL. Role of interleukin-7 in T-cell development from hematopoietic stem cells. *Immunol Rev.* 1998;165:13-28.
- 36 Agosti V, Corbacioglu S, Ehlers I et al. Critical role for Kit-mediated Src kinase but not PI 3-kinase signaling in pro T and pro B cell development. *J Exp Med.* 2004;199:867-878.
- 37 Staal FJ, Meeldijk J, Moerer P et al. Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur J Immunol.* 2001;31:285-293.

- 38 Staal FJT, Weerkamp F, Baert MRM et al. Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34<sup>+</sup> thymocytes regulate proliferation and cell adhesion. *J Immunol.* 2004;172:1099-1108.
- 39 Cobas M, Wilson A, Ernst B et al.  $\beta$ -catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J Exp Med.* 2004;199:221-229.
- 40 Xu Y, Banerjee D, Huelsken J, Birchmeier W, Sen JM. Deletion of  $\beta$ -catenin impairs T cell development. *Nat Immunol.* 2003;4:1177-1182.
- 41 Harman BC, Jenkinson EJ, Anderson G. Microenvironmental regulation of Notch signalling in T cell development. *Semin Immunol.* 2003;15:91-97.
- 42 Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 2004;5:247-253.
- 43 Schilham MW, Wilson A, Moerer P et al. Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. *J Immunol.* 1998;161:3984-3991.
- 44 Ioannidis V, Beermann F, Clevers H, Held W. The  $\beta$ -catenin-TCF-1 pathway ensures CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocyte survival. *Nat Immunol.* 2001;2:691-697.
- 45 Michie AM, Zuniga-Pflucker JC. Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and b-selection. *Semin Immunol.* 2002;14:311-323.
- 46 Borowski C, Li X, Aifantis I, Gounari F, Von Boehmer H. Pre-TCRa and TCRA are not interchangeable partners of TCR $\beta$  during T lymphocyte development. *J Exp Med.* 2004;199:607-615.

- 47 Balciunaite G, Keller MP, Balciunaite E et al. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol.* 2002;3:1102-1108.
- 48 Pongracz J, Hare K, Harman B, Anderson G, Jenkinson EJ. Thymic epithelial cells provide Wnt signals to developing thymocytes. *Eur J Immunol.* 2003;33:1949-1956.
- 49 Sitnicka E, Bryder D, Theilgaard-Monch K et al. Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity.* 2002;17:463.
- 50 Fry TJ, Sinha M, Milliron M et al. Flt3 ligand enhances thymic-dependent and thymic-independent immune reconstitution. *Blood.* 2004;104:2794-2800.
- 51 Mulroy T, McMahon JA, Burakoff SJ, McMahon AP, Sen J. Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur J Immunol.* 2002;32:967-971.
- 52 Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt,  $\beta$ -catenin, and cadherin pathways. *Science.* 2004;303:1483-1487.
- 53 Staal FJ, Clevers HC. Wnt signaling in the thymus. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:204-208.
- 54 Douglas NC, Jacobs H, Bothwell AL, Hayday AC. Defining the specific physiological requirements for c-Myc in T cell development. *Nat Immunol.* 2001;2:307-315.

- 55 Nunomura S, Sato T, Habu S. Molecular basis for functional maturation of thymocytes: increase in c-fos translation with positive selection. *J Immunol.* 2000;164:5590-5595.
- 56 Allen RD, Bender TP, Siu G. c-Myb is essential for early T cell development. *Genes Dev.* 1999;13:1073-1078.
- 57 Tice DA, Soloviev I, Polakis P. Activation of the Wnt pathway interferes with serum response element-driven transcription of immediate early genes. *J Biol Chem.* 2002;277:6118-6123.
- 58 Barker N, Hurlstone A, Musisi H et al. The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with b-catenin to promote target gene activation. *EMBO J.* 2001;20:4935-4943.
- 59 Willert J, Epping M, Pollack JR, Brown PO, Nusse R. A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev Biol.* 2002;2:8.
- 60 Haggerty TJ, Zeller KI, Osthus RC, Wonsey DR, Dang CV. A strategy for identifying transcription factor binding sites reveals two classes of genomic c-Myc target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:5313-5318.
- 61 Passegué E, Wagner EF. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J.* 2000;19:2969-2979.

- 62 Crowe DL, Brown TN, Kim R, Smith SM, Lee MK. A c-fos/Estrogen receptor fusion protein promotes cell cycle progression and proliferation of human cancer cell lines. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2000;3:243-248.
- 63 Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med.* 2004;10:55-63.
- 64 Duval D, Reinhardt B, Keding C, Boeuf H. Role of suppressors of cytokine signaling (Socs) in leukemia inhibitory factor (LIF) -dependent embryonic stem cell survival. *FASEB J.* 2000;14:1577-1584.
- 65 Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* 2003;115:281-292.
- 66 Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M et al. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med.* 1999;189:63-73.
- 67 Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y et al. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity.* 1996;5:449-460.
- 68 Wright LS, Li J, Caldwell MA et al. Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor. *J Neurochem.* 2003;86:179-195.

- 69 Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*. 2000;19:2548-2556.
- 70 Shimizu C, Kawamoto H, Yamashita M et al. Progression of T cell lineage restriction in the earliest subpopulation of murine adult thymus visualized by the expression of lck proximal promoter activity. *Int Immunol*. 2001;13:105-117.
- 71 Costello PS, Cleverley SC, Galandrini R, Henning SW, Cantrell DA. The GTPase rho controls a p53-dependent survival checkpoint during thymopoiesis. *J Exp Med*. 2000;192:77-85.
- 72 Yucel R, Karsunky H, Klein-Hitpass L, Moroy T. The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit<sup>+</sup> T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *J Exp Med*. 2003;197:831-844.
- 73 Su DM, Navarre S, Oh WJ, Condie BG, Manley NR. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat Immunol*. 2003;4:1128-1135.
- 74 Habas R, Kato Y, He X. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell*. 2001;107:843-854.
- 75 Arber C, BitMansour A, Sparer TE et al. Common lymphoid progenitors rapidly engraft and protect against lethal murine cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003;102:421-428.

- 76 Kondo M, Wagers AJ, Manz MG et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for clinical application. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:759-806.



## Figure Legends

**Figure 1. Surface phenotype of Lin<sup>-</sup> cell subsets in the wt thymus, wt LN, and OM<sup>+</sup> LN.** (A) To estimate the proportion of cells with DN1-DN4 phenotype, lymphoid cells were stained for CD25, CD44, and lineage markers (CD3 $\epsilon$ , CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , CD11b, CD45R/B220, Ly6C, Ly6G, NK1.1, TER-119, TCR $\beta$ , and TCR $\gamma$ ). Numbers in the various quadrants correspond to percentage of Lin<sup>-</sup> cells stained with CD25 and CD44. (B) Number of cells with DN1-DN4 phenotype in the three lymphoid organs (mean  $\pm$  SD; n = 3). (C) Expression of c-Kit on DN1 phenotype cells (Lin<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), and of Sca-1 on both c-Kit<sup>lo</sup> and c-Kit<sup>hi</sup> subsets are shown for each organ. (D) Number of c-Kit<sup>-</sup>, c-Kit<sup>lo</sup>, and c-Kit<sup>hi</sup> DN1 phenotype cells per 10<sup>6</sup> lymphoid cells. Gated Lin<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells were stained for c-Kit (mean  $\pm$  SD; n = 3). No DN1 phenotype c-Kit<sup>hi</sup> cells were detected in the wt and OM<sup>+</sup> LNs (\*). (E) Thymic DN1 subsets defined according to c-Kit levels were further characterized for expression of IL-7R $\alpha$ , HSA (CD24), and Sca-1. Negative control staining is shown as dotted lines in IL-7R $\alpha$  and Sca-1 panels. MFI is shown for IL-7R $\alpha$  staining. Data in (A), (C) and (E) are representative of one experiment out of three.

**Figure 2. T cell commitment of lymphoid progenitors in the LNs.** RT-PCR analysis of DN1 (A), pre-DN2 (B), and DN4 (E) cells sorted from wt thymus, wt LN and OM<sup>+</sup> LN. One step RT-PCR was done on the same mRNA samples for transcripts of interest and Hprt. (C) c-Kit expression on DN2 and DN3 subsets from wt thymus (dotted line) and OM<sup>+</sup> LN (solid line). Intracellular TCR $\beta$  (icTCR $\beta$ ) chain expression in DN3 (D) and

DN4 (F) subsets. (G)  $10^5$  sorted DN4 cells ( $\text{Lin}^- \text{CD8}^+ \text{CD44}^- \text{CD25}^-$ ) harvested from wt LNs were co-cultured on OP9-DL1 cells and analyzed for T cell development after 7 days of *in vitro* culture. Numbers indicate cell population percentages. In (F) and (G), dotted lines represent staining with isotype control antibodies.

**Figure 3. Survival and proliferation of DN cells are impaired in wt LN.** (A) Analysis of cell cycle status of DN phenotype cells. Forty min after injection of 1 mg BrdU i.p., mice were sacrificed, and cells were stained with 7AAD and antibodies against BrdU, CD25, CD44 and lineage markers. Numbers correspond to the percentages of cells in the  $G_{1/0}$ , S, and  $G_2+M$  phase of the cell cycle. One representative experiment out of three. (B)  $\text{Lin}^- \text{CD44}^+ \text{c-Kit}$  subsets in cycling thymocytes. Mice received two injections (1mg each) of BrdU at 2h interval. 24h later, prepared cells were stained with antibodies against BrdU, CD44, c-Kit and lineage markers (which included CD25). One representative experiment out of three. (C) Percentage of AnnexinV<sup>+</sup> cells in wt thymus, wt LN, and OM<sup>+</sup> LN.

**Figure 4. Quantitative real time PCR analysis on thymic and lymph node stromas and OP9 DL-1 cells.** (A) mRNA expression profile of selected genes in the stroma of wt thymus and LN, OM<sup>+</sup> LN, and OP9 DL-1 cells. (B) levels of *Wnt4* transcripts in the stromal and lymphoid fraction of lymphoid organs. mRNA values were normalized according to Hprt and thymic stroma mRNA levels were set as 1. Data are mean  $\pm$  SD from three or four independent experiments (\* indicates no detectable mRNA after 50 amplification cycles). Differences between groups were evaluated with Student's t test.

Levels of statistical significance for comparison of wt thymus vs. wt LN are ¥  $P < .04$ , §  $P < .005$ , and ‡  $P < .0001$ . † Levels of DL-1 transcripts for OP9 DL1 cells ( $715 \pm 55$ ) are not shown on the graph.

**Figure 5. Wnt and LIF/OM signaling pathways in DN cells.** Real-time RT-PCR assays and FACS analysis measuring gene and protein expression in DN1 (A, B), pre-DN2 (C, D), and DN4 (E, F) cells sorted from lymphoid organs. The mRNA levels of the wt thymus for DN1 (A) and DN4 (E) cells, and of wt LN for pre-DN2 (C) cells were set as 1. Hprt mRNA levels were used to normalize cDNA content among subpopulations. Data are mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Differences between groups were evaluated with Student's t test. Levels of statistical significance for comparison of wt thymus vs. wt LN are \* $P < .02$  and \*\* $P < .003$ , and for comparison of wt LN vs. OM<sup>+</sup> LN, † $P < .04$ , †† $P < .008$ , and ††† $P < 2 \times 10^{-6}$ . For protein expression, intracellular (bcl-2 and phospho-Stat3 (P-Stat3)) and surface staining (CD44) were done (B, D and F) on wt thymus (black line), wt LN (shaded histograms) and OM<sup>+</sup> LN (thick grey line) DN cells. Secondary antibody was used as a negative control for P-Stat3 staining (dotted line).

**Figure 6. c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> and c-Kit<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> progenitors display different differentiation potential when grown on OP9 and OP9-DL1 cells.** The following subsets of Lin<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> DN1 cells were sorted: c-Kit<sup>lo</sup>Sca-1<sup>+</sup> cells from the thymus, wt LN and OM<sup>+</sup> LN, and c-Kit<sup>hi</sup>Sca-1<sup>+</sup> cells from the thymus. These DN1 cell populations were plated on confluent monolayer of (A) OP9 cells or (B) OP9-DL1 cells, and analyzed by flow cytometry at the indicated time points. Fold expansion was

measured by dividing the number of cells harvested by the number of cells initially plated. The analysis is of one representative experiment out of three.

**Figure 7. LN c-Kit<sup>lo</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> progenitors can complete T cell development when grown on OP9-DL1-Wnt4 cells.** (A)  $4 \times 10^3$  sorted DN1 cells (Lin<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Scal<sup>+</sup>c-kit<sup>lo</sup>) from wt LN were plated on 6-well tissue culture plates containing a confluent monolayer of OP9-DL1 cells expressing or not Wnt4, and analyzed by flow cytometry after 12 days in culture. (B)  $10^5$  sorted DN4 cells (Lin<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) harvested from wt LN were co-cultured on OP9-DL1 cells overexpressing or not Wnt4, and analyzed on day 7. Numbers indicate cell population percentages. The analysis is of one representative experiment out of two.

Figure 1-1

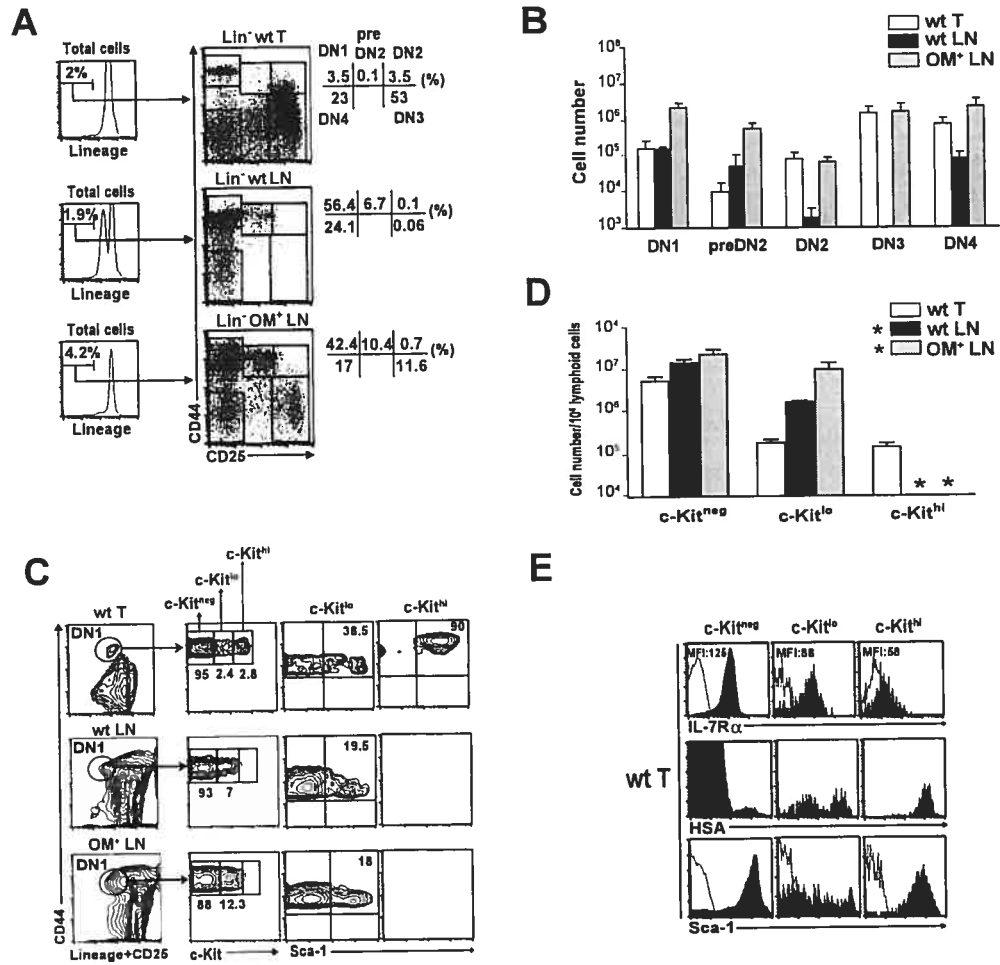


Figure 1-2

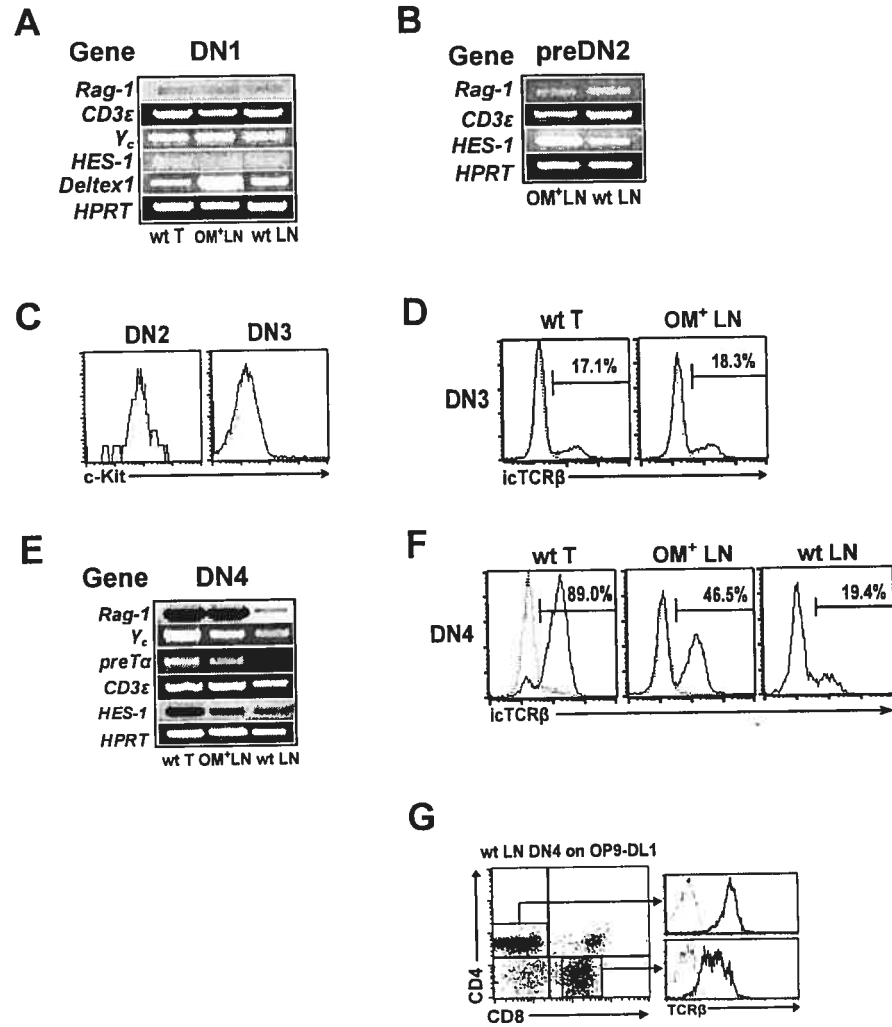


Figure 1-3

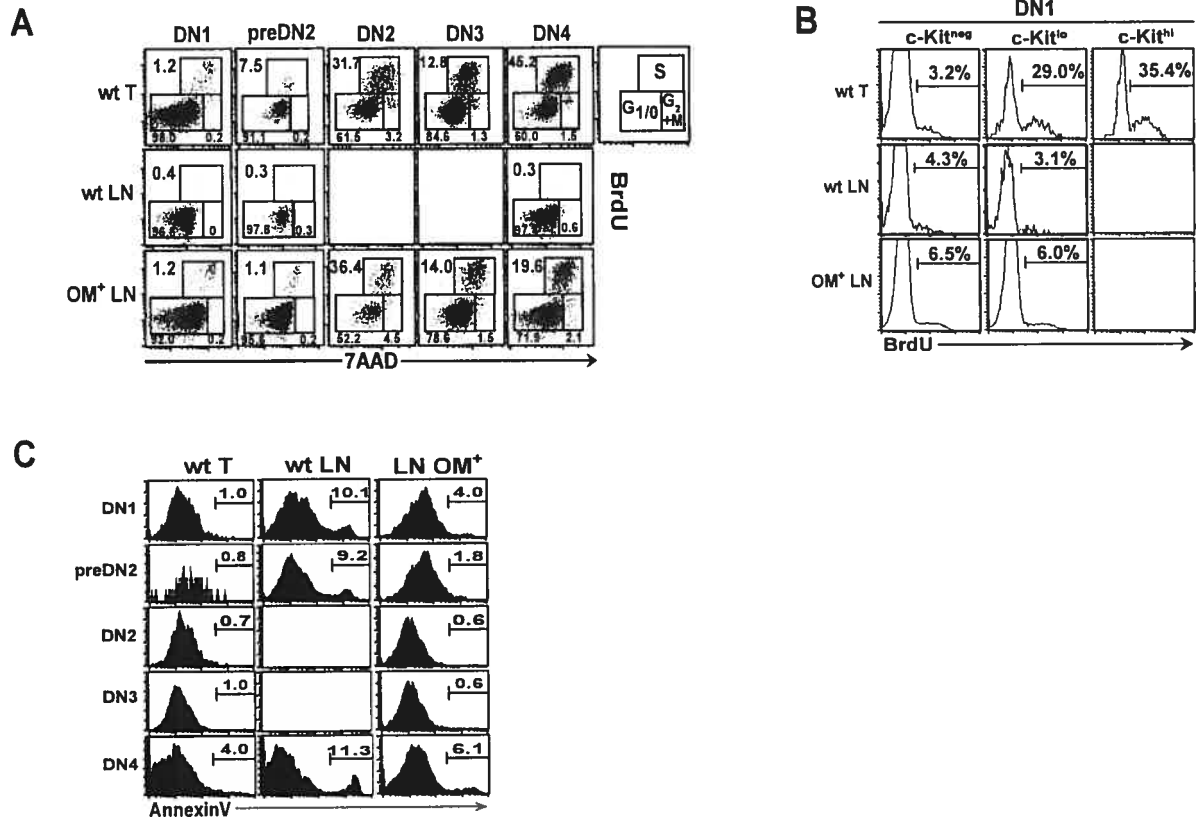


Figure 1-4

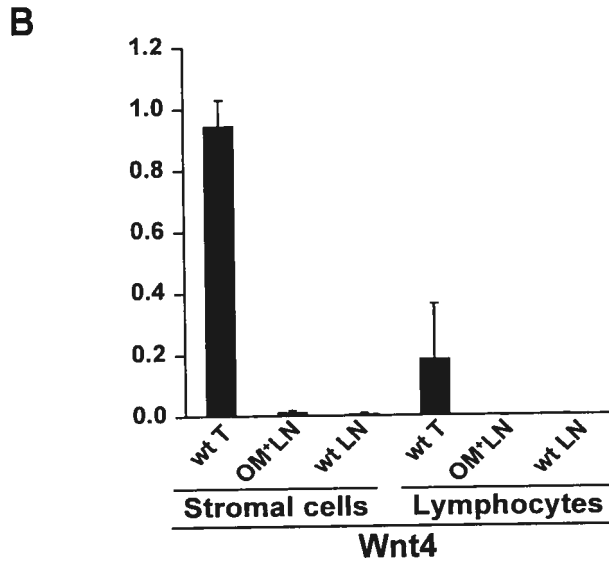
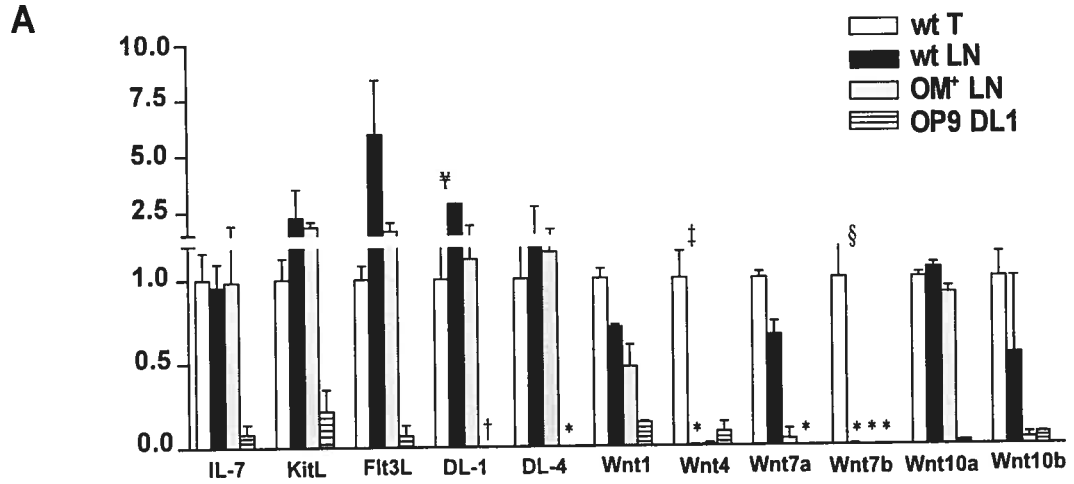




Figure 1-5

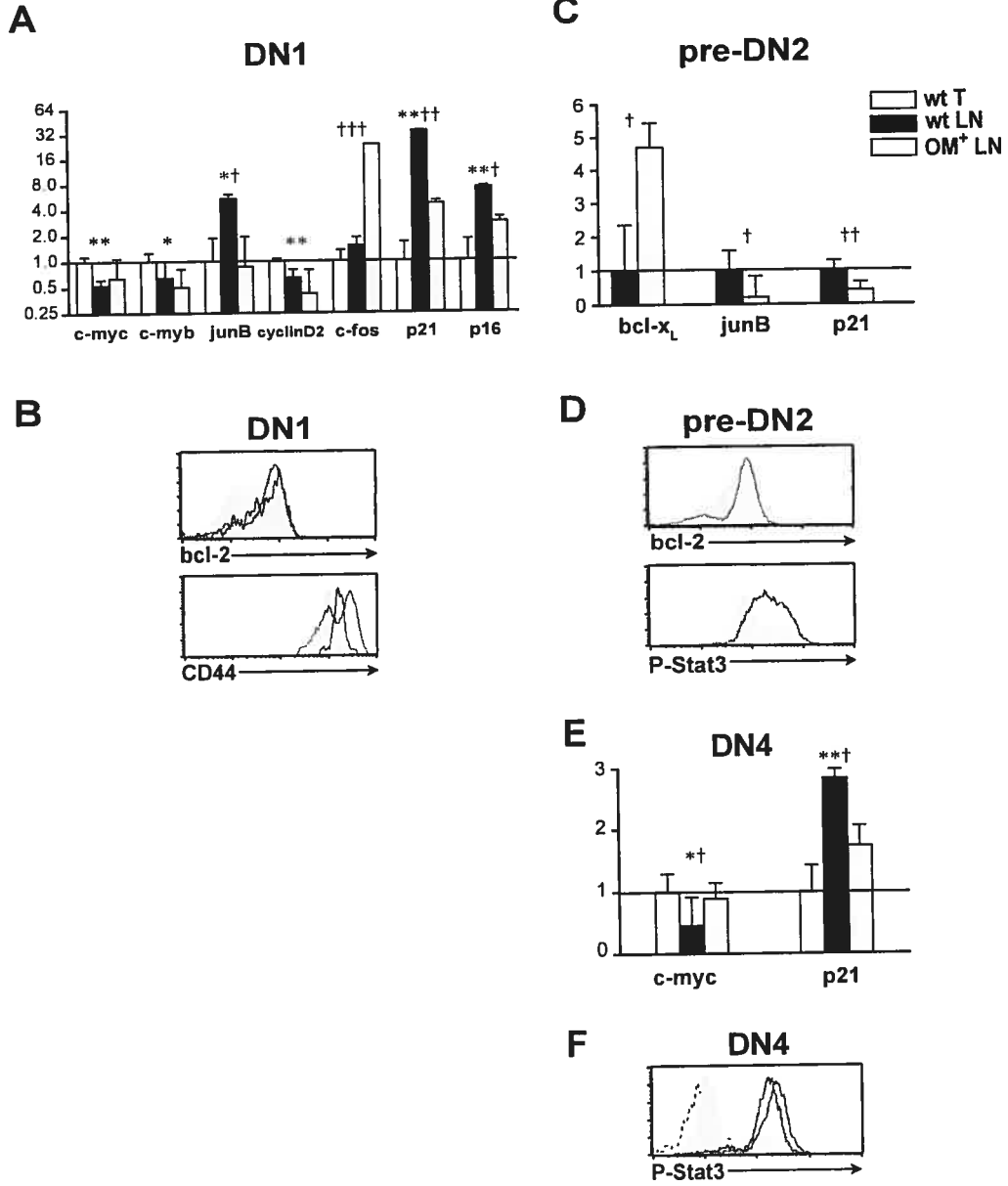


Figure 1-6

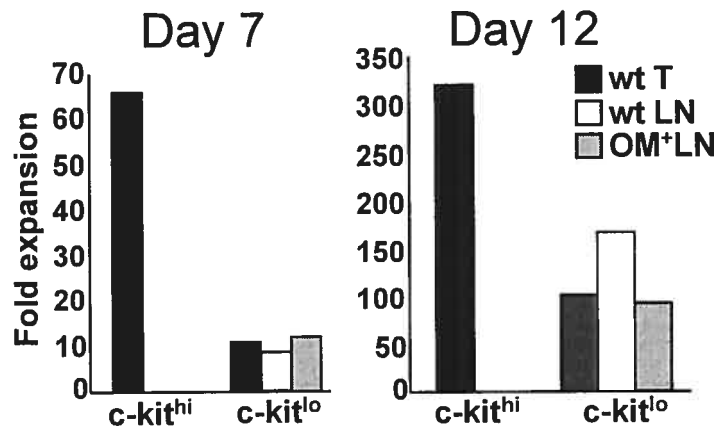
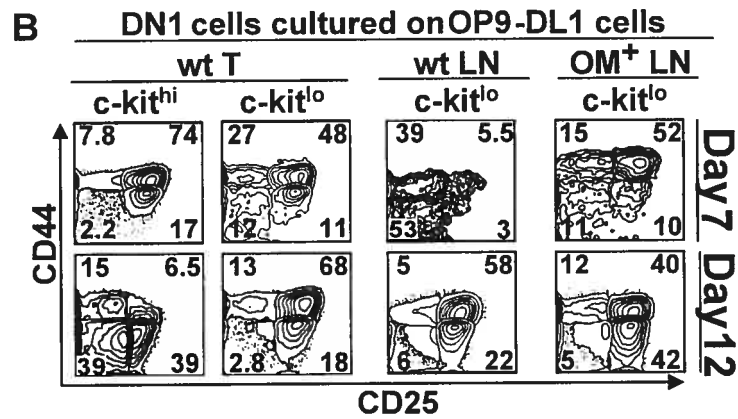
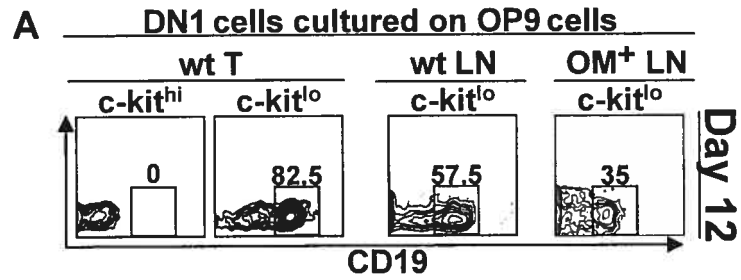


Figure 1-7

