

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

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

NOTICE

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

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

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

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

Université de Montréal

**Étude de la fonction et de la régulation homéostatique des
lymphocytes T extrathymiques**

par

Marie-Eve Blais

Institut de recherche en immunologie
et en cancérologie (IRIC)

Département de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

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

Juin 2008

© Marie-Eve Blais, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude de la fonction et de la régulation homéostatique
des lymphocytes T extrathymiques.**

présentée par :

Marie-Eve Blais

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Françoise Le Deist
président-rapporteur

Claude Perreault
directeur de recherche

Abdelaziz Amrani
membre du jury

Alain Lamarre
examineur externe

Résumé

L'homéostasie des cellules T est maintenue grâce à un équilibre entre la production, la prolifération et la mort des cellules T périphériques. Le thymus est généralement reconnu en tant que site privilégié de développement des cellules T. Cependant, les cellules T peuvent également être produites à l'extérieur du thymus. La capacité des cellules T extrathymiques à générer une réponse immune protectrice n'est pas définie dû aux faibles nombres de cellules produites chez les souris athymiques, ce qui restreint la réalisation d'études fonctionnelles. La sur-expression d'Oncostatin M (OM) sous le contrôle du promoteur proximal P56^{Lck}, induit le développement extrathymique d'un nombre élevé de cellules T dans les ganglions. Les cellules T OM⁺ sont sélectionnées sur les cellules hématopoïétiques des ganglions et possèdent constitutivement un phénotype mémoire ainsi qu'un taux de prolifération rapide.

Le premier objectif de cette thèse consistait à déterminer la capacité des cellules T OM⁺ à générer une réponse immune protectrice. Afin de réaliser ceci, nous avons analysé la capacité des cellules T extrathymiques à reconnaître et à éliminer le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV). Nous avons observé que les cellules T OM⁺ répondaient plus rapidement au LCMV que les cellules T thymiques et qu'elles limitaient la réplication du virus au cours des premiers stades de l'infection. Cependant, le contrôle du LCMV par les cellules T OM⁺ n'est que temporaire puisqu'elles meurent précocément par apoptose. Nous avons également constaté que les cellules T OM⁺ étaient déjà susceptibles à l'apoptose avant que les souris ne soient infectées par le LCMV. Ceci indique que l'homéostasie des cellules T extrathymiques OM⁺ est constitutivement perturbée.

Le second objectif de cette thèse visait à établir pourquoi les cellules T OM⁺ étaient susceptibles à l'apoptose. Nous avons évalué l'expression de facteurs de survie cellulaire (IL-7R α et Bcl-2) et de molécules apoptotiques (Fas et Fas-L) chez

les cellules T OM^+ . Nous avons observé que, comparativement aux cellules T thymiques, les cellules T $CD4^+ OM^+$ exprimaient moins d'IL-7R α et de Bcl-2 et que les cellules T $CD8^+ OM^+$ exprimaient davantage Fas et Fas-L. Nous avons montré que l'IFN- γ est responsable de l'augmentation de l'expression de Fas et de Fas-L chez les cellules T OM^+ ainsi que de l'augmentation de la proportion de cellules T régulatrices (Treg) extrathymiques. Finalement, nous avons observé un 'patron apoptotique' similaire entre les cellules T en prolifération homéostatique (PH) et les cellules T OM^+ . Nous avons conclu que l'apoptose des cellules T OM^+ était causée par leur constante PH.

Nous proposons qu'en absence du thymus, la perturbation de l'homéostasie des cellules T extrathymiques OM^+ est causée par une apoptose spontanée et une accumulation de Treg activés. Nous démontrons que la nature des cellules impliquées dans le processus de sélection positive influence considérablement la fonction des cellules T et que les cellules épithéliales thymiques sont nécessaires au développement de cellules aptes à générer une immunité protectrice. Les résultats de nos travaux contribuent à l'avancement des connaissances portant sur l'homéostasie et le développement des cellules T.

Mots-clés: cellules T extrathymiques, homéostasie, apoptose, cytokines, cellules T régulatrices, prolifération homéostatique, thymus, réponse anti-virale, cellules T mémoires, souris transgénique.

Abstract

Peripheral T cell homeostasis is maintained through a tight balance between T cell production, proliferation and death. It is widely recognized that the thymus plays a central role in the regulation of T cell homeostasis and development. However, a growing body of evidence indicates that T cell development can occur in the absence of a thymus. The functionality of extrathymic T cells is still being debated since functional studies involving extrathymic T cells are impeded by the limited numbers of cells found in athymic mice. Overexpression of Oncostatin M (OM) under the P56^{Lck} promoter induces massive extrathymic T cell development in the lymph nodes. This pathway is thymus-independent and is exclusive to the lymph nodes where T cells are positively selected on hematopoietic cells. Extrathymic T cells generated in LckOM mice (OM⁺ T cells) constitutively display a memory-like phenotype and have an accelerated turnover rate.

The primary objective of this thesis was to determine whether OM⁺ T cells were able to generate a protective immune response. To achieve this, we compared Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV)-specific CD8⁺ T cell responses and virus clearance by extrathymic OM⁺ versus conventional thymically-produced T cells. We found that consistent with their memory phenotype, OM⁺ T cells proliferate faster than thymic T cells *in vivo* in response to LCMV infection and that viral replication was efficiently controlled by OM⁺ T cells during the early phase of infection. However, LCMV clearance is curtailed by early apoptosis of OM⁺ T cells during LCMV infection. Furthermore, we showed that OM⁺ T cells were already prone to apoptosis before LCMV infection, indicating that T cell homeostasis is constitutively disrupted in LckOM mice.

The second objective of this thesis was to determine why OM⁺ T cells were spontaneously susceptible to apoptosis. To achieve this, we assessed expression of several key regulators of T cell survival (IL-7R α and Bcl-2) and cell death mediators

(Fas and Fas-L). We found that, compared to thymic T cells, CD4⁺ OM⁺ T cells downregulated IL-7R α and Bcl-2, whereas CD8⁺ OM⁺ T cells overexpressed Fas and Fas-L. Moreover, IFN- γ upregulated Fas-L on OM⁺ T cells and stimulated expansion of OM⁺ regulatory T cells (Treg). We found that apoptosis-related molecules were modulated in a similar fashion between OM⁺ T cells and T cells in HP. We concluded that apoptosis of extrathymic T cells was a consequence of their sustained HP.

We propose herein that in the absence of a thymus, T cell homeostasis is deeply disrupted. We observed that spontaneous apoptosis of extrathymic OM⁺ T cells and T cells in HP and massive Treg accumulation are feedback mechanisms aimed at limiting proliferation of autoreactive clones. Our results provide important insights on fundamental immunology issues such as T cell homeostasis, T cell development en peripheral tolerance.

Key Words: extrathymic T cells, homeostasis, apoptosis, cytokines, regulatory T cells, homeostatic proliferation, thymus, anti-viral response, memory T cells, transgenics.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des figures et tableaux	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Remerciements.....	xiii
INTRODUCTION	1
1 Homéostasie des lymphocytes T.....	1
1.1. Compartiments lymphocytaires T	1
1.2. Lymphopénie et prolifération homéostatique.....	2
2 Régulation de la survie des cellules T.....	5
2.1. Signaux de survie des lymphocytes T naïfs	5
2.2. Signaux de survie des lymphocytes T activés et mémoires	8
2.3. Mécanismes d'apoptose des lymphocytes T	10
3 Développement des lymphocytes T.....	13
3.1. Structures spécialisées du thymus	13
3.2. Développement extrathymique des cellules T et Oncostatin M.....	17
3.3. Fonction des cellules T extrathymiques	21
RÉSULTATS	25
<i>Premier article</i>	<i>26</i>
Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses?.....	26
<i>Deuxième article.....</i>	<i>63</i>

Why T cells of thymic versus extrathymic origin are functionally different.	63
.....	
<i>Troisième article</i>	113
T cell development: an extrathymic perspective	113
<i>Figures supplémentaires</i>	153
DISCUSSION	156
1. <i>Efficacité des lymphocytes T extrathymiques dans un contexte d'infection virale</i>	156
2. <i>Mécanismes d'apoptose spontanée des lymphocytes T extrathymiques.</i>	162
3. <i>Perturbation de l'homéostasie des lymphocytes T extrathymiques</i>	172
4. <i>Rôle du thymus et développement T extrathymique : mise en perspective</i>	181
CONCLUSION	185
Contribution aux articles	189
Bibliographie	193

Liste des figures et tableaux

- Figure 1) Les deux principales voies apoptotiques actives chez les cellules T. 12
- Figure 2) Développement extrathymique des cellules T dans les ganglions des souris LckOM. 19
- PREMIER ARTICLE** : Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses?
- Figure 3) *In vitro* proliferation of T lymphocytes of thymic versus extrathymic origin. 55
- Figure 4) Compared with control T cells, extrathymic T lymphocytes show a higher apoptosis rate and produce more IFN- γ . 56
- Figure 5) LCMV GP33-specific CTL responses generated by thymus derived vs. extrathymic T cells following infection with LCMV-ARM and LCMV-WE. 57
- Figure 6) Clearance of LCMV-ARM and LCMV-WE by thymus-derived and extrathymic T cells. 58
- Figure 7) *In vivo* CTL cytotoxicity against GP33-41 coated cells in B6 mice and OM \rightarrow RAG1^{-/-} chimeras after immunization with DCs. 59
- Figure 8) Failure of extrathymic T cells to control LCMV-ARM following adoptive transfer in RAG1^{-/-} mice. 60

Figure 9) Antibody response to LCMV-WE and VSV-IND in OM→RAG1^{-/-} chimeras vs. control mice. 61

Table 1) Quantitative dynamics of thymic and extrathymic T cell proliferation *in vitro* 62

DEUXIÈME ARTICLE : Why T cells of thymic versus extrathymic origin are functionally different.

Figure 10) Features of extrathymic T cells in OM-transgenic mice 103

Figure 11) Apoptosis of thymus-derived (thymic) and extrathymic T cells 104

Figure 12) Non-transgenic extrathymic T cells share key features of OM-transgenic T cells. 105

Figure 13) Apoptosis of extrathymic CD4 T cells is non cell-autonomous and correlates with low expression of IL-7R α and Bcl-2. 106

Figure 14) Overproduction of IL-2 and IFN- γ by extrathymic T cells. 107

Figure 15) The role of IFN- γ in regulation of extrathymic T-cell survival. 108

Figure 16) Lack of IFN- γ receptor improves survival of thymus-derived CD8 T cells in HP. 109

Figure 17) Increased frequency of Treg cells correlates with IFN- γ overproduction. 110

Figure 18)	Extrathymic CD4 ⁺ CD25 ⁺ T cells show high <i>in vitro</i> suppressive activity.	111
Figure 19)	Proposed model explaining how spontaneous HP and cytokine overproduction bring on apoptosis of extrathymic T cells.	112
TROISIÈME ARTICLE : T cell development, an extrathymic perspective.		
Figure 20)	Important features of hemato-lymphoid organs in wt and OM-transgenic mice.	150
Figure 21)	Expression of <i>Aire</i> and Aire regulated transcripts in thymic and LN stromal cells.	151
Figure 22)	Relative expansion kinetics of NK cells and $\alpha\beta$ T cell subsets.	152
Figure 23)	Détection des concentrations d'IL-7 à l'intérieur des organes lymphoïdes des souris LckOM et WT.	154
Figure 24)	Expression de l'IL-7R α chez les cellules T CD4 ⁺ d'origine thymique et extrathymique selon l'expression de FoxP3.	155

Liste des sigles et abréviations

AIRE :	Autoimmune Regulator
APC :	Antigen Presenting Cell; cellule présentatrice d'antigène
Bcl-2 :	B-cell lymphoma 2
Cellules T OM⁺ :	Lymphocytes T extrathymiques produits dans les ganglions de la souris LckOM
DN :	Double negative
DP :	Double positive
EAE :	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EOMES :	Eomesodermine
IFN-γ :	Interféron gamma
IEL :	Intestinal Intraepithelial Lymphocytes
IL :	Interleukine
JAK :	Janus kinase
LCMV :	Virus de la chorioméningite lymphocytaire
PD-1 :	<i>Programmed Death 1</i>
PH :	Prolifération homéostatique
TE :	Lymphocyte T effecteur
TM :	Lymphocyte T mémoire
TN :	Lymphocyte T naïf
TCR :	T Cell Receptor, récepteur de cellule T
TEC :	Thymic Epithelial Cells; cellules épithéliales thymiques
TGF-β :	Transforming Growth Factor- β
TREC :	TCR Excision Circle
Treg :	Lymphocyte T régulateur
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
VSV :	Virus de la stomatite vésiculeuse
WT :	de type sauvage

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Claude Perreault, pour m'avoir accordé la chance de faire partie de son équipe pendant ces huit années. J'ai profité de sa supervision constante tout en étant encouragée à développer une créativité, une autonomie ainsi qu'une rigueur scientifique qui me seront utiles dans le cadre de ma future carrière de chercheuse. Sa passion pour la recherche fût pour moi, une source d'inspiration tout au long de mes études graduées.

Je remercie également mes collègues de laboratoires, tout particulièrement Marie-Christine Meunier, Isabelle Louis, Caroline Côté, Jean-Sébastien Delisle, Étienne Caron et Rafik Terra avec qui j'ai partagé mon apprentissage de la recherche ainsi que plusieurs joies et déceptions. Ce fût un réel plaisir de côtoyer une équipe aussi compétente, stimulante et sympathique. J'aimerais aussi remercier Sylvie Brochu et Chantal Baron pour leurs encouragements pendant les moments plus difficiles.

Sur une note plus personnelle, j'aimerais remercier mon mari, Christian Martel pour son soutien, sa compréhension et son intérêt envers la réalisation de ce projet ainsi que pour son aide dans la mise en page de cette thèse. Je remercie également mon amie, Danielle Tremblay pour sa présence et ses encouragements. Finalement, je remercie ma famille qui m'a constamment épaulée depuis le tout début.

Ce projet a été réalisé grâce au soutien financier de l'Institut National du Cancer du Canada et de la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal.

INTRODUCTION

1 Homéostasie des lymphocytes T

1.1. Compartiments lymphocytaires T

Chez les vertébrés, le maintien des populations lymphocytaires T est essentiel au développement d'une immunité efficace et durable. Les cellules T sont séparées en deux groupes principaux: les cellules T naïves (TN) et les cellules T mémoires (TM). Dans un contexte non infectieux, les deux compartiments lymphocytaires T sont maintenus de façon indépendante. En effet, l'exportation de cellules T par le thymus renouvelle la population de TN sans affecter le nombre de TM (1). À l'inverse, lorsque le nombre de TN diminue suite au vieillissement ou à une maladie virale, le nombre de TM reste constant indiquant qu'ils ne comblent pas l'espace laissé vacant par les TN (2). Cette régulation assure le maintien d'un répertoire T diversifié chez les TN tout en procurant une capacité de réponse rapide contre des pathogènes récurrents par les TM. Les nombres de lymphocytes T contenus à l'intérieur des compartiments périphériques sont relativement constants jusqu'à ce que la production thymique diminue avec le vieillissement. La stabilité des compartiments des TN est assurée par un équilibre entre l'intégration de cellules nouvellement produites par le thymus et la mort des TN en périphérie. Par exemple, suite à de multiples greffes de thymi, le nombre de TN périphériques n'est pas significativement augmenté chez la souris (3). Considérant que lorsque pleinement fonctionnel, le thymus produit environ deux millions de nouvelles cellules T par jour chez une souris adulte, seule une infime fraction de ces cellules n'est intégrée au compartiment de TN (4, 5).

L'homéostasie des cellules TN est assurée grâce à des mécanismes compensatoires. Puisque le thymus involue à partir de l'âge de un an et que les cellules TN possèdent une espérance de vie limitée, les TN devraient disparaître complètement au bout d'une dizaine d'années. Ce n'est toutefois pas le cas. Il est indéniable que le nombre de TN est significativement réduit suite au vieillissement puisque leur nombre est indexé à la production thymique (6). Par contre, les TN sont encore présents chez des humains âgés de plus de 65 ans puisqu'une prolifération accrue des TN assure en partie leur auto-renouvellement (7). En accord avec ceci, Tanchot *et al* ont proposé que la survie des TN est accrue lorsqu'ils sont présents en faibles nombres, facilitant ainsi l'accès aux ressources et signaux normalement limités (6). En contrepartie, le maintien des TM ne dépend pas essentiellement de la production thymique puisque, contrairement aux TN, ces cellules prolifèrent en absence de leur antigène spécifique (6). La conversion des TN en TM au cours d'un processus appelé prolifération homéostatique (PH) contribue également à alimenter le réservoir en TM. En somme, le maintien de l'homéostasie des TN repose sur un équilibre entre d'une part, l'approvisionnement provenant du thymus et la prolifération cellulaire et d'autre part, la perte par apoptose ou par différenciation en cellules T effectrices (TE) suite à l'activation. Conjointement à cela, l'homéostasie des TM est maintenue par une prolifération cellulaire soutenue et la différenciation des TN en TM, processus contrebalancés par la mort par apoptose.

1.2. Lymphopénie et prolifération homéostatique

Le processus de PH fait référence à la capacité des TN à se diviser rapidement en absence de leur antigène spécifique dans un contexte de lymphopénie (carence en lymphocytes T). La réduction soudaine du nombre de cellules T périphériques survient généralement suite à l'administration de traitements médicaux (chimiothérapie, radiothérapie, etc.), ou dans certains contextes physiologiques (nouveau-né, infections, etc.). À l'origine, la PH fut désignée ainsi puisqu'elle était perçue comme un mécanisme compensatoire permettant de renflouer le réservoir de TN suite à une diminution de la productivité thymique (8). Ceci s'avéra rapidement

faux puisque les TN en PH acquièrent rapidement un phénotype typique des TM caractérisé par l'expression de marqueurs d'activation (CD44) et une capacité proliférative accrue. En conséquence, les cellules T récupérées suite à la PH ne font plus partie du groupe des TN. De plus, il est clair que la PH à elle seule ne parvient pas à combler le vide causé par la lymphopénie à l'intérieur des organes périphériques. Ceci est dû au fait que suite au transfert de TN chez un hôte lymphopénique, le nombre de TM produits suite à la conversion des TN en TM est inférieur aux nombres de TM présents en situation d'homéostasie (6, 9, 10). En contrepartie, l'injection d'un faible nombre de TE ou de TM chez des receveuses lymphopéniques suffit à rétablir les nombres de cellules T à des niveaux homéostatiques (1, 11, 12). Ces faits mettent en évidence des différences importantes dans la régulation des cellules TN et TM ainsi que leurs capacités respectives à reconstituer un hôte lymphopénique.

Les cellules TN et TM possèdent des potentiels différents en terme de survie, prolifération et fonctions effectrices. Normalement, les TN se divisent très peu, permettant tout juste l'auto-renouvellement de la population (10, 13). Les TN expriment quelques récepteurs les rendant sensibles à des cytokines de survie telles que l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-7, mais ne possèdent pas de fonctions effectrices sans stimulation (14). À l'opposé, les cellules TM prolifèrent d'emblée et acquièrent rapidement de puissantes fonctions effectrices et lytiques lorsqu'elles sont stimulées (15). La prolifération des TM dans un contexte non infectieux leur confère une capacité d'auto-renouvellement supérieure à celles des TN (6, 16). Par exemple, en contexte de PH, les TM empêchent la prolifération et l'activation des TN, prévenant ainsi l'accumulation et l'acquisition d'un phénotype mémoire par les TN (2, 17). Les TM se distinguent également des TN par l'expression de marqueurs d'activation. Par exemple, l'expression de la molécule d'adhésion CD44 présente à de faibles niveaux chez les TN (CD44^{low}) augmente suite à l'acquisition de fonctions effectrices et est fortement exprimée par les TM (CD44^{high}). L'acquisition d'un phénotype mémoire est également caractérisée par l'expression de récepteurs divers tels que CD69, CD54 (ICAM-1), CD11a (LFA-1), CCR7, CCR5, CCR4, CCR8, CCR2, CXCR4 et CXCR2

(18-20). Le marqueur CD25 (IL-2R α) est principalement exprimé chez les TM CD4⁺ tandis que CD122 (IL-2R β), CD43, Ly6C sont davantage retrouvés chez les TM CD8⁺ (10, 19).

L'impact de la PH sur les cellules T n'est pas restreint à l'acquisition de marqueurs phénotypiques. Le processus est également accompagné d'une division cellulaire accélérée ainsi que de l'acquisition de fonctions effectrices telles que la sécrétion d'interféron gamma (IFN- γ), de granzyme B et de perforine. Lorsque les TN sont convertis en TM dans un contexte de PH, ils subissent une modulation génétique extrêmement similaire à celle observée chez les TM ayant répondu à un antigène spécifique. Des analyses de micro-puces d'ADN ont démontré que jusqu'à 95% des gènes induits chez les TM le sont également chez les cellules T en PH (19). De plus, les gènes dont l'expression est réprimée chez les TM et les TE sont également inactivés chez les cellules T en contexte de PH, ce qui indique que le patron d'expression génique chez ces trois populations est identique. Cependant, les changements d'expression génique survenant chez les cellules T en HP sont moins prononcés que chez les TM et les TE. L'activation des cellules T pendant la PH survient suite à la reconnaissance des peptides du soi présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le signal produit lors de cette interaction est moins intense que le signal généré suite à la reconnaissance d'un antigène étranger dans un contexte infectieux. La puissance des fonctions effectrices des cellules T est proportionnelle à l'intensité et/ou à la durée du signal reçu par le TCR, ceci explique que les modifications géniques survenant pendant la PH soient de faible intensité. (21, 22). De plus, l'expression de plusieurs gènes-clés de la cytolyse n'est pas augmentée chez les cellules T en PH, en conséquence les fonctions effectrices des cellules T en PH ne sont pas aussi puissantes que celles des TM (6, 19). En conséquence, les cellules T en PH possèdent des fonctions effectrices supérieures celle des cellules TN, mais inférieures à celles des TE et des TM.

2 Régulation de la survie des cellules T

2.1. Signaux de survie des lymphocytes T naïfs

La survie des lymphocytes TN est un processus actif dépendant de deux signaux essentiels : la stimulation continue du TCR et la liaison de l'interleukine (IL) 7 à son récepteur spécifique (IL-7R) (23). Ces signaux n'induisent pas la prolifération des TN, mais leur permettent de survivre sur de longues périodes dans un état de quiescence (24). Plusieurs études ont démontré que l'interaction des TCR avec les molécules du CMH est indispensable à la survie des cellules TN. Tanchot *et al* ont montré que les cellules T CD8⁺ disparaissaient suite à leur transfert chez des receveuses n'exprimant pas de CMH de classe I ($\beta 2M^{-/-}$) ou un CMH d'haplotype différent de celui des cellules transférées (16). Takeda *et al*, avaient préalablement démontré, selon un devis expérimental semblable, que la présence des CMH de classe II était essentielle à la survie des cellules T CD4⁺ (23, 25, 26). Contrairement aux TN, la survie des TM ne nécessite pas la présence de leur antigène spécifique et semble indépendante d'un contact avec les molécules du CMH; la survie étant alors assurée par des cytokines telles que l'IL-15 pour les cellules T CD8⁺ et l'IL-7 pour les cellules T CD4⁺ (23, 27-30). Par contre, la stimulation des TCR chez les TM est requise puisque l'ablation de ce complexe entraîne la disparition complète des TM CD8⁺ (26). Ceci concorde avec plusieurs études ayant montré que la présence des molécules de CMH allogéniques contribuaient au maintien des TM (16, 31-33). Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que les signaux issus d'un contact non spécifique avec les molécules de CMH contribuent à l'homéostasie des TM, mais qu'ils ne sont pas requis pour la survie et la prolifération de cette population (31).

La survie de toutes les cellules TN et TM dépend de l'IL-7 tel que démontré par l'absence de cellules T chez des souris ne produisant pas cette cytokine (34, 35). À l'intérieur des organes lymphoïdes, l'IL-7 est produite par les cellules stromales et dendritiques à un niveau constitutivement fixe (indépendant de facteurs extrinsèques tel que la taille de la population T) (36, 37). Le signal de survie transmis par l'IL-7

est acheminé via son récepteur spécifique constitué d'une chaîne commune γ_c (CD132) ainsi que d'une chaîne spécifique IL-7R α (CD127) (38). La liaison de l'IL-7 à son récepteur induit la phosphorylation de la *Janus kinase 1* (JAK1) et de JAK3, ce qui mène à la phosphorylation du *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5) (37, 39). Ceci transmet un signal de survie puissant en activant la transcription de gènes de survie cellulaire tels que le *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) et en séquestrant les facteurs pro-apoptotiques BAX et BAD (37, 40, 41). Outre l'IL-7, d'autres cytokines dont les récepteurs partagent la chaîne γ_c , interviennent dans la génération, la survie et l'homéostasie des différentes populations de TN. Par exemples, l'IL-15 est essentielle à la survie des TN CD4⁺ et CD8⁺ et des TM CD8⁺ tandis que l'IL-21 contribue à la survie et à la prolifération des TN et des TM (42). Une autre cytokine de la famille γ_c , l'IL-2 est nécessaire à la tolérance périphérique puisqu'elle est essentielle à la survie des cellules T régulatrices (Treg) CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (43). Cette dépendance des Treg pour l'IL-2 est illustrée par l'absence presque complète de ces cellules chez des souris IL-2^{-/-}, CD25^{-/-} et CD122^{-/-}. Ces souris développent spontanément un syndrome auto-immun mortel caractérisé par un nombre anormalement élevé de TE (44). Certaines évidences démontrent également que l'IL-2 favorise la survie des TN en stimulant la synthèse de Bcl-2 (45, 46). En somme, les signaux acheminés par l'IL-2 et l'IL-7 jouent un rôle critique dans la régulation de l'homéostasie T (47). La survie des cellules T est régulée par le niveau d'expression des récepteurs de cytokines, lequel dépend du degré d'activation des cellules ainsi que de la disponibilité des différentes cytokines (28). Contrairement aux autres récepteurs de cytokines partageant la chaîne γ_c , l'IL-7R α est presque exclusivement exprimé par des cellules de la lignée lymphoïde (37). L'expression de l'IL-7R α contrôle l'intensité du signal de survie acheminé par l'IL-7 puisque la synthèse de cette cytokine est constitutive et stable. La taille de la population des TN est donc déterminée par la disponibilité en IL-7 et l'accès aux complexes CMH + peptides du soi (10).

Le niveau d'expression de l'IL-7R α est généralement relié à la force du signal de survie reçu. Cependant, cette relation dépend des populations de cellules T

étudiées. D'une part, Kaech *et al* ont démontré *in vivo* dans un contexte d'infection au LCMV qu'une expression élevée de l'IL-7R α corrélait avec la réception d'un signal de survie et de prolifération (48). Les cellules T exprimant fortement le IL-7R α (IL-7R α^{high}) au début de l'infection possédaient un avantage de survie par rapport aux cellules exprimant de faibles niveaux de l'IL-7R α (IL-7R α^{low}) (48, 49). De plus, suite au transfert des cellules IL-7R α^{high} ou IL-7R α^{low} chez une receveuse WT, les nombres de cellules récupérées étaient supérieurs lorsque les cellules transférées étaient IL-7R α^{high} , illustrant la supériorité de cette population en terme de survie. Cependant, une autre étude a prouvé qu'une faible expression de l'IL-7R α était représentative d'une excellente capacité de survie des cellules T. En effet, Park *et al* ont prouvé, dans un système de culture *in vitro*, que la signalisation par l'IL-7 réprimait la transcription du gène de l'IL-7R α , réduisant subséquemment l'expression de la protéine en surface (38). De plus, les auteurs ont observé que la transcription de l'IL-7R α était également diminuée par d'autres cytokines de survie telles que l'IL-2, IL-4, IL-6 et IL-15 et plus modérément par l'IFN- γ (50). Les auteurs ont proposé que la diminution de l'expression de l'IL-7R α par l'IL-7, restreindrait la consommation de la cytokine par les cellules T ayant déjà reçu ce signal (38). Ce mécanisme viserait à augmenter la disponibilité en l'IL-7 pour que les cellules T n'ayant pas déjà interagit avec la cytokine puissent à leur tour bénéficier du signal de survie (51). Les conclusions des deux études citées ci-haut semblent diamétralement opposées, toutefois les contextes dans lesquels ces études ont été réalisées diffèrent substantiellement et leurs conclusions sont conciliables. La raison de ceci est la suivante: Kaech *et al* ont étudié des cellules T activées dans un contexte infectieux tandis que le modèle *in vitro* de Park *et al* impliquait des TN. Dans les deux cas, une expression accrue de Bcl-2 a été observée chez les populations cellulaires bénéficiant d'un avantage de survie. Ceci indique que, suite à l'acheminement du signal de survie, l'IL-7 régule différemment l'expression de l'IL-7R α selon le niveau d'activation des cellules-cibles.

2.2. Signaux de survie des lymphocytes T activés et mémoires

L'homéostasie des populations de cellules T dépend de niches distinctes et indépendantes fournissant des signaux de survie adaptés à chaque type cellulaire. Les différentes populations de cellules T (naïves, activées et mémoires) possèdent leur propres niches, mais certaines niches sont partagées (9, 16, 52). La disponibilité des cytokines de survie régit la croissance et le maintien des populations de cellules T. Notamment, la stimulation du TCR diminue l'expression de l'IL-7R α chez les cellules T activées (34, 48). Mazzucchelli *et al* ont récemment suggéré que cette diminution de l'IL-7R α rendait les cellules TE plus réceptives aux signaux de survie acheminés par d'autres cytokines telles que l'IL-2, nécessaire à l'activation complète des cellules T (37, 53). Les cellules T activées sont soumises à plusieurs effets de l'IL-2 dont certains sont diamétralement opposés. Au début de la réponse, l'IL-2 assure la survie, la prolifération et la mise en branle des fonctions effectrices telles que la production d'IFN- γ , de perforine et de granzyme (50). À la fin de la réponse, l'IL-2 induit l'apoptose des cellules T activées et des CD8⁺ mémoires par *activation induced cell death* (AICD), un processus impliquant Fas (CD95) ainsi que son ligand (CD95L) (45, 54). Deux autres cytokines de la famille γ_c , l'IL-15 et l'IL-21, possèdent également des fonctions semblables et complémentaires à celle de l'IL-2 (55).

Ainsi, la survie des cellules T activées est contrôlée par les cytokines conférant un avantage compétitif à un moment précis. Tandis que l'IL-7 ne semble pas requise pour la survie des TE, elle est déterminante dans le processus de transition des TE en TM (48). Le rôle indispensable que joue l'IL-7 dans le maintien des TM CD8⁺ a été démontré il y a de cela plusieurs années, toutefois la nécessité de ce signal dans la survie des TM CD4⁺ n'a que récemment été prouvée (28, 34, 56). Les signaux requis pour le maintien des cellules TM sont également nécessaires à la survie des cellules T en contexte de PH. Dans un hôte lymphopénique, l'IL-7 est indispensable à la survie ainsi qu'à la PH des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ (36, 57, 58). Malgré cette exigence pour IL-7, l'expression de IL-7R α à la surface des cellules T en PH est

considérablement diminuée de façon analogue aux TE (suite à une stimulation antigénique conventionnelle) (59). L'IL-15 est également indispensable à la PH des cellules T CD8⁺ puisqu'elle régule la survie et la prolifération de cette population comme pour les TM CD8⁺. Il a récemment été démontré que l'IL-15 n'est pas nécessaire à la survie des TN. Par contre, elle soutient la prolifération des TM suite à la conversion des TN pendant la PH (60). L'IL-12 est également un joueur important dans la PH des cellules T CD8⁺. Contrairement à L'IL-7 et à l'IL-15, cette cytokine n'est pas indispensable au processus de PH, mais elle contribue significativement à la survie et l'accumulation des cellules T dans ce contexte (60, 61).

Le terme *homéostasie* implique qu'un système tend vers l'équilibre. L'expression *prolifération homéostatique* est paradoxale puisque l'homéostasie n'est jamais rétablie suite à une déplétion majeure des cellules T et ce, malgré une prolifération accélérée des cellules. En situation de PH, les cellules TM empêchent la prolifération des TN ainsi que leur conversion en TM (2). L'avantage des TM sur les TN réside dans leur capacité accrue à assimiler l'IL-7 (59). Ceci va à l'encontre de ce qui se produit dans un système à l'équilibre à l'intérieur duquel les populations de TN et TM sont régulées indépendamment. Au cours d'une réponse immune typique, la taille des populations de TN et TM est déterminée par la distribution des cellules à l'intérieur des compartiments lymphoïdes ainsi que la durée et l'intensité de la stimulation antigénique. Les cellules TN possèdent un potentiel prolifératif supérieur à celui des TM puisqu'elles sont moins différenciées (62). Par contre, les cellules TM sont généralement plus résistantes à l'apoptose que les TN (63). L'homéostasie des cellules T dans un contexte de stimulation antigénique classique est régulée à la fois individuellement, au niveau de chaque cellule, et collectivement, au niveau des populations. Par exemple, l'élimination complète de l'antigène n'est pas requise pour mettre un terme à l'expansion clonale des TE. Cette dynamique semble programmée au niveau des cellules individuellement. Par contre, les nombres de TM produits suite à une infection virale sont préalablement définis selon un mécanisme de régulation intervenant à l'échelle de la population. En effet, *Badovinac et al* ont démontré que des quantités différentes de cellules précurseurs généraient des nombre identiques de

TM suite à une infection virale (64). La compétition pour les facteurs de survie et de croissance ainsi que l'accessibilité des cellules présentatrices d'antigène (*antigen presenting cell*, APC) régulent l'homéostasie des cellules T à ces deux niveaux (individuel et collectif). Ces mécanismes préviennent la prolifération démesurée ainsi que la mort cellulaire excessive lorsque les cellules T sont chroniquement exposées à un antigène (62). Par exemple, les cellules TE détruisent les APC ayant initié leur activation, ce qui limite la taille du compartiment de TE. D'autre part, la phase de contraction de la réponse immune est associée à un état réfractaire des TE caractérisé par une capacité réduite à sécréter l'Il-2, à répondre à l'IFN- γ ainsi qu'à proliférer (65). Ces deux mécanismes sont orchestrés par des cytokines ainsi que des populations cellulaires pourvues d'une activité régulatrices telles les Treg.

2.3. Mécanismes d'apoptose des lymphocytes T

L'apoptose des cellules T est indispensable au maintien de l'homéostasie et prévient des aberrations telles que les cancers et les maladies auto-immunes. La mise en branle du processus apoptotique est nécessaire aux différentes étapes du développement des cellules T ainsi qu'au contrôle de la réplication virale (63). Il existe deux principales voies apoptotiques chez les cellules T matures : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Figure 1). La voie extrinsèque résulte d'un signal de mort cellulaire transmis suite à l'activation d'un *Death Receptor* membre de la famille des récepteurs TNF, (Fas, TNF- α R). Le signal acheminé par un *Death Receptor* entraîne la formation d'un *Death Inducing Signaling Complex* (DISC) dont fait partie la pro-caspase 8. Le signal ainsi produit est ensuite acheminé via une cascade de caspases menant à l'activation de la pro-caspase 3 et au clivage de constituants cellulaires vitaux (66). La voie apoptotique extrinsèque est mobilisée principalement au cours de la phase de contraction de la réponse alors que la mort de plus de 90% des cellules TE est requise. Cette voie est également activée suite à une stimulation répétée du TCR en absence de co-stimulation, ce qui induit l'expression

de Fas-L et mène ultimement à l'AICD. Lorsque Fas-L est exprimé, il peut induire l'apoptose en interagissant avec son récepteur Fas présent sur une cellule voisine (fratricide) ou sur la cellule exprimant à la fois les deux récepteurs (suicide) (67). En contrepartie, la voie intrinsèque est généralement induite par l'absence d'un signal de survie (contrairement à la voie extrinsèque qui est activée par un signal via les *Death Receptors*). Les stimuli activant cette voie incluent une carence en cytokines de survie, l'irradiation aux UV, l'ADN endommagé, un stress du réticulum endoplasmique, certaines hormones ainsi que la stimulation du TCR (68). La perméabilisation de la membrane mitochondriale est une étape essentielle à l'exécution de cette voie apoptotique. Lorsque les conditions sont propices à la survie cellulaire, la protéine Bcl-2 maintient l'intégrité de la mitochondrie en empêchant l'activation des protéines BH3. Par contre, lorsque les signaux de survie sont insuffisants ou absents de l'environnement, l'expression de Bcl-2 est diminuée, ce qui libère les protéines BH3 qui endommagent la membrane mitochondriale. Le cytochrome c est ensuite expulsé des mitochondries ce qui active l'apoptosome, entraînant à l'activation de la pro-caspase 3 et le clivage de protéines cellulaires vitales.

La susceptibilité des cellules T aux voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque dépend de leur niveau d'activation ainsi que des cytokines présentes dans le milieu. Les TN maintenues dans un état de quiescence sont normalement peu sensibles à l'apoptose puisque ces cellules doivent conserver leur potentiel de réponse rapide en tout temps. Par contre, l'activation rend les cellules T sensibles à l'apoptose. Dans un premier temps, la stimulation du TCR et la co-stimulation de CD28 accroît la survie des TE en augmentant l'expression de molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-XL et Bcl-2 (69). Cela permet aux TE de produire de l'IL-2, de proliférer et de migrer au site d'infection afin d'exercer leurs fonctions effectrices. L'organisme ne peut maintenir indéfiniment des nombres élevés de TE; ces derniers deviennent donc brusquement susceptibles à l'apoptose afin d'être rapidement éliminés et de rétablir l'homéostasie des compartiments lymphocytaires (70). L'apoptose des TE est causée en partie par l'érosion des télomères et par une sensibilité accrue à l'IL-2 (71, 72).

Dans ce contexte précis, l'IL-2 sensibilise les TE à l'apoptose par AICD plutôt que d'agir comme facteur de survie (73). L'IL-2 est indispensable à l'AICD, laquelle est induite par une stimulation répétée du TCR et l'expression accrue de Fas et de Fas-L (74). L'AICD est le principal mécanisme régulant la phase de contraction de la réponse, ce qui implique que Fas joue un rôle majeur dans le rétablissement de l'homéostasie des cellules T suite à une infection (75). L'IL-2 participe également à la contraction de la réponse en réprimant la transcription de Bcl-2 et en activant la protéine pro-apoptotique Bim (73, 76, 77). Les TM produits suite à l'élimination du pathogène sont plus résistantes à l'apoptose que les TE, ce qui leur permet de persister à long terme dans l'organisme (66).

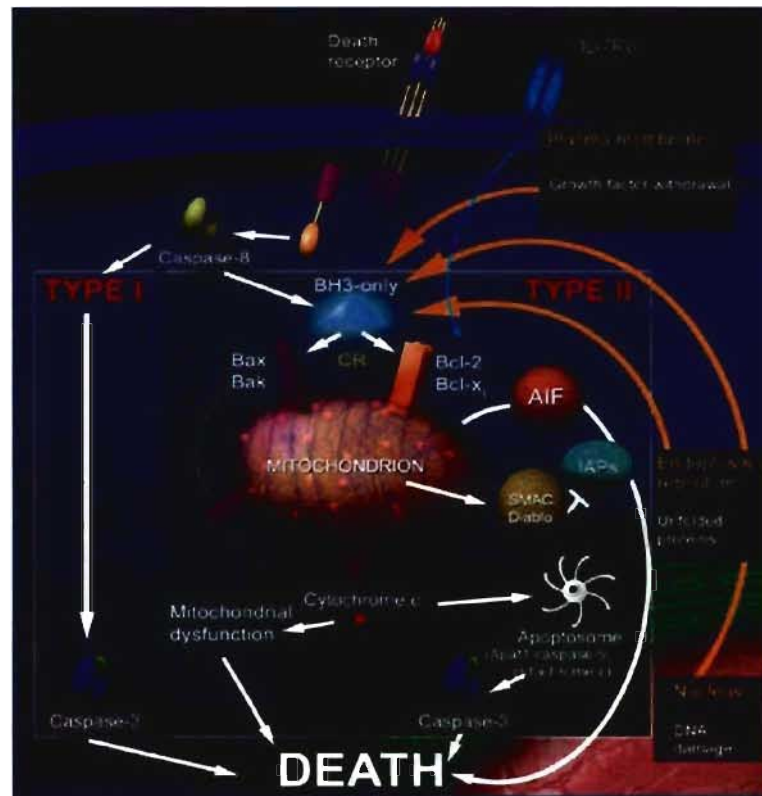


Figure 1: Les voies apoptotiques extrinsèque (TYPE I) et intrinsèque (TYPE II) chez les cellules T. La survie de la cellule dépend d'un équilibre entre les signaux positifs et négatifs.

Tiré de : JT Opferman et SJ Korsmeyer, *Nature Immunology* 4, 410 - 415 (2003).

3 Développement des lymphocytes T

3.1. Structures spécialisées du thymus

Alors que la majorité des cellules hématopoïétiques se différencient dans la moëlle osseuse, le développement des cellules T a lieu dans le thymus, un organe spécialisé à cet effet. Les cellules épithéliales (TEC) constituent la principale structure caractéristique du stroma thymique (78). Les TEC sont indispensables au développement des cellules T dans le thymus tel qu'illustré chez les souris *nude* dont l'absence de TEC empêche la production de cellules T, causant une immunodéficience importante (79). À l'intérieur du thymus, les TEC forment deux structures très distinctes : le cortex et la médulla (80). Les TEC corticales supportent la différenciation des progéniteurs provenant de la moëlle osseuse en plus de jouer un rôle crucial dans la sélection positive (81). Les TEC médullaires sont plutôt impliquées dans la sélection négative des cellules T immatures conjointement avec les cellules dendritiques (82). Les différentes étapes de différenciation des progéniteurs hématopoïétiques vers la lignée T sont assignées à des régions précises du cortex et de la médulla thymiques. La migration des cellules T immatures à l'intérieur et à l'extérieur de ces régions est un processus crucial au développement des cellules T (80). La nature des progéniteurs hématopoïétiques recrutés par le thymus est très controversée (83). Les *EarlyThymic Progenitors* (ETP) forment la population cellulaire la plus primitive retrouvée dans le thymus étant pourvue d'un potentiel de prolifération soutenue et d'une capacité à générer des cellules T (84). Suite à leur entrée dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire, les progéniteurs entrent dans le cortex et progressent jusqu'à la zone sous-capsulaire au fur et à mesure que leur maturation progresse (85). Au cours de ce processus, les cellules T immatures effectuent la transition du stade DN ($CD4^-CD8^-$) vers le stade DP ($CD4^+CD8^+$). Ensuite, les thymocytes se dirigent vers le centre de l'organe tout en demeurant à l'intérieur du cortex où ils réarrangent les chaînes α et β de leur TCR et subissent la sélection positive. Les cellules sélectionnées positivement grâce à leur capacité à reconnaître des complexes CMH + peptide via une interaction de faible

affinité se dirigent ensuite vers la médulla où les clones auto-réactifs sont éliminés par sélection négative (86). Chaque région associée à un stade précis de différenciation constitue donc un microenvironnement spécialisé fournissant les signaux optimaux à l'achèvement de chaque étape du développement T.

Parmi les signaux essentiels à production des cellules T, la voie de signalisation impliquant Notch et ses ligands figure en tête de liste. L'absence de signalisation Notch par les progéniteurs hématopoïétiques empêche le développement de cellules T et mène à une production de cellules B dans le thymus (87). L'activation de Notch1 induit et consolide l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques vers la lignée T en plus de promouvoir la transition des étapes précoces du développement T (88). Les cinq ligands de Notch (Delta-like (DLL) 1, Dll3, Dll4, Jagged1 et Jagged2) sont exprimés par les TEC à l'intérieur du thymus où ils sont répartis de façon à interagir avec les thymocytes à des stades de maturation précis (83). En plus de la voie Notch, d'autres voies de signalisation régulent le développement des cellules T. La voie des *Wnt* est principalement active chez les thymocytes DN auxquels elle achemine des signaux de prolifération vitaux. L'inhibition de la voie *Wnt* entraîne un blocage des transitions entre les quatre stades de DN (DN1, DN2, DN3 et DN4), ce qui cause une réduction de 50% de la cellularité thymique (89, 90). La voie impliquant les protéines Hedghog (Hh) est également nécessaire aux étapes précoces du développement des cellules T. La fonction des Hh est similaire à celle des *Wnt* puisqu'en absence de Sonic Hh, la cellularité des thymi d'embryons est considérablement réduite (91). Le signal acheminé via les Hh est indispensable à la transition des stades ETP à DN3, mais son action n'est pas requise au cours des phases de différenciation ultérieures (83). Les cytokines procurent également des signaux cruciaux aux différentes étapes de différenciation des cellules T. L'IL-7 et le *Stem Cell Factor* (SCF) sont essentielles au développement des cellules T dans le thymus. D'une part, l'IL-7 régule la taille et l'homéostasie des progéniteurs suite à leur entrée dans le thymus, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie de l'organe. Spécifiquement, l'IL-7 assure la survie des thymocytes entre les stades DN2 et DN3 (83). D'autre part, le rôle du SCF consiste à maintenir les progéniteurs dans un état indifférencié afin de

soutenir la croissance de ces populations immatures (92). En absence de l'une de ces cytokines, le développement des cellules T est interrompu à un stade précoce de différenciation, ce qui entraîne une réduction considérable de la cellularité thymique et une immunodéficience importante (47, 93). Le mouvement des progéniteurs en développement à l'intérieur du thymus est orienté par les chimiokines. Le recrutement des progéniteurs par le thymus est orchestré par CCR9, un récepteur exprimée chez les progéniteurs, lequel s'associe à son ligand CCL25 présent chez les TEC (94). Le mouvement des thymocytes à l'intérieur du cortex thymique est ensuite assuré par CXCL12 (SDF-1), CCL-19 et CCL21 (94, 95). La localisation des chimiokines et de leurs récepteurs dans des régions précises du thymus et l'orientation du mouvement des thymocytes selon leur stade de différenciation constitue le mécanisme par lequel le thymus régule l'homéostasie des cellules T en devenir.

La sélection positive favorise la survie des thymocytes ayant adéquatement réarrangé un TCR leur permettant de reconnaître des peptides du soi présentés par des molécules de CMH. De plus l'environnement thymique est conçu de façon à déterminer l'orientation des thymocytes vers la lignée CD8⁺ ou la lignée CD4⁺ lors de la sélection positive. Les dernières études portant sur ce sujet suggèrent qu'un signal de longue durée et/ou de forte intensité mènerait au développement de cellules T CD4⁺. À l'inverse, un signal de courte durée et/ou de faible intensité favoriserait la production de cellules T CD8⁺ (96). Cela implique que la voie menant à la production de cellules T CD4⁺ est activée par défaut lorsque le signal reçu par le TCR est optimal. La nature des peptides impliqués dans le processus de sélection positive résulte de l'activité du protéasome, un complexe multi-catalytique responsable de la génération des peptides chez les vertébrés à mâchoire (97, 98). Le thymus est le seul organe connu exprimant la sous-unité catalytique $\beta 5t$ du protéasome 20S. Cette forme unique du protéasome, le thymoprotéasome, est exprimée dans les TEC corticales et est nécessaire à la sélection positive des cellules T CD8⁺. *Murata et al* ont démontré qu'en absence de $\beta 5t$, la quantité de cellules T CD8⁺ matures produites par le thymus est considérablement diminuée bien que l'expression des molécules de CMH est

inchangée. Pendant la sélection positive, les thymocytes DP interagissent avec les peptides du soi présentés par les molécules de CMH. Cette interaction doit être assez forte pour empêcher la mort par apoptose des cellules tout en n'étant pas trop intense, ce qui mènerait à leur élimination lors de la sélection négative. Le protéasome standard génère normalement des peptides possédant une forte affinité pour les molécules de CMH. Toutefois, les peptides produits par le thymoprotéasome possèdent une affinité réduite envers les molécules de CMH, ce qui fait en sorte que les complexes CMH + peptide générés sont moins stables (98). Il a récemment été proposé que les complexes CMH + peptides générés par le thymoprotéasome seraient reconnus via une interaction de faible affinité par les TCR des thymocytes. Ceci mettrait en place des conditions optimales à la sélection positive (98).

La contribution du thymus à la tolérance des tissus périphériques est bien établie (99). Lors de la sélection négative, des peptides spécifiques aux organes périphériques (autres que le thymus) sont exprimés par les TEC de la médulla thymique dans le but d'éliminer des cellules pouvant interagir fortement avec ces peptides. Le régulateur d'auto-immunité AIRE contrôle l'expression ectopique de plus d'un millier de gènes normalement exprimés par les tissus périphériques tels que *insulin2*, *Igf2* et *Cdkn1c* (100). AIRE est principalement exprimé dans le thymus par les TEC médullaires et en périphérie, par les cellules dendritiques. La fonction de AIRE est illustrée chez les souris *knock out* pour cette molécule, lesquelles sont affligées d'infiltrats d'auto-anticorps dans tous les organes périphériques, dont les yeux et l'estomac (101, 102). La tolérance des organes périphérique est également assurée par la production de Treg. Deux types de Treg ont été définis selon leur origine : les Treg *naturels*, produits par le thymus et les Treg *induits*, générés en périphérie dans un contexte d'activation (103). Les Treg *naturels* sont des cellules T CD4⁺ exprimant constitutivement le marqueur d'activation CD25 et le facteur de transcription FoxP3 nécessaire à l'exécution de leur action suppressive (104). Les Treg sont responsables de la suppression des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ susceptibles de se retourner contre l'hôte lorsqu'elle sont activées suite à une stimulation intense et répétée du TCR en absence de co-stimulation (105). Les TEC jouent un rôle essentiel

dans le développement des Treg et l'absence de cette population mène à une maladie auto-immune généralisée (106).

3.2. Développement extrathymique des cellules T et Oncostatin M

Le développement des cellules T à l'intérieur du thymus est un processus conservé depuis des millions d'années d'évolution chez les animaux munis d'un système immunitaire adaptatif (107). Toutefois de nombreuses évidences démontrent que le développement de cellules T peut survenir à l'extérieur du thymus. Par exemple, la culture de progéniteurs hématopoïétiques en présence de cellules stromales médullaires exprimant un ligand de Notch (OP9-D11) suffit à générer des cellules T fonctionnelles *in vitro* (108). De plus, le développement extrathymique des cellules T a été observé dans le foie et les intestins de souris athymiques (109, 110). Toutefois, ces cellules T diffèrent légèrement des cellules T conventionnelles produites dans le thymus puisque la majorité des cellules T CD8⁺ provenant de souris athymiques possèdent un phénotype particulier; par exemple, plusieurs sont CD8 $\alpha\alpha$ ou possèdent un TCR $\gamma\delta$ plutôt qu'un TCR $\alpha\beta$ (111). De plus, la différenciation extrathymique de ces cellules ne se déroule pas exactement selon les mêmes étapes que dans le thymus puisque certains stades de développement sont absents des souris athymiques. Par exemple, la production des IEL ne nécessite pas de passage par le stade DP tandis que le stade DN n'est pas observé lors de la génération des cellules IEL (TCR $\gamma\delta$) (111). La production de cellules T extrathymiques a également été observée à l'intérieur des ganglions de souris athymiques *nude*. Dans ce contexte, le développement des cellules T se déroule selon les mêmes stades de différenciation (DN, DP, SP) que lors du développement thymique (112). De façon analogue au développement thymique, la production extrathymique de cellules T dans les ganglions des souris *nude* dépend d'une signalisation Notch (113). Les cellules T extrathymiques ainsi produites possèdent constitutivement un phénotype mémoire ainsi qu'une capacité proliférative accrue comparativement aux cellules T thymiques conventionnelles (111, 114). Cette

voie de différenciation est activée en contexte de lymphopénie et est complètement réprimée en présence d'un thymus fonctionnel. La réalisation d'études fonctionnelles chez les cellules T extrathymiques est restreinte par les faibles nombres de cellules T produites chez les souris athymiques, ce qui explique le peu de données disponibles sur l'efficacité de ces cellules dans un contexte infectieux (115, 116). Cependant, plusieurs études indépendantes ont démontré que les cellules T extrathymiques jouaient un rôle certain dans la réponse dirigée contre la Malaria (115, 116).

Il existe un modèle transgénique murin unique chez lequel le développement des cellules T dans les ganglions est induit suite à la sur-expression du gène de l'Oncostatin M (OM) sous le contrôle du promoteur proximal p56^{Lck} (LckOM). La production de cellules T extrathymiques chez la souris LckOM est restreinte aux ganglions exclusivement et génère des quantités importantes de cellules T matures (Figure 2) (117). Il est fort probable que le développement des cellules T dans les ganglions des souris LckOM soit en fait une amplification du développement extrathymique observé chez la souris *nude*. Ce phénotype est surprenant considérant que l'OM n'intervient normalement pas dans le développement des cellules T ; étant plutôt reconnu pour sa capacité à stimuler et/ou à inhiber la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques et neuronaux (118). À l'origine, ce modèle transgénique était voué à l'étude des propriétés anti-tumorales de l'OM. Le développement extrathymique important observé chez cette souris en fait un outil privilégié dans l'étude du développement des cellules T (Figure 20). La production des cellules T dans les ganglions sous l'effet d'une sur-expression d'OM survient indépendamment du thymus, lequel est atrophié au point où il n'en reste qu'un rudiment. Clegg *et al* ont démontré que le développement extrathymique peut être induit chez une souris de type sauvage grâce à l'effet paracrine de l'OM, suite à l'injection des progéniteurs LckOM (OM⁺) (119). De plus, comme pour le développement des thymocytes dans le thymus, le développement des cellules T dans les ganglions des souris LckOM est dépendant de l'IL-7. Les différentes populations de cellules T retrouvées dans les organes lymphoïdes des souris LckOM sont présentes en nombres et en proportions identiques à une souris de type sauvage

(Figure 2). Les cellules T OM⁺ possèdent un répertoire V β polyclonal semblable à celui des cellules T issues du développement thymique conventionnel (120). De plus, elles sont comparables en plusieurs points aux cellules T thymiques conventionnelles : par exemple, elle expriment des TCR $\alpha\beta$ et des co-récepteurs CD8 $\alpha\beta$ conventionnels, et n'expriment pas NK1.1. Par contre, contrairement aux cellules T classiques, les cellules T OM⁺ possèdent un phénotype mémoire de façon constitutive (CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low} et CD8⁺CD44^{high}CD62L^{high}CD122^{high}). Des études d'incorporation et de libération du BrdU réalisées antérieurement dans le laboratoire ont également permis de mettre en évidence la prolifération accrue des cellules T OM⁺ relativement aux cellules T conventionnelles en absence de stimulation (120, 121).

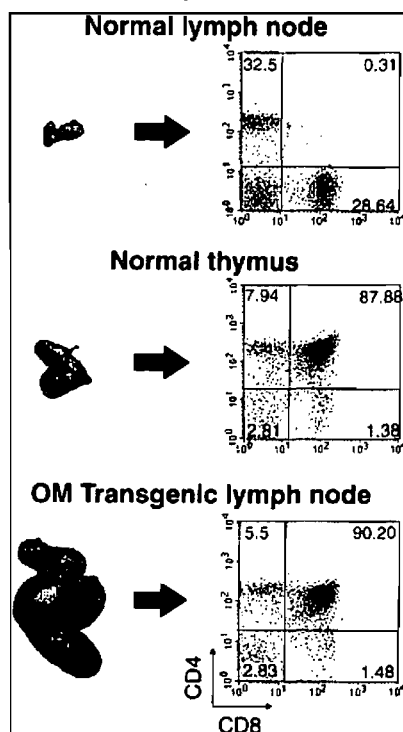


Figure 2: Développement extrathymique des cellules T dans les ganglions des souris LckOM. La morphologie ainsi que les stades de maturation des cellules T provenant des organes lymphoïdes de souris LckOM et WT sont illustrés.

Tiré de M.-E. Blais et al., *Experimental Hematology* 31 (2003) 349–354.

Normalement, les progéniteurs provenant de la moëlle osseuse accèdent au thymus grâce à l'action d'intégrines et autres molécules d'adhésion permettant le

roulement, l'adhésion et la migration des cellules à travers l'endothélium vasculaire. La nature exacte ainsi que les mécanismes d'action des vaisseaux impliqués dans ce processus ne sont pas clairement définis (85). En contrepartie, le recrutement des progéniteurs à l'intérieur des ganglions en présence d'une sur-expression d'OM est assuré par les High Endothelial Venules (HEV). Les HEV sont de petits vaisseaux spécialisés permettant l'entrée de cellules T matures dans les organes lymphoïdes secondaires. La proportion des HEV à l'intérieur des ganglions des souris LckOM est substantiellement accrue comparativement à une souris WT. Cette augmentation survient grâce à une angiogénèse dépendante de la cyclo-oxygénase 2 (Cox-2) et permet le recrutement de *Common Lymphoid Progenitors* (CLP, Lin⁻c-kit^{lo}IL-7R α ⁺) à l'intérieur des ganglions (122). Les TEC, le type cellulaire régissant normalement les étapes de sélection positive et négative dans le thymus, sont complètement absentes des ganglions des souris LckOM. En conséquence, la différenciation des progéniteurs à l'intérieur des ganglions est assurée par les cellules hématopoïétiques (123). Deux études distinctes ont démontré que les cellules hématopoïétiques peuvent assurer la sélection positive des cellules T immatures dans le thymus bien que les TEC corticales soient les principaux acteurs de ce processus (124, 125). Tous les stades de différenciation du développement thymique (DN, DP, SP) sont représentés dans les ganglions OM⁺ de façon analogue au thymus (Figure 2). La présence de cellules indifférenciées dans les ganglions de la souris LckOM ne résulte pas d'une attraction de progéniteurs provenant de la périphérie ou du rudiment thymique puisque les cellules OM⁺ immatures expriment des transcrits de la chaîne pT α . La transcription de la chaîne pT α est induite lors du réarrangement de la chaîne β du TCR précédant la formation du TCR $\alpha\beta$ et le début de la sélection positive (85). L'expression de la chaîne pT α chez les cellules T OM⁺ DP à l'intérieur des ganglions de la souris LckOM indique que le réarrangement des chaînes du TCR se produit localement (117). La sélection positive d'un répertoire polyclonal de progéniteurs est aussi efficace dans le ganglion de la souris LckOM que dans le thymus. Par contre, les cellules T possédant un TCR transgénique (HY et 2C) sont sélectionnées moins efficacement, probablement parce que ces peptides ne sont pas fortement exprimés dans les ganglions comparativement au thymus (123, 126). Par contre, la sélection

négative des cellules T dans les ganglions OM⁺ est très efficace malgré une faible expression de AIRE ne totalisant que 25% des niveaux détectés dans le thymus (Figure 21) (126). Le développement des cellules T dans les ganglions n'est pas une anomalie se manifestant chez un groupe restreint de modèles transgéniques. Le développement des cellules T dans le ganglion est amorcé naturellement malgré la présence d'un thymus fonctionnel (113, 127, 128). En effet, chez une souris de type sauvage, les ganglions attirent les CLP et soutiennent les étapes précoces de la maturation des cellules T (128). Le développement des progéniteurs vers la lignée T est donc amorcé dans les ganglions malgré l'absence de ETP, lesquels sont retrouvés exclusivement dans le thymus. Cette voie de différenciation n'aboutit pas à la production de cellules T matures puisqu'elle est interrompue entre les stades DN1 et DN2 faute de signaux de survie adéquats normalement acheminés via *Wnt4* et *Wnt7b* par le stroma thymique (128). Chez la souris LckOM, la sur-expression de l'OM permet cette transition en augmentant la production de Bcl-2 et Bcl-XL, ce qui palie à l'absence de *Wnt4* et *Wnt7b* et permet aux ganglions de soutenir les étapes nécessaires au développement des cellules T.

3.3. Fonction des cellules T extrathymiques

L'intérêt d'étudier le développement extrathymique des cellules T est de mieux comprendre le rôle ainsi que le fonctionnement du thymus. Il est admis que le stroma thymique possède un rôle non redondant et une fonction essentielle dans le développement des cellules T (129). Il serait donc logique de postuler que le développement extrathymique des cellules T ne serait pas aussi performant que la voie thymique conventionnelle. Une telle comparaison permettrait alors de mettre en évidence des signaux uniques et essentiels au bon fonctionnement du thymus ainsi qu'à la fonction de cellules T matures en périphérie. À l'opposé, en admettant que des cellules T matures et fonctionnelles peuvent être générées indépendamment du thymus, la raison d'être de cet organe et de sa conservation au cours de l'évolution seraient questionnables. Il serait alors pertinent de déterminer comment les sites soutenant le développement extrathymique peuvent se substituer au thymus et de

définir de quelle façon la production de cellules T extrathymiques pourrait ultérieurement être induite.

De plus, l'atrophie thymique causée par le vieillissement est à l'origine d'une diminution draconienne de la production de cellules T dès le début de la puberté. L'importance de ce processus est illustrée par la résorption du thymus, lequel n'atteint que 10% de sa taille maximale chez un humain dans la jeune vingtaine (130). L'involution thymique est associée à une incidence élevée de cancers, d'infections et de maladies auto-immunes (131). En principe, la reconstitution des compartiments T suite à une diminution importante du nombre de cellules T est assurée par la production de nouvelles cellules par le thymus ainsi que la prolifération de cellules T matures en périphérie. Le rétablissement des différentes populations de cellules T, particulièrement les TN, est entravé par l'atrophie thymique chez les adultes, ce qui réduit considérablement l'efficacité des réponses immunes subséquentes (132). De plus, la génération d'une immunité protectrice par la vaccination chez la population vieillissante est une préoccupation grandissante de notre société. Jusqu'à maintenant, la stratégie privilégiée afin d'améliorer la réponse T des personnes âgées consistait à générer des vaccins composés de plusieurs épitopes susceptibles de générer une forte réponse T spécifique à un pathogène donné. Cependant, le vieillissement cause la disparition de plusieurs clones de TN spécifiques aux épitopes retrouvés dans la plupart des vaccins, ce qui explique l'incapacité des personnes âgées à générer une réponse immune efficace (133). Une nouvelle approche permettant de contourner ce problème consisterait à prolonger la fonction thymique chez les adultes (133). La perspective de stimuler la production de cellules T extrathymiques afin de générer des substituts thymiques à long terme est donc intéressante. Ceci permettrait également de compenser la diminution de la fonction thymique ainsi que d'atténuer le déficit lymphocytaire résultant d'immunodéficiences causées par des infections chroniques, l'administration de drogues immunosuppressives ainsi que des traitements tels que l'irradiation et la chimiothérapie. Cependant, la fonctionnalité des cellules T extrathymiques dans un

contexte de réponse immune spécifique à un pathogène donné est inconnue dû à un manque de modèles animaux permettant ce type d'études (120).

OBJECTIF 1 : Évaluation de la capacité des cellules T extrathymiques à générer une réponse T protectrice.

Nous avons utilisé le modèle unique de développement des cellules T extrathymiques qu'est la souris LckOM dans la réalisation de cet objectif pour les raisons suivantes :

- 1) Contrairement aux modèles de développement T extrathymique documentés dans la littérature jusqu'à présent, les nombres de cellules T matures retrouvés chez la souris LckOM sont comparables aux nombres de cellules T retrouvés chez une souris WT. Ceci permet la réalisation d'études fonctionnelles.
- 2) À l'exception de leur phénotype mémoire et de leur prolifération rapide, les cellules T extrathymiques produites chez la souris LckOM sont extrêmement semblables aux cellules T produites par le thymus (TCR $\alpha\beta$, V β diversifié, etc).
- 3) Le développement des cellules T extrathymiques dans les ganglions n'est pas exclusif au modèle LckOM puisqu'il a lieu également chez la souris *nude*.
- 4) Le développement extrathymique chez la souris LckOM est similaire au développement thymique conventionnel et les étapes de différenciation des cellules T extrathymiques dans les ganglions sont conformes à celles de la voie thymique.

La fonctionnalité des cellules T extrathymiques a été évaluée selon deux paramètres :

- 1) la prolifération en réponse à un pathogène
- 2) le contrôle de la réplication du pathogène et à son élimination

OBJECTIF 2 : Évaluation de l'impact du développement T extrathymique sur l'homéostasie des cellules T.

Lorsque les cellules T sont produites de façon extrathymique, quel est l'impact de l'absence du thymus sur la survie et la prolifération cellulaires ainsi que sur la tolérance périphérique? L'expression du thymoprotéasome étant exclusive au thymus, les peptides impliqués dans les sélections positive et négative des cellules T immatures à l'intérieur des ganglions sont nécessairement différents de ceux présentés lors de la voie de différenciation conventionnelle. De plus, la sélection positive des cellules T a lieu sur les cellules hématopoïétique des ganglions plutôt que sur les TEC thymiques.

Dans le but de définir davantage les processus contrôlant l'homéostasie des cellules T, nous avons déterminé les mécanismes moléculaires et cellulaires régulant la survie ainsi que la tolérance périphérique des cellules T extrathymiques.

RÉSULTATS

Premier article

Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses?

Marie-Ève Blais^{1,2}, Gwladys Gérard^{1,2}, Marianne M. Martinic^{1,3}, Guillaume Roy-Proulx², Rolf M. Zinkernagel³ and Claude Perreault^{2,4}

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

³Institute for Experimental Immunology, University Hospital,
CH-8091 Zürich, Switzerland

¹ The first three authors contributed equally to this work.

Blood, Volume 103, Number 8, p.3102-10, 2004

Abstract

If present in sufficient numbers, could extrathymic T cells substitute for thymus-derived T cells? To address this issue, we studied extrathymic T cells that develop in athymic mice under the influence of oncostatin M (OM). In this model, extensive T cell development is probably due to amplification of a minor pathway of T cell differentiation taking place only in the lymph nodes. Extrathymic CD4 T cells expanded poorly and were deficient in providing B cell help after infection with vesicular stomatitis virus (VSV) and lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). Compared with classic T cells, stimulated extrathymic CD8 T cells produced copious amounts of IFN- γ , and their expansion was precocious but of limited amplitude because of a high apoptosis rate. Consequently, although extrathymic CTLs responded to LCMV infection, as evidenced by the expansion of GP33-41 tetramer⁺ CD8 T cells, they were unable to eradicate the virus. Our data indicate that the site of development impinges on T cell quality and function and that extrathymic T cells functionally cannot substitute for classical thymic T cells.

Introduction

One hallmark of the adaptive immune system is that the thymus has been conserved as the primary T lymphoid organ during 450 million years of evolution.¹ This level of conservation is remarkable when one considers that about ten different organs have been used as primary sites of hematopoiesis in jawed vertebrates.¹ Thymic epithelial cells (TEC) derived from the third pharyngeal pouch are the main constituent of the thymic environment.² TECs provide two types of signals to thymocytes: TCR-dependent and –independent.³⁻⁵ In conjunction with mesenchymal cells, TECs have a unique ability to provide TCR-independent interactions which are essential for several thymocyte developmental events but whose nature is still elusive.^{2,6-9} Indeed, studies in wild-type and TCR-transgenic euthymic and nude mice indicated that the efficiency of generating mature T cells was 100-1000 times less in nude compared to euthymic mice.⁵ In contrast, TCR-mediated signals, dictating which TCR clonotypes are positively selected, can be supported by MHC-peptide complexes displayed by other cell types. Thus, studies involving hematopoietic chimeras and thymus grafts have shown that hematopoietic cells can mediate positive selection of CD8 T cells *in vivo*.^{5,10,11} In line with this, studies in tetraparental aggregation chimeras have demonstrated that the MHC of TECs is not required for efficient positive selection of MHC Ia- and MHC II-restricted T cells.¹² Moreover, under normal circumstances, preferential or exclusive positive selection on hematopoietic cells appears to be a general characteristic shared by many (if not all) MHC class Ib-restricted T cells.¹³⁻¹⁵ These data indicate that the non redundant role of TECs is to provide TCR-independent signal(s) to thymocytes, but that TCR signals can be provided by other cells in the thymus and the periphery.^{5,16}

The above considerations raise the question of whether the canonical influence of thymic epithelial cells on T cell development is essential for survival: would lymphocytes developing in a TEC-free milieu be functional and reach sufficient numbers to eradicate pathogens? Oncostatin M (OM) transgenic mice represent a unique model to directly address this issue. Remarkably, chronic exposure

to OM transforms the lymph node (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.^{17,18} The lymphopoietic pathway modulated by OM is truly thymus-independent and takes place only in the LNs.^{17,18} The proportions of double-negative, double-positive and single-positive T cells in the OM⁺ LN reproduce those found in a thymus, and the TCR repertoire of the SP cells is diversified. The effect of OM on extrathymic T cell development in the LNs is probably due to some amplification of a cryptic pathway that is operative in conditions of defective thymopoiesis and was nicely characterized in nude mice.¹⁹ Like normal LNs, OM-transgenic LNs contain no reticular epithelial cells.²⁰ Studies in hematopoietic chimeras have demonstrated that MHC class I expression strictly on hematopoietic cells was sufficient to support the development of a diversified repertoire of CD8 T cells in the OM⁺ LNs.²¹

In order to directly evaluate the functionality of T cells generated in an environment devoid of TECs, we therefore sought to characterize *in vitro* and *in vivo* the function of extrathymic T cells that develop in the OM-conditioned LN of athymic mice. More specifically, we addressed two questions: do extrathymic T cells proliferate normally following TCR engagement, and are they able to generate protective immune responses against model infections, such as lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)- and vesicular stomatitis virus (VSV)-infection?

Materials and methods

Mice

C57BL/6J (B6) mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and the Institute of Laboratory Animal Science, University of Zürich, Switzerland. B6.SJL-*Ptprc^aPep3^b*/BoyJ (Ly5^a) (B6.SJL; Ly 5.1⁺) and B6.129S7-*Rag1^{tm1Mom}* (RAG1^{-/-}) mice were purchased from The Jackson Laboratory. LckOM-transgenic mice on a B6 background have been previously described.^{18,22} Unless stated otherwise, differences between groups were tested using Mann-Whitney test.

Thymectomy and fetal liver transplantation

Thymectomy was performed as previously described.¹⁸ Hemopoietic chimeras were created by injecting i.v. 2×10^6 LckOM fetal liver cells, collected on day 13 postcoitum, into irradiated (10 Gy) thymectomized RAG1^{-/-} or B6.SJL recipients. Functional studies in hemopoietic chimeras were initiated 80 to 120 days after transplantation.

In vitro T cell stimulation

T cell isolation. Splenocytes were depleted of B lymphocytes using microbeads coated with anti-B220 antibody (Dynal, Lake Success, NY, USA), and adherent cells (macrophages) were removed. Fluorescent labeling of T cells with carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) was performed as described.²³

Culture conditions. CFSE-labeled cells were plated at 1×10^5 cells per well in round-bottom 96-well microtiter plates. T cell activation was achieved by coated anti-CD3 (145-2C11, Pharmingen, Mississauga, Canada) with or without soluble

anti-CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$; 37.51, Pharmingen) or control hamster Ig (1 $\mu\text{g/ml}$; Ha4/8, Pharmingen). At the time of harvest, CFSE-labeled cells were counted, washed in RPMI 1640, and stained with a combination of antibodies before analysis. Division peaks (as determined by CFSE-intensity) were labeled from 0 to n . Since a single T cell dividing n times will generate 2^n daughter cells, if the total number of T cells which have divided three times ($n = 3$) is eight, then exactly one precursor had to divide three times to generate these eight cells ($2^3 = 8$). Making use of this mathematical relationship, the number of T cells that have divided was extrapolated from the number of daughters under each division peak, and the total number of mitotic events was calculated as described.²⁴ The proliferative burst size (number of daughter cells generated by a dividing T cell “precursor”) was obtained by dividing the total number of mitoses by the number of precursors that had divided.²⁴ For intracellular cytokine staining, cells were restimulated with PMA (20 ng/ml; Sigma, St. Louis, MO, USA) and ionomycin (750 ng/ml; Sigma) 4 h prior to cell harvesting and monensin (Pharmingen) was added one hour later.

LCMV and VSV infection

VSV Indiana (VSV-IND; Mudd-Summers isolate) was grown on BHK21 cells. LCMV-WE and –Armstrong (ARM) were propagated on L929 fibroblast cells. Mice were infected by i. v. injection of LCMV-ARM (200 pfu), LCMV-WE (200 pfu) or VSV-IND (2×10^6 pfu).²⁵⁻²⁷ LCMV titers in different organs were determined as described with the immunological focus assay.²⁸ LCMV-NP specific IgG Abs were measured by ELISA²⁷, and the VSV neutralization assay was performed as previously described.^{29,30} In general, experiments with VSV and LCMV-WE were done in Zürich, experiments using LCMV-ARM in Montréal.

Flow cytometric analyses

Analyses were performed with a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (Becton Dickinson, Oakville, ON, Canada) using the following monoclonal antibodies (Pharmingen): PerCP- or APC-conjugated anti-CD4 (RM4-5), APC-conjugated anti-CD8 (53-6.7), biotin-conjugated anti-Ly5.1 and anti-Ly5.2, and PE- or PerCP-conjugated streptavidin. H2D^b/LCMV GP33-41 tetramers and H2D^b/B6^{dom1} tetramers^{31,32} were obtained from the NIAID MHC Tetramer Core Facility (Atlanta, GA, USA) and CANVAC Tetramer Core Facility (Montreal, QC, Canada), respectively. Intracellular cytokine staining for IL-2 and IFN- γ was performed according to the manufacturer's instructions (Pharmingen). Estimation of apoptotic cells was based on staining with PE- or FITC-conjugated annexin-V (Pharmingen).

Immunization with DCs and in vivo CTL assays

Enrichment for splenic DCs was performed as described.³³ Spleen DCs were resuspended in medium containing GP33-41 at a concentration of 10^{-6} M, incubated for 60 min at 37°C, washed three times with RPMI 1640, and the proportion of CD11c⁺MHCII⁺ DCs was assessed by flow cytometry. The cell concentration was adjusted so that the cell suspension used for i.v. immunization contained 2×10^6 CD11c⁺MHCII⁺ DCs per ml. In vivo CTL assay was performed as described by Coles et al.³⁴ Briefly, B6 splenocytes pulsed with 10^{-6} M GP33-41 peptide or not were labeled with a high (250 nM) and low (25 nM) concentration of CFSE, respectively. Equal numbers of cells from each population (10^7 cells) were mixed, then injected i.v. On day 0, CFSE labeled cells were injected into recipients that were naive or had been previously injected with peptide pulsed DCs on days -21 and -7. Recipients were sacrificed 4 h later. The following formula was used to calculate specific lysis: ratio = (percentage CFSE^{low}/percentage CFSE^{high}), and percentage specific lysis = [1 - (ratio unprimed/ratio primed)] X 100.

Results

In vitro function of T lymphocytes of thymic vs. extrathymic origin

Proliferation. T cells of extrathymic origin, which developed in OM⁺ LNs, were tested for proliferative behavior and compared to T cells of thymic origin by stimulation with anti-CD3 ± anti-CD28. Spleen T cells from B6 mice (thymic T cells) and from irradiated (10 Gy) adult-thymectomized B6.SJL (Ly5.1) hosts reconstituted with LckOM fetal liver cells (Ly5.2; extrathymic T cells) were labeled with CFSE and cultured in CD3-coated microtiter plates in the presence or not of soluble anti-CD28. After culturing for 24 to 96 h, cells were labeled with 7-AAD to exclude necrotic cells, and stained with antibodies against CD4, CD8, Ly5.1 and Ly5.2. At all time points after stimulation more than 99% of harvested T lymphocytes were Ly5.1⁺ Ly5.2⁺ (data not shown).

The absolute numbers of CD4 and CD8 T cells recovered after stimulation for 24 to 96 h, and their CFSE content (which decreases by 50% after each cell division) are shown in Figure 3. The numbers of CD4 and CD8 T cells harvested at 48 to 96 h were expressed as a function of X which represents the number of cells/well at 24 h (before the beginning of cell division). Calculation of the proliferative burst size and the doubling time were based on the results of five consecutive experiments (Table 1-I). The proliferative burst size corresponds to the number of daughter cells generated by a dividing T cell “precursor”, and the doubling time represents the time required for the average responding T cell to achieve a single cell division.²⁴ As expected, proliferation of thymic T cells was more rapid in the presence of co-stimulation with anti-CD28 than when stimulated with anti-CD3 alone. Furthermore, expansion of thymic CD8 T cells was more rapid and extensive than for CD4 T cells. When compared to their thymic counterparts, extrathymic CD4 T cells showed an increased burst size when stimulated with anti-CD3 alone but not when anti-CD28 was added (Table 1-I). Of note, in the presence of anti-CD3 ± anti-CD28, total accumulation of extrathymic CD4 T cells at 72 h was decreased by ~50% relative to thymic T cells. When stimulated with anti-CD3 ± anti-CD28, extrathymic CD8 T cells proliferated more rapidly and showed a greater burst size than thymic T cells. However, although

extrathymic T cells accumulated to higher levels than thymic CD8 T cells when stimulated with anti-CD3 alone, their expansion, in contrast to thymic T cells, was barely augmented by co-stimulation with anti-CD28. Thus, altogether, extrathymic T cells divided more rapidly and extensively than thymic T cells. However, a great discrepancy emerged between the doubling time and burst size on one side and total cell accumulation of extrathymic T cells on the other side. This discrepancy suggested that accumulation of extrathymic T cells following TCR engagement might be possibly curtailed by an increased apoptosis rate.

Apoptosis. Annexin V labeling showed that after stimulation with anti-CD3 \pm anti-CD28, the apoptosis rate was greater for extrathymic than for thymic CD4 and CD8 T cells (Figure 4A). Analysis of Annexin V staining of T cells as a function of their CFSE content revealed that the difference between thymic and extrathymic T cells prevailed irrespective of whether they had gone through 0 to >6 cell divisions after stimulation (Figure 4B). Therefore, the higher apoptosis rate of extrathymic CD4 and CD8 T cells was a constant finding and probably was not due to their more rapid post-triggering proliferation rate.

Cytokine production. We next asked whether the brisk proliferative response of extrathymic T cells was coupled with a more rapid cytokine production. IL-2 and IFN- γ production was assessed by intracellular staining in thymic and extrathymic T cells stimulated with anti-CD3 \pm anti-CD28. Only minor yet reproducible differences were found between thymic and extrathymic T cells as regards IL-2 production. The proportion of IL-2 producing CD8 T cells was greater among extrathymic than thymic T cells (Figure 4C). Yet, more thymic than extrathymic CD4 T cells produced IL-2 when stimulated with anti-CD3 and anti-CD28. The salient finding was the difference in IFN- γ production following stimulation with anti-CD3 \pm anti-CD28 (Figure 4C). The proportion of IFN- γ producing T cells was increased about twofold in extrathymic relative to thymic CD4 and CD8 T cells. Thus, following stimulation with anti-CD3 + anti-CD28, the percentage of IFN- γ producing T cells was

approximately 48% and 97% for thymic and extrathymic CD8 T cells, respectively (n = 3). Furthermore, in IFN- γ producing CD8 T cells, the intracellular levels of IFN- γ (fluorescence intensity) were dramatically increased in extrathymic compared to thymic CD8 T cells (Figure 4C).

In vivo responses against viruses

We assessed in vivo responses of extrathymic T cells against two model infections, LCMV and VSV. Initial control of LCMV, a noncytopathic virus, is mainly dependent on CD8 CTLs^{35,36} whereas long-term virus control requires B cells and CD4 T cells.^{25,37} VSV, a cytolytic virus, is eliminated by early produced neutralizing IgM (T-independent) followed by IgG (CD4-dependent) antibodies against VSV glycoprotein.^{38,39} In order to study animals in which 100% of T cells were of extrathymic origin, we transplanted thymectomized-irradiated RAG1^{-/-} mice with LckOM fetal liver cells (OM \rightarrow RAG1^{-/-} chimeras), and infected them with LCMV or VSV approximately 90 days later. Two LCMV isolates, LCMV-ARM and LCMV-WE, were used that differ with regard to susceptibility to IFN- γ and neutralizing antibodies, as well as their tropism and replication rates.⁴⁰

CD8 response against LCMV-ARM. Following infection with LCMV-ARM (200 pfu i.v.), the kinetics of anti-LCMV CD8 response were assessed with H2D^b/GP33-41 tetramers and its efficacy in terms of virus clearance was estimated with the immunological focus assay.²⁸ The percentage of tetramer⁺ CD8 splenocytes increased more rapidly in OM \rightarrow RAG1^{-/-} chimeras (~12% on day 3) than in B6 controls (~4% on day 3) (Figure 5A). Thus, compared to B6 mice, chimeras exhibited higher absolute numbers of tetramer⁺ T cells on day 3 in their LNs though not in the spleen (Figure 5C-D, and see below). Tetramer⁺ CD8 cells in chimeras were genuine GP33-41 specific T cells since they were CD3⁺NK1.1⁻CD11c⁻, and did not show nonspecific binding of H2D^b/B6^{dom1} tetramers (data not shown). The rapid expansion of extrathymic tetramer⁺ CD8 T cells is in keeping with what we observed following

in vitro stimulation (Figure 3 and Table 1). Is this rapid expansion cell autonomous (that is, related to some intrinsic feature of extrathymic CD8 T cells) or due to some bystander or helper effect of OM? To discriminate between these two possibilities, we used OM→B6.SJL chimeras. When studied on day 90 posttransplant, before LCMV-ARM infection, these mice presented a mixed lymphoid chimerism: ~95% T cells were donor-derived extrathymic T cells (Ly5.2⁺) while ~5% were residual host T cells (Ly5.1⁺) (data not shown). Donor and recipient T cells were exposed to the same levels of OM in these chimeras since OM mediates its effects in a paracrine fashion.¹⁸ Nevertheless, following LCMV-ARM infection, the two T cell populations behave differently. Again, extrathymic T cells accumulation (Ly5.2⁺) peaked on day 3, while host thymus-derived T cells (Ly5.1⁺) expanded at a slower pace (Figure 5B) like control thymus-derived T cells (compare B6 mice in Figure 5A). Thus, the ability of extrathymic T cells to expand more rapidly than classical T cells following LCMV-ARM infection is cell autonomous.

In OM→RAG1^{-/-} chimeras the pool size of single-positive T lymphocytes is significantly increased in the LNs but decreased in the spleen. Furthermore, when injected in OM⁺ mice, T cells with a naive or a memory phenotype preferentially home to the LN rather than to the spleen.¹⁸ In line with this, we found that following LCMV-ARM infection, activated extrathymic CD8 effector T cells accumulated preferentially in the LNs. Indeed, estimates of absolute numbers of tetramer⁺ T cells showed that while tetramer⁺ T cells accumulated to higher levels in the spleen of B6 mice, they were more numerous in the mesenteric LNs (mLNs) of OM→RAG1^{-/-} chimeras (Figure 5C-D). The fact that T cells mainly accumulate in the LNs rather than the spleen in OM⁺ mice should have no influence on virus clearance because previous studies in Hox11^{-/-} mice have shown that spleenless mice have normal T cell anti-virus responses when infected with low doses (200 pfu) of LCMV.⁴¹

Antigen driven T cell expansion is not synonymous with protective immunity. In fact, some antigen specific CD8 T cells may expand considerably in vivo yet show

defective effector activity.^{42,43} LCMV-ARM titers were similar in the spleen and lung of OM→RAG1^{-/-} chimeras and B6 controls up to day 15 (Figure 6A). In the LNs, viral titers on day 10 and 15 were higher in chimeras than B6 mice. However, since viral titers are expressed as log pfu/organ, the fact that the cellularity of LNs from OM→RAG1^{-/-} chimeras is approximately ten times the cellularity of B6 LNs (data not shown) contributed to the latter discrepancy (Figure 6A). On day 15, LCMV-ARM titers in all organs were higher in RAG1^{-/-} controls than in OM→RAG1^{-/-} chimeras and B6 mice. By day 30 however, LCMV-ARM titers were increasing in the lymphoid organs, though not the lung, of OM→RAG1^{-/-} chimeras. Thus, extrathymic T cells provided only a short-lived control of LCMV-ARM infection. The upsurge of viral replication on day 30 (Figure 6A) was suggestive of CD8 exhaustion²⁶, which would be consistent with the high apoptosis rate of extrathymic T cells observed following in vitro TCR ligation (Figure 4). This prompted us to evaluate T cell apoptosis following LCMV-ARM infection. Notably, the proportion of apoptotic cells (Annexin V⁺) was increased in extrathymic (~9.9%) relative to thymic (~2.1%) CD8 T on day 0, under steady state conditions prior to infection (p <0.05; Figure 6C). This is consistent with the high turnover of extrathymic T cells in BrdU labeling experiments.¹⁸ As expected, following infection the proportion of Annexin V⁺ cells in B6 mice and OM→RAG1^{-/-} chimeras was greater among tetramer⁺ than tetramer⁻ CD8 T cells (Figure 6C). Thus, in the same manner as thymic T cells, apoptosis of extrathymic T cells was specific primarily to LCMV responsive T cells rather than being a TCR-independent bystander event. Nevertheless, the key finding was that the apoptosis rate was significantly increased in extrathymic relative to control tetramer⁺ CD8 T cells. The difference was most dramatic on day 3 (p <0.0001). Thus, following in vitro and in vivo stimulation, extrathymic T cells proliferate quickly, but their accumulation is limited by a high rate of apoptosis. The low tropism of LCMV-ARM for extralymphatic tissues and the fact that LCMV-specific T cells in non lymphoid tissues are more resistant to apoptosis than those in lymphoid tissues⁴⁴ may explain the absence of detectable LCMV-ARM virus in the lungs of OM→RAG1^{-/-} chimeras on day 30 (Figure 6A).

CD8 response against LCMV-WE. A correlation was observed between resistance to IFN- γ of various LCMV strains and their ability to disseminate widely and to establish persistent infection.⁴⁰ LCMV-WE is less susceptible to IFN- γ than LCMV-ARM, disseminates more extensively and shows an increased ability to induce T cell exhaustion.⁴⁵ We therefore asked whether infection with LCMV-WE would magnify the functional discrepancies between thymic and extrathymic T cells. Compared to B6 controls, the proportion of GP33-41 tetramer⁺ CD8 T cells was lower in the spleen and mLNs of chimeras on day 8 post-infection (Figure 5E; $0.05 < p < 0.1$), being totally absent in one of the two chimeras tested. Moreover, LCMV-WE titers were higher in chimeras than controls on day 8 ($0.05 < p < 0.1$ for spleen and lung), and even more so on day 20 ($0.05 < p < 0.1$ for all organs tested) as viral replication was evident in the spleen, kidney and lung (Figure 6B). Thus, the discrepancy between thymic and extrathymic CD8 T cells was more drastic following infection with LCMV-WE than LCMV-ARM. Extrathymic T cells were unable to provide even transient protection against LCMV-WE.

CTL response against LCMV GP33-41-coated DCs. To evaluate the response of extrathymic CTLs against a nonreplicative antigen, we immunized OM \rightarrow RAG1^{-/-} chimeras and control mice with GP33-41 coated DCs on day 0 and 14, and assessed in vivo CTL cytotoxicity against GP33-41 coated cells on day 21. Under these experimental conditions, CTL responses were generated in the absence of CD4 help. This allowed us to assess cytotoxic activity of extrathymic T cells without the confounding variable of CD4 help. This was important because defective CD4 help could explain the exhaustion of CD8 T cells that we observed following LCMV infection.^{25,37} In vivo CTL assays were performed as described by Coles *et al.*³⁴: naive and immunized mice were transfused with a mixture of uncoated (CFSE^{low}) and GP33-41 coated (CFSE^{high}) splenocytes, and after 4 h specific lysis was estimated from the numbers of CFSE^{low} and CFSE^{high} cells in the spleen and mLNs. Extrathymic (chimeras') T cells showed deficient GP33-41-specific cytotoxicity (Figure 7). The paucity of extrathymic tetramer⁺ T cells in chimeras' spleen was correlated with the low CTL activity in this organ (Figure 7B). In contrast,

accumulation of tetramer⁺ T cells in the LN was similar for thymic and extrathymic T cells (Figure 7B). Since killing of GP33-41 coated targets by extrathymic LN T cells was deficient this result indicated that, on a per cell basis, extrathymic tetramer⁺ T cells displayed at best low cytotoxicity. Coupled with their high propensity to apoptosis following TCR triggering (Figure 4A-B and Figure 6C), the low cytotoxic activity of extrathymic T cells (Figure 7) suggested that these T cells were unduly susceptible to functional exhaustion and activation induced cell death.^{26,46}

Extrathymic CD8 T cells present an intrinsic defect. The LNs of OM-transgenic mice show a disturbed architecture since they are dual primary and secondary lymphoid organs where mature T cells are not apparently segregated from immature T lymphocytes.²⁰ We therefore performed adoptive transfer experiments to evaluate whether extrathymic T cells could eradicate LCMV-ARM in recipients whose LNs were unencumbered with immature T cells. RAG1^{-/-} mice were transfused with 30 x 10⁶ splenocytes from B6 mice (thymic T cells) or OM→RAG1^{-/-} chimeras (extrathymic T cells); in each case, splenocyte suspensions contained approximately 15% CD8 T cells, 25% CD4 T cells, and 60% B cells. Two days later recipient mice were infected with 200 pfu of LCMV-ARM. Viral titers measured on day 30 demonstrated that compared with thymic T cells, extrathymic T cells have a cell autonomous defect in their ability to eradicate LCMV-ARM (Figure 8).

Antibody production against LCMV and VSV. To evaluate the functionality of CD4 extrathymic T cells, we assessed their ability to help B cells for production of Ab against LCMV-NP (ELISA) and VSV (neutralizing Ab) (Figure 9). Compared to B6 controls, both OM→RAG1^{-/-} chimeras tested produced only low levels of LCMV-NP-specific IgG from day 12 onward (Figure 9A). This low levels of LCMV-NP-specific IgG may be an overestimate, however, because of the hypergammaglobulinemia caused by LCMV.⁴⁷ Following VSV infection, B6 control mice remained healthy and produced high titers of neutralizing IgM Ab on day 4, and of IgG neutralizing Ab from day 8 to 20 (Figure 9B). In contrast, while they produced

normal amounts of IgM Ab on day 4, chimeras gave barely detectable IgG titers on day 8, two of three chimeras died on day 10 and the sole survivor exhibited only low IgG Ab titers on day 12 and 20. Thus, extrathymic CD4 T cells were defective in providing help to B cells.

Discussion

Athymic mice reconstituted with OM-transgenic hematopoietic stem cells provide a unique model for analysis of T cells generated extrathymically in an environment devoid of TECs. A main conclusion of this work is that OM⁺ extrathymic T cells do not behave like classic thymic T cells following antigen stimulation. Extrathymic CD4 T cells responded by proliferation and intracellular IFN- γ production (Figure 3 and Figure 4) to in vitro stimulation with anti-CD3 \pm CD28. However, because of their high apoptosis rate, OM⁺ CD4 T cells failed to accumulate to normal levels in vitro despite their normal doubling time and burst size (Table 1 and Figure 4). In line with this, they did not provide adequate help to B cells when mice were infected with VSV or LCMV. Thus, extrathymic CD4 T cells are functionally deficient. The functionality of extrathymic CD8 T cells was superior to that of their CD4 counterpart. In vitro they proliferated extensively and produced greater quantities of IFN- γ than thymus-derived T cells (Table 1 and Figure 4). Under these conditions, their accumulation in 72 h culture assays was nevertheless not commensurate with their proliferative activity because it was curtailed by a high apoptosis rate. Consistent with the high apoptosis rate observed in vitro (Figure 4A-B), GP33-41 tetramer⁺ extrathymic CD8 T cells were unduly susceptible to apoptosis following LCMV-ARM infection (Figure 6C). Moreover, extrathymic CD8 T cells specific for the GP33-41 epitope developed only low cytotoxic activity following in vivo stimulation (Figure 7), and they accumulated to lower levels than thymic T cells after LCMV-WE infection (Figure 5E). Though LCMV-ARM titers were similar in chimeras and controls up to day 15, it cannot be excluded that innate resistance levels differ and influence initial replication. It seems probable that in chimeras control of LCMV-ARM during the first two weeks correlated with higher IFN- γ production of extrathymic T cells. However, control of LCMV-ARM was only transient since viral replication became evident by day 30 (Figure 6A). Furthermore, extrathymic T cells provided no significant protection against LCMV-WE. This discrepancy between effects on LCMV-ARM versus -WE is in line with earlier finding of former's greater susceptibility to IFN- γ and lower propensity to induce T cell exhaustion.⁴⁰

Considering their ability to rapidly produce high amounts of IFN- γ and their high susceptibility to apoptosis, extrathymic CD8 T cells should be more efficient against targets that are sensitive to IFN- γ e.g., a substantial proportion of intracellular pathogens and tumor cells.^{48,49} This interpretation is supported by two series of observations: i) OM⁺ extrathymic T cells can eradicate a lethal inoculum of allogeneic tumor cells¹⁷; and ii) MHC Ib-restricted CD8 T cells which share critical features with OM⁺ CD8 T cells (see below) are effective against *Listeria monocytogenes* which is highly susceptible to IFN- γ .⁵⁰ Finally, even though we have demonstrated that extrathymic T cells are insufficient to permanently eradicate LCMV, their brisk expansion and production of IFN- γ could help classical T cells to eliminate pathogens. Indeed, under normal circumstances, CD8 T cells with an activated/memory phenotype (akin to extrathymic T cells) are responsible for the early (~day 4) production of IFN- γ following infection which occurs prior to maximal CD8 T cell expansion (~day 8) and probably is important for initial control of infection.⁵¹⁻⁵³ Evidence suggests that the early burst of IFN- γ is produced by MHC Ib-restricted CD8 T cells.⁵¹ OM⁺ extrathymic T cells are remarkably similar to MHC Ib-restricted T cells since they differ from classic MHC Ia-restricted T cells in the following ways: they display an activated phenotype even in uninfected animals; they initiate expansion and production of IFN- γ more rapidly, yet accumulate to lower levels than mainstream CD8 T cells following infection.^{14,50,54,55} Notably, while MHC Ib-restricted T cells could generate protective response against (IFN- γ sensitive) *Listeria monocytogenes*, they failed, like OM⁺ CD8 T cells, to eradicate LCMV.^{50,55} Interestingly, both T cell populations are positively selected by hematopoietic cells, in the thymus for MHC Ib-restricted T cells and in the LN for OM⁺ extrathymic T cells.^{14,21} How the cellular milieu providing TCR-dependent and -independent signals to immature T cells influences the properties of their progeny will need to be addressed in further studies.

Since T lymphocytes have a finite lifespan (of about 6 months in mouse), decreased thymus output associated with ageing and disease leads to a major restriction of the diversity of the T cell repertoire.^{56,57} Thus, in human subjects aged 20 to 30 years, the long-lived memory repertoire, as opposed to the naive repertoire, contributes less than 1% of the total diversity.⁵⁸ Several observations suggest that immune competence has a major influence on lifespan, and that changes in T lymphocyte populations could be implicated in the age-related increase in incidence of infections, cancer, and autoimmune diseases.^{57,59,60} Therefore, strategies to rejuvenate the thymus or to create thymus substitutes are being pursued with intense interest.⁶¹⁻⁶⁴ That OM⁺ extrathymic T cells cannot substitute for thymic T cells even though they have a diversified TCR repertoire implies that having the ability to generate new T cells is not sufficient to ensure immunocompetence. As a corollary, our studies illustrate that immunocompetence is best assessed by confrontation with pathogens. Indeed, based solely on the ability to reject allogeneic cells, OM⁺ extrathymic T cells seemed to be normal.¹⁷

Our demonstration that one crucial limitation of extrathymic T cells is their difficulty in dealing with viruses would be consistent with the idea that co-evolution with viruses has been a driving force in the remarkable conservation of the thymus as the primary T lymphoid organ in all jawed vertebrates. Interestingly, our work demonstrates that OM⁺ extrathymic T cells share the phenotype and functional properties of a minor subset of T cells found in euthymic mice, MHC Ib-restricted T cells. Similar to MHC Ib-restricted T cells¹⁴, the behavior of OM⁺ T cells seems to fit somewhere between conventional T cells and their evolutionary precursors, NK T cells. It will be important to determine how the environment where they develop can impinge on the function of T lymphocytes. Moreover, further studies will be needed to determine whether OM⁺ extrathymic T cells show the same behaviour as MHC Ib-restricted T cells against various pathogens. If this was the case, modulation of the OM-induced extrathymic development pathway may not substitute for classical thymic T cells but could have interesting therapeutic potential.

Acknowledgements

We are indebted to the NIAID MHC Tetramer Core Facility and CANVAC Tetramer Core Facility for providing tetramers. We thank Nathalie Labrecque for insightful comments, Pascale Blais for help with statistical analyses, and J.A. Kashul for editorial assistance. We are also grateful to Sylvie Brochu, Caroline Côté and Edit Horvath for helpful discussions and technical assistance.

References

- (1) Zapata A, Amemiya CT. Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;248:67-107.
- (2) Anderson G, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:73-99.
- (3) Anderson G, Harman BC, Hare KJ, Jenkinson EJ. Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. *Semin Immunol.* 2000;12:457-464.
- (4) Anderson G, Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature Rev Immunol.* 2001;1:31-40.
- (5) Zinkernagel RM, Althage A. On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:8092-8097.
- (6) Anderson G, Jenkinson EJ, Moore NC, Owen JJ. MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. *Nature.* 1993;362:70-73.
- (7) Suniara RK, Jenkinson EJ, Owen JJT. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J Exp Med.* 2000;191:1051-1056.
- (8) Anderson G, Hare KJ, Jenkinson EJ. Positive selection of thymocytes: the long and winding road. *Immunol Today.* 1999;20:463-468.
- (9) Carlyle JR, Zuniga-Pflücker JC. Requirement for the thymus in ab T lymphocyte lineage commitment. *Immunity.* 1998;9:187-197.
- (10) Zinkernagel RM, Althage A, Waterfield E et al. Restriction specificities, alloreactivity, and allotolerance expressed by T cells from nude mice reconstituted with H-2-compatible or -incompatible thymus grafts. *J Exp Med.* 1980;151:376-399.
- (11) Zerrahn J, Volkman A, Coles MC et al. 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.* 1999;96:11470-11475.

- (12) Martinic MM, Rulicke T, Althage A et al. Efficient T cell repertoire selection in tetraparental chimeric mice independent of thymic epithelial MHC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:1861-1866.
- (13) Coles MC, Raulet DH. NK1.1+ T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4+CD8+ cells. *J Immunol*. 2000;164:2412-2418.
- (14) Urdahl KB, Sun JC, Bevan MJ. Positive selection of MHC class Ib restricted CD8+ T cells on hematopoietic cells. *Nat Immunol*. 2002;3:772-779.
- (15) Sullivan BA, Kraj P, Weber DA, Ignatowicz L, Jensen PE. Positive selection of a Qa-1-restricted T cell receptor with specificity for insulin. *Immunity*. 2002;17:95-105.
- (16) Tanchot C, Lemonnier FA, Perarnau B, Freitas AA, Rocha B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science*. 1997;276:2057-2062.
- (17) Clegg CH, Rulffes JT, Wallace PM, Haugen HS. Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature*. 1996;384:261-263.
- (18) 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.
- (19) 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.
- (20) Louis I, Dulude G, Corneau S et al. Changes in the lymph node microenvironment induced by Oncostatin M. *Blood*. 2003;102:1397-1404.
- (21) Terra R, Labrecque N, Perreault C. Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules. *J Immunol*. 2002;169:684-692.
- (22) 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.

(23) Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1994;171:131-137.

(24) Gudmundsdottir H, Wells AD, Turka LA. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol.* 1999;162:5212-5223.

(25) Planz O, Ehl S, Furrer E et al. A critical role for neutralizing-antibody-producing B cells, CD4+ T cells, and interferons in persistent and acute infections of mice with lymphocytic choriomeningitis virus: implications for adoptive immunotherapy of virus carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:6874-6879.

(26) Gallimore A, Glithero A, Godkin A et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med.* 1998;187:1383-1393.

(27) Ochsenbein AF, Pinschewer DD, Odermatt B et al. Protective T cell-independent antiviral antibody responses are dependent on complement. *J Exp Med.* 1999;190:1165-1174.

(28) Battegay M, Cooper S, Althage A et al. Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates [published errata appears in *J Virol Methods* 1991 Nov;35(1):115 and 1992 Aug;38(2):263]. *J Virol Methods.* 1991;33:191-198.

(29) Ochsenbein AF, Pinschewer DD, Odermatt B et al. Correlation of T cell independence of antibody responses with antigen dose reaching secondary lymphoid organs: implications for splenectomized patients and vaccine design. *J Immunol.* 2000;164:6296-6302.

(30) Charan S, Zinkernagel RM. Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against vesicular stomatitis virus. *J Immunol.* 1986;136:3057-3061.

- (31) Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L et al. Adoptive transfer of T lymphocytes targeted to a single immunodominant minor histocompatibility antigen eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med.* 2001;7:789-794.
- (32) McBride K, Baron C, Picard S et al. The model B6dom1 minor histocompatibility antigen is encoded by a mouse homolog of the yeast STT3 gene. *Immunogenetics.* 2002;54:562-569.
- (33) Ludewig B, Ehl S, Karrer U et al. Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity. *J Virol.* 1998;72:3812-3818.
- (34) Coles RM, Mueller SN, Heath WR, Carbone FR, Brooks AG. Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. *J Immunol.* 2002;168:834-838.
- (35) Zinkernagel RM, Welsh RM. H-2 compatibility requirement for virus-specific T cell-mediated effector functions in vivo. I. Specificity of T cells conferring antiviral protection against lymphocytic choriomeningitis virus is associated with H-2K and H-2D. *J Immunol.* 1976;117:1495-1502.
- (36) Byrne JA, Oldstone MB. Biology of cloned cytotoxic T lymphocytes specific for lymphocytic choriomeningitis virus: clearance of virus in vivo. *J Virol.* 1984;51:682-686.
- (37) Thomsen AR, Johansen J, Marker O, Christensen JP. Exhaustion of CTL memory and recrudescence of viremia in lymphocytic choriomeningitis virus-infected MHC class II-deficient mice and B cell-deficient mice. *J Immunol.* 1996;157:3074-3080.
- (38) Charan S, Huegin AW, Cerny A, Hengartner H, Zinkernagel RM. Effects of cyclosporin A on humoral immune response and resistance against vesicular stomatitis virus in mice. *J Virol.* 1986;57:1139-1144.
- (39) Lefrancois L. Protection against lethal viral infection by neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies: distinct mechanisms of action in vivo. *J Virol.* 1984;51:208-214.

- (40) Moskophidis D, Bategay M, Bruendler MA et al. Resistance of lymphocytic choriomeningitis virus to α interferon and to γ interferon. *J Virol.* 1994;68:1951-1955.
- (41) Karrer U, Althage A, Odermatt B et al. On the key role of secondary lymphoid organs in antiviral immune responses studied in alymphoplastic (aly/aly) and spleenless (Hox11^{-/-}) mutant mice. *J Exp Med.* 1997;185:2157-2170.
- (42) Ehl S, Klenerman P, Aichele P, Hengartner H, Zinkernagel RM. A functional and kinetic comparison of antiviral effector and memory cytotoxic T lymphocyte populations in vivo and in vitro. *Eur J Immunol.* 1997;27:3404-3413.
- (43) Welsh RM. Assessing CD8 T cell number and dysfunction in the presence of antigen. *J Exp Med.* 2001;193:F19-F22.
- (44) Wang XZ, Stepp SE, Brehm MA et al. Virus-specific CD8 T cells in peripheral tissues are more resistant to apoptosis than those in lymphoid organs. *Immunity.* 2003;18:631-642.
- (45) Zinkernagel RM, Ehl S, Aichele P et al. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev.* 1997;156:199-209.
- (46) Meunier MC, Roy-Proulx G, Labrecque N, Perreault C. Tissue distribution of target antigen has a decisive influence on the outcome of adoptive cancer immunotherapy. *Blood.* 2003;101:766-770.
- (47) Hunziker L, Recher M, Macpherson AJ et al. Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections. *Nat Immunol.* 2003;4:343-349.
- (48) van den Broek MF, Muller U, Huang S, Aguet M, Zinkernagel RM. Antiviral defense in mice lacking both α / β and γ interferon receptors. *J Virol.* 1995;69:4792-4796.
- (49) Becker C, Pohla H, Frankenberger B et al. Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN- γ capture assay. *Nat Med.* 2001;7:1159-1162.

- (50) Seaman MS, Wang CR, Forman J. MHC class Ib-restricted CTL provide protection against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol.* 2000;165:5192-5201.
- (51) Das G, Sheridan S, Janeway CA, Jr. The source of early IFN-g that plays a role in Th1 priming. *J Immunol.* 2001;167:2004-2010.
- (52) Berg RE, Cordes CJ, Forman J. Contribution of CD8+ T cells to innate immunity: IFN-g secretion induced by IL-12 and IL-18. *Eur J Immunol.* 2002;32:2807-2816.
- (53) Pien GC, Nguyen KB, Malmgaard L, Satoskar AR, Biron CA. A unique mechanism for innate cytokine promotion of T cell responses to viral infections. *J Immunol.* 2002;169:5827-5837.
- (54) Kerksiek KM, Busch DH, Pilip IM, Allen SE, Pamer EG. H2-M3-restricted T cells in bacterial infection: rapid primary but diminished memory responses. *J Exp Med.* 1999;190:195-204.
- (55) Pérarnau B, Saron MF, San Martin BR et al. Single H2Kb, H2Db and double H2KbDb knockout mice: peripheral CD8+ T cell repertoire and anti-lymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses. *Eur J Immunol.* 1999;29:1243-1252.
- (56) Di Rosa F, Ramaswamy S, Ridge JP, Matzinger P. On the lifespan of virgin T lymphocytes. *J Immunol.* 1999;163:1253-1257.
- (57) Tanchot C, Rocha B. Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output. *J Exp Med.* 1997;186:1099-1106.
- (58) Arstila TP, Casrouge A, Baron V et al. A direct estimate of the human ab T cell receptor diversity. *Science.* 1999;286:958-961.
- (59) Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. *Science.* 1996;273:70-74.
- (60) Miller RA, Chrisp C. T cell subset patterns that predict resistance to spontaneous lymphoma, mammary adenocarcinoma, and fibrosarcoma in mice. *J Immunol.* 2002;169:1619-1625.
- (61) Erickson M, Morkowski S, Lehar S et al. Regulation of thymic epithelium by keratinocyte growth factor. *Blood.* 2002;100:3269-3278.

- (62) Poznansky MC, Evans RH, Foxall RB et al. Efficient generation of human T cells from a tissue-engineered thymic organoid. *Nat Biotechnol.* 2000;18:729-734.
- (63) Rossi S, Blazar BR, Farrell CL et al. Keratinocyte growth factor preserves normal thymopoiesis and thymic microenvironment during experimental graft-versus-host disease. *Blood.* 2002;100:682-691.
- (64) 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.

Figure Legends

Figure 3: In vitro proliferation of T lymphocytes of thymic versus extrathymic origin. Spleen T cells from B6 mice (thymic T cells) and from irradiated adult-thymectomized B6.SJL (Ly5.1) hosts reconstituted with LckOM fetal liver cells (Ly5.2; extrathymic T cells) were labeled with CFSE and stimulated with anti-CD3 \pm anti-CD28. After culturing for 24 to 96 h, cells were labeled with 7-AAD to exclude dead cells, and stained with antibodies against CD4, CD8, Ly5.1 and Ly5.2. Total cell numbers are expressed as a function of X which represents the number of cells/well at 24 h (before the beginning of cell division). This is one representative experiment out of five (cf Table 1).

Figure 4: Compared with control T cells, extrathymic T lymphocytes show a higher apoptosis rate and produce more IFN- γ . T lymphocytes of thymic and extrathymic origin were stimulated with anti-CD3 \pm anti-CD28 as in Figure 3. The proportion of Annexin V stained cells (mean \pm SD) was expressed for (A) whole CD4 (circles) and CD8 (triangles) populations of thymic (open symbols) and extrathymic (closed symbols) origin, and (B) as a function of the CFSE content (after 72 h) for thymic (open columns) and extrathymic (closed columns) T cells. Three mice per group. For Panel (A), statistically significant differences between thymic and extrathymic T cells are indicated for CD4 (*) and CD8 (\ddagger) T cells. (C) Production of cytokines by thymic (shaded histograms) and extrathymic (solid lines) T cells was assessed by intracellular staining with IL-2- and IFN- γ -specific antibodies 24 and 72 h after stimulation, respectively. Percentages represent the proportion of cytokine producing thymic (upper numbers) and extrathymic (bold font lower numbers) T cells. This is one representative experiment out of three.

Figure 5: LCMV GP33-specific CTL responses generated by thymus derived vs. extrathymic T cells following infection with LCMV-ARM (A-D) and LCMV-WE (E). GP33 tetramer⁺ CD8 T cells in the spleen (A, C) and mLNs (D) of B6 mice

(control T cells; open squares) and OM→RAG1^{-/-} chimeras (extrathymic T cells; closed triangles) following i.v. injection of LCMV ARM (200 pfu). Three mice per group. (B) OM→B6.SJL chimeras were created by transplantation of LckOM fetal liver into adult-thymectomized-irradiated B6.SJL mice. On day 90 post-transplant these mice presented a mixed lymphoid chimerism. Kinetics of expansion of extrathymic donor-derived T cells (Ly5.2⁺; closed triangles) vs. residual (thymus-derived) host cells (Ly5.1⁺; open triangles) following LCMV infection. Six mice were tested on day 3, and three mice on the other days. Results are depicted as percentages of tetramer⁺ CD8 T cells in panels (A-B) and absolute numbers in panels (C-D). (E) Percentage of GP33 tetramer⁺ CD8 T cells in the spleen and mLN of B6 (open squares; n = 3) mice and OM→RAG1^{-/-} chimeras (closed triangles; n = 2) 8 days following i.v. infection with LCMV-WE (200 pfu). All graphs are gated on CD8⁺ T cells.

Figure 6: Clearance of LCMV-ARM and LCMV-WE by thymus-derived and extrathymic T cells. (A) Mean virus titers (log pfu/organ) in the spleen, mLN and lung of B6 mice (open squares), OM→RAG1^{-/-} chimeras (closed triangles) and RAG1^{-/-} mice (circles) following LCMV-ARM infection. There were three mice per group. (B) Mean virus titers (log pfu/organ) in mice infected with LCMV-WE. Spleen, kidney and lung of B6 mice (open circles) and OM→RAG1^{-/-} chimeras (closed bars) were harvested on day 8 and 20 post-infection. Two to three mice per group. Dotted lines indicate the detection limit of the immunological focus assay. (C) Apoptosis of splenic CD8 T cells following LCMV-ARM infection. Histogram bars show the mean proportion of Annexin V⁺ elements among GP33 tetramer⁺ (+) and tetramer⁻ (-) CD8 T cells in B6 mice (closed bars) and OM→RAG1^{-/-} chimeras (open bars). Three to four mice per group.

Figure 7: In vivo CTL cytotoxicity against GP33-41 coated cells in B6 mice and OM→RAG1^{-/-} chimeras after immunization with DCs. Mice were immunized with 1-2 X 10⁶ splenic DCs coated with GP33-41 peptide on days 0 and 14. GP33-41-

specific cytotoxicity in vivo was assessed on day 21. Splenic cells pulsed with 10^{-6} M GP33-41 peptide or not were labeled with a high (250 nM) and low (25 nM) concentration of CFSE, respectively. A 1:1 mixture of these target cell populations was injected i.v. into naïve and immunized mice. After 4 h, the mice were killed and the spleen and mLNs were analyzed for the presence of CFSE^{high} and CFSE^{low} target cell population and the tetramer⁺ CD8 T cells. (A), Data show a representative histogram plot of spleen cells from naïve and immunized mice 4 h after transfer of CFSE labeled target cells. (B) Percentage of specific lysis in spleen and mLNs of immunized B6 mice and chimeras. The mean numbers of GP33-specific CD8 cells are shown above each bar. There were three mice per group.

Figure 8: Failure of extrathymic T cells to control LCMV-ARM following adoptive transfer in RAG1^{-/-} mice. RAG1^{-/-} mice were infected with 200 pfu of LCMV-ARM LCMV i.v., and viral titers in the spleen, mLNs and lung were determined on day 30. Recipient were either untreated or received 30×10^6 splenocytes from naïve OM→RAG1^{-/-} chimeras (extrathymic T cells) or C57Bl/6J mice (thymic T cells) two days before LCMV infection. Data represent means for three mice per group.

Figure 9: Antibody response to LCMV-WE and VSV-IND in OM→RAG1^{-/-} chimeras vs. control mice. (A) Blood of B6 mice (open squares) and OM→RAG1^{-/-} chimeras (closed triangles) was tested for LCMV-NP-specific IgG Ab following i.v. infection with 200 pfu of LCMV-WE. The data show the mean values from two chimeras and three B6 mice per point. Anti-LCMV antibody titers were inferior in chimeras relative to controls on day 12 and 20 ($0.05 < p < 0.1$). (B) VSV neutralizing antibody titers were assessed in the blood of B6 mice (open squares) and OM→RAG1^{-/-} chimeras (closed triangles) following intravenous infection with 2×10^6 pfu of VSV Indiana. The data show the values obtained for three mice per point except for days 12 to 20 because two out of three chimeras died on day 10 after infection with VSV (*). On day 8, VSV neutralizing titers were lower in chimeras relative to controls ($p < .05$ for total Ig as well as IgG titers)

Figure 3

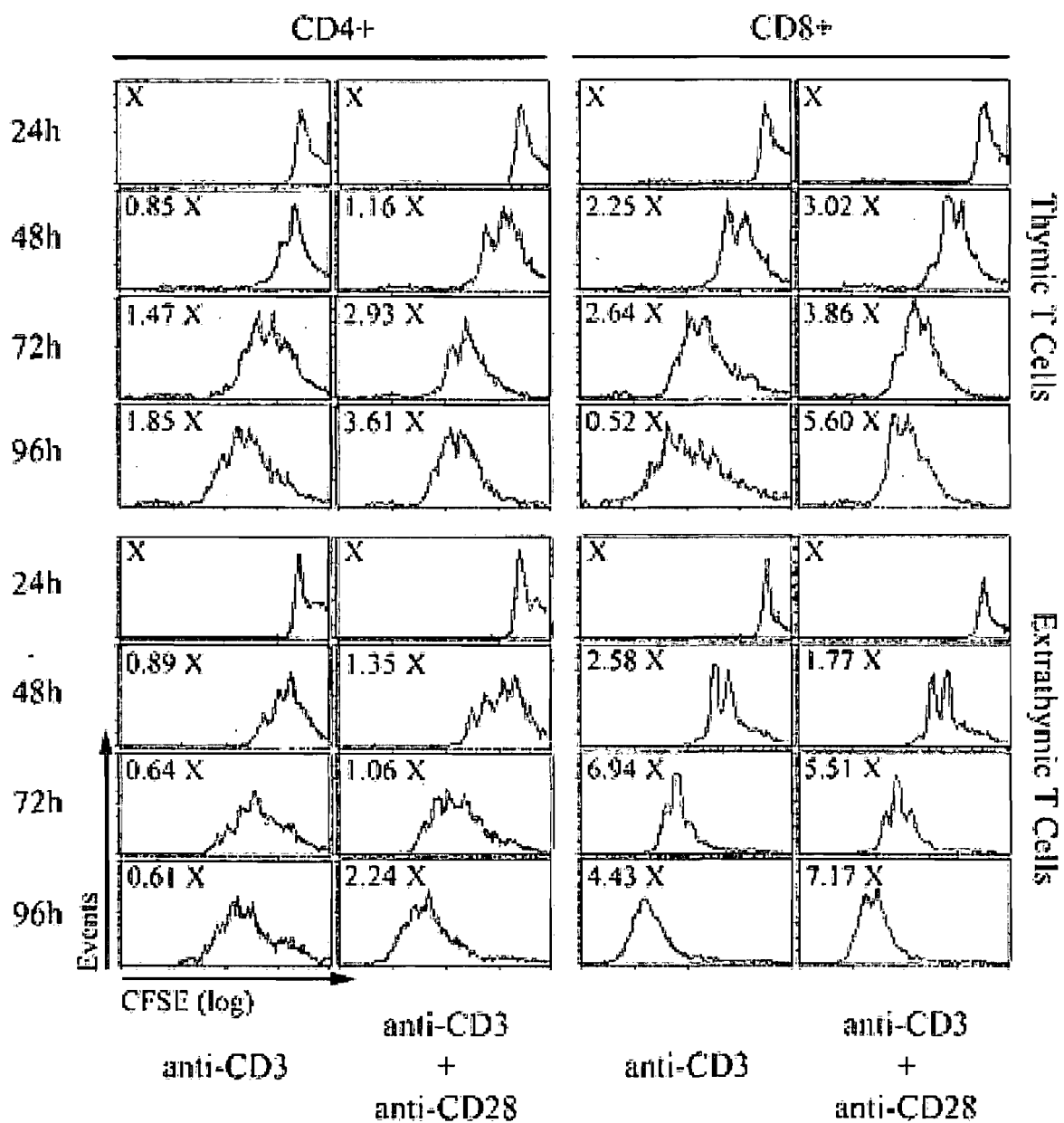


Figure 4

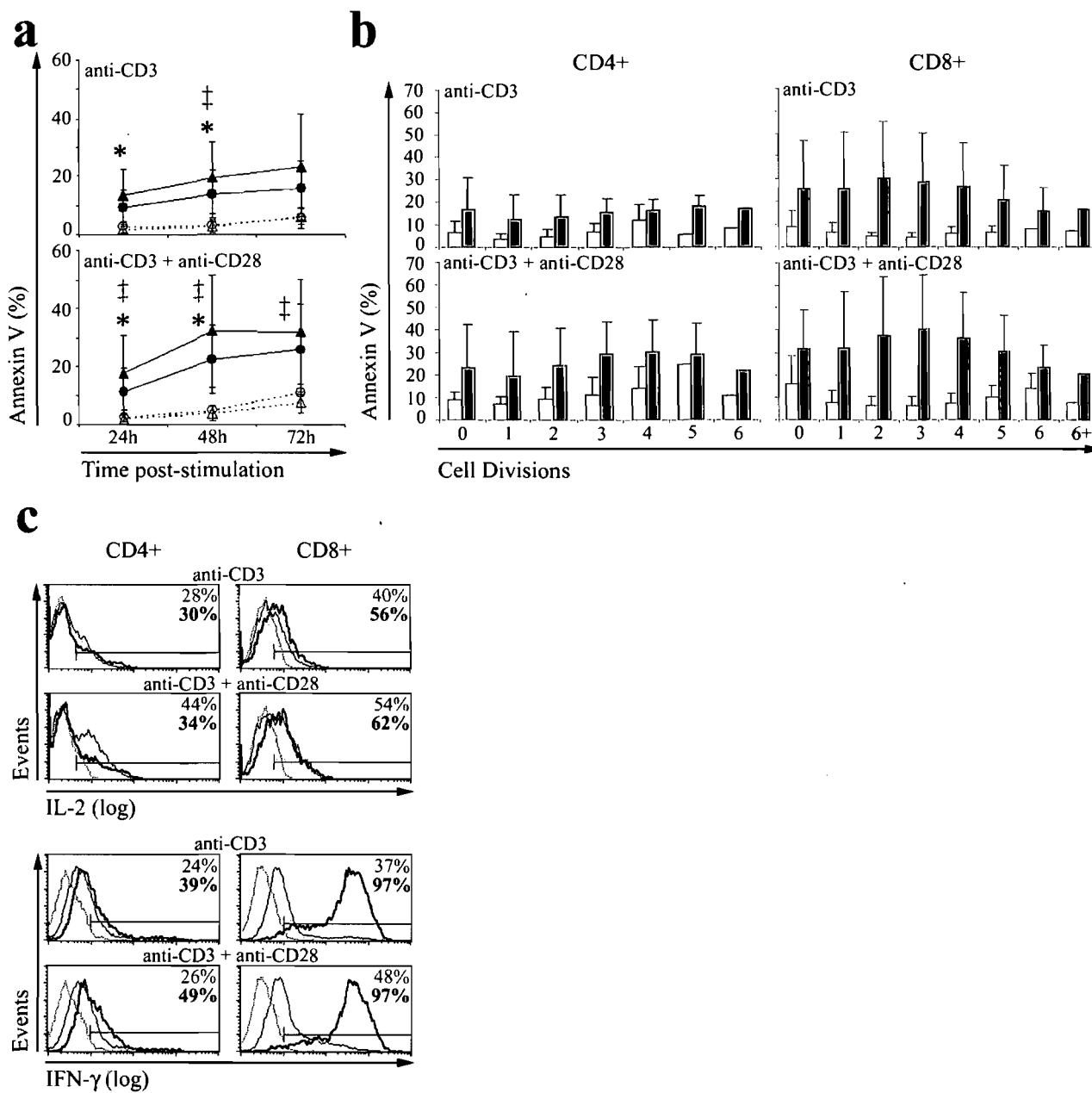


Figure 5

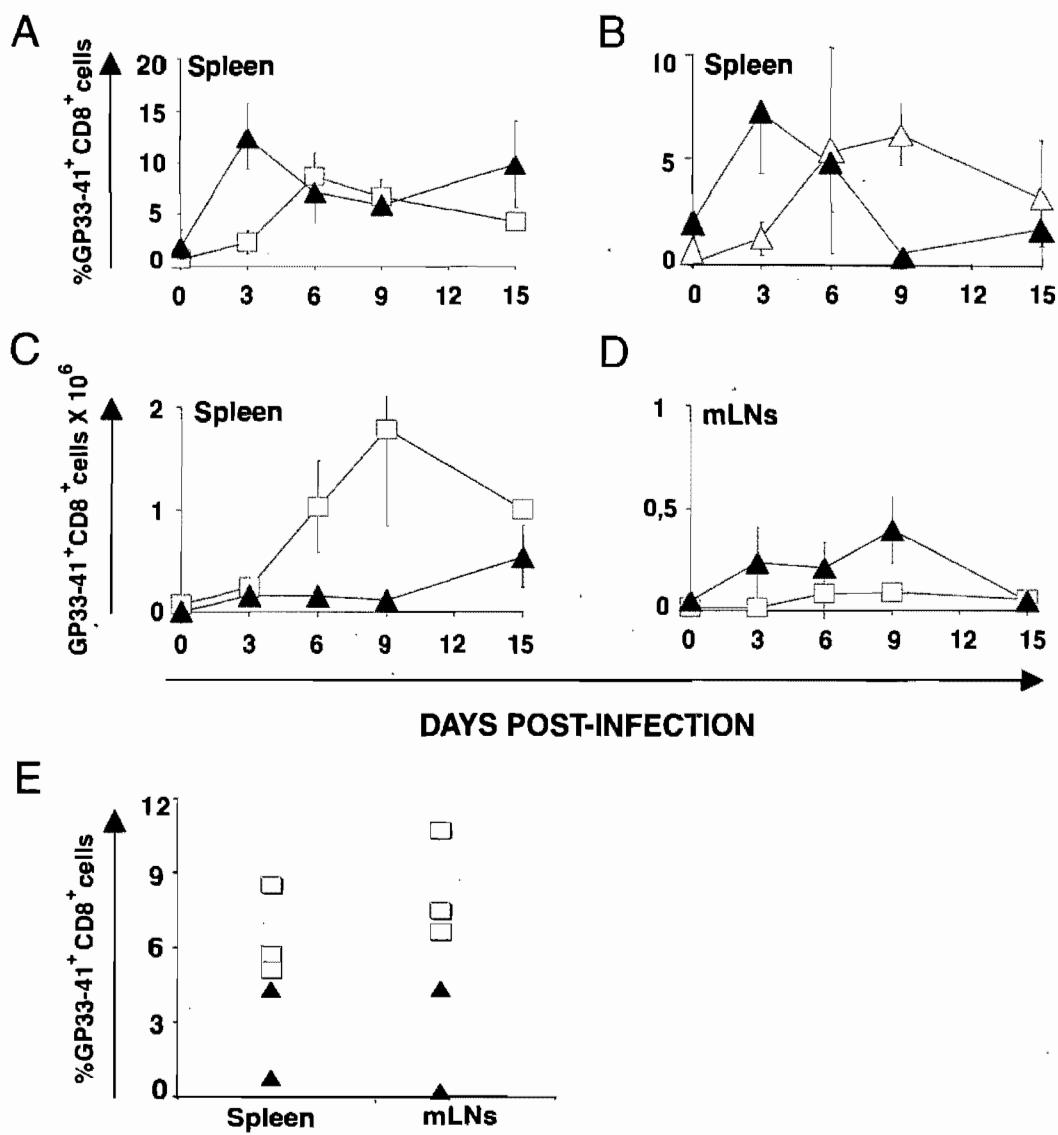


Figure 6

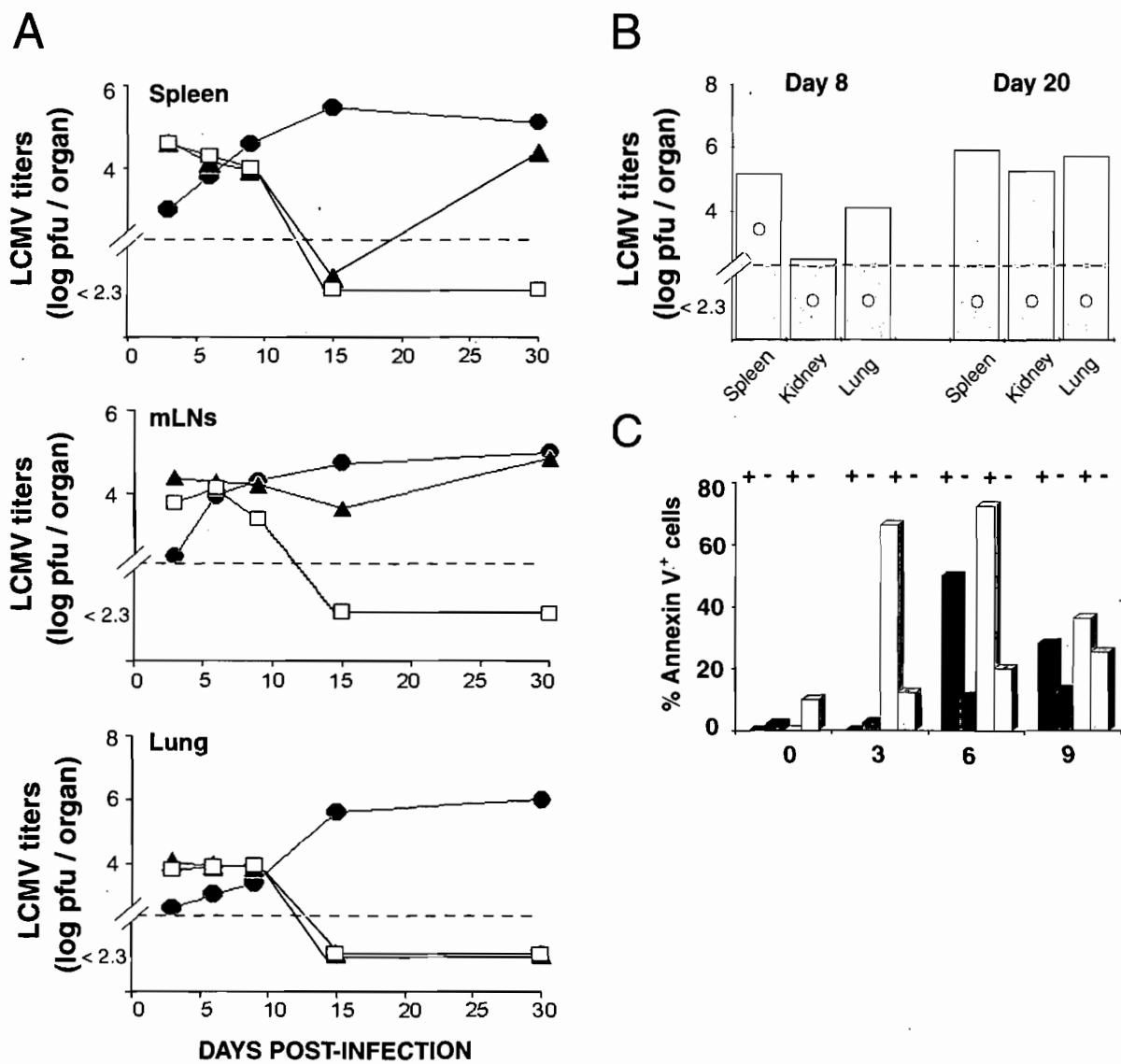


Figure 7

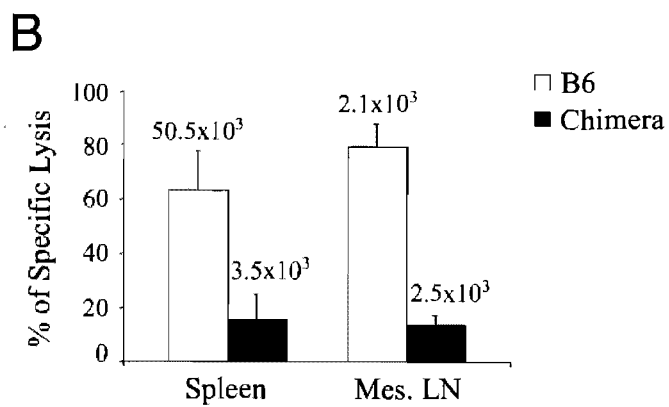
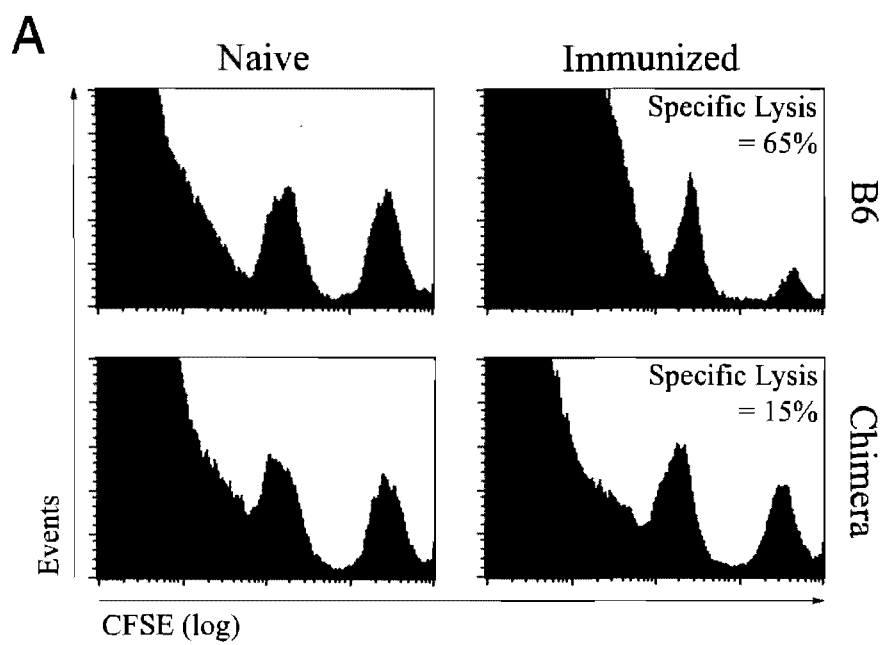


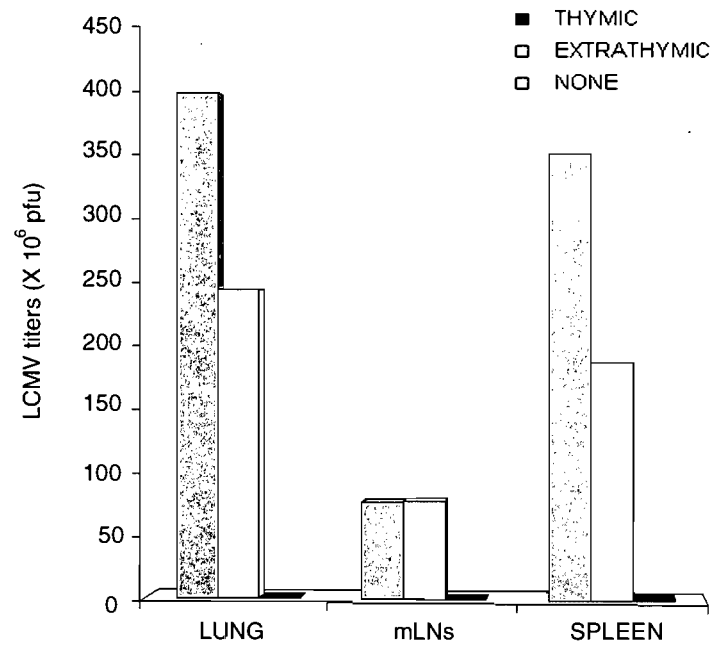
Figure 8

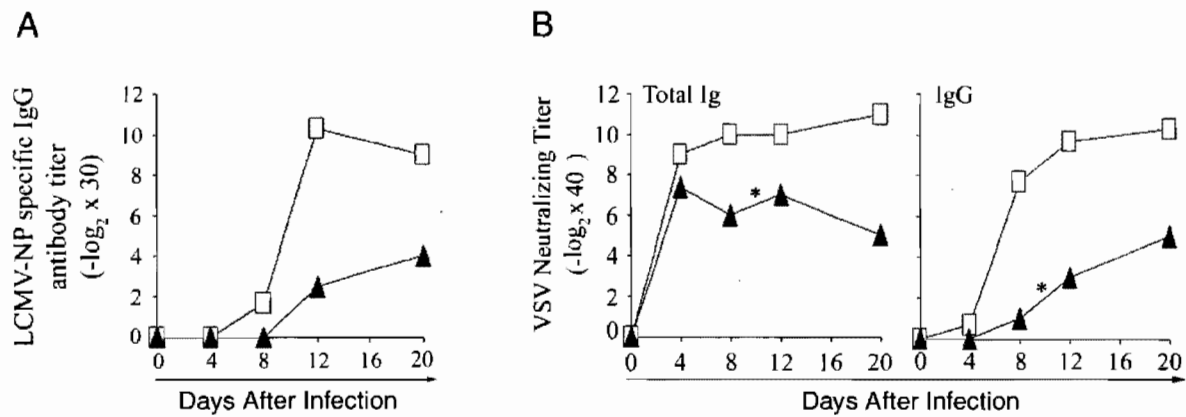
Figure 9

Table 1**Table 1.** Quantitative dynamics of thymic and extrathymic T cell proliferation *in vitro*.

	CD4+		CD8+	
	anti-CD3	anti-CD3+ anti-CD28	anti-CD3	anti-CD3+ anti-CD28
Thymic T cells				
Burst size (n) ^a	3.4 ± 0.9	5.8 ± 0.8	6.7 ± 2.3	10.8 ± 1.7
Doubling Time (h) ^b	43.3 ± 9.9	28.8 ± 2.4	28.0 ± 6.1	21.1 ± 1.4
Expansion (x-fold) ^c	1.3 ± 0.3	1.7 ± 0.9	1.9 ± 0.9	5.7 ± 3.5
Extrathymic T cells				
Burst size (n)	4.3 ± 0.6*	6.2 ± 2.1	18.8 ± 5.1**	18.0 ± 3.7**
Doubling Time (h)	34.9 ± 3.2	28.7 ± 5.1	17.3 ± 1.8*	17.5 ± 1.3**
Expansion (x-fold)	0.6 ± 0.1**	0.8 ± 0.4*	5.6 ± 1.8*	4.7 ± 1.0
Splenocytes from B6 mice (thymic T cells) and from OM→B6.SJL chimeras (extrathymic T cells) were labeled with CFSE and stimulated with anti-CD3 ± anti-CD28. After 72 h, cells were labeled with 7-AAD and stained with antibodies against CD4, CD8, Ly5.1 and Ly5.2 (mean ± SD for five experiments).				
^a burst size = number of daughter cells / number of dividing precursor cells.				
^b doubling time = t x ln2 / ln burst size.				
^c expansion = number of cells at 72 hrs / number of cells at 24 hrs.				
Student's <i>t</i> test: * p < 0.05, ** p < 0.01.				

Deuxième article

Why T cells of thymic versus extrathymic origin are functionally different.

Marie-Ève Blais,^{*†} Sylvie Brochu,^{*†} Martin Giroux,^{*†} Marie-Pier Bélanger,^{*†} Gaël
Dulude,[‡] Rafick-Pierre Sékaly[‡] & Claude Perreault^{*†§ 2}

* Institute for Research in Immunology and Cancer and

† Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada H3C 3J7

‡ Centre de Recherche du CHUM, Montréal, QC, Canada H2X 1P1

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

The Journal of Immunology, Volume 180, Number 4, p.2299-312, 2008

Abstract

Age-related thymic involution severely impairs immune responsiveness. Strategies to generate T cells extrathymically are therefore being explored with intense interest. We have demonstrated that T cells produced extrathymically were functionally deficient relative to thymus-derived T cells. The main limitation of extrathymic T cells is their undue susceptibility to apoptosis; they thus do not expand properly when confronted with pathogens. Using Oncostatin M-transgenic mice, we found that in the absence of lymphopenia, T cells of extrathymic origin constitutively undergo excessive homeostatic proliferation that leads to overproduction of IL-2 and IFN- γ . IFN- γ upregulates Fas and FasL on extrathymic CD8 T cells, thereby leading to their demise by Fas-mediated apoptosis. Moreover, IFN- γ and probably IL-2 curtail survival of extrathymic CD4 T cells by downregulating IL-7R α and Bcl-2, and support a dramatic accumulation of Foxp3⁺ T regulatory cells. In addition, we show that wild-type thymus-derived T cells undergoing homeostatic proliferation in a lymphopenic host shared key features of extrathymic T cells. Our work explains how excessive lymphopenia-independent homeostatic proliferation renders extrathymic T cells functionally defective. Based on previous work and data presented herein, we propose that extrathymic T cells undergo constitutive homeostatic proliferation because they are positively selected by lymph node hematopoietic cells rather than by thymic epithelial cells.

Introduction

We have known for over forty years that the primary function of the thymus is to produce T lymphocytes (1). However, despite enormous progress in our understanding of molecular and cellular processes involved in T-cell development, the ultimate role of the thymus stroma still eludes us (2). By ultimate role, we mean the ecologically relevant and evolutionarily selected function of the thymus in host defense (3). Indeed, though commonly taken for granted, the conservation of the thymus as the primary T lymphoid organ in all animals with an adaptive immune system is remarkable. In contrast, about ten different organs have served as primary sites of hematopoiesis (including “B-cell poiesis”) in jawed vertebrates (4, 5). At face value, conservation of the thymus as the primary T lymphoid organ suggests that intrathymic development endows T cells with elusive evolutionarily selected functional attributes (6). The reason why the thymus unquestionably provides a unique environment for T-cell precursor differentiation remains largely unknown. This is problematic since progressive thymus atrophy ultimately affects all ageing subjects and can even impinge on younger subjects affected by several serious illnesses (7-10). Therefore, strategies to create thymus substitutes are being pursued with intense interest (11-14).

Unexpectedly, studies from Zúñiga-Pflücker’s group have shown that a monolayer of stromal cells can support all steps of T-cell development (13, 15). Thus the three-dimensional thymic microenvironment and the presence of thymic epithelial cells are not essential for T-cell development. In line with this, a cryptic extrathymic T-cell development pathway has been described in lymph nodes (LN)³ of WT mice. Indeed, studies by Guy-Grand et al. using transgenic mice bearing a green fluorescent protein gene placed under the control of the RAG2 promoter showed that LNs (and to a much lesser extent Peyer’s patches) were the sole sites of extrathymic T lymphopoiesis in mice (16). In euthymic mice, this pathway is inhibited by the progeny of the classic thymic pathway. However, the extrathymic LN pathway is amplified in athymic mice and in mice with severe T-cell depletion (16, 17).

Nevertheless, in nontransgenic athymic mice, extrathymic T-cell development is extremely limited (16). Therefore, since athymic mice present severe T-cell lymphopenia, it has been difficult to compare the protective value of thymically- and extrathymically-produced T cells. That caveat was resolved by using Oncostatin M (OM)-transgenic mice. Transgenic expression or injection of OM induces total thymic atrophy that is compensated by a massive production of T cells in LNs that ectopically recapitulates all the development stages normally found in the thymus (18, 19). OM has two crucial effects on LNs. OM induces a COX-2-dependent angiogenesis of high endothelial venules that entails a massive accumulation of common lymphoid progenitors in LNs (20). Furthermore, OM increases the clonogenic potential of LN-resident common lymphoid progenitors (21). Therefore, induction of extrathymic T-cell development by OM is not a transgenic idiosyncrasy. OM simply amplifies a cryptic T-cell development pathway that is operative in LNs of nontransgenic mice. Since OM-transgenic mice have no quantitative CD4 or CD8 T-cell deficit (19), they provide a unique model to evaluate the function of T cells generated extrathymically. We wish to emphasize that for brevity, we will hereafter refer to T cells generated in the thymus as thymus-derived T cells and to T cells generated extrathymically as extrathymic T cells.

T-cell development in OM-transgenic mice is truly thymus-independent as shown by reconstitution of athymic *nude* mice by OM-transgenic hematopoietic stem cells (18). In contrast, T-cell development in OM-transgenic mice is LN-dependent. This was demonstrated by breeding OM-transgenic mice with *aly/aly* mice which have no LNs but have a normal spleen (22). When tested at 12 wk of age, spleens of OM-transgenic *aly/aly* mice were essentially devoid of T cells (Figure 10 A). Extrathymic T cells generated in the LNs of OM-transgenic mice display a polyclonal V β repertoire (19). We have previously demonstrated that even though OM-transgenic mice have no CD4 or CD8 T-cell lymphopenia, their extrathymic T cells are functionally deficient and cannot substitute for thymus-derived T cells (6, 19, 23). Extrathymic CD4 T cells fail to expand normally following antigen stimulation and do not provide adequate B-cell help following infection with lymphocytic

choriomeningitis virus (LCMV) or vesicular stomatitis virus (23). Function of extrathymic CD8 T cells is somewhat better than that of their CD4 counterparts. Following antigen presentation, extrathymic CD8 T cells swiftly initiate proliferation and IFN- γ production, but undergo premature contraction and hence accumulate to lower levels than thymus-derived T cells (23). Accordingly, extrathymic CD8 T cells provide only transient control of LCMV infection (23). Overall, the Achilles' heel of extrathymic T cells resides in their rapid and massive apoptosis following antigenic stimulation (6). The primary objective of this work was therefore to discover why extrathymic T cells are overly susceptible to apoptosis and consequently less fit than classic thymus-derived T cells.

Notably, OM-induced extrathymic CD4 and CD8 T cells behave like "innate" T cells (24): they have a memory-like phenotype ($CD4^+ CD44^{high} CD62L^{low}$ and $CD8^+ CD44^{high} CD122^{high}$) (19, 25), rapidly secrete high amounts of IFN- γ upon antigen recognition, exhibit an accelerated turnover rate in 5-bromo-2'-deoxyuridine pulse-chase assays (19), and display exceedingly low levels of T-cell receptor excision circles (Figure 10 *B* and *C*). Thus, though OM-transgenic mice are not T-cell lymphopenic (19), their extrathymic LN-derived T cells undergo vigorous "homeostatic" proliferation (HP) under steady-state conditions (in the absence of infection). Our second objective was therefore to determine whether the functional behavior of extrathymic T cells was due to their excessive HP. To this end, we compared features of extrathymic T cells from OM-transgenic mice to those of thymus-derived T cells undergoing HP in lymphopenic mice. Our work explains why extrathymic T cells cannot substitute for thymus-derived T cells and provides a rationale for conservation of the thymus as the sole primary T-lymphoid organ.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6J (referred to as CD45.2⁺ WT mice), B6.129P2-Tcrb^{tm1Mom}/J (TCR β -KO mice), B6.SJL-*Ptprc*^a*Pep3*^b/BoyJ (B6.SJL; referred to as CD45.1⁺ WT mice), C3H/HeJ (H-2^k), B6.129S7-*Ifngr1*^{tm1Agt}/J (referred to as IFN- γ R-KO), and **B6.129S7-*Ifng*^{tm1Ts}/J** (*Ifng*^{-/-}) mice were initially obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). We purchased *aly/aly* mice from CLEA Japan and CD1-*Foxn1*^{nu} mice were purchased from the Charles River Laboratory. OM-transgenic mice on a C57BL/6J background have been previously described (19). In OM-transgenic mice, expression of bovine OM is driven by the proximal *Lck* promoter that is active primarily in immature thymocytes. *Ifng*^{-/-} OM-transgenic mice were generated by breeding *Ifng*^{-/-} females with OM-transgenic males. All mice were bred at the Institute for Research in Immunology and Cancer and maintained under specific pathogen-free conditions according to the standards of the Canadian Council on Animal Care. Experimental protocols were approved by the Comité de Déontologie Animale of the Université de Montréal. Mice between 8 and 15 weeks of age were used.

Antibodies

All antibodies were purchased from BD Biosciences except anti-IL-7R α (eBiosciences). Cells were stained as previously described(23). Bcl-2 and cytokine intracellular staining was achieved by using the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Prior to intracellular cytokine staining, cells were stimulated with phorbol myristate acetate (PMA; 50 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) for 4 h in presence of 2.5 ug/ml of Brefeldin A. This step is necessary to allow cytokine accumulation in the Golgi but insufficient to induce *de novo* cytokine production in naive cells. Intranuclear anti-FoxP3 staining was performed with the Treg staining kit from eBioscience.

Quantification of T-cell receptor excision circles (TRECs)

TRECs from C57BL/6J and OM-trangenic mice were quantified as previously described (26).

Homeostatic Proliferation

Homeostatic proliferation in lymphopenic mice was induced according to classic methods (27). CD4 CD44^{low} and CD8 CD44^{low} spleen T cells from WT mice were enriched using EasySep T-cell enrichment kit (Molecular Probes), followed by purification by flow cytometry. 10^6 total cells (5×10^5 CD4 T cells and 5×10^5 CD8 T cells) were transferred into non irradiated TCR β -KO mice and analyzed by flow cytometry 14 or 30 days later. For competitive assays, 5×10^5 IFN- γ R-KO T cells (CD45.2⁺) were injected along with 5×10^5 B6.SJL (WT, CD45.1⁺) T cells into TCR β KO mice. Transferred cells were tracked according to CD45.1 and CD45.2 expression.

Quantitative real-time PCR (qPCR): cDNA preparation

Thymus-derived and extrathymic CD4 and CD8 spleen T cells were purified by flow cytometry according to CD44 expression. Total RNA of purified cells was extracted and reverse transcribed in a final volume of 100 μ L using the High Capacity cDNA Archive Kit with random primers (Applied Biosystems, Foster City, CA) as suggested by the manufacturer. Gene expression level was determined using primer and probe sets from Applied Biosystems (ABI Assays on Demand, <http://www.appliedbiosystems.com/>). PCR reactions for 384-well plate formats were performed using 2 μ l of cDNA samples (20–50 ng), 5 μ l of the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA), 0.5 μ l of the TaqMan® Gene Expression Assays (20X) and 2.5 μ l of water in a total volume of 10 μ l. The mouse GAPD (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and/or Hprt (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) pre-developed TaqMan® assay were used as endogenous controls.

Primer and probe sets

Gene expression level was also determined using primer and probe sets from Universal ProbeLibrary, a fast, specific and flexible format for qPCR. (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp>). PCR reactions for 384-well plate formats were performed using 2 μ l of cDNA samples (50 ng), 5 μ l of the TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA), 2 μ M of each primer and 1 μ M of the Universal TaqMan probe in a total volume of 10 μ l.

Detection and analysis

The ABI PRISM[®] 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed to an initial step of 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. All reactions were run in triplicate and the average values were used for quantification. The mouse GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), ACTB (Beta Actin) or 18S ribosomal RNA were used as endogenous controls. The relative quantification of target genes was determined by using the $\Delta\Delta$ CT method. Briefly, the Ct (threshold cycle) values of target genes were normalized to an endogenous control gene (GAPDH) (Δ CT = Ct_{target} - Ct_{GAPDH}) and compared with a calibrator (Human reference RNA): $\Delta\Delta$ CT = Δ Ct_{Sample} - Δ Ct_{Calibrator}. Relative expression (RQ) was calculated using the Sequence Detection System (SDS) 2.2.2 software (Applied Biosystems) and the formula $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$.

Expression of IL-7R α and Bcl-2 in adoptively transferred cells

Extrathymic CD4 T cells (CD45.2⁺) from spleen of OM-transgenic mice were enriched using EasySep T-cell enrichment kit (Molecular Probes), then isolated by FACS sorting. Cells were stained with the following antibodies: anti-IL-7R α , anti-Bcl-2, anti-CD4 and anti-CD45.2. Expression of IL-7R α and Bcl-2 in donor cells was assessed before injection of 2×10^6 cells into non-irradiated B6.SJL mice (CD45.1⁺).

Donor-derived cells were harvested from the spleen of recipient mice 4.5 d later and were analyzed using the same antibodies and flow cytometry settings. In control groups, B6.SJL cells were injected into OM-transgenic or C57BL/6 hosts.

Detection of soluble cytokines

IFN- γ concentrations were assessed with the *In Vivo* Cytokine Capture Assay according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences). Briefly, mice were injected with a biotin-labeled antibody specific to the targeted cytokine. Mice were sacrificed 24 h later and the cytokine/antibody complex was captured from sera on ELISA plate microwells coated with antibody specific to a different epitope of the same cytokine. The complex was detected by streptavidin horseradish peroxidase followed by the addition of a chromogenic solution. IL-2 was detected in spleens of naive mice using Cytometric Bead Arrays (CBA, BD Biosciences).

In vitro suppression assay

To test for suppression of allogeneic MLR by individual T-cell subsets, spleen cells from WT or OM-transgenic mice were sorted according to their CD4 and CD25 expression. Graded numbers of sorted test T cells were combined with 5×10^5 B6.SJL CFSE-labeled effector (E) splenocytes (2.5 μ M) and 5×10^5 allogeneic irradiated (2800 rad) stimulator (S) C3H/HeJ splenocytes. Cells were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 4 d and analyzed by flow cytometry using FCS (DeNovo softwares) and *Modfit* softwares (Verity Software House).

Statistics

Differences between groups were tested using Student's t-test (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$). Error bars represent standard deviations.

Results

Apoptotic profile of extrathymic T cells

All studies reported in this article were performed on spleen T cells. Unless stated otherwise, extrathymic T cells were harvested from the spleen of OM-transgenic mice and thymus-derived T cells were isolated from the spleen of WT C57BL/6 mice. In initial experiments, we used Annexin V labeling to quantify the apoptosis rate among thymus-derived and extrathymic T cells of adult uninfected mice. The proportion of apoptotic cells was significantly increased in both CD4 (seven-fold) and CD8 (four-fold) extrathymic T cells compared to thymus-derived T cells. About 17% of CD4 and 8% of CD8 extrathymic T cells were Annexin V⁺ (Figure 10 D). Practically all extrathymic T cells in OM-transgenic mice are CD44^{high} (Figure 11 A). In contrast, only a small proportion of thymus-derived CD4 (~15%) and CD8 (~20%) T cells express high CD44 levels. We observed that like extrathymic (CD44^{high}) T cells, and in accordance with previous studies (28), thymic CD44^{high} T cells displayed much higher apoptosis rates than CD44^{low} T cells (Figure 11 B). Since thymus-derived CD44^{low} and CD44^{high} T-cell subsets have different apoptosis rates, they were analyzed separately in further experiments.

Factors affecting T-cell viability vary depending on cell type and status (29). Survival of naive T cells is regulated by a Bcl-2/Bim-dependent route and Bcl-2 levels are primarily regulated by IL-7 signals. Survival of activated T cells is regulated not only by members of the Bcl-2 family, but also by death receptors, in particular Fas. To uncover the molecular mechanisms involved in apoptosis of extrathymic T cells, we first evaluated expression of IL-7R α , Bcl-2 and Fas in extrathymic and thymus-derived (CD44^{low} and CD44^{high}) T cells. Among CD4 T cells, extrathymic and CD44^{high} thymus-derived T cells showed a conspicuous reduction in IL-7R α and Bcl-2 expression relative to thymus-derived CD44^{low} T cells (Figure 11 C). Moreover, extrathymic CD4 T cells showed upregulation of two senescence markers, PD-1 and KLRG-1 (Figure 10 E). Analysis of mRNA transcripts

by quantitative real-time PCR (qPCR) revealed that repression of Bcl-2 expression occurred at the transcriptional level while that of IL-7R α depended on posttranscriptional mechanisms (Figure 11 D). In contrast to CD4 T cells, expression of IL-7R α and Bcl-2 in CD8 T cells was increased in extrathymic and thymus-derived CD44^{high} population relative to thymus-derived CD44^{low} T cells (Figure 11 C). However, Fas levels were upregulated in both CD4 and CD8 extrathymic and thymus-derived CD44^{high} T cells compared to thymus-derived CD44^{low} T cells. We conclude from these results that expression of these three key molecules for T-cell survival is similar in CD44^{high} T cells irrespective of their thymic or extrathymic origin, and differs from that of thymus-derived CD44^{low} T cells. In addition, our data indicate that expression of IL-7R α , Bcl-2 and Fas is differentially regulated in CD4 and CD8 T cells. They also suggest that downregulation of IL-7R α /Bcl-2 and upregulation of Fas are instrumental in apoptosis of extrathymic CD4 and CD8 T cells, respectively. Notably, key features of OM-transgenic T cells were also found in non-transgenic extrathymic T cells. Indeed, CD4 and CD8 T cells from *nu/nu* mice showed an increased frequency of apoptotic cells that correlated with low IL-7R α and Bcl-2 expression in CD4 T cells and increased Fas expression in CD8 T cells (Figure 12).

Thymus-derived CD44^{high} T cells include two types of cells: genuine memory cells that have encountered foreign antigen, and memory-like cells engendered by HP (30). As mentioned in the introduction, OM-transgenic extrathymic T cells undergo excessive HP in the absence of lymphopenia. We therefore sought to compare the apoptotic profile of extrathymic T cells with that of thymus-derived T cells undergoing HP. HP of thymus-derived T cells was induced in all experiments reported in this manuscript by injection of 10⁶ CD44^{low} thymus-derived spleen T cells from WT mice in nonirradiated TCR β -KO mice. Recipient mice were analyzed during early and late stages of HP, that is, 14 and 30 days post-transfer. At both time points, CD4 and CD8 thymus-derived T cells undergoing HP showed high apoptosis rates (Annexin V⁺ cells), similar to those of extrathymic T cells (Figure 11 E). On day

14, and to a lesser extent on day 30 of HP, IL-7R α and Bcl-2 were downregulated and Fas was upregulated on CD4 T cells in HP, a pattern similar to that of extrathymic and thymus-derived CD44^{high} CD4 T cells (Figure 11 E, left). Expression profiling of CD8 T cells yielded a more complicated picture as it disclosed both similarities and discrepancies between extrathymic T cells and thymus-derived T cells in HP (Figure 11 E, right). Thus, similar to extrathymic CD8 T cells, thymus-derived CD8 T cells in HP upregulated IL-7R α on day 30 and showed a modest upregulation of Fas on day 14. However, while Bcl-2 expression was increased in extrathymic CD8 T cells, thymus-derived T cells in HP downregulated Bcl-2 on days 14 and 30. Since binding of Fas to its ligand induces apoptosis of T cells in HP (31), we next quantified expression of Fas ligand (FasL) transcripts in CD4 and CD8 T-cell subsets. Extrathymic CD8 T cells presented a distinctive and major upregulation of FasL transcripts that was not found in thymus-derived CD44^{high} T cells or in thymus-derived T cells in HP (Figure 11 F). Thus, thymus-derived T cells in HP shared most but not all features of extrathymic T cells.

Downregulation of IL-7R α and Bcl-2 in extrathymic CD4 T cells is non cell-autonomous

To determine whether downregulation of IL-7R α expression impinged on apoptosis of extrathymic CD4 T cells, we determined the proportion of Annexin V⁺ cells among IL-7R α ^{lo} and IL-7R α ^{hi} extrathymic CD4 T cells. The CD4 population with a high apoptosis rate resided in the IL-7R α ^{low} fraction (19.1%) and not in the IL-7R α ^{hi} subset (3.5%), suggesting that downregulation of IL-7R α is instrumental in apoptosis of extrathymic CD4 T cells (Figure 13 A). Several environmental factors such as γ_c cytokines, glucose deprivation and TCR triggering can decrease IL-7R α expression (32, 33). To assess whether cell-extrinsic factors were responsible for downregulation of IL-7R α on extrathymic CD4 T cells, we transferred extrathymic CD4 T cells from OM-transgenic mice (CD45.2⁺) into non irradiated WT (CD45.1⁺) mice and evaluated IL-7R α expression on transferred cells. We first verified in a

negative control group that IL-7R α expression was essentially unchanged on WT CD45.1⁺ cells transferred into WT CD45.2⁺ recipients (Figure 13 B, top). In contrast, expression of IL-7R α was increased by 105% on extrathymic CD4 T cells transferred into WT mice (Figure 13 B, middle). In keeping with this observation, IL-7R α expression on extrathymic T cells increased 3.8-fold following overnight incubation in serum-free medium (data not shown). Moreover, when thymus-derived T cells (from WT mice) were transferred into OM-transgenic mice, expression of IL-7R α decreased by 64% (Figure 13 B, bottom). Of significance, we found a close correlation between expression of IL-7R α and Bcl-2 in adoptively transferred T cells (Figure 13 C). Furthermore, decreased expression of IL-7R α and Bcl-2 in WT T cells transferred into OM-transgenic mice correlated with low cell recovery relative to OM⁺ T cells transferred into WT hosts (Figure 13 D). This finding shows that apoptosis of extrathymic CD4 T cell is induced by the OM-transgenic environment. Collectively, these results lead us to conclude that downregulation of IL-7R α on extrathymic CD4 T cells is a reversible non cell-autonomous feature that reduces levels of Bcl-2 and entails a high apoptosis rate.

IL-2 and IFN- γ production and accumulation in OM-transgenic mice

The above results suggest that apoptosis of extrathymic CD4 T cells is due to repression of IL-7R α by cell-extrinsic factors and they point to the Fas pathway as being instrumental in apoptosis of extrathymic CD8 T cells. IL-2 and IFN- γ are known to decrease IL-7R α expression and to upregulate Fas and FasL (32, 34-37). We therefore evaluated expression of these cytokines in thymus-derived and extrathymic T cells by intracellular cytokine staining. After a brief *in vitro* culture in presence of phorbol myristate acetate, ionomycin and Brefeldin A, we detected production of IFN- γ in more than 80% of extrathymic CD8 T cells but only 14% of thymus-derived CD44^{low} CD8 T cells (Figure 14, A and B). A more modest, but highly significant overproduction of IFN- γ was also found in extrathymic CD4 T cells. In addition, the proportion of IL-2-producing cells was 38.8% for extrathymic T CD4 cells versus 3.4% for CD44^{low} thymus-derived T cells (Figure 14, A and B).

Moreover, we found that, like extrathymic T cells, thymus-derived CD44^{high} T cells and thymus-derived T cells in HP secreted increased amounts of IL-2 and IFN- γ (Figure 14, A and B). Thus, among thymus-derived T cells in HP (on day 14 after injection in TCR β -KO mice), 45% of CD8 T cells produced IFN- γ and 31% of CD4 T cells produced IL-2 (Figure 14, B).

We next asked whether overproduction of IL-2 and IFN- γ by extrathymic T cells would lead to extracellular accumulation of these cytokines in OM-transgenic mice. Concentrations of IL-2 in OM-transgenic spleens were twice those in WT spleens, whereas serum IFN- γ levels were increased four-fold in OM-transgenic relative to WT mice (Figure 14 C). Binding of IFN- γ to its receptor induces repression of *Ifngr2* transcription in activated T cells (38). We therefore quantified levels of *Ifngr2* transcripts to determine whether IFN- γ specific signaling was induced in extrathymic T cells *in vivo*. We found that indeed, the quantity of *Ifngr2* transcripts was considerably decreased in CD4 and CD8 extrathymic T cells relative to thymus-derived CD44^{low} T cells (Figure 14 D). Again, thymus-derived CD44^{high} and thymus-derived T cells in HP were similar to extrathymic T cells except for CD8 T cells in HP in which amounts of *Ifngr2* transcripts were not significantly decreased (Figure 14 D).

Increased survival of extrathymic CD8 T cells in absence of IFN- γ

IFN- γ can modulate T-cell survival by upregulating Fas and FasL and/or by downregulating IL-7R α . To further investigate the contribution of IFN- γ on apoptosis of extrathymic T cells, we generated IFN- γ -deficient (*Ifng*^{-/-}) OM-transgenic mice. *Ifng*^{-/-} OM-transgenic mice and standard OM-transgenic mice share key phenotypic features: they display a severe thymic atrophy, support a massive extrathymic T cell development in their LNs and show similar cellularities in lymphoid organs (data not shown). To assess the survival of *Ifng*^{-/-} extrathymic T cells, we then compared expression of IL-7R α , Bcl-2 and Fas in standard OM-transgenic mice versus *Ifng*^{-/-}

OM-transgenic mice. *Ifng*^{-/-} extrathymic CD4 T cells expressed more IL-7R α and Bcl-2 and less Fas than *Ifng*^{+/+} extrathymic T cells (Figure 15 A, left). However, these differences did not translate into a reduced apoptosis rate for CD4 T cells (Figure 15 B). IFN- γ deficiency did not affect expression of IL-7R α and Bcl-2, but slightly decreased levels of Fas in extrathymic CD8 T cells (Figure 15 A, right). Furthermore, IFN- γ deficiency totally abrogated the upregulation of FasL in extrathymic CD8 T cells (Figure 11 F and Figure 15 C) and significantly reduced apoptosis of extrathymic CD8⁺ T cells (Figure 15 B). These data establish an important role for IFN- γ in regulation of extrathymic T-cell survival. That is particularly true for CD8 extrathymic T cells: lack of IFN- γ abrogated upregulation of Fas and FasL and significantly improved survival. In CD4 extrathymic T cells, IFN- γ deficiency did not significantly improve survival, but nevertheless upregulated IL-7R α and Bcl-2 and downregulated Fas expression. This is consistent with the increased cell recovery following transfer of OM+ CD4 T cells in WT recipients (Figure 13 D).

Lack of IFN- γ receptor improves survival of thymus-derived CD8 T cells in HP

To test whether survival of T cells undergoing HP was also affected by IFN- γ , we assessed survival of IFN- γ -responsive and IFN- γ -unresponsive T cells in a competitive assay. We induced HP by co-transferring equal numbers (5×10^5) of IFN- γ receptor-deficient T cells (IFN- γ R-KO) and WT T cells (IFN- γ R+) into TCR β -KO mice (Figure 16 A). Lack of IFN- γ R in CD4 cells had no significant impact on expression of IL-7R α , Bcl-2 and Fas (Figure 16 B, left), nor on the apoptosis rate (Figure 16 C). Hence, the relatively modest effects of IFN- γ on extrathymic CD4 T cells (Figure 15 A, left) did not extend to thymus-derived CD4 T cells in HP (Figure 16 B, left). In contrast, IFN- γ R-KO CD8 T cells undergoing HP expressed more IL-7R α and Bcl-2 and less Fas than their IFN- γ R+ counterparts (Figure 16 B, right). Moreover, the proportion of apoptotic CD8 T cells was reduced by 50% in IFN- γ R-KO compared to IFN- γ R+ cells (Figure 16 C). Increased survival of IFN- γ R-KO

CD8 T cells led to preferential accumulation of this subset: 77% of cells recovered were IFN- γ R-KO as opposed to only 22% for WT T cells (Figure 16 D). In contrast with this, proportions of IFN γ R-KO and WT CD4 T cells were almost identical, showing that this subset is less affected by IFN- γ than CD8 T cells. Thus, for CD8 T cells IFN- γ has a significant effect on survival of both extrathymic T cells (Figure 15 B) and thymus-derived T cells in HP (Figure 16 C).

Regulatory T-cell enrichment in extrathymic T cells and thymus-derived T cells in HP

A cardinal feature of extrathymic T cells and thymus-derived T cells in HP is that they produce high amounts of IL-2 and IFN- γ (Figure 14). Along with their capacity to regulate expression of pro-survival and pro-apoptotic molecules, IL-2 and IFN- γ can modulate the generation and function of regulatory T (Treg) cells. Since Treg cells are enriched in the CD25⁺ subset of CD4 T cells, we examined the frequency of CD4⁺CD25⁺ cells in extrathymic T cells and thymus-derived T cells in HP. Compared with WT mice, we discovered a four-fold increase in the proportion of CD4⁺CD25⁺ T cells in extrathymic T cells and a three-fold increase in thymus-derived T cells undergoing HP (Figure 17, A and B). Remarkably, enrichment in CD4⁺CD25⁺ T cells during HP did not occur in IFN- γ R-KO T cells (Figure 17, A and B). Thus, the proportion of CD4⁺CD25⁺ T cells was increased in extrathymic T cells and thymus-derived T cells in HP and, at least in the latter case, this phenomenon was IFN- γ -dependent.

Treg cell function depends strictly upon FoxP3 expression (39). We therefore compared FoxP3 expression by CD4 T cells in our experimental groups. While about 7.5% of total CD4 T cells were FoxP3⁺ in WT mice, the proportion rose to 20% for thymus-derived CD4 in HP (day 14) and reached the surprising level of 40% for extrathymic CD4 T cells (Figure 17, C and D). Accumulation of FoxP3⁺ cells during HP was abrogated in CD4 T cells derived from IFN- γ R-KO donors (Figure 17, C and

D upper panels). As expected, the vast majority of thymus-derived CD4⁺CD25⁺ T cells were FoxP3⁺. Likewise, the proportion of CD4⁺CD25⁺ T cells that were FoxP3⁺ was about 90% for extrathymic T cells and thymus-derived T cells undergoing HP (Figure 17, *C* and *D* middle panels). That proportion decreased to 50% for IFN- γ R-KO thymus-derived T cells in HP. Analysis of CD4⁺CD25⁻ T cells revealed notable differences between thymus-derived and extrathymic T cells. While the proportion of CD4⁺CD25⁻ T cells that were FoxP3⁺ was only 2.7% among thymus-derived T cells, it increased to 20.9% in extrathymic T cells and 10.4% in thymus-derived T cells in HP (Figure 17, *C* and *D* lower panels). Again, expansion of FoxP3⁺ CD4⁺CD25⁻ T cells did not occur in IFN- γ R-KO T cells. Taken together, these results demonstrate a dramatic increase in the proportion of FoxP3⁺ cells among extrathymic CD4 T cells. Of note, the absolute number of spleen CD4 T cells in OM-transgenic mice is similar to that of WT mice (19). Therefore, absolute numbers of FoxP3⁺ CD4 T cells per spleen were increased about 4-fold in OM-transgenic relative to WT mice (data not shown). This increase resulted from two factors: an accumulation of CD4⁺CD25⁺ cells that are practically all FoxP3⁺, and the presence of a significant proportion of FoxP3⁺ cells in the CD4⁺CD25⁻ compartment. A similar increase in the proportion of FoxP3⁺ CD4 T cells was observed in thymus-derived T cells in HP. In the latter case, expansion of FoxP3⁺ CD4 T cells was clearly shown to be IFN- γ -dependent.

Recent studies showing that human and mouse FoxP3⁺ Treg cells express low levels of IL-7R α provide suggestive evidence that FoxP3 may repress transcription of IL-7R α (40, 41). This begs the question: is the high proportion of FoxP3⁺ cells among extrathymic CD4 T cells (Figure 15 *B*) responsible for their decreased expression of IL-7R α (Figure 11 *C*) (134) We found that IL-7R α expression was lower at the surface of FoxP3⁺ than FoxP3⁻ thymus-derived CD4 T cells (data not shown). Conversely, FoxP3⁺ and FoxP3⁻ extrathymic CD4 T cells displayed similar levels of cell surface IL-7R α (data not shown). Thus, decreased expression of IL-7R α in extrathymic CD4 T cells is not limited to FoxP3⁺ cells.

Suppressive activity of extrathymic Treg cells

We next sought to determine whether extrathymic CD4⁺CD25⁺ T cells had suppressor function. We performed mixed lymphocyte reactions (MLR) between B6.SJL (H2^b, CD45.1⁺) responding effector cells labeled with carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) and irradiated C3H/HeJ (H2^k, CD45.2⁺) stimulator cells. Thymus-derived (WT) or extrathymic (OM-transgenic) CD45.2⁺ CD4 spleen T cells were FACS-sorted according to CD25 expression and graded numbers were added to the MLR (Figure 18 A). We monitored CD8 effector (E) T-cell recovery and proliferation to evaluate the suppressive activity of added CD4 T cells (S). As expected, thymus-derived CD4⁺CD25⁻ had no deleterious impact on the recovery of effector T cells (Figure 18 B, left). In fact, at the E:S ratio of 1:1, thymus-derived CD4⁺CD25⁻ T cells enhanced the number of effector cells recovered. Extrathymic CD4⁺CD25⁻ T cells had no effect on the MLR. They did not significantly hamper recovery of effector cells, and consistent with previous observations (23), they had minimal, if any helper activity at the E:S ratio of 1:1 (Figure 18, B and D, left and Figure 16). The key finding was that extrathymic CD4⁺CD25⁺ T cells showed a clear and dose-dependent inhibitory effect on the recovery of effector cells (Figure 18 B and D). The suppressive effect of extrathymic CD4⁺CD25⁺ T cells was illustrated as follows: they inhibited the recovery of effector cells (Figure 18 B) by inhibiting their proliferation (Figure 18, C and D), and they mitigated upregulation of CD44 on effector cells (Figure 18 C). When added in low numbers (E:S ratio of 1:0.06) the suppressive effect of extrathymic CD4⁺CD25⁺ T cells was even greater than that of thymus-derived CD4⁺CD25⁺ T cells (Figure 18 D, right).

Treg cells can be segregated in two functional subsets based on CD103 (integrin $\alpha_E\beta_7$) expression (42-44). CD103⁻ Tregs have a naive-like phenotype and reside in LNs where they can suppress naive T-cell proliferation. Because of differential expression of selectin ligands and chemokine receptors, CD103⁺ Tregs seek inflamed sites and exhibit high suppressive potential in various inflammation models. We found that the proportion of CD103⁺ cells was 70% in extrathymic

CD4⁺FoxP3⁺ cells versus only 16% in CD4⁺FoxP3⁺ thymus-derived T cells (Figure 18 E). Thus, the dramatic accumulation of extrathymic CD4⁺FoxP3⁺ Treg cells in OM-transgenic mice essentially involves CD103⁺ elements endowed with powerful suppressive potential. The impressive *in vitro* suppressive activity of extrathymic CD4⁺CD25⁺ T cells was independent of OM. Indeed, though mature T cells from OM-transgenic mice may secrete low amounts of OM, CD4⁺CD25⁺ T cells did not produce more OM than the non-suppressive CD4⁺CD25⁻ T cells, excluding a direct suppressive action of OM in the MLR (data not shown).

Discussion

Extrathymic T cells cannot substitute for conventional thymus-derived T cells (23). A significant implication is that having the ability to generate T cells and to sustain normal numbers of T cells is not sufficient to ensure immunocompetence (6). The main drawback of extrathymic T cells is that they are unduly susceptible to apoptosis and therefore do not expand properly when confronted with a pathogen. The present work demonstrates that apoptosis of extrathymic CD4 T cells is due to repression of IL-7R α and Bcl-2 by cell-extrinsic factors, while apoptosis of extrathymic CD8 T is death receptor mediated (Figure 19). Extrathymic T cells undergo excessive HP that leads to overproduction and accumulation of IL-2 and IFN- γ . IFN- γ plays a pivotal role in homeostasis of extrathymic T cells. High levels of IFN- γ upregulate Fas and FasL on extrathymic CD8 T cells and thereby lead to their death by death receptor mediated apoptosis. Moreover, IFN- γ curtails the survival of extrathymic CD4 T cells by downregulating IL-7R α and Bcl-2. Overproduction of IL-2 [and possibly of other cytokines of the IL-2 family (32)] probably contributes to downregulation of IL-7R α on extrathymic CD4 T cells, but further studies are needed to directly assess this point.

Taken together, three features provide incontrovertible evidence that extrathymic T cells undergo exalted HP in absence of lymphopenia: their memory-like phenotype (25), their exuberant proliferation rate (19) and the paucity of T-cell receptor excision circles (Figure 10 *B* and *C*). Accordingly, we report herein that classic thymus-derived T cells undergoing HP in a lymphopenic host shared key features of extrathymic T cells: high apoptosis rate of CD4 and CD8 T cells; downregulation of IL-7R α and Bcl-2, overproduction of IL-2 and accumulation of FoxP3 Treg cells in the CD4 population; overproduction of IFN- γ and upregulation of Fas on CD8 T cells. The sole significant difference was that thymus-derived CD8 T cells in HP did not show the upregulation of FasL found in extrathymic CD8 T cells. This discrepancy is probably due to the fact that we studied thymus-derived T cells only in the acute phase of HP, and that upregulation is a late event in thymus-derived

CD8 T cells undergoing HP. In accordance with this assumption, Fas/FasL interactions have been shown to induce apoptosis of thymus-derived T cells in another experimental model of HP (31).

Extrathymic CD8 T cells share all features of thymus-derived “innate” CD8 T cells: they undergo “spontaneous” HP in non lymphopenic animals, they display a memory-like phenotype, and they exhibit immediate effector cytokine production (6, 24, 45). Two main types of innate thymus-derived TCR $\alpha\beta$ CD8 T cells have been described. First, in WT mice, T cells whose TCR is specific for peptides presented by MHC Ib molecules (24, 46). Second, CD8 T cells that develop in the thymus of mutant mice deficient for Tec-family tyrosine kinases Itk and Rlk (47-49). A key feature of innate thymus-derived T cells is that they are positively selected by hematopoietic cells whereas conventional TCR $\alpha\beta$ CD8 T cells are positively selected by thymic epithelial cells (24, 46). It has been proposed that CD8 T cells selected on hematopoietic cells may play a unique role in immune responses (6, 24). This would be contingent upon rapid generation of effector function, and in particular swift and massive secretion of IFN- γ . Evidence suggests that positive selection on hematopoietic cells entails high avidity interactions leading to the induction of Eomes or T-bet transcription factors. Upregulation of Eomes or T-bet would then dictate the peculiar homeostatic and functional behavior of innate CD8 T cells (24). We previously reported that extrathymic CD8 T cells in OM-transgenic mice are positively selected by LN hematopoietic cells (25). This supports the concept that the nature of the cells supporting positive selection dictates whether TCR $\alpha\beta$ CD8 T cells will be innate or conventional T cells. This begs a question: why do thymic epithelial cells have the unique ability to induce generation of conventional T cells? In other words, what is the critical difference between positive selection on thymic epithelial cells versus other cells? This question might be directly addressed by studying polyclonal T cells positively selected on thymic epithelial versus hematopoietic cells. Also, answers may lie, at least in part, in the fact that thymic cortical epithelial cells express a unique form of proteasome (the thymoproteasome) that probably generates low affinity MHC I ligands compared with other proteasomes (50). It is tempting to

speculate that MHC I molecules associated with low affinity peptides may induce weaker TCR signals in developing T cells and thereby promote generation of conventional rather than innate TCR $\alpha\beta$ CD8 T cells.

When confronted with pathogens, extrathymic CD4 T cells do not expand properly and fail to provide help to B cells and CD8 T cells (23). We report herein that FoxP3 is expressed by about 40% of extrathymic CD4 T cells, most of which are CD25⁺ and CD103⁺. Furthermore, extrathymic CD4⁺CD25⁺ T cells display potent suppressive activity *in vitro*. To the best of our knowledge, the magnitude of (extrathymic) Treg cell expansion found in OM-transgenic mice is unprecedented. Nevertheless, it is perfectly consistent with the fact that expansion of Treg cells is induced by three key factors that coalesce in extrathymic T cells: HP, production of IL-2 and IFN- γ (51-56). Generation of Treg cells whenever T cells are activated by foreign or self antigens (e.g., during HP) is important to prevent autoimmunity (57-60). Since about 40% are Treg cells, it makes sense that extrathymic CD4 T cells show limited expansion following antigen recognition and are unable to help CD8 T cells and B cells (23). One further possibility for future exploration is that Treg cells may induce apoptosis of extrathymic T cells. Indeed, extrathymic T cells show signs of activation and Treg cells display perforin-dependent cytotoxicity against autologous activated CD4 and CD8 T cells (61). Why are extrathymic CD4 T cells totally unfit to generate protective responses when confronted with pathogens? In tetraparental aggregation chimeras, thymus-derived CD4 T cells positively selected on hematopoietic cells are unable to generate functional anti-viral responses (62). We therefore posit that positive selection by thymic epithelial cells is absolutely required to produce functional CD4 T cells. The unique ability of thymic epithelial cells to promote generation of functional CD4 T cells might be due to expression of a unique range of MHC II-associated self peptides (63). Indeed, in contrast with most peripheral cells, thymus cortical epithelial cells use lysosomal cathepsin L in place of cathepsin S to generate MHC II-associated peptides (64). Furthermore, deletion of the cathepsin L-encoding gene in mice hindered positive selection of CD4 T cells (64). Similar to what has been predicted for the thymoproteasome and MHC I-associated

peptides (50), cathepsin L might generate peptides with a low affinity for MHC II molecules that in turn would induce weak TCR signals required for generation of conventional TCR $\alpha\beta$ CD4 T cells. Stronger TCR signals (below the negative selection threshold) lead to induction of Foxp3 and generation of Treg cells (65). Thus, the exceedingly high proportion of Treg cells among extrathymic CD4 T cells could result from positive selection on LN hematopoietic cells as opposed to thymic epithelial cells.

T lymphocytes are the sole hematolymphoid cell lineage that is not generated in main hematopoietic organs. In all vertebrates with an adaptive immune system, this task is outsourced to the thymus. This brings two fundamental questions: why must T cells be produced in a different microenvironment and why is it always in the thymus? By contrast, vertebrates have been using various organs for hematopoiesis and B-cell poiesis: bursa of Fabricius, cranium, gonads, gut, heart, kidney, liver, meninges (4, 66). Moreover, experimental mouse models have shown that Notch signals could transform the mammalian bone marrow in a primary T lymphoid organ (13, 67-69), while OM, leukemia inhibitory factor and possibly *Wnt4* could do the same for LNs (18, 21, 70). Clearly, it might not be so difficult to produce T cells extrathymically, but our work demonstrates that extrathymic T cells are functionally deficient and suggests that they could even have a deleterious effect on conventional T cells. Extrathymic CD4 T cells are completely ineffective by themselves. Moreover, the exceedingly high proportion of Treg cells among extrathymic CD4 T cells could hinder expansion of conventional T cells in infected animals. Besides, extrathymic CD8 T cells are essentially innate T cells. The key issue now is to discover how interactions between stromal cells and lymphoid cells generate functionally different progeny in the thymus versus extrathymic sites. The answer will most probably come from a better understanding of molecular interactions that take place between stromal cells and T-lineage cells in discrete thymic subcompartments (71-73). Finally, since T cells can literally be produced “in a dish” (74), there have recently been efforts to develop effective *ex vivo* strategies to generate T lineage cells for patients with impaired thymic function (12, 14, 75). Our

work demonstrates that the function of such extrathymic T cells needs to be carefully assessed and that for the time being, positive selection on thymic epithelial cells remains an absolute prerequisite for generation of conventional TCR $\alpha\beta$ T cells. In addition, we show that preservation of T-cell function necessitates restoration of normal numbers of T cells. Otherwise, even genuine thymus-derived T cells will undergo lymphopenia-induced HP and thereby acquire the same defects as extrathymic T cells.

Acknowledgments

We are grateful to Danièle Gagné for advice on flow cytometry and cell sorting, Pierre Chagnon for help with qPCR and to the staff of IRIC animal care facility for superb assistance. We thank M. Guimond and N. Labrecque for helpful comments, and J.A. Kashul for editorial assistance.

References

1. Miller, J. F. 2002. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunol.Rev.* 185:7-14.
2. Zinkernagel, R. M. 2002. Uncertainties - discrepancies in immunology. *Immunol.Rev.* 185:103-125.
3. Casanova, J. L. and L. Abel. 2004. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat.Rev.Immunol.* 4:55-66.
4. Zapata, A. and C. T. Amemiya. 2000. Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. *Curr.Top.Microbiol.Immunol* 248:67-107.
5. Boehm, T. and C. C. Bleul. 2007. The evolutionary history of lymphoid organs. *Nat.Immunol.* 8:131-135.
6. Blais, M. E., I. Louis, and C. Perreault. 2006. T-cell development: an extrathymic perspective. *Immunol.Rev.* 209:103-114.
7. Dulude, G., S. Brochu, P. Fontaine, C. Baron, M. Gyger, D. C. Roy, and C. Perreault. 1997. Thymic and extrathymic differentiation and expansion of T lymphocytes following bone marrow transplantation in irradiated recipients. *Exp.Hematol.* 25:992-1004.
8. Dulude, G., D. C. Roy, and C. Perreault. 1999. The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J.Exp.Med.* 189:1329-1342.
9. Mackall, C. L. and R. E. Gress. 1997. Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol.Rev.* 157:61-72.
10. Taub, D. D. and D. L. Longo. 2005. Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol.Rev.* 205:72-93.

11. Poznansky, M. C., R. H. Evans, R. B. Foxall, I. T. Olszak, A. H. Piascik, K. E. Hartman, C. Brander, T. H. Meyer, M. J. Pykett, K. T. Chabner, S. A. Kalams, M. Rosenzweig, and D. T. Scadden. 2000. Efficient generation of human T cells from a tissue-engineered thymic organoid. *Nat.Biotechnol.* 18:729-734.
12. Ohishi, K., B. Varnum-Finney, and I. D. Bernstein. 2002. Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34⁺. *J.Clin.Invest.* 110:1165-1174.
13. Schmitt, T. M. and J. C. Zúñiga-Pflücker. 2002. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 *in vitro*. *Immunity* 17:749-756.
14. Zakrzewski, J. L., A. A. Kochman, S. X. Lu, T. H. Terwey, T. D. Kim, V. M. Hubbard, S. J. Muriglan, D. Suh, O. M. Smith, J. Grubin, N. Patel, A. Chow, J. Cabrera-Perez, R. Radhakrishnan, A. Diab, M. A. Perales, G. Rizzuto, E. Menet, E. G. Pamer, G. Heller, J. C. Zúñiga-Pflücker, O. Alpdogan, and M. R. van den Brink. 2006. Adoptive transfer of T-cell precursors enhances T-cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Nat.Med.* 12:1039-1047.
15. Schmitt, T. M., R. F. de Pooter, M. A. Gronski, S. K. Cho, P. S. Ohashi, and J. C. Zúñiga-Pflücker. 2004. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated *in vitro*. *Nat.Immunol.* 5:410-417.
16. Guy-Grand, D., O. Azogui, S. Celli, S. Darche, M. C. Nussenzweig, P. Kourilsky, and P. Vassalli. 2003. Extrathymic T cell lymphopoiesis: Ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J.Exp.Med.* 197:333-341.
17. Maillard, I., B. A. Schwarz, A. Sambandam, T. Fang, O. Shestova, L. Xu, A. Bhandoola, and W. S. Pear. 2006. Notch-dependent T-lineage commitment

- occurs at extrathymic sites following bone marrow transplantation. *Blood* 107:3511-3519.
18. 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.
 19. 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.
 20. Louis, I., G. Dulude, S. Corneau, S. Brochu, C. Boileau, C. Meunier, C. Côté, N. Labrecque, and C. Perreault. 2003. Changes in the lymph node microenvironment induced by Oncostatin M. *Blood* 102:1397-1404.
 21. Terra, R., I. Louis, R. LeBlanc, S. Ouellet, J. C. Zúñiga-Pflücker, and C. Perreault. 2005. T cell generation by lymph node resident progenitor cells. *Blood* 106:193-200.
 22. Shinkura, R., K. Kitada, F. Matsuda, K. Tashiro, K. Ikuta, M. Suzuki, K. Kogishi, T. Serikawa, and T. Honjo. 1999. A lymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding Nf- κ b-inducing kinase. *Nat.Genet.* 22:74-77.
 23. Blais, M. E., G. Gérard, M. M. Martinic, G. Roy-Proulx, R. M. Zinkernagel, and C. Perreault. 2004. Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses? *Blood* 103:3102-3110.
 24. Berg, L. J. 2007. Signalling through TEC kinases regulates conventional versus innate CD8⁺ T-cell development. *Nat.Rev.Immunol.* 7:479-485.
 25. Terra, R., N. Labrecque, and C. Perreault. 2002. Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules. *J.Immunol.* 169:684-692.

26. Poulin, J. F., M. Sylvestre, P. Champagne, M. L. Dion, N. Kettaf, A. Dumont, M. Lainesse, P. Fontaine, D. C. Roy, C. Perreault, R. P. Sékaly, and R. Cheynier. 2003. Evidence for adequate thymic function but impaired naïve T-cell survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the absence of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 102:4600-4607.
27. Moses, C. T., K. M. Thorstenson, S. C. Jameson, and A. Khoruts. 2003. Competition for self ligands restrains homeostatic proliferation of naive CD4 T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 100:1185-1190.
28. McNally, J. M., C. C. Zarozinski, M. Y. Lin, M. A. Brehm, H. D. Chen, and R. M. Welsh. 2001. Attrition of bystander CD8 T cells during virus-induced T-cell and interferon responses. *J.Virol.* 75:5965-5976.
29. Marrack, P. and J. Kappler. 2004. Control of T cell viability. *Annu.Rev.Immunol.* 22:765-787.
30. Peacock, C. D., S.-K. Kim, and R. M. Welsh. 2003. Attrition of virus-specific memory CD8⁺ T cells during reconstitution of lymphopenic environments. *J.Immunol.* 171:655-518.
31. Fortner, K. A. and R. C. Budd. 2005. The death receptor Fas (CD95/APO-1) mediates the deletion of T lymphocytes undergoing homeostatic proliferation. *J.Immunol.* 175:4374-4382.
32. Park, J. H., Q. Yu, B. Erman, J. S. Appelbaum, D. Montoya-Durango, H. L. Grimes, and A. Singer. 2004. Suppression of IL7R α transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* 21:289-302.
33. Fox, C. J., P. S. Hammerman, and C. B. Thompson. 2005. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat.Rev.Immunol.* 5:844-852.

34. Xue, H. H., P. E. Kovanen, C. A. Pise-Masison, M. Berg, M. F. Radovich, J. N. Brady, and W. J. Leonard. 2002. IL-2 negatively regulates IL-7 receptor α chain expression in activated T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 99:13759-13764.
35. Refaeli, Y., L. Van Parijs, S. I. Alexander, and A. K. Abbas. 2002. Interferon γ is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 196:999-1005.
36. Puliaev, R., P. Nguyen, F. D. Finkelman, and C. S. Via. 2004. Differential requirement for IFN- γ in CTL maturation in acute murine graft-versus-host disease. *J.Immunol.* 173:910-919.
37. Badovinac, V. P., B. B. Porter, and J. T. Harty. 2004. CD8⁺ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat.Immunol.* 5:809-817.
38. Haring, J. S., G. A. Corbin, and J. T. Harty. 2005. Dynamic regulation of IFN- γ signaling in antigen-specific CD8⁺ T cells responding to infection. *J.Immunol.* 174:6791-6802.
39. Williams, L. M. and A. Y. Rudensky. 2007. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat.Immunol.* 8:277-284.
40. Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. Alexander, I. R. Nanan, A. Kelleher, and B. Fazekas de St.Groth. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J.Exp.Med.* 203:1693-1700.
41. Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. Fazekas de St.Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler, and J. A. Bluestone. 2006. CD127 expression

- inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J.Exp.Med.* 203:1701-1711.
42. Lehmann, J., J. Huehn, M. de la Rosa, F. Maszyra, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold, and A. Hamann. 2002. Expression of the integrin $\alpha_E\beta_7$ identifies unique subsets of CD25⁺ as well as CD25⁻ regulatory T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 99:13031-13036.
 43. Huehn, J., K. Siegmund, J. C. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G. F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G. K. Przybylski, U. Niesner, R. M. de la, C. A. Schmidt, R. Brauer, J. Buer, A. Scheffold, and A. Hamann. 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4⁺ regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 199:303-313.
 44. Huehn, J. and A. Hamann. 2005. Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends Immunol.* 26:632-636.
 45. Chow, M. T., S. Dhanji, J. Cross, P. Johnson, and H. S. Teh. 2006. H2-M3-restricted T cells participate in the priming of antigen-specific CD4⁺ T cells. *J.Immunol.* 177:5098-5104.
 46. Urdahl, K. B., J. C. Sun, and M. J. Bevan. 2002. Positive selection of MHC class Ib restricted CD8⁺ T cells on hematopoietic cells. *Nat.Immunol.* 3:772-779.
 47. Atherly, L. O., J. A. Lucas, M. Felices, C. C. Yin, S. L. Reiner, and L. J. Berg. 2006. The Tec family tyrosine kinases Itk and Rlk regulate the development of conventional CD8⁺ T cells. *Immunity.* 25:79-91.
 48. Broussard, C., C. Fleischacker, R. Horai, M. Chetana, A. M. Venegas, L. L. Sharp, S. M. Hedrick, B. J. Fowlkes, and P. L. Schwartzberg. 2006. Altered development of CD8⁺ T cell lineages in mice deficient for the Tec kinases Itk and Rlk. *Immunity.* 25:93-104.

49. Dubois, S., T. A. Waldmann, and J. R. Muller. 2006. ITK and IL-15 support two distinct subsets of CD8⁺ T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 103:12075-12080.
50. Murata, S., K. Sasaki, T. Kishimoto, S. I. Niwa, H. Hayashi, Y. Takahama, and K. Tanaka. 2007. Regulation of CD8⁺ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 316:1349-1353.
51. Curotto de Lafaille, M. A., A. C. Lino, N. Kutchukhidze, and J. J. Lafaille. 2004. CD25⁻ T cells generate CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion. *J.Immunol.* 173:7259-7268.
52. Zhang, H., K. S. Chua, M. Guimond, V. Kapoor, M. V. Brown, T. A. Fleisher, L. M. Long, D. Bernstein, B. J. Hill, D. C. Douek, J. A. Berzofsky, C. S. Carter, E. J. Read, L. J. Helman, and C. L. Mackall. 2005. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat.Med.* 11:1238-1243.
53. Wang, Z., J. Hong, W. Sun, G. Xu, N. Li, X. Chen, A. Liu, L. Xu, B. Sun, and J. Z. Zhang. 2006. Role of IFN- γ in induction of Foxp3 and conversion of CD4⁺ CD25⁻ T cells to CD4 Tregs. *J.Clin.Invest.* 116:2434-2441.
54. Bosco, N., F. Agenes, A. G. Rolink, and R. Ceredig. 2006. Peripheral T cell lymphopenia and concomitant enrichment in naturally arising regulatory T cells: the case of the pre-T α gene-deleted mouse. *J.Immunol.* 177:5014-5023.
55. Almeida, A. R. M., B. Zaragoza, and A. A. Freitas. 2006. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *J.Immunol.* 177:192-200.
56. Bayer, A. L., A. Yu, and T. R. Malek. 2007. Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulatory cells. *J.Immunol.* 178:4062-4071.

57. Shen, S., Y. Ding, C. E. Tadokoro, D. Olivares-Villagomez, M. Camps-Ramirez, M. A. Curotto de Lafaille, and J. J. Lafaille. 2005. Control of homeostatic proliferation by regulatory T cells. *J.Clin.Invest.* 115:3517-3526.
58. Baccala, R. and A. N. Theofilopoulos. 2005. The new paradigm of T-cell homeostatic proliferation-induced autoimmunity. *Trends Immunol.* 26:5-8.
59. Akbar, A. N., M. Vukmanovic-Stejic, L. S. Taams, and D. C. Macallan. 2007. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4⁺ T cells in the periphery. *Nat.Rev.Immunol.* 7:231-237.
60. Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat.Immunol.* 6:345-352.
61. Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson, and T. J. Ley. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21:589-601.
62. Martinic, M. M., M. F. van den Broek, T. Rulicke, C. Huber, B. Odermatt, W. Reith, E. Horvath, R. Zellweger, K. Fink, M. Recher, B. Eschli, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 2006. Functional CD8⁺ but not CD4⁺ T cell responses develop independent of thymic epithelial MHC. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 103:14435-14440.
63. Bevan, M. J. 2007. IMMUNOLOGY: The Cutting Edge of T Cell Selection. *Science* 316:1291-1292.
64. Nakagawa, T., W. Roth, P. Wong, A. Nelson, A. Farr, J. Deussing, J. A. Villadangos, H. Ploegh, C. Peters, and A. Y. Rudensky. 1998. Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280:450-453.
65. Jordan, M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Hohenbeck, M. A. Lerman, A. Naji, and A. J. Caton. 2001. Thymic selection of CD4⁺CD25⁺

- regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat.Immunol.* 2:301-306.
66. Ratcliffe, M. J. H. 2006. Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Dev.Comp.Immunol.* 30:101-118.
67. Radtke, F., A. Wilson, G. Stark, M. Bauer, J. van Meerwijk, H. R. MacDonald, and M. Aguet. 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10:547-558.
68. Jaleco, A. C., H. Neves, E. Hooijberg, P. Gameiro, N. Clode, M. Haury, D. Henrique, and L. Parreira. 2001. Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J.Exp.Med.* 194:991-1002.
69. Maeda, T., T. Merghoub, R. M. Hobbs, L. Dong, M. Maeda, J. Zakrzewski, M. R. van den Brink, A. Zelent, H. Shigematsu, K. Akashi, J. Teruya-Feldstein, G. Cattoretti, and P. P. Pandolfi. 2007. Regulation of B versus T lymphoid lineage fate decision by the proto-oncogene LRF. *Science* 316:860-866.
70. 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.
71. Anderson, G., W. E. Jenkinson, T. Jones, S. M. Parnell, F. A. Kinsella, A. J. White, J. E. Pongrac'z, S. W. Rossi, and E. J. Jenkinson. 2006. Establishment and functioning of intrathymic microenvironments. *Immunol.Rev.* 209:10-27.
72. Takahama, Y. 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat.Rev.Immunol.* 6:127-135.
73. Petrie, H. T. and J. C. Zúñiga-Pflücker. 2007. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu.Rev.Immunol.* 25:649-679.

74. Schmitt, T. M. and J. C. Zúñiga-Pflücker. 2006. T-cell development, doing it in a dish. *Immunol.Rev.* 209:95-102.
75. van den Brink, M. R., O. Alpdogan, and R. L. Boyd. 2004. Strategies to enhance T-cell reconstitution in immunocompromised patients. *Nat.Rev.Immunol.* 4:856-867.

Figure Legends

Figure 10: Features of extrathymic T cells in OM-transgenic mice. *A*, Extrathymic T cell development in OM-transgenic mice is LN-dependent. Number (mean \pm SD) of single positive TCR $\alpha\beta$ ⁺ T cells per spleen in OM-transgenic and OM-transgenic *aly/aly* mice. Four mice per group. *B* and *C*, Mature extrathymic T cells have low levels of T-cell receptor excision circles (TRECs). *B*, Double-positive (CD4⁺CD8⁺) cells were harvested from thymi and LNs of C57BL/6J and OM-transgenic mice, respectively. Levels of SJ49, SJ50, DJ2.4 and DJ2.5 TRECs are similar in thymic and extrathymic double-positive T cells. *C*, Single-positive CD4 and CD8 cells were harvested from the spleen of C57BL/6J and OM-transgenic mice. TREC levels are lower in extrathymic than thymic T cells. Three to six mice per group. *D*, Increased apoptosis in extrathymic T cells. Proportions of Annexin V⁺ cells among extrathymic T cells are significantly higher than in their thymus-derived CD4⁺ and CD8⁺ counterparts. *E*, Enhanced expression of senescence markers in extrathymic CD4 T cells. PD-1 and KLRG-1 expression on thymic (black) and extrathymic (grey) CD4 T cells. Isotype control is shown in dotted line. Numbers indicate percentages of positive cells. One representative experiment from three. (****P* < 0.001)

Figure 11: Apoptosis of thymus-derived (thymic) and extrathymic T cells. *A*, Expression of CD44 on TCR $\alpha\beta$ ⁺ spleen T cells. **Left:** T cells from WT mice. **Middle:** Extrathymic T cells from OM-transgenic mice. **Right:** Thymus-derived T cells during HP (day 30 after adoptive transfer in TCR β -KO mice). *B*, Proportion of Annexin V⁺ cells and *C*, expression of IL-7R α , Bcl-2 and Fas in extrathymic T cells and thymus-derived T cells according to CD44 expression. Cells were freshly harvested from the spleen of OM-transgenic mice and WT mice, respectively, and stained with the reagents mentioned above. Numbers in panel *C* represent the GMFI. Data are representative of four separate experiments. *D*, Relative levels of IL-7R α and Bcl-2 transcripts in thymus-derived T cells and extrathymic T cells (symbolized by the letter **E**). CD4 and CD8 T cells harvested from the spleen of WT and OM-transgenic mice were purified by flow cytometry and frozen in Trizol before

proceeding to mRNA extraction and cDNA amplification. *E*, Increased apoptosis of T cells undergoing HP. Fold change values for proportion of Annexin V⁺ cells and expression of IL-7R α , Bcl-2 and Fas in extrathymic T cells and T cells undergoing HP. Results are depicted as ratios relative to CD44^{low} thymus-derived T cells (red line) on a log₁₀ scale. *F*, Increased expression of Fas-L mRNA in extrathymic T cells. Fold change values for FasL transcripts relative to CD44^{low} WT T cells. A uniform color code is used in (*A-F*) for thymus-derived CD44^{high} (orange) and CD44^{low} (red) T cells, extrathymic (blue) T cells, and thymus-derived T cells in HP on day 14 (black) or 30 (grey) post-transfer. Three to five mice per group. **P* \leq 0.05, ***P* \leq 0.01, ****P* \leq 0.001.

Figure 12: Non-transgenic extrathymic T cells share key features of OM-transgenic T cells. *A*, Increased apoptosis of extrathymic T cells from *nu/nu* mice relative to thymus-derived T cells from WT mice. Percentage of Annexin V⁺ cells and expression of IL-7R α and Bcl-2 (GMFI) in extrathymic CD4 T cells from *nu/nu* mice. *B*, Percentage of Annexin V⁺ cells and Fas expression levels (GMFI) in CD8 T cells from *nu/nu* mice. Data are representative of four mice per group. *C*, Relative levels of Fas-L transcripts in thymus-derived versus extrathymic CD8 T cells (from OM-transgenic and *nu/nu* mice) were assessed by qPCR. Data represent the mean of two to four mice per group.

Figure 13: Apoptosis of extrathymic CD4 T cells is non cell-autonomous and correlates with low expression of IL-7R α and Bcl-2. *A*, Most apoptotic extrathymic T cells reside in the IL-7R α ^{lo} population. Apoptosis rate of IL-7R α ^{lo} and IL-7R α ^{hi} extrathymic CD4 T cells. Numbers indicate the percentage of Annexin V⁺ cells in gate. Results are from one experiment out of three. *B*, IL-7R α expression on donor T cells before (grey) and 4.5 d after (black) adoptive transfer in non-irradiated hosts as described in materials and methods. Numbers indicate the increment (%) of IL-7R α GMFI on donor T cells on day 4.5 relative to day 0. Results are representative of three independent experiments. *C*, Ratio of IL-7R α (GMFI) and Bcl-2 (% positive

cells) expression after versus before adoptive T-cell transfer. Circles represent individual mice and horizontal thick lines represent mean fold changes. Data were normalized to that of negative control group (WT→WT). *D*, Absolute numbers of WT and OM+ T cells recovered following transfer gated on CD4 T cells. Data represent the mean of three independent experiments. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Figure 14 : Overproduction of IL-2 and IFN- γ by extrathymic T cells. *A* and *B*, Intracellular staining for IL-2 and IFN- γ . We show in *A*, data from one representative experiment (numbers represent percent of positive cells), and in *B*, the mean \pm SD for three to six mice per group. *C*, Accumulation of IFN- γ and IL-2 in serum and spleen of OM-transgenic mice, respectively. *D*, Decreased expression of *Ifngr2* mRNA in extrathymic T cells. *Ifngr2* mRNA expression in purified CD4 and CD8 T-cell subsets. Three to six mice per group. A uniform color code is used in *A*, *B* and *D*, for thymus-derived CD44^{high} (orange) and CD44^{low} (red) T cells, extrathymic (E; blue) T cells, and thymus-derived T cells in HP on day 14 (black) or 30 (grey) post-transfer. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Figure 15 : The role of IFN- γ in regulation of extrathymic T-cell survival. *A*, Expression of IL-7R α , Bcl-2 and Fas, and *B*, percentage of Annexin V⁺ cells in extrathymic T cells from standard OM-transgenic (blue) versus *Ifng*^{-/-} OM-transgenic (yellow) mice. *C*, Overexpression of Fas-L mRNA is abrogated when extrathymic T cells are generated in absence of IFN- γ (*Ifng*^{-/-} OM+). FasL mRNA expression was determined by qPCR on sorted CD8 T cells from OM-transgenic (blue) and *Ifng*^{-/-} OM-transgenic (yellow) mice. Four to six mice per group. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Figure 16: Lack of IFN- γ receptor improves survival of thymus-derived CD8 T cells in HP. *A*, Experimental design: purified CD44^{low} CD4 and CD8 T cells from IFN- γ R-KO (CD45.2⁺) and WT (CD45.1⁺) donors were co-injected into TCR β -KO

(T-cell deficient) mice. On day 14 post-transfer, splenocytes from recipient mice were collected for analysis of donor cells. Allelic markers CD45.1 and CD45.2 were used to discriminate between IFN- γ R-KO and WT T cells. *B*, Expression of IL-7R α , Bcl-2 and Fas in IFN- γ R-KO and WT T cells. *C*, Decreased apoptosis in IFN- γ R-KO CD8 T cells but not in IFN- γ R-KO CD4 T cell during HP. Proportion of Annexin V⁺ IFN- γ R-KO and WT T cells. Data are from three to six mice distributed across three independent experiments. *D*, Proportion of IFN γ R-KO (CD45.2+) and WT (CD45.1+) T cells recovered during HP. Data represent the mean of three independent experiments. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

Figure 17: Increased frequency of Treg cells correlates with IFN- γ overproduction. *A* and *B*, Proportions of CD4⁺CD25⁺ T cells in four experimental groups: thymus-derived and extrathymic T cells harvested from WT and OM-transgenic mice, respectively; WT and IFN- γ R-KO T cells undergoing HP in nonirradiated TCR β -KO mice (day 14). *C* and *D*, Proportion of FoxP3⁺ cells among spleen CD4 T cells in the four experimental groups. *A* and *C*, One representative experiment out of three. Numbers represent percentages of positive cells. *B* and *D*, Mean values of three to five mice per group. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

Figure 18: Extrathymic CD4⁺CD25⁺T cells show high *in vitro* suppressive activity. *A*, Experimental design for the suppression assay. An MLR was generated by co-culturing CFSE-labeled H2^d effector cells (CD45.1⁺) and H2^K antigen presenting cells (CD45.2⁺) for 4 d. Sorted CD4⁺CD25⁻ or CD4⁺CD25⁺ thymus-derived or extrathymic T cells were added to the MLR at graded effector:suppressor (E:S) cell ratios. *B*, Recovery of CD8 effector T cells following addition of graded numbers of CD4⁺CD25⁻ (left) or CD4⁺CD25⁺ (right) thymus-derived (red) or extrathymic (blue) T cells to the MLR. *C*, CFSE profile (upper panels) and CD44 expression (lower panels) of effector cells in absence (control) or presence of CD4 T cells at an E:S ratio of 1:0.25. Numbers indicate percentages of undivided cells and of cells in the 8th division peak. One representative experiment out of three. *D*,

Extrathymic $CD4^+CD25^-$ (left) and $CD4^+CD25^+$ (right) T cells inhibit the proliferation of CD8 effector cells. Percentage of inhibition was calculated as follows using the proliferation index (pi) provided by *Modfit*: [(pi MLR + added cells) – (pi MLR no added cells)] / (pi MLR no added cells). *E*, Expression of CD103 on thymus-derived and extrathymic $CD4^+FoxP3^+$ T cells. Data are representative of three to five independent experiments.

Figure 19: Proposed model explaining how spontaneous HP and cytokine overproduction bring on apoptosis of extrathymic T cells. Extrathymic T cells undergo vigorous HP in nonlymphopenic animals. Extrathymic CD4 and CD8 T cells produce high amounts of IL-2 and IFN- γ , respectively. Accumulation of IFN- γ upregulates Fas and FasL on CD8 T cells and leads to Fas-mediated apoptosis. IFN- γ and probably IL-2 cause apoptosis of CD4 T cells through downregulation of IL-7R α and Bcl-2. Moreover, IFN- γ and probably IL-2 induce Foxp3 in CD4 T cells and thereby cause a massive expansion of Treg cells. As discussed in the text, the homeostatic and functional behavior of extrathymic T cells are similar to those of two types of thymus derived T cells: innate T cells positively selected on hematopoietic cells, and conventional “adaptive” T cells undergoing HP. Solid lines indicate direct evidence; dotted lines, indirect evidence.

Figure 10

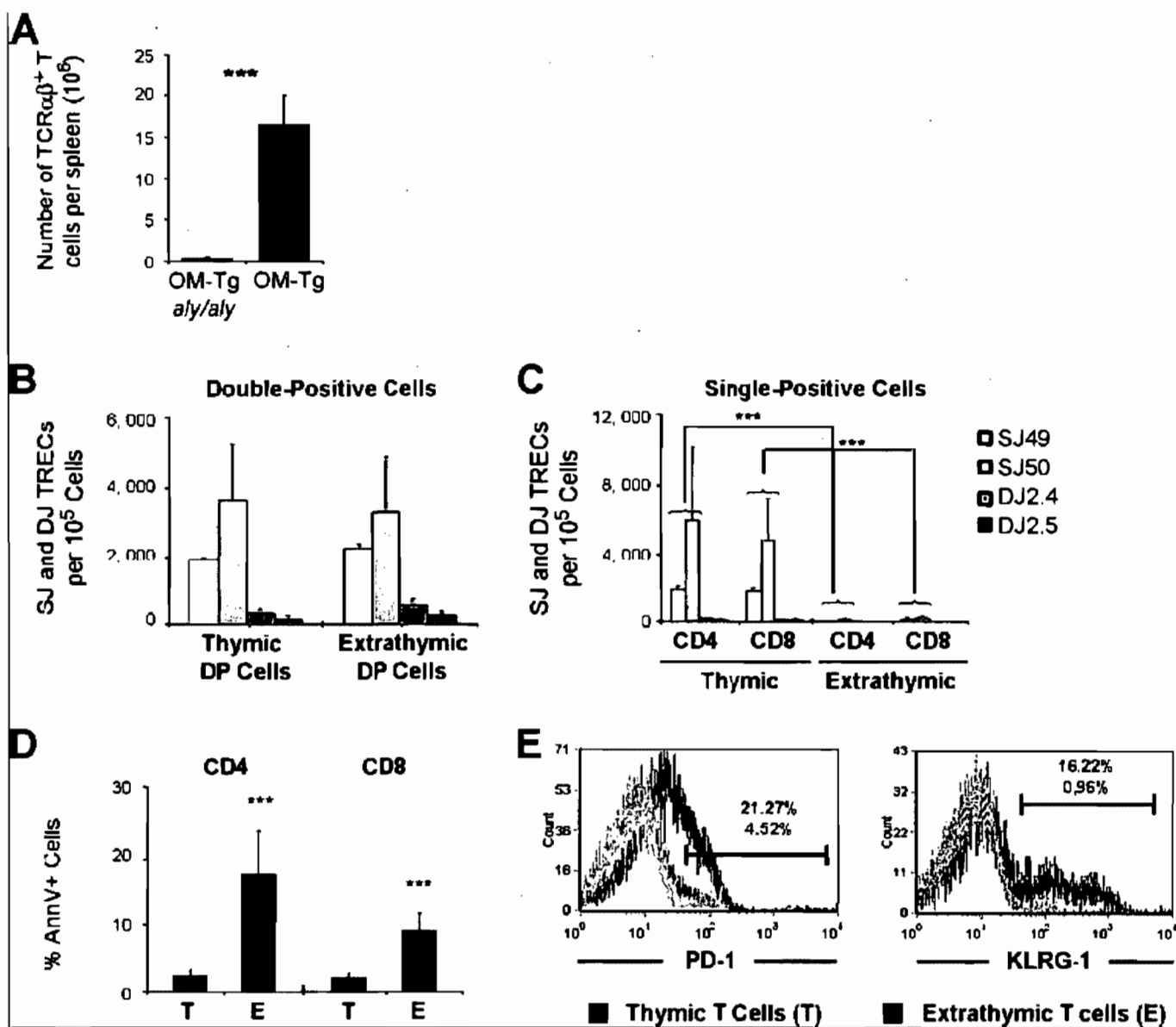


Figure 11

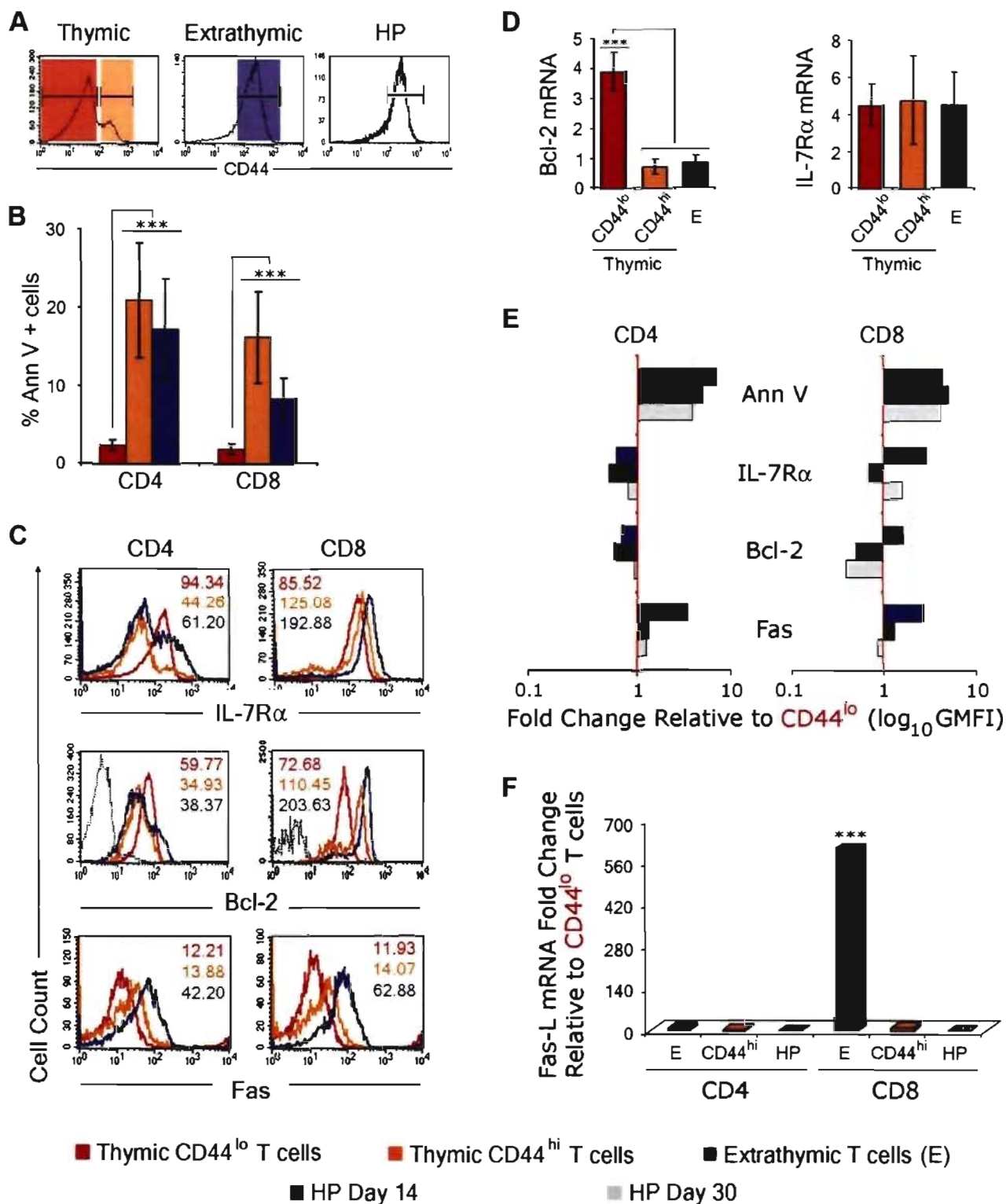
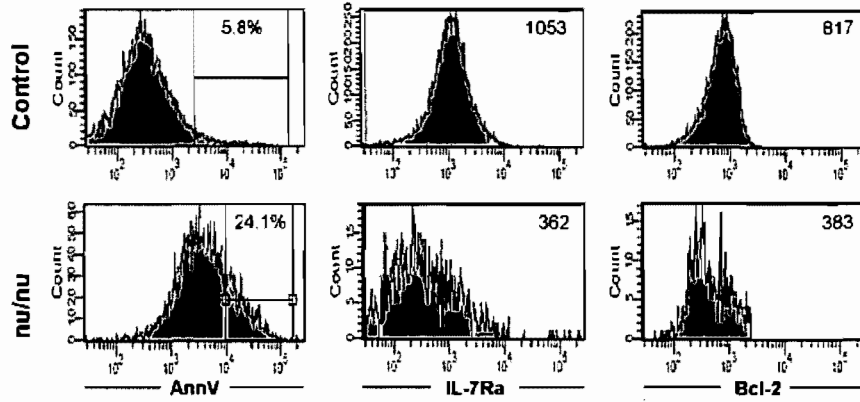
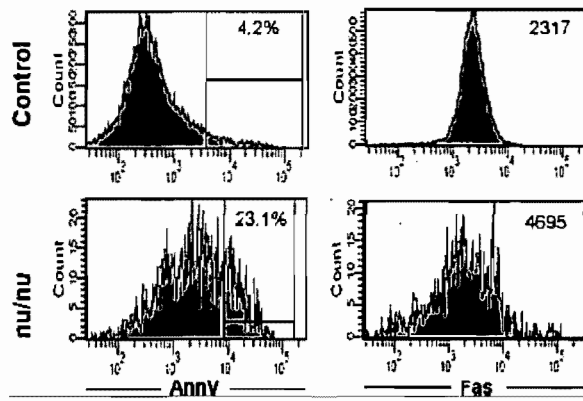


Figure 12

A CD4 T Cells



B CD8 T Cells



C

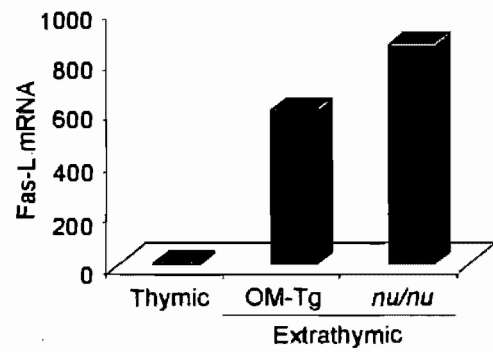


Figure 13

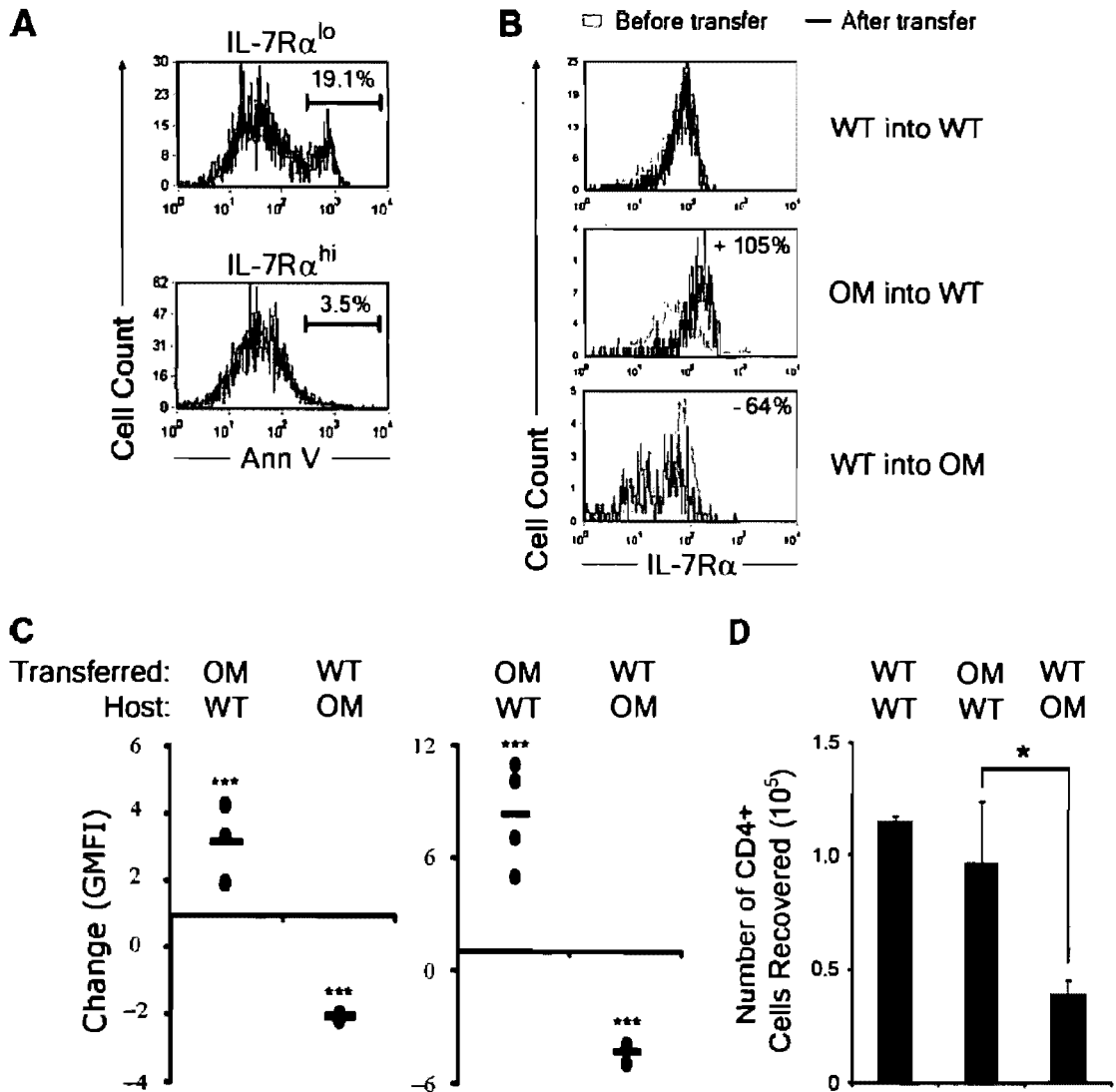


Figure 14

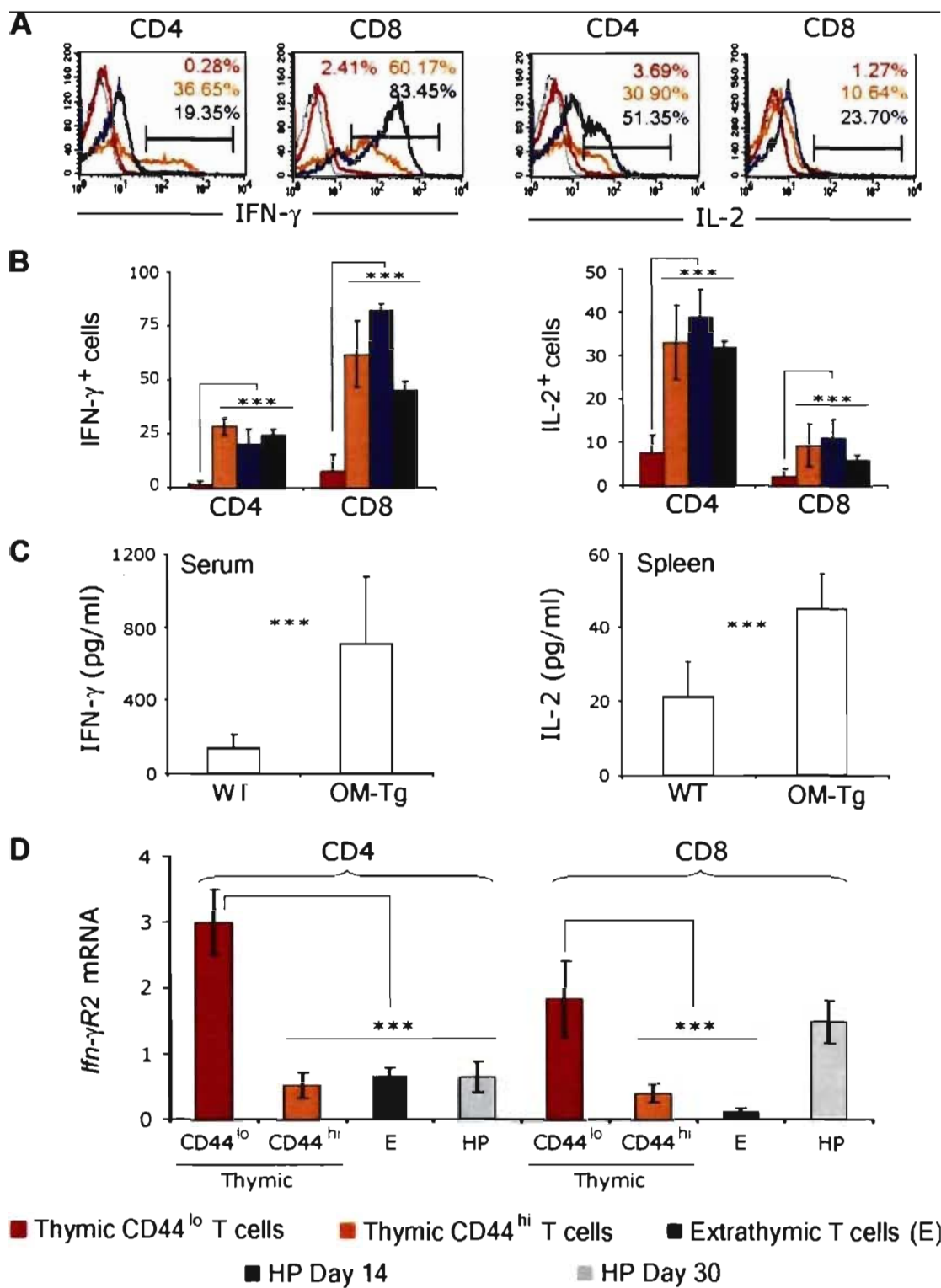


Figure 15

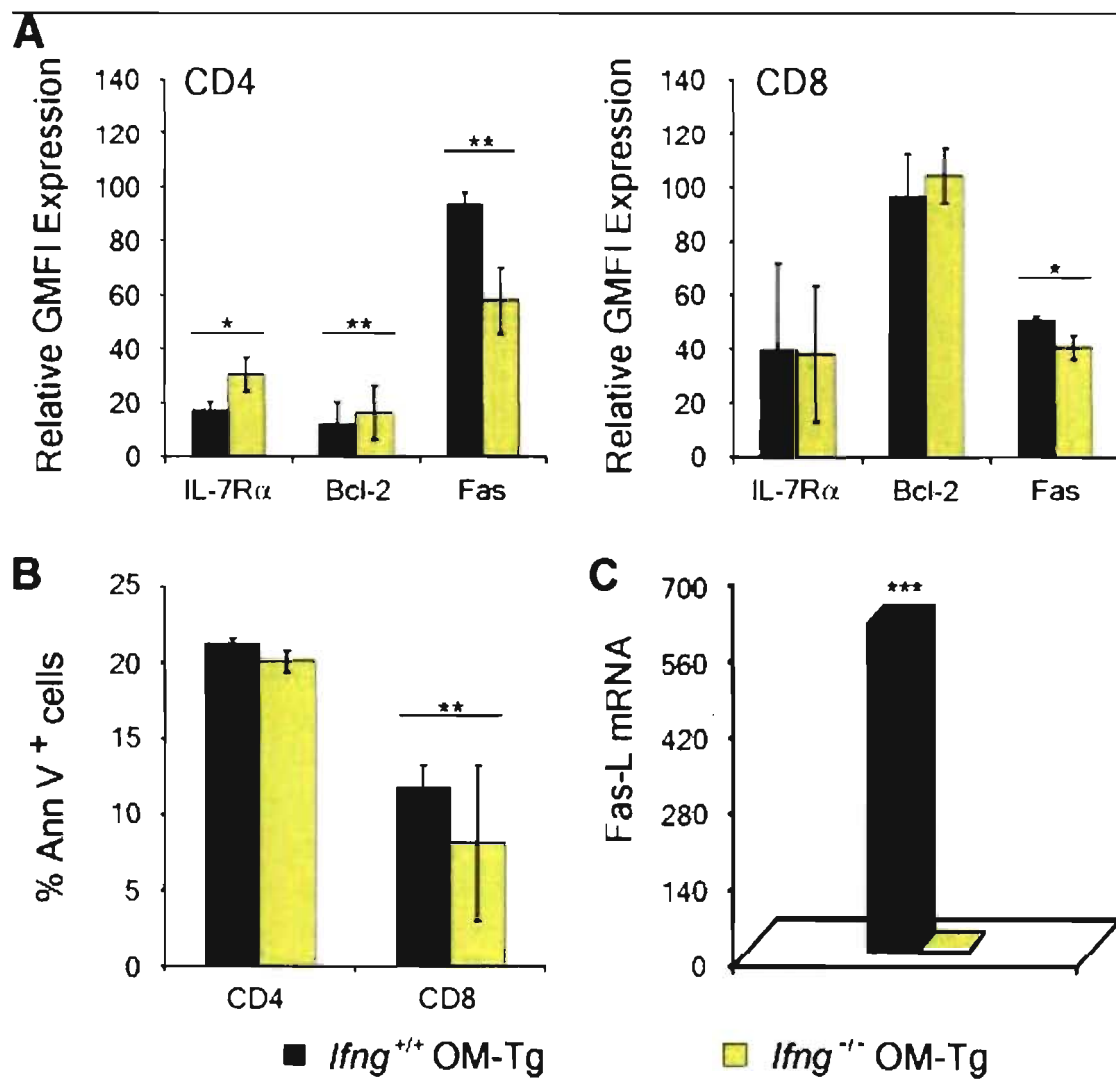


Figure 16

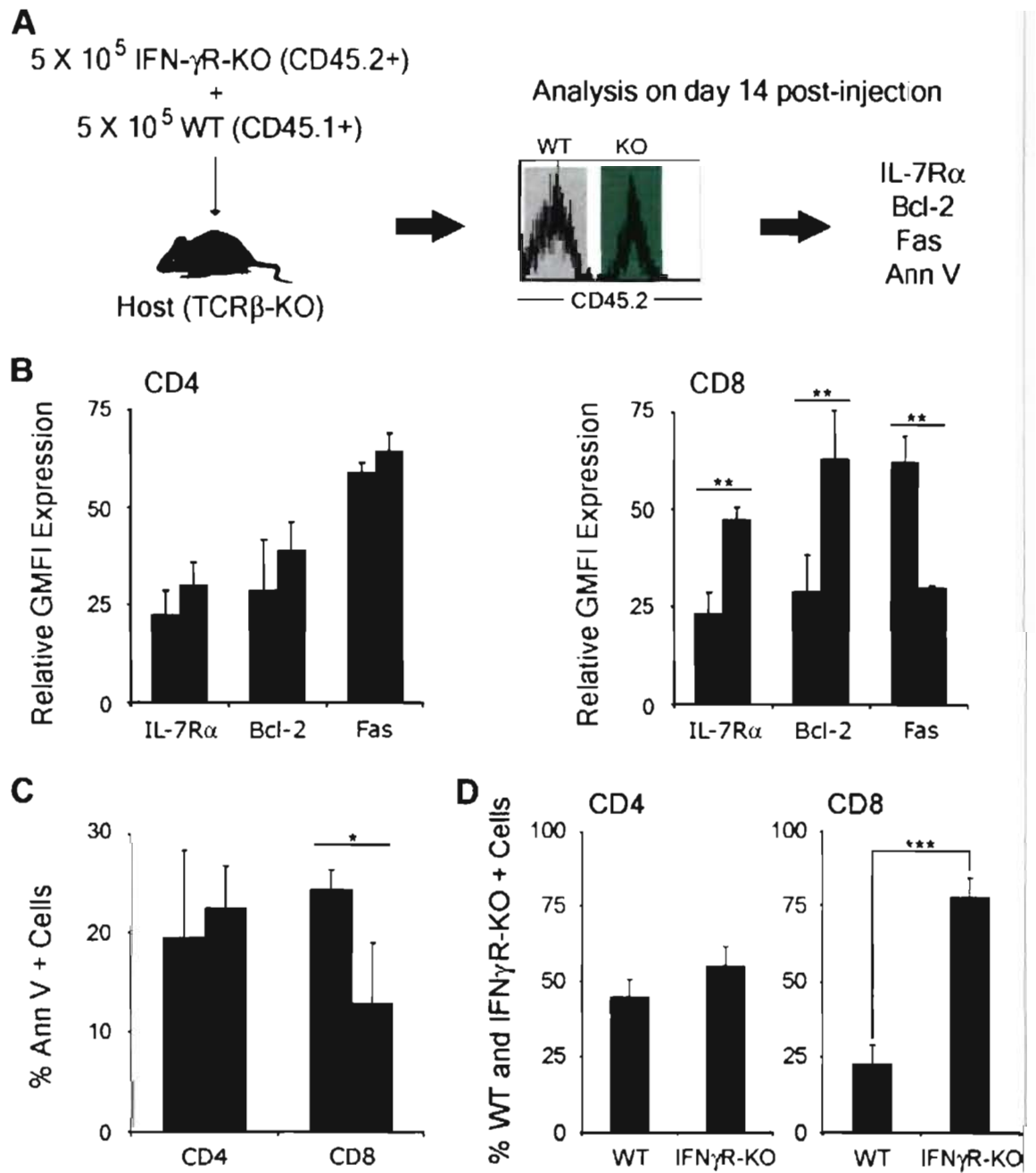


Figure 17

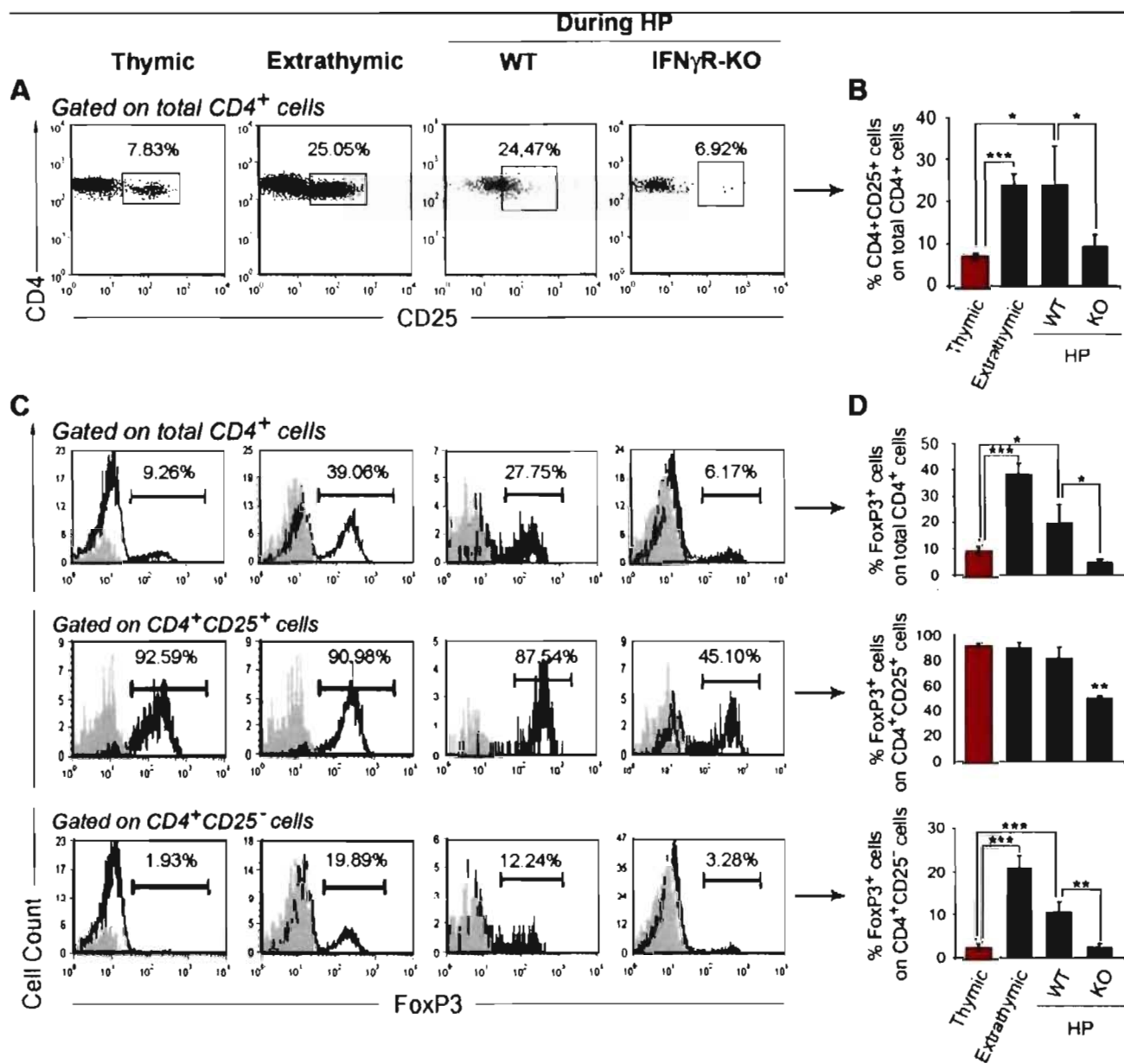


Figure 18

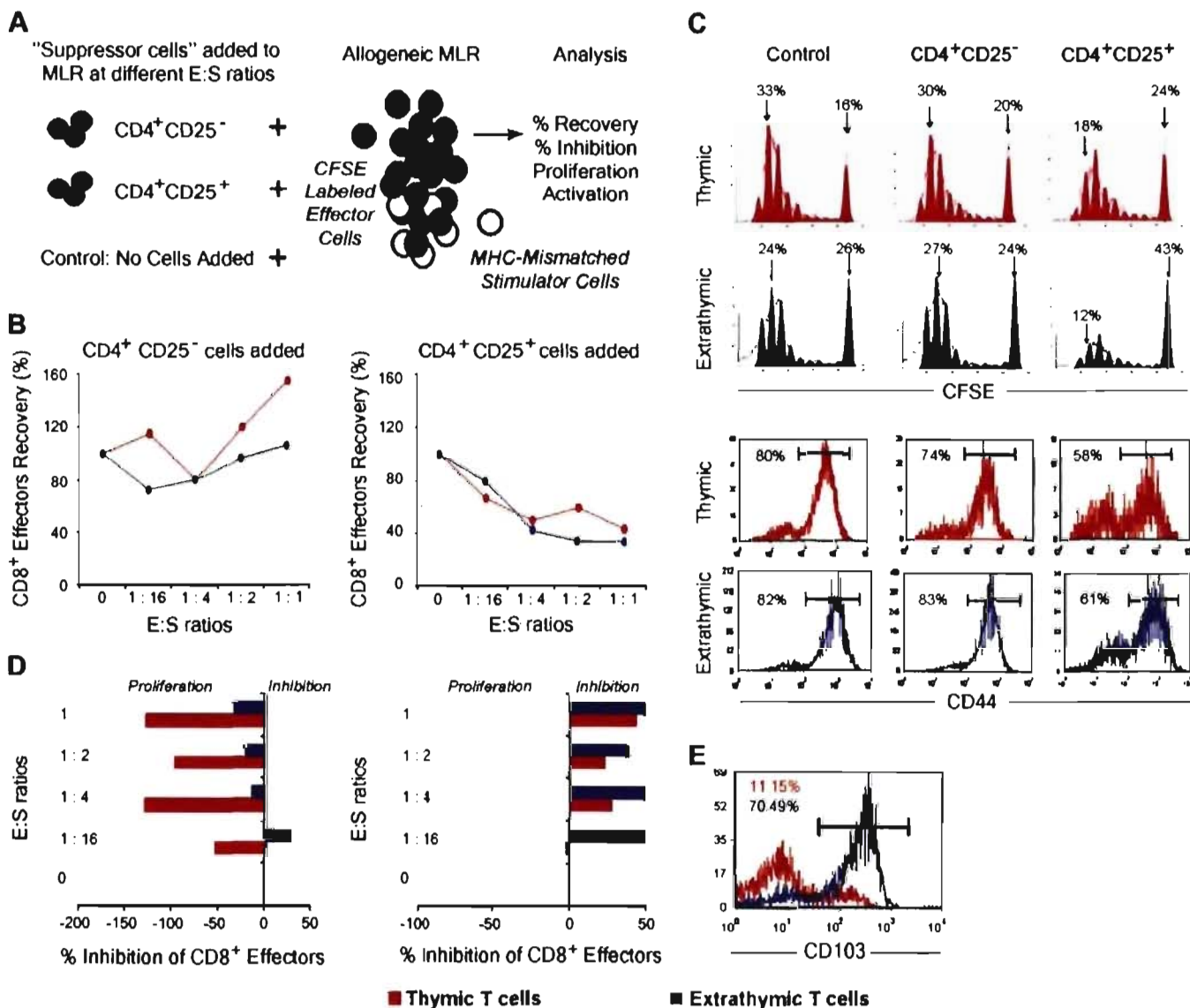
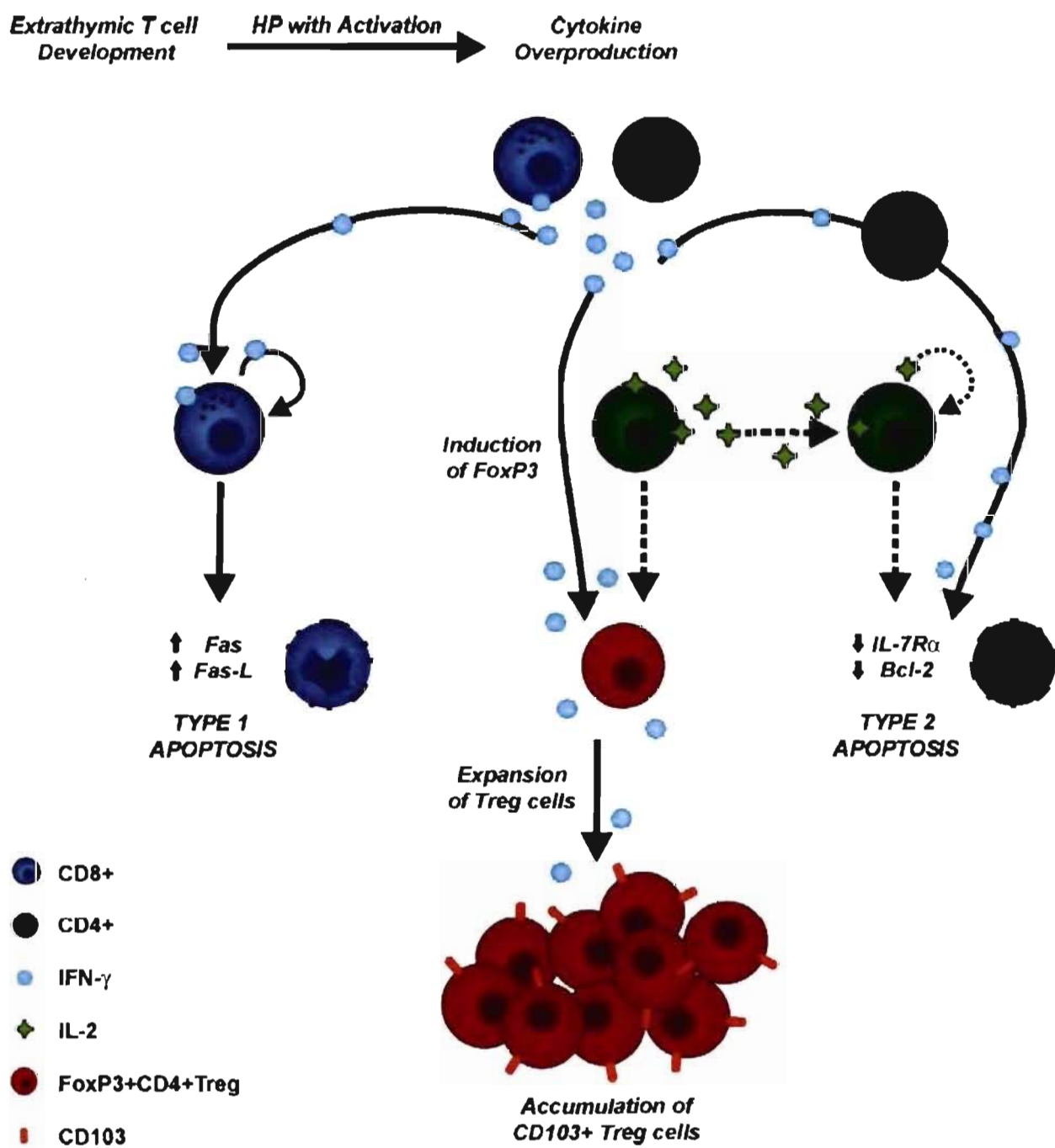


Figure 19



Troisième article**T cell development: an extrathymic perspective**

Marie-Ève Blais^{1,2}, Isabelle Louis^{1,2}, Claude Perreault¹

¹ Institute for Research in Immunology and Cancer and Department of Medicine,
University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

² Equal contribution

Immunological reviews, 209:103-114

Summary

Lymph nodes (LNs) harbor a cryptic T-lymphopoietic pathway that is dramatically amplified by Oncostatin M (OM). OM-transgenic mice generate massive amounts of T lymphocytes in the absence of $\text{Lin}^{-}\text{c-Kit}^{\text{hi}}\text{IL-7R}\alpha^{-}$ lymphoid progenitors and of reticular epithelial cells. Extrathymic T cells that develop along the OM-dependent LN pathway originate from $\text{Lin}^{-}\text{c-Kit}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^{+}$ lymphoid progenitors and differ from classical T cells in turnover kinetics and function. Repertoire selection does not obey the same rules in the thymus and the LNs where positive selection of developing T cells is supported primarily by epithelial and hematopoietic cells, respectively. Extrathymic T cells undergo enhanced homeostatic proliferation thereby acquiring some properties of memory T cells. Following antigen encounter, extrathymic T cells initiate proliferation and cytokine secretion more readily than classical T cells, but their accumulation is limited by their enhanced susceptibility to apoptosis. Studies on extrathymic T cell development *in vitro* and *in vivo* have yielded novel insights into the essence of a primary T lymphoid organ. Furthermore, comparison of the thymic and OM-dependent extrathymic pathways shows how the division of labor between primary and secondary lymphoid organs influences the repertoire and homeostasis of T lymphocytes.

Running title: Extrathymic T cells

The thymus is the sole primary T lymphoid organ: an enigma and a problem

The thymus, the primary T lymphoid organ in all animals with an adaptive immune system, has both its structure and function remarkably conserved (1,2). During their journey in the postnatal thymus, thymocytes travel in an orderly fashion through distinct regions of the cortex and medulla (3-5). A logical inference is that sequential encounters with distinct subsets of thymic stromal cells must be instrumental in regulating thymocyte development. Strikingly, seminal studies have shown that a bone marrow stromal cell line ectopically expressing the Notch ligand Delta-like-1 (OP9-DL1) acquired the capacity to induce the differentiation of hematopoietic progenitors into functional T cells *in vitro* (6,7). A startling implication is that the three-dimensional thymic microenvironment and the presence of thymic epithelial cells are not essential for T cell development (6). Therefore, the reason why the thymus unquestionably provides a unique environment for T cell precursor differentiation remains largely unknown (8,9).

No other organ can compensate for defective thymic function (10,11). 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 (12-15). Decreased thymus output leads to progressive disappearance of naive T cells and to oligoclonal expansion of memory T cells that entail a major restriction of the diversity of the T cell repertoire (16-19). Several observations suggest that immune competence has a major influence on lifespan and that changes in T lymphocyte populations could be implicated in the age-related increase in incidence of infections, cancer, and autoimmune diseases (17,20-23). Therefore, strategies to rejuvenate the thymus or to create thymus substitutes are being pursued with intense interest (6,15,24-26).

Interestingly, chronic exposure to OM amplifies a cryptic extrathymic lymphopoietic pathway and transforms the LNs into primary T lymphoid organs (27-32).

Extrathymic T cells that develop along the OM-dependent LN pathway are different from classical T cells in repertoire selection, turnover kinetics and function. Studies of this extrathymic development pathway have yielded novel insights into the essence of a primary T lymphoid organ. Moreover, they show that differences between the thymic and extrathymic T cell development pathways drastically impinge on the function of their progeny.

LNs harbor a cryptic lymphopoietic pathway that is amplified by OM

The existence of a cryptic extrathymic T lymphocyte development pathway can be inferred from the presence of low numbers of T lymphocytes in the secondary lymphoid organs of athymic mice (13,33,34). The gut cryptopatches, liver and bone marrow have been proposed as potential sites of extrathymic T cell development (35-40). However, recent studies using transgenic mice bearing a green fluorescent protein gene placed under the control of the RAG2 promoter showed that LNs (in particular mesenteric LNs) and to a much lesser extent Peyer's patches, were the sole sites of extrathymic T lymphopoiesis (34). In euthymic mice, this extrathymic pathway is totally repressed, except in conditions of severe lymphocytic depletion. Unexpectedly, transgenic overexpression of two members of the IL-6 family, OM and leukemia inhibitory factor (LIF), was found to induce a massive extrathymic T cell development in the LNs, particularly the mesenteric LNs (29-31). Following extensive investigation, the OM-induced pathway was found to be totally thymus-independent (30,31). Extrathymic T cell development can thus be induced in athymic mice by repeated injection of OM over a few weeks. Breeding experiments with $IL-6^{-/-}$ and $IL-7r^{-/-}$ mice showed that induction of extrathymic development by the OM transgene occurs in the absence of IL-6, but is strictly dependent on IL-7 receptor signaling (41). Importantly, OM-induced extrathymic T cell development, as evidenced by the expression of pT α and the presence of all stages of T cell development, takes place only in the LNs and not in other organs such as the spleen, bone marrow, gut and liver (30,31). Notably, the proportions of double-negative

(DN), double-positive (DP) and single-positive (SP) T cells in the OM-transgenic LN reproduce those found in a thymus. Thus, this model affords an unforeseen opportunity to gain novel insights into the essence of a primary T lymphoid organ (Fig. 20).

Lymphoid progenitors in the thymus and 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 (42-44). The relation between $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^-$ DN1 cells and the thymus seeding cells remains a matter of controversy however. One paradigm holds that thymic $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^-$ DN1 cells (referred to as ETPs, early thymic progenitors) arise from an early bone marrow derived $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{Sca-1}^+ \text{IL-7R}\alpha^- \text{Flt3}^+$ hematolymphoid progenitors (42,45-47). An alternative model posits that the development sequence starts with bone marrow $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$ common lymphoid progenitors (CLP)-1 that give rise to a $\text{B220}^+ \text{c-Kit}^- \text{IL-7R}\alpha^+$ CLP-2 population that enters the thymus and subsequently acquires the $\text{B220}^- \text{c-Kit}^+ \text{IL-7R}\alpha^-$ phenotype (43,48,49). 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 $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ DP T cells.

LNs have a unique ability to support *in situ* generation of mature SP T cells following i.v. injection of DN thymocytes, but not of hematopoietic stem cells, into athymic hosts (50). 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(s) 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 analyzed populations of lineage-negative (Lin^-) cells in these organs. Three major

points emerged from these data (51). First, $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^-$ DN1 cells, whose phenotype corresponds to that of ETPs (42), are present exclusively in the thymus. Second, cells bearing a CLP-like phenotype ($\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$) are more abundant in the wt LN than the thymus, and even more so in the OM^+ LN. A corollary is that, at least in the OM-transgenic LN, mature T cells can be produced in the absence of $\text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^-$ DN1 cells. Finally, $\text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^+$ progenitors undergo abortive T cell commitment in the wt LN and become arrested in G1 phase of the cell cycle because they fail both to upregulate *c-myb*, *c-myc*, and *cyclin D2* and to repress *junB*, *p16^{INK4a}* and *p21^{Cip1/WAF}*. As a result, wt LN DN1 cells cannot progress to the DN2 development stage *in vivo*, and fail to generate mature T cells *in vitro* when cultured with OP9-DL1 stromal cells.

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) (52-57) and T cell lineage commitment (Delta-like Notch-1 ligands) (47,58-60). We found no deficit of these transcripts in the stroma of wt LNs relative to the thymus: *IL-7*, *Kit ligand*, *flt3L*, *Delta-like-1* and *-4*, *Wnt1*, *Wnt7a*, *Wnt10a* and *Wnt10b*. Furthermore, none of these transcripts is more abundant in the OM-transgenic compared to wt LN. However, two salient differences were observed between the thymus and LNs: *Wnt4* and *Wnt7b* transcripts are present in the thymus [as previously reported (61,62)] but absent in the LNs. This is interesting because lack of Wnt signals could well explain the above described differences in gene expression profile among DN1 cells from the thymus versus wt LN. Consistent with this assumption, we found that when cultured with OP9-DL1 stromal cells engineered to express thymus-like levels of *Wnt4*, wt LN CLP-phenotype cells generate mature SP T cells (51). Furthermore, though *Wnt4* and *Wnt7b* are not upregulated in OM-transgenic LN stromal cells, signals downstream of OM partially overlap with those induced by Wnt signaling (63). Evidence for OM signaling in DN cells in the OM-transgenic LN includes upregulation of *bcl-2*, *bcl-x_L* and of phosphorylated STAT3 (51). Comparison of transcript levels in the OM-transgenic relative to wt LN supports the idea that OM signals in DN cells compensate for the lack of Wnt signaling: levels

of *c-fos* and *c-myc* were higher while those of *junB*, *p16^{INK4a}*, and *p21^{Cip1/WAF1}* are decreased in DN cells from the OM-transgenic relative to the wt LN.

Two types of Lin⁻Sca-1⁺ progenitors can generate T cells in the thymus: c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ and c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ (42,43,48). Our results show that these progenitors fail to generate T cells in the wt LN for different reasons: c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ are absent in the LNs, while c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ are present but cell cycle arrested. A parsimonious explanation is that failure of c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ cells to develop in the wt LNs is due to lack of Wnt4 (and possibly Wnt7b) and that OM can compensate for this defect.

Architecture of the OM-transgenic LN

Unlike the thymus, the OM-transgenic LN contains no reticular epithelial cells, and SP T cells are not segregated from DP T cells (64). As in a normal LN, a clear segregation exists between B cell zones (follicles) and T cell zones in the OM-transgenic LN (64). These parameters are similar in the wt and OM-transgenic LNs: the proportion of MHC class II⁺CD11c⁺ dendritic cells, the content of extracellular matrix components (epiligrin, fibronectin, hyaluronic acid and tenascin) and the amount of ER-TR7⁺ fibroblasts. The key difference between the stroma of wt and OM-transgenic LNs is the number of high endothelial venules (HEV) per μm^2 , which is increased 3.5-fold in the OM-transgenic LN as determined with anti-CD62L ligand (PNAd) staining. Interestingly, the two cytokines of the IL-6 family that can induce T cell development in the LN, OM and LIF, are precisely those that have an *in vitro* angiogenic effect (IL-6 is ineffective in both cases) (29,30,65,66). *In vitro* studies have shown that OM-induced proliferation of microvascular endothelial cells requires induction of COX-2 (67). We took advantage of the latter finding to determine whether the OM-induced HEV angiogenesis was important for the occurrence of extrathymic T development. OM-transgenic Ly5.1⁺ fetal liver cells were injected into adult-thymectomized irradiated COX-2^{-/-} mice and COX-2⁺ littermates, and extrathymic T cell development was assessed on day 90 posttransplant. Strikingly,

the number of DP T cells in the LNs of COX-2^{-/-} recipients of OM-transgenic fetal liver cells was decreased 3-fold and HEV density was decreased 2.5-fold relative to COX-2⁺ littermates. These data strongly suggest that COX-2-dependent angiogenesis is instrumental in supporting extrathymic T cell development in the OM-transgenic LN (64), perhaps through recruitment of massive numbers of CLP-phenotype progenitors (51).

Chemokines play a key role in development of T lymphocytes in the thymus (68-70). We assessed the expression profile of 19 chemokine and chemokine receptor genes in the wt thymus and LN and the OM-transgenic LN. Two key points emerged from these experiments. First, CCL25 expression is not increased in the OM-transgenic LN relative to the wt LN (64). This is noteworthy because CCL25 is a prototypical chemokine; abundance of CCL25 transcripts is more than 100-fold-greater in the wt thymus than the LNs. This suggests that CCL25 is not involved in the behavior of the OM-transgenic LN as a primary T lymphoid organ. Second, relative to the wt LN, expression of CCL20 is increased ~ 20-fold in the wt thymus and ~ 30-fold in the OM-transgenic LN. However, we showed that CCL20 interactions with its receptor CCR6 were not essential for OM-dependent extrathymic T cell development in the LN (64). Whether OM-induced upregulation of CCL20 is biologically significant therefore remains a matter of conjecture. Nonetheless, given the remarkable degree of conservation of the thymus, it is notable that T cells can be produced in the OM-transgenic LN which lacks at least three canonical thymic features: reticular epithelial cells, cortex-medulla segregation and high levels of CCL25 chemokine. This means that a primary T lymphoid organ does not have to share all attributes of the thymus.

T cell repertoire selection in the OM-transgenic LN

Positive selection

According to the dominant paradigm, thymocyte positive selection is driven mainly by thymic cortical epithelial cells (9). However, studies involving hematopoietic

chimeras and thymus grafts have shown that hematopoietic cells can mediate positive selection of CD8 T cells *in vivo* (11,71,72). Accordingly, studies in tetraparental aggregation chimeras have demonstrated that the MHC of thymic epithelial cells is not required for efficient positive selection of MHC Ia- and MHC II-restricted T cells (73). Moreover, under normal circumstances, preferential or exclusive positive selection on hematopoietic cells appears to be a general characteristic shared by many (if not all) MHC class Ib-restricted T cells (74).

Studies on repertoire selection in the OM-transgenic LN have been limited to CD8 T cells. Analyses of hematopoietic chimeras showed that MHC class I expression on hematopoietic cells suffices for positive selection of CD8 T cells in the OM-transgenic LN (32). Though presence of MHC I on nonhematopoietic LN stromal cells (endothelial cells, fibroblasts) is not required for positive selection of CD8 T cells, some minor contribution to the process has not been formally excluded. Positive selection does not proceed in the same fashion in the thymus and the OM-transgenic LN (32). Indeed, taking CD5 expression as a surrogate marker for the avidity of positively selecting TCR-MHC-ligand interactions, we found a discrepancy between T cells bearing a transgenic TCR versus polyclonal T cells. CD8 SP T lymphocytes bearing the 2C or H-Y TCR express lower levels of CD5 when they develop in the OM-transgenic LN than in the thymus. In contrast, in the case of polyclonal nonTCR-transgenic CD8 SP T cells, the CD5 staining intensity is superior for those developing in the OM-transgenic LN than in the thymus. 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 H-Y and 2C TCRs 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.

Negative selection

Negative selection of extrathymic T lymphocytes bearing H-Y or 2C TCR is very effective in the OM-transgenic LN. If anything, depletion of H-Y TCR⁺ DP T cells is more drastic in the OM-transgenic LN than in the thymus. This finding supports the concept that when a negatively selecting ligand is expressed on hematopoietic cells, negative selection does not require a thymus-specific type of antigen-presenting cell (75). Nevertheless, one might expect a different story for peripheral tissue-restricted antigens (76). Indeed, the autoimmune regulator (*Aire*) transcription factor expressed by thymic medullary epithelial cells has a nonredundant role in establishment of tolerance to proteins that are primarily expressed in nonthymic parenchymal tissues (77-79). *Aire* prevents autoimmunity by promoting the ectopic expression of peripheral tissue-restricted antigens in medullary epithelial cells of the thymus (80). The *Aire* pathway can induce intrathymic deletion of autoreactive thymocytes, but the possibility that other tolerance mechanisms may also depend on *Aire* cannot be excluded (79). Anderson *et al.* have compared the transcriptome of thymic medullary epithelial cells from wt and *Aire*-deficient mice, and identified the 30 genes most strongly down-regulated in *Aire*-deficient cells (78). We performed similar studies on thymic and LN stromal cells to determine whether *Aire*-regulated gene transcripts would be absent in LN stromal cells (unpublished observations). Consistent with Anderson *et al.* (78), we found that LN stromal cells expressed *Aire* transcripts. Relative expression of *Aire* in wt and OM-transgenic LNs was about 25% of that in thymic stromal cells (*Fig. 21a*). To our surprise, we found that the transcripts most upregulated by *Aire* were expressed at similar levels by stromal cells of the wt thymus, wt LN and OM-transgenic LN (*Fig. 21b*). The current dogma holds that ectopic expression of nonlymphoid tissue-specific genes is limited to thymic medullary epithelial cells. Our data show that LN stromal cells share ectopic expression of peripheral tissue-restricted antigens even though these cells express relative levels of *Aire* transcripts that are fourfold lower than in thymic

stromal cells. These preliminary results suggest that the levels of *Aire* expression in LN stromal cells may be sufficient to promote expression of tissue-specific genes. However, we cannot formally exclude the possibility that some unidentified gene compensates for the paucity of *Aire* expression in the LN. Nonetheless, the ectopic expression of *Aire*-regulated genes in the LNs must be taken into account when discussing autoimmunity in OM-transgenic mice (see below).

Homeostatic proliferation and autoimmunity

TCR $\alpha\beta$ ⁺ SP T cells derived from the OM-transgenic LN express relatively low TCR levels and have a memory T cell phenotype: CD44^{hi}CD62L^{lo} for CD4 T cells and CD44^{hi}CD62L^{hi}CD122^{hi} for CD8 T cells (31,32). Moreover, 5-bromo-2'-deoxyuridine pulse-chase assays revealed that the turnover of extrathymic T cells is more rapid than that of thymic T cells (31). These data indicate that extrathymic T cells are undergoing enhanced peripheral proliferation. Our interpretation for this is based on the assumption that the mixture of MHC/peptide complexes presented by thymic cortical epithelial cells and LN cells differs. Because of the blood-thymus barrier, thymus-derived naive SP T cells never see the thymic cells that supported their positive selection (only some effector-memory T cells in the S-phase of the cell cycle can reenter the thymus) (81-83). Therefore, the cells that thymic T cells encounter in the periphery do not express the same MHC-peptide mixture as thymic epithelial cells. In contrast, LN-derived SP T cells recirculate and reenter the LNs freely (31). We therefore infer that LN-derived T cells undergo enhanced homeostatic proliferation because they are continually in contact with the LN MHC/peptide mixture that entailed their positive selection. In this context, TCR down-modulation may be required to prevent overstimulation of extrathymic T cells. This might explain why extrathymic T cells express low TCR levels. It has yet to be determined whether provision of thymus-derived competitor T cells would mitigate homeostatic proliferation of extrathymic T cells (84).

OM-transgenic mice develop features of autoimmunity including autoantibodies to double-stranded DNA, dermatitis and glomerulonephritis with accumulation of immune complexes (41). We found no evidence that these mice were defective in deleting autoreactive T cells [(32) and *Fig.21b*]. However, we observed that autoimmune dermatitis was absent in OM-transgenic mice that were i) both MHC I- and II-deficient and ii) bearing the P14 TCR (specific for the dominant H2D^b-associated epitope of the lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) on a RAG-2-deficient background (unpublished observations). These data suggest that autoimmunity in OM-transgenic mice depends on the presence of a polyclonal T cell repertoire. LN-derived T cells in OM-transgenic mice undergo excessive homeostatic expansion (31,32) and homeostatic expansion has been shown to drive autoimmunity (85,86). Our working hypothesis is therefore that, in the absence of thymus-derived competitors, the unabated peripheral proliferation of LN-derived T cells leads to autoimmunity.

Thymic and extrathymic T cells are not functionally equivalent

The function of T cells derived from the LN lymphopoietic pathway modulated by OM was evaluated in irradiated thymectomized RAG1-deficient mice reconstituted with OM-transgenic fetal liver cells. Extrathymic CD4 T cells are functionally deficient (87). They respond by proliferation and intracellular IFN- γ production to *in vitro* stimulation with anti-CD3 \pm CD28. However, because of their high apoptosis rate, they fail to accumulate to normal levels *in vitro* despite their normal doubling time and burst size. Moreover, they do not provide adequate *in vivo* help to B cells in mice infected with vesicular stomatitis virus or LCMV. The functionality of extrathymic CD8 T cells is superior to that of their CD4 counterpart. Following *in vitro* stimulation with anti-CD3 \pm CD28, extrathymic CD8 T cells proliferate rapidly and extensively and produce greater quantities of IFN- γ than thymus-derived T cells (87). Furthermore, they are able to reject allogeneic tumor cells (30). However, their accumulation in 72 h culture assays is not commensurate

with their proliferative activity because it is curtailed by a high apoptosis rate. Likewise, following LCMV infection, GP33-41 tetramer⁺ extrathymic CD8 T cells initiate proliferation swiftly but are unduly susceptible to apoptosis (*Fig. 22*). As a result, extrathymic CD8 T cells specific for the GP33-41 epitope accumulate to lower levels than thymic T cells and provide only transient control of LCMV-ARM and LCMV-WE infection (87).

OM-induced extrathymic T cells are remarkably similar to the small subset of thymus-derived T cells that are MHC Ib-restricted: i) they display an activated phenotype even in uninfected animals; ii) they initiate expansion and production of IFN- γ more rapidly, yet accumulate to lower levels than mainstream CD8 T cells following infection, and iii) they fail to eradicate LCMV (74,88-90). Interestingly, both T cell populations are positively selected by hematopoietic cells, in the thymus for MHC Ib-restricted T cells and in the LN for OM-induced extrathymic T cells (32,74). That OM-induced extrathymic T cells cannot substitute for thymic T cells implies that having the ability to generate new T cells is not sufficient to ensure immunocompetence. This concept is relevant to strategies aimed at creating thymic substitutes (6,25). Further studies will be needed to determine whether LN-derived extrathymic T cells when confronted with various pathogens show the same behavior as MHC Ib-restricted T cells. If this is the case, modulation of the OM-induced extrathymic development pathway may not substitute for classical thymic T cells but could have considerable therapeutic potential for eradication of IFN- γ sensitive pathogens. Finally, demonstration that the T cell generation potential of CLP-phenotype cells is dramatically amplified by Wnt4 (51) 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 (91). Thus, Wnt4 protein could have a valuable role in developing *ex vivo* culture systems for generating therapeutically relevant numbers of T lymphocytes from extrathymic lymphoid progenitors.

Conclusions and perspective

There is no known substitute for the thymus

Studies on OM-transgenic mice show that, consistent with *in vivo* data (6,44), many canonical thymic features are dispensable to generating T cells. However, TCR $\alpha\beta$ T cells generated extrathymically are not functionally equivalent to thymic T cells. Like their thymic counterparts, extrathymic TCR $\alpha\beta$ T cells see the universe with TCRs that recognize MHC-peptide complexes (92,93). However, extrathymic TCR $\alpha\beta$ T cells also share properties with NK cells (94,95) and MHC Ib-restricted T cells (88,89,96) (*Fig. 22*). They respond rapidly to antigen stimulation by proliferating and secreting IFN- γ , but their expansion has limited amplitude and they generate few memory T cells. Thus, the thymus hitherto remains the sole milieu that generates cells that exhibit all the functional properties of conventional adaptive TCR $\alpha\beta$ T cells.

Why do extrathymic T cells behave differently from thymic T cells?

One unexplored possibility would implicate derivation of thymic and extrathymic T cells from different types of progenitors. Indeed, extrathymic T cells originate from LN progenitors with a CLP-phenotype (51) whereas substantial evidence suggests that most thymic T cells derive from ETP-phenotype cells (44,45). This question might be directly addressed with experiments where the thymus or LNs are seeded with pure populations of CLPs or ETPs and the resulting T cells are challenged with pathogens. Key questions are whether the type of progenitor (CLP versus ETP) and/or the site of development (thymus versus LN) will dictate the functional properties of the T cell progeny. A related problem is the reason why ETPs are found in the thymus and not the LNs. No Lin⁻c-Kit^{hi} cells are present in the LNs (51). Their absence could be due to lack of importation or to lack of *in situ* induction of c-Kit. Thus, if the hematogenous progenitors that seed the thymus and give rise to

ETPs have a Lin⁻c-Kit^{hi} phenotype (45,47), then the thymus must have a unique ability to attract these thymus seeding progenitors. It was recently reported that the engraftment of T cell progenitors in the thymus depends on interactions between P-selectin expressed on thymic endothelium and P-selectin glycoprotein ligand-1 expressed on circulating thymic progenitors (97). It will therefore be interesting to evaluate expression of P-selectin in the LNs and of P-selectin glycoprotein ligand-1 on various types of lymphoid progenitors. Alternatively, if thymic Lin⁻c-Kit^{hi} cells originate from CLP-2 thymus seeding cells (43), the problem might be that the LN stroma fails to provide a signal that upregulates c-Kit on CLP-2 cells or their progeny.

At present however, our favored hypothesis holds that a key difference between thymic and extrathymic T cells is the nature of cells responsible for their positive selection. Most, though not all, studies support the concept that MHC II- and MHC Ia-restricted thymic T cells are positively selected by thymic epithelial cells while only a minor subset of MHC Ib-restricted T cells are positively selected on hematopoietic cells (9,11,73,74,98,99). In contrast, LNs contain no reticular (thymus-like) epithelial cells and, at least for CD8 T cells, *in situ* positive selection is supported mainly by hematopoietic cells. Whatever their origin, naïve T cells receive survival signals (TCR tickling) from hematopoietic antigen-presenting cells in secondary lymphoid organs (100,101). We speculate that the source of functional differences between T cells positively selected by epithelial versus hematopoietic cells arises at the intersection of positive selection and peripheral survival signals. Thus, naïve T cells would acquire an activated phenotype and undergo enhanced peripheral proliferation when signals responsible for both positive selection and peripheral survival are derived from hematopoietic cells. T cells undergoing peripheral 'homeostatic' expansion acquire functional properties of memory T cells (102) but, for elusive reasons, their fitness (survival potential) is inferior to that of genuine memory T cells (103). Consistent with this, extrathymic T cells undergo proliferation and cytokine secretion, but also apoptosis, more readily than thymic T cells (87). A related conundrum that ought to be deciphered using novel proteomic

approaches (104,105) is the level of overlap and differences between MHC-associated peptides presented by cells of different lineages such as hematopoietic cells and thymic epithelial cells.

The role of Wnt in ETP and CLP development

Indirect evidence suggests that in the wt LN, the T lineage differentiative potential of Lin⁻c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ cells is thwarted by the absence of Wnt signaling (51). First, blockade of DN1 \rightarrow DN2 transition with accumulation of pre-DN2 cells in wt LN is reminiscent of what can be seen in the thymus of mutant mice with disruption of the Wnt signaling pathway. Indeed, transcription factor Tcf-1 is essential for DN1 thymocytes 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^{-/-}) (106,107). A common link among Tcf-1, GTPase Rho and c-Kit is that they are involved in Wnt signaling (61,108-110). Second, among key ligands that are produced by stromal cells and that may regulate early steps of T cell development, *Wnt4* and *Wnt7b* are the sole transcripts that are deficient in the LNs relative to the thymus. Third, expression profiling incriminates deficient Wnt signaling as a plausible explanation for the proliferative defect of wt LN relative to thymus DN cells. 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⁻c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ cells (29,31,41). These cytokines lead to downstream events that significantly overlap with those induced by Wnt signaling (51,63). Fifth, when cultured with OP9-DL1 stromal cells expressing thymus-like levels of *Wnt4*, wt LN Lin⁻c-Kit^{lo}Sca-1⁺IL-7R α ⁺ progenitors generate SP T cells. Nevertheless, generation of Wnt-transgenic mice will be essential to evaluate directly whether T cell development in the LN is normally and solely hampered by the lack of Wnt signals.

In contrast to c-Kit^{lo}IL-7R α ⁺ cells, thymic c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ cells did not require high levels of Wnt4 to generate T cells *in vitro*. Two possibilities could explain this unexpected discrepancy between the two types of progenitors: c-Kit^{hi}IL-7R α ⁻ cells do not require Wnt signals or they can use Wnt ligands other than Wnt4. Considering the controversy over the involvement of Wnt signaling in T cell development (56,57,110,111), both scenarios must be considered plausible.

The functional attributes of extrathymic T cells.

Are extrathymic T cells and other T cells positively selected on hematopoietic cells functionally relevant? CD8 subsets certainly are. In general, these CD8 T cells are effective against IFN- γ sensitive targets, such as allogeneic tumor cells and *Listeria monocytogenes*, but IFN- γ resistant viruses represent their nemesis (74,87-90,112). Nonetheless, even though extrathymic T cells are insufficient to permanently eradicate viruses like LCMV, their brisk expansion and production of IFN- γ could help classical T cells to eliminate pathogens. Indeed, under normal circumstances, CD8 T cells with an activated/memory phenotype are responsible for the early production of IFN- γ following infection (113-115). Production of IFN- γ (~day 4) is initiated prior to maximal CD8 T cell expansion (~day 8) and is important for initial control of infection. An attractive hypothesis would be that under normal conditions, MHC Ia- and MHC Ib-restricted T cells generated in the thymus have nonredundant complementary functions. MHC-Ib-restricted T cells (whose behavior is similar to that of extrathymic T cells) would interfere with early pathogen replication while classical MHC Ia-restricted T cells that come into play later, would carry out full pathogen eradication and provide long-term memory.

Acknowledgements

We thank Dr. Christopher Clegg (ZymoGenetics Inc.) and members of our laboratory who have participated in studies related to this review. We are grateful to J.A. Kashul for editorial assistance. The experimental work from the authors' laboratory was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). MEB and IL are supported by training grants from the National Cancer Institute of Canada and CIHR, respectively. CP holds a Canada Research Chair in Immunobiology.

References

1. Zapata A, Amemiya CT. Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; **248**:67–107.
2. Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* 2004; **20**:367–379.
3. Lind EF, Prockop SE, Porritt HE, Petrie HT. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 2001; **194**:127–134.
4. 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.
5. Witt CM, Raychaudhuri S, Schaefer B, Chakraborty AK, Robey EA. Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS Biol* 2005; **3**:e160.
6. Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by Delta-like-1 in vitro. *Immunity* 2002; **17**:749–756.

7. Schmitt TM, de Pooter RF, Gronski MA, Cho SK, Ohashi PS, Zúñiga-Pflücker JC. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated *in vitro*. *Nat Immunol* 2004; **5**:410–417.
8. Carlyle JR, Zúñiga-Pflücker JC. Requirement for the thymus in $\alpha\beta$ T lymphocyte lineage commitment. *Immunity* 1998; **9**:187–197.
9. Anderson G, Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature Rev Immunol* 2001; **1**:31–40.
10. Jamieson BD, Douek DC, Killian S, Hultin LE, Scripture-Adams DD, Giorgi JV et al. Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity* 1999; **10**:569–575.
11. Zinkernagel RM, Althage A. On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:8092–8097.
12. Duludé G, Brochu S, Fontaine P, Baron C, Gyger M, Roy DC et al. Thymic and extrathymic differentiation and expansion of T lymphocytes following bone marrow transplantation in irradiated recipients. *Exp Hematol* 1997; **25**:992–1004.
13. 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.

14. 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.
15. Taub DD, Longo DL. Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol Rev* 2005; **205**:72–93.
16. Di Rosa F, Ramaswamy S, Ridge JP, Matzinger P. On the lifespan of virgin T lymphocytes. *J Immunol* 1999; **163**:1253–1257.
17. Tanchot C, Rocha B. Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output. *J Exp Med* 1997; **186**:1099–1106.
18. Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, Kourilsky P. A direct estimate of the human $\alpha\beta$ T cell receptor diversity. *Science* 1999; **286**:958–961.
19. Messaoudi I, Lemaoult J, Guevara-Patino JA, Metzner BM, Nikolich-Zugich J. Age-related CD8 T cell clonal expansions constrict CD8 T cell repertoire and have the potential to impair immune defense. *J Exp Med* 2004; **200**:1347–1358.
20. Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. *Science* 1996; **273**:70–74.

21. Miller RA, Chrisp C. T cell subset patterns that predict resistance to spontaneous lymphoma, mammary adenocarcinoma, and fibrosarcoma in mice. *J Immunol* 2002; **169**:1619–1625.
22. Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee W-W, Koetz K, Bryl E et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol* 2005; **174**:7446–6802.
23. Miller RA, Berger SB, Burke DT, Galecki A, Garcia GG, Harper JM et al. T cells in aging mice: genetic, developmental, and biochemical analyses. *Immunol Rev* 2005; **205**:94–103.
24. Erickson M, Morkowski S, Lehar S, Gillard G, Beers C, Dooley J et al. Regulation of thymic epithelium by keratinocyte growth factor. *Blood* 2002; **100**:3269–3278.
25. Poznansky MC, Evans RH, Foxall RB, Olszak IT, Piascik AH, Hartman KE et al. Efficient generation of human T cells from a tissue-engineered thymic organoid. *Nat Biotechnol* 2000; **18**:729–734.
26. Rossi S, Blazar BR, Farrell CL, Danilenko DM, Lacey DL, Weinberg KI et al. Keratinocyte growth factor preserves normal thymopoiesis and thymic microenvironment during experimental graft-versus-host disease. *Blood* 2002; **100**:682–691.

27. Lindberg RA, Juan TS, Welcher AA, Sun Y, Cupples R, Guthrie B et al. Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M. *Mol Cell Biol* 1998; **18**:3357–3367.
28. 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.
29. Shen MM, Skoda RC, Cardiff RD, Campos-Torres J, Leder P, Ornitz DM. Expression of LIF in transgenic mice results in altered thymic epithelium and apparent interconversion of thymic and lymph node morphologies. *EMBO J* 1994; **13**:1375–1385.
30. Clegg CH, Rulffes JT, Wallace PM, Haugen HS. Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature* 1996; **384**:261–263.
31. 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.
32. Terra R, Labrecque N, Perreault C. Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules. *J Immunol* 2002; **169**:684–692.
33. Sato K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Yamagiwa S, Watanabe H, Asakura H et al. 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* 1995; **182**:759–767.

34. Guy-Grand D, Azogui O, Celli S, Darche S, Nussenzweig MC, Kourilsky P 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.
35. Rocha B, Vassalli P, Guy-Grand D. Thymic and extrathymic origins of gut intraepithelial lymphocyte populations in mice. *J Exp Med* 1994; **180**:681–686.
- (36) Poussier P, Julius M. Speculation on the lineage relationships among CD4⁺8⁺gut-derived T cells and their role(s). *Semin Immunol* 1999; **11**:293–303.
37. Poussier P, Ning T, Banerjee D, Julius M. A unique subset of self-specific intrainestinal T cells maintains gut integrity. *J Exp Med* 2002; **195**:1491–1497.
38. Abo T, Watanabe H, Iiai T, Kimura M, Ohtsuka K, Sato K et al. Extrathymic pathways of T-cell differentiation in the liver and other organs. *Int Rev Immunol* 1994; **11**:61–102.
39. Abo T, Kawamura T, Watanabe H. Physiological responses of extrathymic T cells in the liver. *Immunol Rev* 2000; **174**:135–149.
40. 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.

41. 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.
42. Allman D, Sambandam A, Kim S, Miller JP, Pagan A, Well D et al. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* 2003; **4**:168–174.
43. Martin CH, Aifantis I, Scimone ML, von Andrian UH, Reizis B, von Boehmer H et al. Efficient thymic immigration of B220⁺ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential . *Nat Immunol* 2003; **4**:866–873.
44. Porritt HE, Rumfelt LL, Tabrizifard S, Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC, Petrie HT. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity* 2004; **20**:735–745.
45. Schwarz BA, Bhandoola A. Circulating hematopoietic progenitors with T lineage potential. *Nat Immunol* 2004; **5**:953–960.

46. Balciunaite G, Ceredig R, Rolink AG. The earliest subpopulation of mouse thymocytes contains potent T, significant macrophage, and natural killer cell but no B-lymphocyte potential. *Blood* 2005; **105**:1930–1936.
47. Sambandam A, Maillard I, Zediak VP, Xu L, Gerstein RM, Aster JC et al. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol* 2005; **6**:663–670.
48. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997; **91**:661–672.
49. Akashi K, Reya T, Dalma-Weiszhausz D, Weissman IL. Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**:144–150.
50. Antica M, Scollay R. Development of T lymphocytes at extrathymic sites. *J Immunol* 1999; **163**:206–211.
51. Terra R, Louis I, LeBlanc R, Ouellet S, Zúñiga-Pflücker JC, Perreault C. T cell generation by lymph node resident progenitor cells. *Blood* 2005; **106**:193–200.
52. Akashi K, Kondo M, Weissman IL. Role of interleukin-7 in T-cell development from hematopoietic stem cells. *Immunol Rev* 1998; **165**:13–28.
53. Agosti V, Corbacioglu S, Ehlers I, Waskow C, Sommer G, Berrozpe G 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.

54. Staal FJ, Meeldijk J, Moerer P, Jay P, van de Weerdt BC, Vainio S et al. Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur J Immunol* 2001; **31**:285–293.
55. Staal FJT, Weerkamp F, Baert MRM, van den Burg CMM, van Noort M, de Haas EFE et al. Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34⁺ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion. *J Immunol* 2004; **172**:1099–1108.
56. Cobas M, Wilson A, Ernst B, Mancini SJ, MacDonald HR, Kemler R et al. β -catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J Exp Med* 2004; **199**:221–229.
57. Xu Y, Banerjee D, Huelsken J, Birchmeier W, Sen JM. Deletion of β -catenin impairs T cell development. *Nat Immunol* 2003; **4**:1177–1182.
58. Harman BC, Jenkinson EJ, Anderson G. Microenvironmental regulation of Notch signalling in T cell development. *Semin Immunol* 2003; **15**:91–97.
59. Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 2004; **5**:247–253.
60. Tan JB, Visan I, Yuan JS, Girdos CJ. Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T cell development. *Nat Immunol* 2005; **6**:671–679.

61. Balciunaite G, Keller MP, Balciunaite E, Piali L, Zuklys S, Mathieu YD et al. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* 2002; **3**:1102–1108.
62. 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.
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. Louis I, Dulude G, Corneau S, Brochu S, Boileau C, Meunier C et al. Changes in the lymph node microenvironment induced by Oncostatin M. *Blood* 2003; **102**:1397–1404.
65. Vasse M, Pourtau J, Trochon V, Muraine M, Vannier JP, Lu H et al. Oncostatin M induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; **19**:1835–1842.
66. Peters M, Iler AM, Rose-John S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 1998; **92**:3495–3504.

67. Pourtau J, Mirshahi F, Li H, Muraine M, Vincent L, Tedgui A et al. Cyclooxygenase-2 activity is necessary for the angiogenic properties of oncostatin M. *FEBS Lett* 1999; **459**:453–457.
68. Plotkin J, Prockop SE, Lepique A, Petrie HT. Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol* 2003; **171**:4521–4527.
69. Misslitz A, Pabst O, Hintzen G, Ohl L, Kremmer E, Petrie HT et al. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med* 2004; **200**:481–491.
70. Liu C, Ueno T, Kuse S, Saito F, Nitta T, Piali L et al. The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi. *Blood* 2005; **105**:31–39.
71. Zinkernagel RM, Althage A, Waterfield E, Kindred B, Welsh RM, Callahan G et al. Restriction specificities, alloreactivity, and allotolerance expressed by T cells from nude mice reconstituted with H-2-compatible or -incompatible thymus grafts. *J Exp Med* 1980; **151**:376–399.
72. Zerrahn J, Volkman A, Coles MC, Held W, Lemonnier FA, Raulet DH. 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* 1999; **96**:11470–11475.

73. Martinic MM, Rulicke T, Althage A, Odermatt B, Hochli M, Lamarre A et al. Efficient T cell repertoire selection in tetraparental chimeric mice independent of thymic epithelial MHC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**:1861–1866.
74. Urdahl KB, Sun JC, Bevan MJ. Positive selection of MHC class Ib restricted CD8⁺ T cells on hematopoietic cells. *Nat Immunol* 2002; **3**:772–779.
75. Matzinger P, Guerder S. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* 1989; **338**:74–76.
76. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2001; **2**:1032–1039.
77. Zuklys S, Balciunaite G, Agarwal A, Fasler-Kan E, Palmer E, Hollander GA. Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *J Immunol* 2000; **165**:1976–1983.
78. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins S, Turley SJ et al. Projection of an immunological self-shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002; **298**:1395–1401.
79. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 2003; **4**:350–354.

80. Villasenor J, Benoist C, Mathis D. AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. *Immunol Rev* 2005; **204**:156–164.
81. Naparstek Y, Holoshitz J, Eisenstein S, Reshef T, Rappaport S, Chemke J et al. Effector T lymphocyte line cells migrate to the thymus and persist there. *Nature* 1982; **300**:262–264.
82. Agus DB, Surh CD, Sprent J. Reentry of T cells to the adult thymus is restricted to activated T cells. *J Exp Med* 1991; **173**:1039–1046.
83. Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T, Jenkins MK. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 2001; **401**:101–105.
84. Stockinger B, Kassiotis G, Bourgeois C. Homeostasis and T cell regulation. *Curr Opin Immunol* 2004; **16**:775–779.
85. King C, Ilic A, Koelsch K, Sarvetnick N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* 2004; **117**:265–277.
86. Knoechel B, Lohr J, Kahn E, Abbas AK. Cutting Edge: The link between lymphocyte deficiency and autoimmunity: Roles of endogenous T and B lymphocytes in tolerance. *J Immunol* 2005; **175**:21–26.
87. Blais ME, Gérard G, Martinic MM, Roy-Proulx G, Zinkernagel RM, Perreault C. Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses? *Blood* 2004; **103**:3102–3110.

88. Seaman MS, Wang CR, Forman J. MHC class Ib-restricted CTL provide protection against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 2000; **165**:5192–5201.
89. Kerksiek KM, Busch DH, Pilip IM, Allen SE, Pamer EG. H2-M3-restricted T cells in bacterial infection: rapid primary but diminished memory responses. *J Exp Med* 1999; **190**:195–204.
90. Pérarnau B, Saron MF, San Martin BR, Bervas N, Ong H, Soloski MJ et al. Single *H2K^b*, *H2D^b* and double *H2K^bD^b* knockout mice: peripheral CD8⁺ T cell repertoire and anti-lymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses. *Eur J Immunol* 1999; **29**:1243–1252.
91. Arber C, BitMansour A, Sparer TE, Higgins JP, Mocarski ES, Weissman IL et al. Common lymphoid progenitors rapidly engraft and protect against lethal murine cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003; **102**:421–428.
92. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJD, Zajac AJ, Miller JD et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998; **8**:177–187.
93. Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Pluckthun A, Elliott T et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major

- histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med* 1998; **187**:1383–1393.
94. Biron CA. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol* 1997; **9**:24–34.
95. Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**:405–429.
96. Kerksiek KM, Ploss A, Leiner I, Busch DH, Pamer EG. H2-M3-restricted memory T cells: persistence and activation without expansion. *J Immunol* 2003; **170**:1862–1869.
97. Rossi FM, Corbel SY, Merzaban JS, Carlow DA, Gossens K, Duenas J et al. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol* 2005; **6**:626–634.
98. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative T cell selection. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**:139–176.
99. Laufer TM, Glimcher LH, Lo D. Using thymus anatomy to dissect T cell repertoire selection. *Semin Immunol* 1999; **11**(1):65–70.
100. Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 1999; **402**:255–262.
101. Stefanova I, Dorfman JR, Germain RN. Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* 2002; **420**:429–434.

102. Goldrath AW, Luckey CJ, Park R, Benoist C, Mathis D. The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:16885–16890.
103. Bourgeois C, Kassiotis G, Stockinger B. A major role for memory CD4 T cells in the control of lymphopenia-induced proliferation of naive CD4 T cells. *J Immunol* 2005; **174**:5316–5223.
104. Lemmel C, Weik S, Eberle U, Dengjel J, Kratt T, Becker HD et al. Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat Biotechnol* 2004; **22**:450–454.
105. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Muller M et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**:7922–7927.
106. 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.
107. Yucel R, Karsunky H, Klein-Hitpass L, Moroy T. The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit⁺ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *J Exp Med* 2003; **197**:831–844.

108. 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.
109. Barker N, Hurlstone A, Musisi H, Miles A, Bienz M, Clevers H. The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with β -catenin to promote target gene activation. *EMBO J* 2001; **20**:4935–4943.
110. Staal FJ, Clevers HC. Wnt signaling in the thymus. *Curr Opin Immunol* 2003; **15**:204–208.
111. 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.
112. Azoulay-Cayla A, Dethlefs S, Perarnau B, Larsson-Sciard EL, Lemonnier FA, Brahic M et al. H-2D^{b/-} mice are susceptible to persistent infection by Theiler's virus. *J Virol* 2000; **74**:5470–5476.
113. Das G, Sheridan S, Janeway CA, Jr. The source of early IFN- γ that plays a role in Th1 priming. *J Immunol* 2001; **167**:2004–2010.
114. Berg RE, Cordes CJ, Forman J. Contribution of CD8⁺ T cells to innate immunity: IFN- γ secretion induced by IL-12 and IL-18. *Eur J Immunol* 2002; **32**:2807–2816.

115. Pien GC, Nguyen KB, Malmgaard L, Satoskar AR, Biron CA. A unique mechanism for innate cytokine promotion of T cell responses to viral infections. *J Immunol* 2002; **169**:5827–5837.

Figure Legends

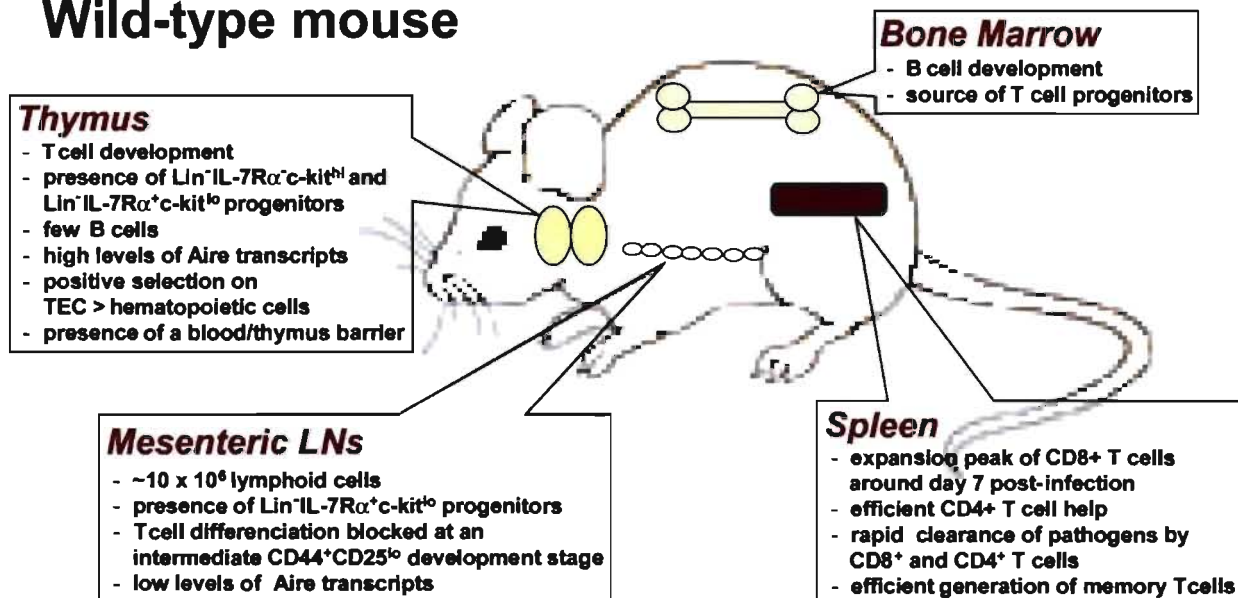
Figure 20: Important features of hemato-lymphoid organs in wt and OM-transgenic mice.

Figure 21: Expression of *Aire* regulated transcripts in thymic and LN stromal cells. **A)** Relative expression of *Aire* transcripts in stromal cells from the thymus and LNs (arbitrary units). Stromal cells were obtained as previously described (51,64). Following mRNA extraction and hybridization on Affymetrix murine MOE430A gene chips, data were normalized using the Robust Multichip Averaging method. Bars represent the mean \pm SD of three independent biological and experimental triplicates. **B)** Expression profile of *Aire* regulated transcripts. Data in red, from Anderson *et al.* (78), show the expression profile of 30 genes in thymic medullary epithelial cells (MEC) from wt and *Aire*-deficient mice. The MEC gene profile was derived from analyses using Affymetrix U74Av2 gene chips. We analyzed the expression of the same 30 genes in stromal cells from the thymus and LNs genes using Affymetrix murine MOE430A gene chips (data in blue which represent the mean of three independent experiments). The (-) symbol indicates that the relevant probe set was not present on the MOE430A gene chips.

Figure 22: Relative expansion kinetics of NK cells and $\alpha\beta$ T cell subsets. Schematic representation of the onset, amplitude and duration of expansion of NK cells (yellow), OM-induced extrathymic T cells (light blue), MHC Ib-restricted (dark blue) and MHC Ia-restricted (red) thymic T cells. Broken lines indicate that compared with thymic MHC Ia-restricted T cells, few data are available on the long-term persistence of thymic MHC Ib-restricted and extrathymic memory T cells. Based on references (87-89,92-96).

Figure 20 : Important features of hemato-lymphoid organs in wt and OM-transgenic mice.

Wild-type mouse



OM-transgenic mouse

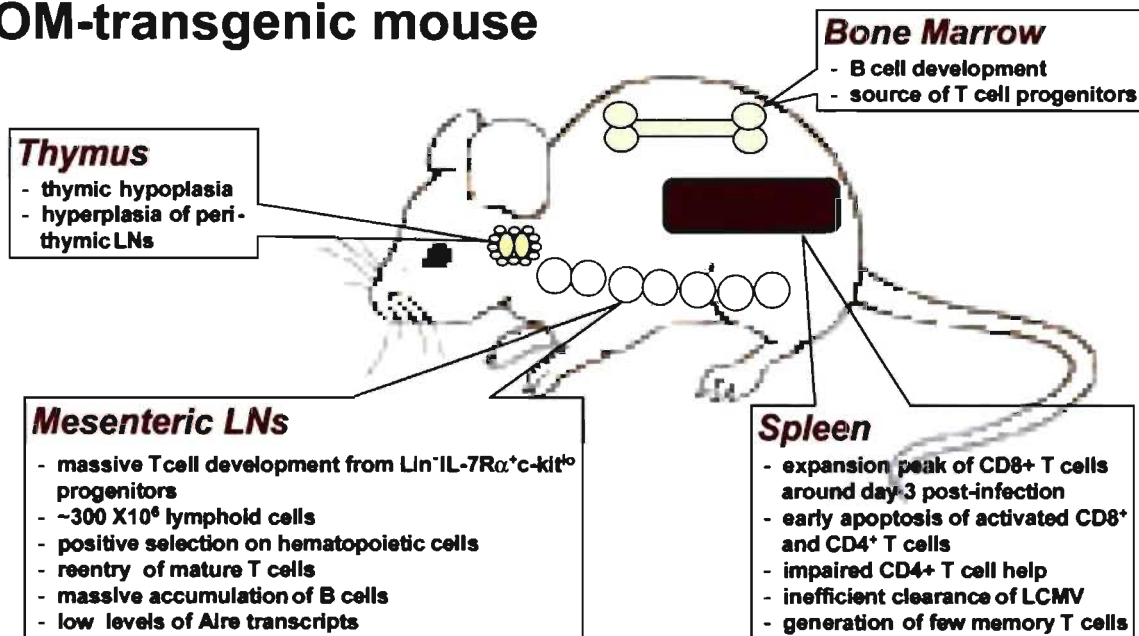


Figure 21: Expression of *Aire* and *Aire* regulated transcripts in thymic and LN stromal cells

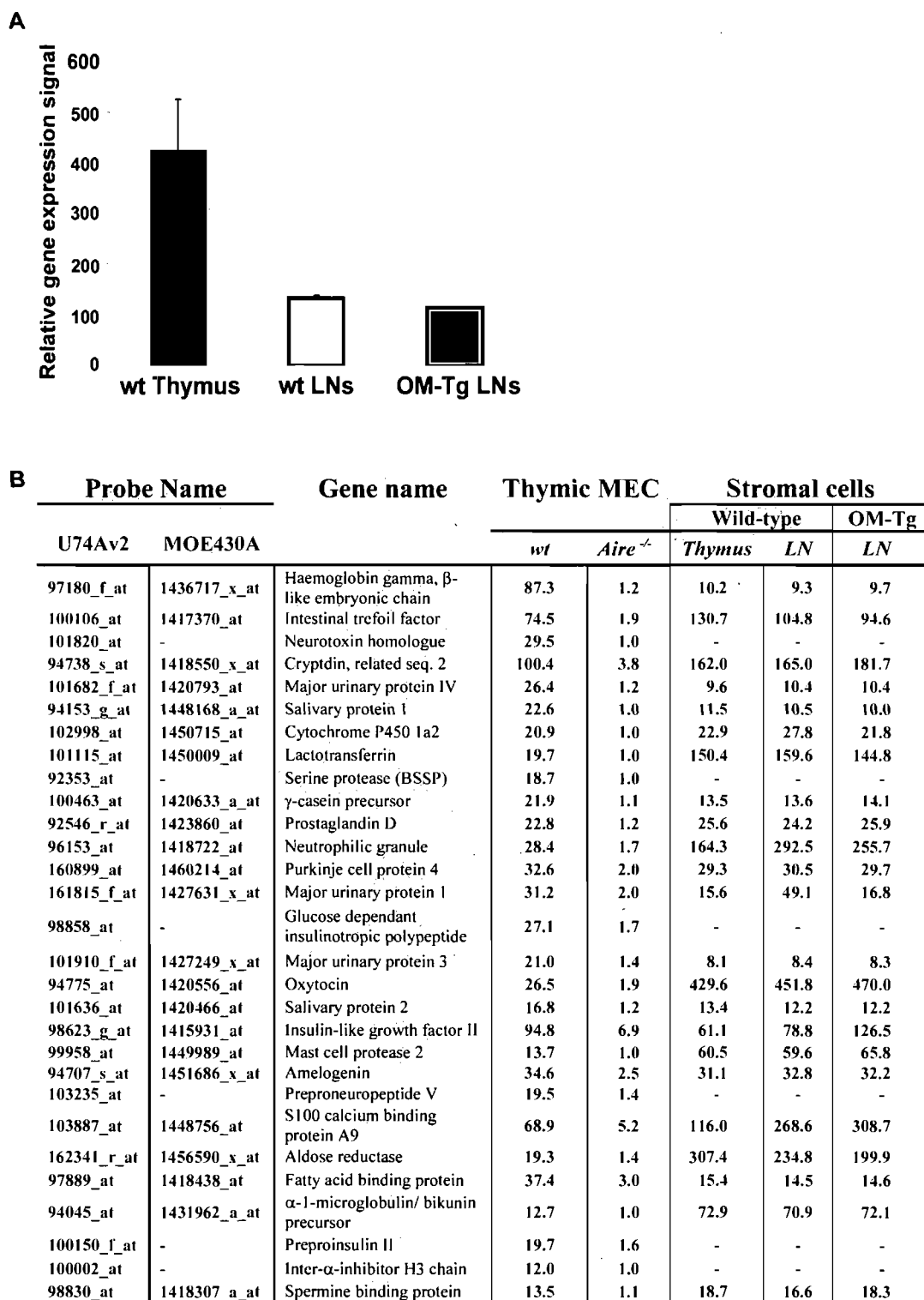
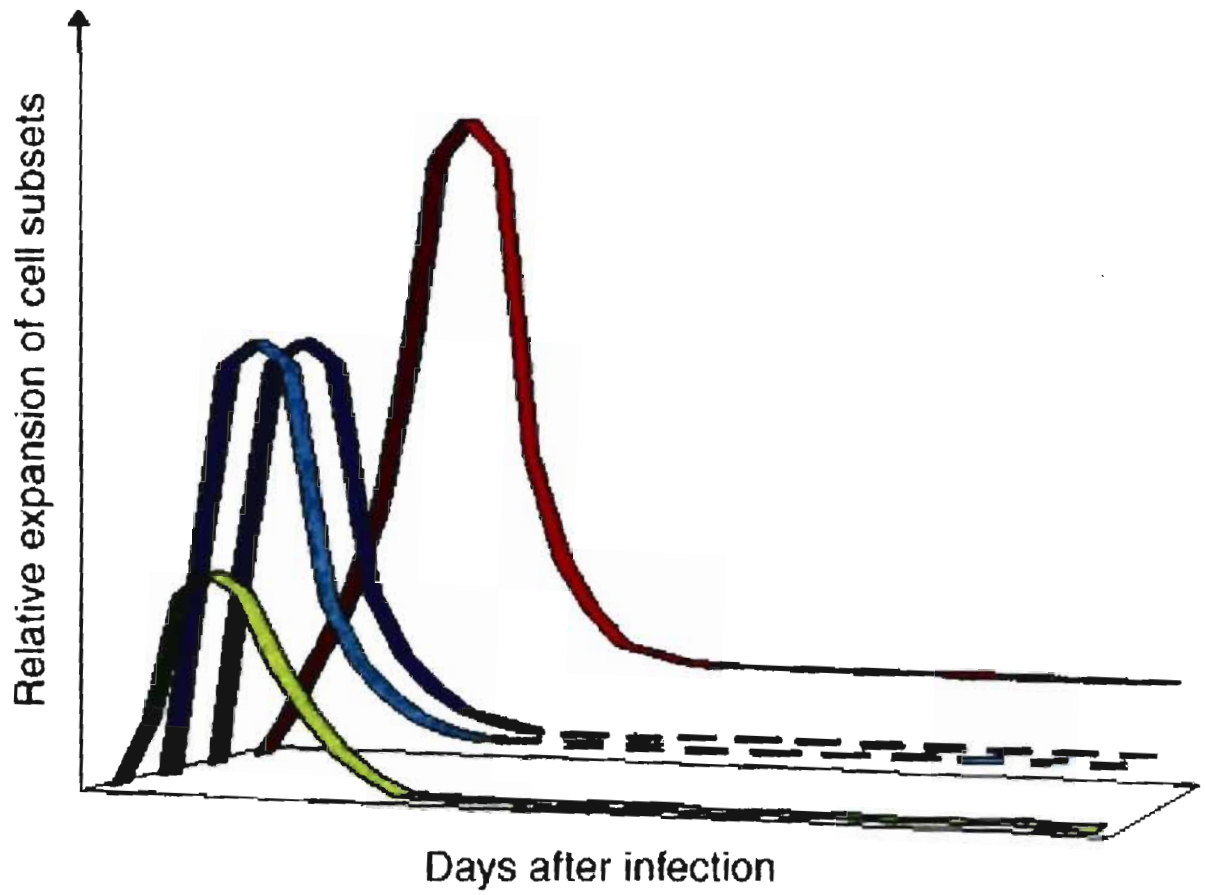


Figure 22 : Relative expansion kinetics of NK cells and $\alpha\beta$ T cell subsets



Figures supplémentaires

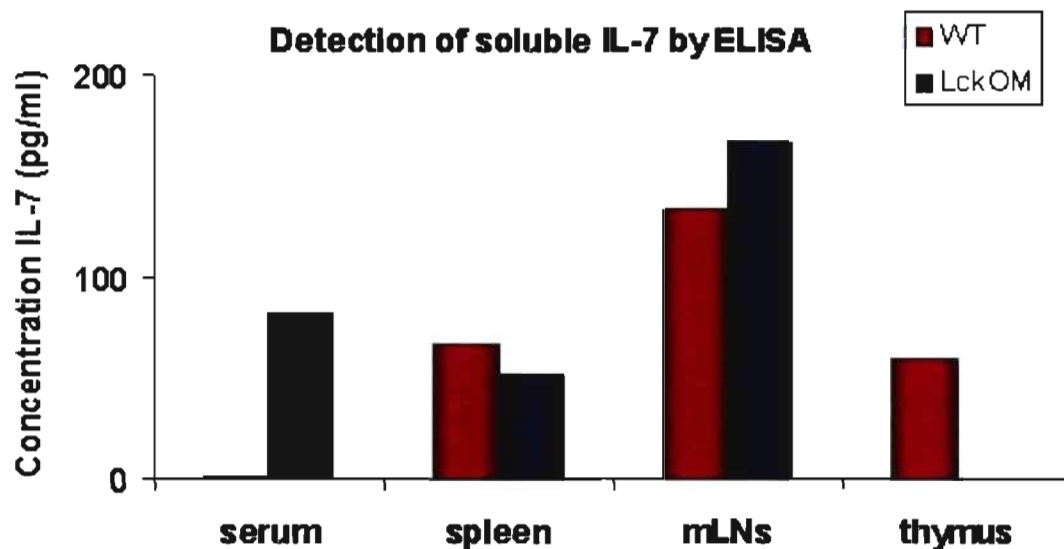
Figure 23

Figure 23: Détection des concentrations d'IL-7 à l'intérieur des organes lymphoïdes des souris LckOM et WT. Les surnageants de rates, ganglions mésentériques (mLNs) et thymus ainsi que les sera des souris LckOM et WT ont été recueillis et congelés. L'ÉLISA a ensuite été réalisé sur ces échantillons en duplicata. Deux souris par groupe.

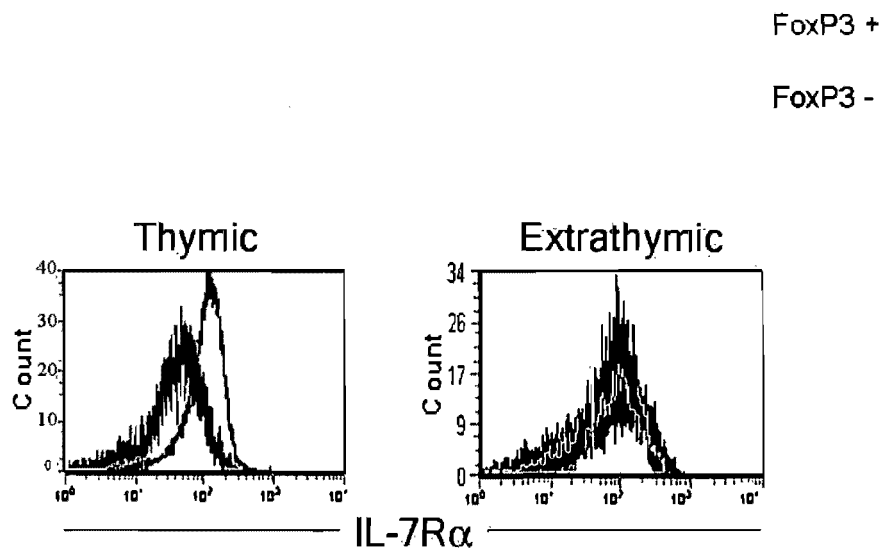
Figure 24

Figure 24: Expression de l'IL-7R α chez les cellules T CD4⁺ d'origine thymique et extrathymique selon l'expression de FoxP3. Les cellules de rates des souris LckOM et WT ont été recueillies et perméabilisées afin de permettre le marquage intracellulaire de FoxP3. Les cellules ont également été marquées afin de détecter l'expression de surface de CD4 et de l'IL-7R α . Trois souris par groupe.

DISCUSSION

Note : Par souci de simplicité, le terme lymphocyte/cellule T extrathymique fait référence aux lymphocytes T produits dans les ganglions de la souris LckOM. Le terme lymphocyte/cellule T thymique fait référence aux cellules T normalement produites par le thymus.

1. Efficacité des lymphocytes T extrathymiques dans un contexte d'infection virale.

The first, and I would argue the only, real purpose of adaptive immunity is the protection of the host from an initial infection [and] to provide lifelong protection against re-infection.

- CHARLES A. JANEWAY JR

Immunology and Cell Biology, 1999, 77 :177-179

Tel qu'illustré par cette citation de feu Charles Janeway Jr, le rôle fondamental des cellules T consiste à reconnaître et à éliminer les pathogènes de façon spécifique afin de pourvoir l'organisme d'une immunité à long terme. Nous avons entrepris de déterminer si les cellules T extrathymiques produites dans les ganglions de la souris LckOM étaient aptes à exercer cette fonction de façon similaire aux cellules T produites conventionnellement par le thymus. Les cellules T extrathymiques générées chez la souris LckOM sont dotées de plusieurs attributs suggérant qu'elles sont aptes à enrayer une infection virale. Par exemple, leur taux de prolifération rapide avant et après stimulation *in vitro* ainsi que l'expression des marqueurs d'activation leur confèrent un phénotype semblable à celui des T_H, lesquelles sont reconnues pour leur rapidité à répondre et à éliminer les pathogènes (Figure 3 et Table 1) (120). Une autre

propriété commune aux lymphocytes T extrathymiques et aux TM est leur capacité de production rapide et massive de cytokines telles que l'IFN- γ et l'IL-2, dont l'action est d'une importance cruciale dans l'activation et l'exécution des fonctions effectrices (Figures 4c et 14). De plus, les cellules T extrathymiques sont fonctionnelles lors d'une réponse anti-tumorale puisqu'elles permettent l'élimination d'un inoculum léthal de cellules de mélanome (117).

L'efficacité des cellules T dans un contexte infectieux dépend avant tout de leur capacité à reconnaître spécifiquement des peptides viraux. Il était donc pertinent d'évaluer cet aspect de la réponse immune adaptative dans notre étude de la fonction des lymphocytes T extrathymiques. Puisque des peptides de nature autre que virale sont également présentés lors d'une infection, nous avons établi un devis expérimental permettant de repérer les cellules T spécifiques à un peptide viral précis en cytométrie en flux (135). L'utilisation des tétramères de CMH couplés à un peptide viral naturellement reconnu par les lymphocytes T thymiques permet d'évaluer la spécificité et de quantifier l'amplitude de la réponse de clones spécifiques à un antigène donné. La stratégie choisie pour évaluer la fonctionnalité des lymphocytes T extrathymiques consistait à générer des chimères hématopoïétiques en injectant des cellules de foie foetal OM⁺ chez des souris RAG^{-/-} préalablement thymectomisées. Cette approche visait à exclure de l'étude toute cellule pouvant potentiellement provenir du rudiment thymique, théoriquement inactif, présent chez la souris LckOM. Les chimères ont été infectées par le LCMV, un virus non cytopathique causant la méningite chez la souris dont l'élimination dépend de l'action cytotoxique des cellules T CD8⁺ (136, 137). Plus de 50% des cellules T CD8⁺ dirigées contre le LCMV sont spécifiques à deux épitopes immunodominants : GP₃₃₋₄₁ et NP₃₉₆₋₄₀₄, (138). Nous avons utilisé les tétramères portant le peptide GP₃₃₋₄₁ afin de détecter les cellules T CD8⁺ spécifiques au LCMV. Le modèle d'infection au LCMV offrait également la possibilité d'évaluer l'efficacité des cellules CD4⁺ et des cellules B produites chez la souris LckOM puisque ces deux populations sont nécessaires au contrôle à long terme de l'infection. Finalement, nous avons utilisé un inoculum de 200 *plaque forming units* ; une faible dose normalement

bien contrôlée par les cellules T thymiques (139). Nous avons observé que les cellules T extrathymiques prolifèrent plus rapidement que les cellules T thymiques pendant l'infection au LCMV. Le pic de prolifération des cellules T extrathymiques en réponse au LCMV a été observé au jour 3 suivant l'infection, tandis que le pic de la réponse des cellules T thymiques n'a été observé qu'au jour 6 post-infection (Figure 5). La prolifération rapide *in vivo* des cellules T extrathymiques en réponse au LCMV concorde avec les études de stimulation *in vitro* montrant que le *burst size* (nombre de cellules filles par précurseur en division) des cellules T extrathymiques est supérieur à celui des cellules T thymiques (Figure 3). Ces études ont également révélé la production accélérée d'IL-2 et d'IFN- γ par les cellules T extrathymiques relativement aux cellules T thymiques (Figure 4c). Cette production rapide de cytokines corrèle avec la capacité proliférative accrue des cellules T extrathymiques. Ces propriétés généralement associées aux cellules TM, sont également retrouvées dans un type cellulaire particulier : les *cellules T innées*. Cette lignée de différenciation cellulaire décrite pour la première fois en 1999 regroupe plusieurs populations; les principales étant les cellules NKT, les cellules T CD8 $\alpha\alpha$ IEL et les CD8 $^+$ restreints au CMH de classe Ib non classique H2-M3 (140, 141). Les cellules T innées sont munies de fonctions effectrices avant même de rencontrer leur antigène spécifique, une caractéristique normalement retrouvée chez les cellules NK. L'acquisition des fonctions effectrices chez les cellules T innées résulte directement du processus de maturation dans le thymus plutôt que d'une activation en périphérie dans un contexte infectieux. Les cellules T innées possèdent un TCR $\alpha\beta$ et exercent plusieurs fonctions normalement associées aux TM dont 1) l'expression constitutive de marqueurs d'activation, 2) la synthèse de facteurs de transcription normalement induits suite à l'activation du TCR et 3) la capacité de produire rapidement de l'IFN- γ (140, 142-145). Les cellules T innées sont sélectionnées suite à une interaction avec les cellules hématopoïétiques thymiques (thymocytes) contrairement aux cellules T thymiques, lesquelles sont sélectionnées sur les TEC (146, 147). Seaman *et al* ont démontré que la réponse des cellules T CD8 $^+$ innées restreintes à H2-M3 face à un pathogène est accélérée comparativement aux cellules T classiques, ce nous avons également observé chez la souris LckOM (144). Malgré une prolifération et une

production d'IFN- γ rapides, les cellules T CD8⁺ restreintes à H2-M3 sont incapables de contrôler la réplication du LCMV, ce qui s'applique également aux cellules T extrathymiques. Cependant, les cellules T CD8⁺ restreintes à H2-M3 sont efficaces contre *Listeria Monocytogenes*, une cible plus sensible à l'IFN- γ que le LCMV (144). Ces observations suggèrent que les lymphocytes T extrathymiques font également partie de la lignée de cellules T innées. La sélection positive sur les cellules hématopoïétiques des ganglions est donc responsable du phénotype et des fonctions des cellules T extrathymiques.

Des études récentes ont démontré que le développement des cellules T innées dans le thymus est indépendant de deux TEC kinases normalement indispensables au développement des cellules T classiques (148-150). En absence de ITK (interleukine-2-inducible T-cell kinase) et de RLK (resting lymphocyte kinase aussi appelée TXK), toutes les cellules T CD8⁺ produites par le thymus possèdent le phénotype propre aux cellules T innées, i.e. phénotype mémoire, tandis que les cellules T CD8⁺ conventionnelles sont absentes. Ceci indique que la sélection des cellules T sur les cellules hématopoïétiques 1) implique des mécanismes moléculaires différents de ceux impliqués dans la sélection classique des cellules T sur les TEC et que 2) le développement des cellules T à l'extérieur du thymus génère par défaut des cellules T innées puisqu'il survient en absence des TEC, donc de ITK et RLK. Les lymphocytes T extrathymiques produits dans les ganglions des souris LckOM et *nude* en sont deux exemples convaincants (112, 123). De plus, Horai *et al* ont montré que lorsque les progéniteurs *Itk*^{-/-} étaient contraints à être sélectionnés sur les TEC plutôt que sur les cellules hématopoïétiques, le développement des cellules T CD8⁺ innées était complètement inhibé (151). Ceci indique que le phénotype des cellules T CD8⁺ innées est acquis lors de la sélection positive par les cellules hématopoïétiques. La production de cellules T innées est dépendante de la présence de SAP, un adaptateur associé aux récepteurs SLAM, lequel n'est pas nécessaire à la maturation des cellules T classiques. Les SLAM sont exprimés par les cellules hématopoïétiques, mais sont absents des TEC (140, 151). Il serait pertinent de vérifier l'expression de SAP à l'intérieur des ganglions de souris LckOM afin de déterminer si le développement des

cellules T extrathymiques est comparable à celui des cellules T innées dans le thymus. En somme, les signaux indispensables au développement des cellules T par les TEC ne sont pas nécessaires à la génération des cellules T innées par les cellules hématopoïétiques et vice versa. Ceci indique que ces deux voies de différenciation des cellules T sont distinctes et régulées indépendamment.

Lorsque la sélection positive est effectuée par les cellules hématopoïétiques, ce sont spécifiquement les thymocytes qui exercent cette fonction à l'intérieur du thymus. Chez la souris, les thymocytes expriment de faibles niveaux de CMH II comparativement aux autres cellules hématopoïétiques (152). Les niveaux d'expression des CMH I par les thymocytes sont plus importants que ceux des CMH II, ce qui explique que la majorité des cellules T innées appartiennent à la lignée CD8⁺. La présence de cellules T CD4⁺ chez la souris LckOM suggère que ces cellules ont été sélectionnées sur les cellules hématopoïétiques à l'intérieur des ganglions. Dans ce contexte, les cellules T sont possiblement sélectionnées par les APC dans les ganglions, lesquelles sont reconnues pour exprimer de hauts niveaux de CMH I et CMH II (153, 154). L'expression des CMH II par les APC des ganglions de la souris LckOM est donc vraisemblablement supérieure à celle des thymocytes. Nous n'avons pas de preuve directe que les cellules hématopoïétiques sélectionnent positivement les cellules T CD4⁺ extrathymiques. Toutefois, ce processus survient naturellement dans le thymus chez l'humain et est également induit chez la souris suite à une augmentation de l'expression des CMH II (125, 153, 155).

Pendant l'infection au LCMV, l'accumulation rapide des cellules T extrathymiques dans les ganglions et la rate ne suffit pas à tenir le virus en échec pendant plus de 15 jours. La recrudescence du titre viral observé entre les jours 15 et 30 de l'infection au LCMV chez la souris LckOM, est causée par l'apoptose précoce des cellules T CD8⁺ extrathymiques spécifiques au virus (Figure 6). L'essoufflement de la réponse des cellules T extrathymiques au cours de la phase tardive de l'infection a été observé dans deux autres contextes :

1) *in vivo*, face à des cellules dendritiques présentant le peptide GP₃₃₋₄₁ où l'accumulation et le pourcentage de lyse spécifique des cellules T CD8⁺ extrathymiques spécifiques au peptide sont inférieurs aux cellules T thymiques.

2) pendant l'infection au LCMV et au VSV alors que les cellules T CD4⁺ extrathymiques sont incapables de stimuler la production d'IgG par les cellules B (Figures 7 et 9).

Ces résultats soulèvent la question suivante : l'architecture perturbée des ganglions sous l'effet d'une sur-expression de l'OM entrave-t-elle le processus d'activation des cellules T? Des études antérieures ont démontré que l'élaboration de la réponse immune était empêchée en absence des ganglions ou lorsque l'architecture de cet organe était perturbée malgré la présence de cellules T fonctionnelles (156-158). Chez la souris LckOM, les cellules DP immatures sont réparties uniformément à l'intérieur des ganglions, ce qui peu entraver la formation de centres germinatifs. Afin de vérifier si l'architecture particulière des ganglions de la souris LckOM nuisait à la génération de la réponse immune, nous avons transféré des cellules T extrathymiques dans un environnement où le développement des organes n'avait pas été préalablement façonné par une sur-expression d'OM. Nous avons démontré que suite à un transfert chez une souris RAG^{-/-}, la capacité des cellules T extrathymiques à éliminer le LCMV était toujours inférieure à celle des cellules T thymiques subissant le même traitement (Figure 8). Nous avons conclu que l'incapacité des cellules T extrathymiques à contrôler l'infection au LCMV est due à un défaut intrinsèque des cellules et non à une malformation architecturale des ganglions.

Le talon d'Achille des cellules T extrathymiques est leur apoptose précoce pendant l'infection au LCMV. Nous avons démontré que l'apoptose des cellules T CD8⁺ spécifiques au LCMV survenait plus rapidement chez les cellules T d'origine extrathymique que chez les cellules d'origine thymique (Figure 4). En effet, nous avons observé la disparition des cellules T CD8⁺ extrathymiques spécifiques au LCMV à partir du jour 6 post-infection, tandis que les cellules T thymiques étaient encore abondantes au jour 9 post-infection (Figures 5 et 6). Ceci suggère que

l'apoptose des cellules T extrathymiques est causée par une accélération de la phase de contraction de la réponse. De plus, nous avons constaté que contrairement aux cellules T thymiques, les cellules T extrathymiques étaient susceptibles à l'apoptose avant l'infection au LCMV (Figures 5 et 10c). Nous avons émis l'hypothèse que l'apoptose précoce des cellules T extrathymiques au cours de l'infection était le résultat d'une prédisposition à la mort cellulaire amplifiée par le contexte infectieux. Nous avons donc entrepris de déterminer pourquoi les cellules T extrathymiques étaient spontanément susceptibles à l'apoptose et comment l'origine des cellules T influence la fonction et la survie cellulaires.

2. Mécanismes d'apoptose spontanée des lymphocytes T extrathymiques.

Les lymphocytes T extrathymiques et les cellules T innées possèdent de nombreux attributs normalement retrouvés chez les cellules TM sans toutefois avoir préalablement rencontré leur antigène spécifique. Ceci est également observé dans un contexte de prolifération homéostatique (PH) au cours duquel les cellules T d'origine thymique acquièrent certains marqueurs et fonctions normalement associés aux TM. Nous avons émis l'hypothèse que 1) les lymphocytes T extrathymiques produits chez la souris LckOM sont en situation de PH de façon continue et que 2) ceci est la cause de leur susceptibilité à l'apoptose. En effet, la dilution des TRECs chez les cellules T extrathymiques matures, leur phénotype mémoire ainsi que leur capacité proliférative élevée dans un contexte non-infectieux confirment qu'elles sont en PH (Figure 10b et c) (159). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer pourquoi les cellules T extrathymiques sont d'emblée en PH. L'hypothèse la plus plausible réside dans la double fonction d'organe primaire et secondaire qu'exercent les ganglions chez la souris LckOM. Le thymus étant physiquement séparé de la périphérie, les cellules T matures n'y retournent pas suite à leur exportation (85). De plus, lors du développement thymique les cellules T immatures sont exposées à des peptides générés par le thymoprotéasome dont l'expression est exclusive au thymus (97). Il est probable que les peptides thymiques et périphériques ne soient pas complètement identiques, faisant en sorte que les cellules T conventionnelles ne soient pas

nouvellement exposées aux peptides rencontrés lors de leur sélection. Par contre chez la souris LckOM, les cellules T matures re-circulent constamment dans les ganglions et sont régulièrement ré-exposées aux complexes CMH + peptides sur lesquels elles ont été sélectionnées. La stimulation continue des cellules T sur les peptides du soi constitue un des éléments déclencheurs de la PH dans un contexte de lymphopénie et entraîne également l'activation de certains clones (160). En accord avec ceci, la co-stimulation n'est pas nécessaire à la PH des cellules T puisqu'elle est possible dans des contextes où CD28, CD40 ou 4-1BBL ne sont pas exprimés (161). Comme pour les cellules T en PH, la co-stimulation via CD28 des cellules T extrathymiques n'est pas nécessaire à leur prolifération *in vitro* (Figure 3). Ceci suggère que la PH des cellules T extrathymiques est une conséquence de leur activation suite à leur stimulation par les peptides du soi.

Nous avons donc entrepris de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apoptose des lymphocytes T extrathymiques. Pour ce faire, nous avons tout d'abord quantifié les niveaux d'apoptose des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ d'origine extrathymique que nous avons ensuite comparés à ceux des cellules T thymiques. Il est important de préciser que nous n'avons pas généré de chimères hématopoïétiques dans la réalisation de cette étude. Les résultats discutés dans cette section ont été obtenus à partir de cellules spléniques fraîchement prélevées chez des souris LckOM puisque l'utilisation de chimères hématopoïétiques aurait pu introduire un biais en activant certaines voies apoptotiques. Nous avons analysé les cellules T selon l'expression de CD44 parce que la totalité des cellules T extrathymiques expriment fortement ce marqueur (CD44^{high}), tandis que la majorité des cellules T thymiques expriment faiblement CD44 (CD44^{low}) (Figure 11a). De plus, nous avons considéré les cellules T thymiques CD44^{low} comme cellules contrôles dans le cadre de cette étude puisqu'elles représentent la grande majorité des cellules T périphériques et qu'elles possèdent un phénotype naïf (CD4⁺CD44^{low}CD62L^{high} et CD8⁺CD44^{low}CD62L^{high}CD122⁻).

Nous avons observé que les niveaux d'apoptose des cellules T CD44^{high} thymiques étaient similaires à ceux observés chez les cellules T extrathymiques (Figure 11b). Nous avons donc conclu que ces deux populations possédaient une plus grande susceptibilité à l'apoptose comparativement aux cellules T thymiques CD44^{low}. L'apoptose accrue des cellules T CD44^{high} relativement aux cellules T CD44^{low} avait préalablement été mentionnée par McNally *et al* (162). À la lumière de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que l'apoptose spontanée était une caractéristique intrinsèque des cellules T CD44^{high}, qu'elles soient d'origine thymique ou extrathymique. La petite proportion de cellules T thymiques CD44^{high} retrouvée chez une souris WT résulte soit 1) des T_M générés lors de réponses immunes antérieures ou 2) des cellules T produites lors de la PH survenant chez le nouveau-né (57, 163). Puisque les cellules T extrathymiques semblent être en constante PH, nous avons comparé leur profil apoptotique à celui de cellules T thymiques en PH. Nous avons donc induit la PH en injectant 1×10^6 cellules T thymiques chez des receveuses dépourvues de cellules T (TCR- β -KO) pour ensuite quantifier la proportion de cellules T apoptotiques dans ce contexte. Des études antérieures avaient déjà déterminé que l'apoptose des cellules T_N augmentait suite à l'induction de la PH (2, 35). Nous avons remarqué que les proportions de cellules T apoptotiques était aussi élevées en contexte de PH que chez les cellules T thymiques CD44^{high} (provenant de souris WT) ainsi que chez les cellules T extrathymiques (Figure 11b). Les similitudes suivantes ont également été relevées chez ces trois types de populations selon leur appartenance à la lignée CD4⁺ ou CD8⁺ au niveau moléculaire. Nous avons observé que l'expression de IL-7R α et de Bcl-2 était inférieure chez les cellules T CD4⁺ des trois populations CD44^{high} comparativement aux cellules T thymiques CD44^{low} (Figure 11c et d). Par contre, au niveau de la lignée T CD8⁺, une augmentation importante de l'expression de Fas et de Fas-L a été détectée chez les cellules T d'origine extrathymique relativement aux cellules T thymiques CD44^{low} (Figure 11f). Cependant, cette augmentation de l'expression du couple Fas/Fas-L n'a pas été observée chez les cellules T CD8⁺ thymiques CD44^{high} et les cellules T CD8⁺ en PH. En somme, nous avons établi que la susceptibilité accrue à l'apoptose des cellules T extrathymiques est une conséquence de leur PH continue. Afin d'éliminer un rôle

direct ou indirect de l'OM sur l'apoptose des cellules T extrathymiques, nous avons quantifié l'apoptose des cellules T retrouvées chez la souris *nude*. La réalisation de cette étude constituait un défi de taille à cause de la faible quantité de cellules T présentes dans ce modèle. Nous avons établi que les niveaux d'apoptose et l'expression de molécules charnières régulant les deux grandes voies apoptotiques étaient similaires entre les cellules T extrathymiques générées en absence (souris *nude*) ou en présence d'OM, excluant ainsi un effet de cette cytokine sur le phénotype observé (Figure 12). En somme, nous avons conclu à la lumière de ces résultats que le 'profil apoptotique' et la survie des cellules T CD44^{high} étaient similaires et ce, indépendamment de leur origine et distinctement des cellules T CD44^{low}.

Conjointement à cela, deux cytokines susceptibles d'induire l'apoptose des cellules T extrathymiques ont été étudiées : l'IFN- γ et l'IL-2. Nous avons préalablement démontré que les cellules T extrathymiques sécrétaient ces cytokines plus rapidement que les cellules T thymiques suite à une stimulation *in vitro*. Puisque l'IL-2 et l'IFN- γ peuvent induire l'apoptose des cellules T dans différents contextes, nous étions intéressés à vérifier si ces cytokines étaient également produites constitutivement chez la souris LckOM (24, 46, 48, 61, 68, 73, 76, 162, 164). Nous avons constaté que, en absence de stimulation, les cellules T extrathymiques retrouvées chez la souris LckOM produisent d'emblée de fortes quantités d'IFN- γ et d'IL-2 (Figure 14a). La production d'IFN- γ étant majoritairement assurée par les cellules T CD8⁺ extrathymiques tandis que les cellules T CD4⁺ constituent la principale source d'IL-2. Ces cytokines sont également produites par les cellules T thymiques CD44^{high} ainsi que par les cellules T en PH contrairement aux cellules T thymiques CD44^{low} (Figure 14b). Nous avons constaté que l'IFN- γ et l'IL-2 sécrétées par les cellules T extrathymiques s'accumulent significativement dans le sérum et la rate des souris LckOM (Figure 14c). Nous avons donc entrepris de démontrer l'impact de cette accumulation sur l'expression de molécules régulant la survie des cellules T extrathymiques.

Tel que décrit précédemment, les cellules T CD4⁺ extrathymiques expriment de faibles niveaux d'IL-7R α et de Bcl-2 comparativement aux cellules T thymiques CD44^{low}. Généralement, la disponibilité en IL-7 détermine les nombres de T_M CD4⁺, tandis que l'expression de l'IL-7R α contrôle la synthèse de Bcl-2 (28). En vertu de cela, nous avons émis l'hypothèse que la faible expression de l'IL-7R α était responsable de l'apoptose des cellules T CD4⁺ extrathymiques (28, 165). Afin de démontrer cela, nous avons évalué la relation entre l'expression de l'IL-7R α et le niveau d'apoptose des cellules T CD4⁺ extrathymiques. Nous avons observé que plus de 80% des cellules T CD4⁺ extrathymiques apoptotiques exprimaient faiblement l'IL-7R α . La quantité d'IL-7 soluble est normalement augmentée dans un contexte de PH puisque l'assimilation de la cytokine est ralentie par le faible nombre de cellules T périphérique présentes (lymphopénie) (166, 167). Les souris LckOM ne sont pas lymphopéniques puisqu'elles possèdent le même nombre de cellules T périphériques que des souris WT. Néanmoins, nous avons détecté à deux reprises par ELISA, une plus forte concentration d'IL-7 dans les sera de souris LckOM lors d'une étude préliminaire (Figure 23). Nous croyons que de façon analogue à un contexte de PH, la grande quantité d'IL-7 soluble chez la souris LckOM est due à une assimilation moindre de l'IL-7 par les cellules T CD4⁺ extrathymiques exprimant de faibles niveaux de l'IL-7R α . Park *et al* ont démontré que suite à une incubation de 16 heures en présence de sérum et en absence de stimulation, l'expression de l'IL-7R α par les cellules T est augmentée significativement (38). L'IL-7 ainsi que d'autres cytokines de la famille γ répriment la transcription de l'IL-7R α *in vivo*. Cette inhibition est levée *in vitro* lorsque les cellules ne sont plus exposées à ces cytokines. Nous nous sommes inspirés de cette étude afin de déterminer si la faible expression de l'IL-7R α chez les cellules T CD4⁺ extrathymiques était causée par 1) une répression réversible de l'IL-7R α et 2) une cytokine de la famille γ . Nous avons donc transféré des cellules T CD4⁺ extrathymiques, préalablement isolées par cytométrie en flux, chez des souris WT et vice versa (WT dans LckOM). Notre raisonnement est basé sur la prémisse suivante : les concentrations de deux cytokines de la famille γ , l'IL-2 et l'IL-7, sous forme soluble sont plus élevées chez la souris LckOM que chez des

souris WT. En admettant que ces cytokines répriment l'expression de l'IL-7R α chez les cellules T CD4⁺ extrathymiques, l'expression de l'IL-7R α devrait augmenter dans un environnement où les concentrations de ces cytokines sont moindres (souris WT). Nous avons effectivement obtenu ce résultat : l'expression de l'IL-7R α chez les cellules T CD4⁺ extrathymiques est augmentée de 105% suite au transfert chez une souris WT (Figure 13). À l'opposé, les cellules T CD4⁺ conventionnelles d'origine thymique transférées chez des souris LckOM, ont subi une diminution de 64% de l'expression de l'IL-7R α . De plus, suite au transfert des cellules T CD4⁺ extrathymiques chez une souris WT, nous avons observé une augmentation de la proportion de cellules T CD4⁺ exprimant Bcl-2 ainsi qu'une augmentation des nombres de cellules récupérées indiquant une amélioration de la survie des cellules T extrathymiques (Figure 13d). Ces résultats montrent que 1) la répression de l'IL-7R α *in vivo* chez les cellules T CD4⁺ extrathymiques est réversible et 2) qu'elle est induite par un facteur soluble présent chez la souris LckOM.

Nous n'avons pas identifié la ou les cytokine(s) responsable(s) de la répression de l'IL-7R α chez les cellules T CD4⁺ extrathymiques. Nous croyons que l'IL-2 est à l'origine de ce processus puisqu'elle 1) est produite abondamment par les cellules T CD4⁺ extrathymiques, 2) s'accumule dans la rate des souris LckOM et 3) peut réprimer la transcription de l'IL-7R α (38, 41). Il est difficile d'établir des devis expérimentaux permettant d'étudier le rôle de l'IL-2 puisque l'homéostasie des cellules T est dramatiquement perturbée en absence de cette cytokine (44). Le syndrome auto-immun sévère survenant chez les souris IL-2^{-/-} et CD25^{-/-} ne permet pas de générer des souris LckOM X IL-2^{-/-}. Nous avons tenté sans succès d'évaluer le rôle de l'IL-2 dans l'apoptose des cellules pendant la PH en co-injectant des cellules T CD25^{-/-} et WT chez des souris TCR β -KO : les quantités de cellules récupérées suite au transfert étaient insuffisantes pour fins d'analyses. Le rôle joué par l'IL-2 dans l'apoptose des cellules T CD4⁺ pourrait être évalué en comparant la survie des cellules T WT suite à leur transfert chez une souris LckOM chez laquelle l'IL-2 aurait préalablement été neutralisée à l'aide d'un anticorps. La survie ainsi que les nombres de cellules T CD4⁺ récupérées chez les receveuses neutralisées devraient

être supérieurs à ceux des cellules transférées chez les receveuses contrôles (sans neutralisation). Une approche différente consisterait à déduire l'implication de l'IL-2 dans l'apoptose des cellules T CD4⁺ extrathymiques en détectant la protéine pro-apoptotique Bim. L'activation de Bim est nécessaire à l'apoptose intrinsèque induite par l'IL-2 et est également impliquée spécifiquement dans l'apoptose des cellules T CD4⁺ IL-7R α ^{low} (49, 63). La présence d'une forme activée de Bim chez les cellules T CD4⁺ extrathymiques ne permettrait toutefois pas à elle seule de prouver que l'IL-2 est responsable de l'apoptose de ces cellules.

Nous avons constaté que les cellules T extrathymiques produisent davantage d'IFN- γ que d'IL-2 (Figure 14). Nous soupçonnions que l'accumulation d'IFN- γ chez les souris LckOM aurait un impact sur l'homéostasie des cellules T extrathymiques. Suite à la réception d'un signal par l'IFN- γ , les cellules deviennent progressivement insensibles à la cytokine en diminuant l'expression de la chaîne 2 du récepteur de l'IFN- γ (IFN- γ R2) (65, 168). La répression de la transcription de l'IFN- γ R2 empêche la phosphorylation de STAT1 et désensibilise ainsi les cellules à l'action de l'IFN- γ (65). Certains auteurs ont suggéré que la transcription de l'IFN- γ R2 serait inhibée par l'action autocrine de l'IFN- γ puisque les cellules les plus affectées produisent la cytokine (169). Nous avons observé une répression de la transcription de l'IFN- γ R2 chez les cellules T extrathymiques, les cellules T thymiques CD44^{high} et chez les cellules T CD4⁺ en PH (Figure 14d). Cette faible production de transcrits de l'IFN- γ R2 chez les cellules T extrathymiques, les cellules T thymiques CD44^{high} et les cellules T CD4⁺ en PH indique que ces cellules ont reçu un signal provenant de l'IFN- γ subséquent acheminé via son récepteur. Ce résultat concorde avec des études ayant démontré que les cellules T possédant un phénotype mémoire expriment des niveaux plus bas IFN- γ R2 comparativement aux cellules T possédant un phénotype naïf (65). Les cellules T CD8⁺ en HP constituent la seule population chez laquelle nous n'avons pas observé de diminution des transcrits de l'IFN- γ R2 (Figure 14d). La désensibilisation des cellules T à l'IFN- γ est un événement temporaire survenant très rapidement après l'activation. En effet, à la fin

de la réponse, la transcription de l'IFN- γ R2 est rétablie à des niveaux comparables à ceux de cellules n'ayant pas été stimulées par l'IFN- γ (65). Nous avons étudié les cellules T en PH au cours du quinzième jour suivant l'injection des cellules. Il est probable que la transcription de l'IFN- γ R2 soit rétablie à des niveaux de base chez les cellules T CD8⁺ au moment où nous avons analysé les souris (170). Nous avons tout de même observé une répression de la transcription de l'IFN- γ R2 chez les cellules T CD4⁺ en HP (Figure 14d). Les cellules T CD4⁺ entament le processus de PH et se divisent plus lentement que les cellules T CD8⁺ (171, 172). Nous croyons que la reprise de la transcription de l'IFN- γ R2 survient plus rapidement chez les cellules T CD8⁺ que chez les cellules T CD4⁺, ce qui expliquerait l'expression supérieure des transcrits de l'IFN- γ R2 chez les cellules T CD8⁺.

Afin d'évaluer davantage l'impact de l'accumulation sérique d'IFN- γ sur l'apoptose des cellules T extrathymiques, nous avons évalué la survie de ces cellules produites en absence d'IFN- γ . Pour ce faire, nous avons croisé des souris LckOM avec des souris *Ifng*^{-/-} afin de générer des cellules T extrathymiques incapables de produire de l'IFN- γ . Les résultats sont clairs : la sur-expression des transcrits de Fas-L préalablement observée chez les cellules T CD8⁺ extrathymiques est abolie en absence d'IFN- γ (Figure 15c). Ceci se traduit par une survie accrue des cellules T CD8⁺ provenant de souris LckOM X *Ifng*^{-/-}; la survie des cellules T CD4 n'est cependant pas affectée par la présence ou l'absence d'IFN- γ (Figure 15). Ce résultat montre que l'apoptose des cellules T CD8⁺ extrathymiques corrèle en partie avec une augmentation de la transcription de Fas-L. Ceci suggère que la voie apoptotique extrinsèque est activée chez les cellules T CD8⁺ extrathymiques. Nous avons ensuite réalisé une étude similaire à partir de cellules T en PH en co-injectant des cellules T WT (CD45.1⁺) et des cellules IFN- γ R-KO (CD45.2⁺) chez receveuses TCR β -KO (Figure 16a). Nous avons observé une augmentation de la survie des cellules T en PH dans un contexte où les cellules étaient insensibles à l'IFN- γ . Tel qu'observé chez les cellules T extrathymiques, l'effet de l'IFN- γ sur les cellules T en PH est restreint aux cellules T de la lignée CD8⁺ ; les cellules T CD4⁺ n'étant pas affectées (Figures 15 et

16). Nous n'avons pas réussi à amplifier les transcrits de Fas-L chez les cellules T en PH malgré deux tentatives réalisées à partir d'échantillons différents. Néanmoins, Fortner *et al* ont clairement démontré, à l'aide de souris *lpr* et *gld* n'exprimant pas Fas et Fas-L respectivement, que l'interaction entre les deux molécules était responsable de l'apoptose des cellules T CD8 en PH (173). Pour cette raison, nous postulons que cette voie était activée dans cette étude bien que nous n'ayons pas observé d'augmentation de l'expression de Fas chez les cellules T CD8⁺ en PH. Nous avons toutefois observé une survie supérieure des cellules T CD8⁺ IFN- γ R-KO comparativement aux cellules T WT pendant la PH (Figure 16). Ceci corrèle avec une expression supérieure de IL-7R α et de Bcl-2 et une expression moindre de Fas comparativement aux cellules WT (recevant le signal de l'IFN- γ). Ces résultats montrent que l'IFN- γ stimule l'apoptose des cellules T extrathymiques et des cellules T en PH et que ce phénomène est restreint aux cellules de la lignée CD8⁺. L'accumulation d'IFN- γ limite donc la croissance des cellules T extrathymiques et des cellules T en PH; elles-mêmes productrices de la cytokine. Certains auteurs ont déjà suggéré qu'un tel mécanisme aurait pour but de limiter la prolifération des cellules T activées chroniquement afin de prévenir l'activation d'une réponse auto-immune (169). Il est reconnu que le maintien de nombres élevés de cellules TE pendant une période prolongée est propice à l'élaboration de réactions auto-immunes (62). L'IFN- γ produit par les cellules T CD8⁺ extrathymiques ainsi que les cellules en PH stimulerait l'apoptose des cellules T activées produisant la cytokine afin de prévenir la génération de clones auto-réactifs (174).

Les Treg sont d'importants médiateurs de la tolérance dont la fonction suppressive est dépendante de l'expression du facteur de transcription FoxP3 (104). Afin d'évaluer si l'homéostasie des Treg était perturbée suite au développement extrathymique ou lors de la PH, nous avons évalué les proportions de cellules possédant le phénotype typique des Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) dans ces deux contextes. Nous avons observé une augmentation de la proportion de Treg parmi les cellules T CD4⁺ extrathymiques ainsi que chez les cellules en PH comparativement aux cellules T thymiques CD44^{low} (Figure 17a et b). Ceci est illustré par une

augmentation de la proportion de cellules T CD4⁺ exprimant FoxP3 dans les deux contextes à l'étude (Figure 17c et d). L'augmentation de la proportion de Treg pendant la PH a déjà été rapportée, mais il s'agit de la première observation de ce genre en ce qui concerne les cellules T extrathymiques (175, 176). De plus, nous avons également observé une expression de FoxP3 chez les cellules T CD4⁺ n'exprimant pas CD25 et ce, chez près de 20% de cellules T CD4⁺ extrathymiques et plus de 10% de cellules T CD4⁺ en PH (Figure 17c et d). Ce résultat était inattendu puisque l'expression de FoxP3 est normalement exclusive aux cellules T CD4⁺CD25⁺, alors que seulement 2% des cellules T CD4⁺CD25⁻ expriment ce facteur de transcription (Figure 17) (177). Nous avons ensuite évalué le rôle de l'IFN- γ dans l'augmentation de la proportion des cellules T CD4⁺CD25⁺ et l'expression accrue de FoxP3 chez les cellules T CD4⁺CD25⁻ pendant la PH. Pour ce faire, nous avons quantifié l'expression de CD25 et de FoxP3 chez des cellules T WT et des cellules IFN- γ R-KO co-injectées chez des souris TCR- β -KO. Nous avons constaté que l'augmentation des nombres de cellules T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ et CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ préalablement observée chez les cellules T WT en PH était inhibée chez les cellules insensibles à l'action de l'IFN- γ (IFN- γ R-KO) pendant la PH (Figure 17). Ceci indique que l'IFN- γ est responsable de l'augmentation des proportions de cellules T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ et CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ suite à l'induction de la PH.

Le rôle de l'IFN- γ dans la conversion des cellules T CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻ en cellules CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ a déjà été démontré *in vitro* (178-180). Nous croyons que cette conversion a lieu *in vivo* pendant la PH ainsi que chez les souris LckOM suite à une exposition à de fortes concentrations d'IFN- γ . Le rôle fondamental de l'IFN- γ dans la tolérance périphérique a été mis en évidence dans de nombreux contextes, notamment dans la survie à long terme de greffes de peau et de cœur et dans la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte. Le rôle protecteur de l'IFN- γ a également été démontré dans la protection de maladies auto-immunes telles que l'EAE et la glomérulonéphrite (181-183). De plus, certaines études font état d'une forte augmentation de la proportion des cellules T CD4⁺FoxP3⁺ pendant la PH, ce qui concorde avec nos observations (59, 177, 184, 185). Bien que les Treg produisent

principalement de l'IL-10 et du TGF- β , une fraction de cette population peut également produire de l'IFN- γ afin de réguler l'activité des APC (186). La production d'IFN- γ par plus de 20 % des cellules T CD4⁺ extrathymiques et des cellules T en PH pourrait être attribuable à une proportion élevée de Treg incluse dans cette population.

Nous avons ensuite déterminé la capacité des cellules T extrathymiques possédant le phénotype typique des Treg (CD4⁺CD25⁺) à exercer une activité suppressive *in vitro*. Pour ce faire, nous avons ajouté des ratios croissants de cellules T CD4⁺CD25⁺ d'origine thymique ou extrathymique à des cultures lymphocytaires mixtes (Figure 18a). Nous avons observé que les Treg extrathymiques réduisent la prolifération et l'activation des TE CD8⁺ et ce, à des ratios où les Treg thymiques n'ont pas d'effet détectable (Figure 18). Ces résultats montrent que les cellules Treg extrathymiques possèdent une activité suppressive plus forte que les cellules Treg d'origine thymiques. De plus, nous avons constaté que 70% des cellules T CD4⁺FoxP3⁺ extrathymiques expriment CD103 tandis qu'à peine plus de 10% des Treg thymiques expriment ce marqueur d'activation (Figure 18e). L'expression de CD103 par les Treg indique qu'elles sont pleinement activées et qu'elles possèdent une activité suppressive puissante (187). Il aurait été intéressant d'évaluer l'activité suppressive des Treg extrathymiques CD25⁻ puisque l'augmentation de la proportion de cette population est considérable chez la souris LckOM comparativement aux souris WT. Toutefois, le devis expérimental que nous avons adopté ne permettait pas la réalisation de ceci puisque la perméabilisation intranucléaire nécessaire à la détection de FoxP3 lors du tri des cellules T CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ n'aurait pas permis l'utilisation subséquente de ces cellules en culture lymphocytaire mixte.

3. Perturbation de l'homéostasie des lymphocytes T extrathymiques.

Nous avons démontré que l'homéostasie des cellules T extrathymiques est sévèrement perturbée et que ceci est une conséquence de la PH soutenue de ces

cellules. Nous avons également établi que la susceptibilité à l'apoptose corrèle avec le phénotype mémoire des cellules T en PH qu'elles soient d'origine thymique ou extrathymique. Des études menées chez l'humain ont démontré que le profil de sécrétion de cytokines résultait directement du type cellulaire impliqué dans la sélection positive (épithéliales versus hématopoïétiques) (151, 155). Nous croyons qu'il en est de même pour les cellules T extrathymiques : le taux de prolifération accéléré et la mise en branle rapide des fonctions effectrices chez ces cellules seraient une conséquence de leur sélection sur les cellules hématopoïétiques dans les ganglions (Figure 10b et c) (188). Le mécanisme à l'origine de ce phénomène n'est pas clair. Les facteurs de transcription T-bet et EOMES activent la transcription de gènes codant pour l'IL-2R β (CD122) et l'IFN- γ chez les cellules TM. Il est probable que T-bet et EOMES soient également responsables de la production constitutive de cytokines par les cellules T extrathymiques (140, 189). Nous croyons que le contact répété entre les cellules T extrathymiques et les complexes CMH + peptide ayant servi à leur sélection active certains clones. Plusieurs études ont démontré que le niveau d'activation des cellules T était proportionnel à l'intensité du signal reçu par le TCR (21, 62, 131). Certains clones de cellules T naïves sont activés en périphérie via une forte interaction entre leur TCR et les complexes CMH + peptide périphériques (62). Conjointement à ceci, les TCR des cellules T innées possèdent une forte affinité pour les complexes CMH + peptides périphériques (147). Les cellules T extrathymiques pourraient être activées lorsqu'elles réintègrent les ganglions après avoir circulé en périphérie. Il a récemment été prouvé que le niveau d'activation des cellules T est inversement proportionnel à l'expression du co-récepteur CD8; un processus connu sous le nom de *co-receptor tuning* (51). Lorsque le signal reçu par le TCR est de forte intensité, l'expression de la molécule CD8 en surface diminue afin de réduire l'affinité du clone pour les complexes CMH + peptides du soi. L'expression du TCR et de ses deux co-récepteurs (CD4 et CD8) est réduite en surface des cellules T extrathymiques relativement aux cellules T d'origine thymique (123). Ceci suggère que la faible expression de ces molécules en surface est une conséquence de l'activation des cellules T extrathymiques en périphérie.

En réunissant les différentes analyses réalisées chez la souris LckOM au cours des dernières années, nous avons établi un modèle afin d'expliquer l'apoptose des cellules T extrathymiques (Figure 19). Selon ce modèle, l'activation des cellules T extrathymiques initiée après quelques cycles de recirculation entre la périphérie et les ganglions entraîne la production massive d'IL-2 et d'IFN- γ (Figure 14a et b). Ensuite, l'accumulation de ces cytokines serait à l'origine de plusieurs processus inter-reliés. L'IFN- γ produit par les cellules T CD8 extrathymiques augmente l'expression de Fas et de Fas-L chez cette population via la voie apoptotique extrinsèque, probablement grâce à un effet autocrine de l'IFN- γ (Figures 11 et 14). En accord avec ceci, il a récemment été démontré que les cellules T possédant un phénotype mémoire sont plus susceptibles à l'apoptose induite par Fas que les cellules possédant un phénotype naïf (66). Par exemple, chez des patients infectés par le VIH, la sensibilité des TM à l'apoptose via Fas est accrue via un mécanisme dépendant de l'activation du facteur de transcription FOXO₃ (190). En contrepartie, les mécanismes régulant l'apoptose des cellules T CD4⁺ extrathymiques sont moins bien définis que ceux des cellules T CD8⁺ extrathymiques. Nous avons observé que l'apoptose des cellules T CD4⁺ concorde avec leur faible expression de l'IL-7R α , elle-même responsable de la faible expression de Bcl-2, ce qui induit la voie apoptotique intrinsèque. Le rôle de l'IL-2 dans la répression de la transcription de l'IL-7R α a été démontré auparavant (38, 50). Il est donc fort probable que l'accumulation d'IL-2 chez la souris LckOM soit responsable de la faible expression de l'ARNm de l'IL-7R α dans ce contexte. L'IFN- γ agit également à ce niveau en réduisant l'expression de l'IL-7R α et de Bcl-2 (Figure 15a) (191). Nous avons également noté une augmentation de la proportion de Treg extrathymiques relativement aux Treg thymiques (Figure 17). Nous avons mis évidence le rôle de l'IFN- γ dans ce processus. Il est également possible que l'IL-2 stimule la production de Treg extrathymiques puisque cette cytokine est normalement essentielle à la génération de cette population (192). L'importance de l'IL-2 dans ce phénomène est controversée : certains prétendent que l'IL-2 est essentielle à toutes les étapes de la génération des Treg puisqu'une réduction du nombre de Treg est observée suite à la neutralisation de la cytokine ainsi que chez les souris IL-2^{-/-} (193). Par contre, Tang *et al* ont récemment démontré que l'IL-2 est plutôt requise pour le

maintien de l'homéostasie des Treg et ne serait pas nécessaire à leur génération (186). Quoiqu'il en soit, en vertu du fait que le nombre des Treg est indexé à la quantité de cellules productrices d'IL-2, nous assumons que les quantités élevées d'IL-2 présentes chez la souris LckOM contribuent à la production des Treg extrathymiques (Figure 14) (194). Cette action de l'IL-2 a d'ailleurs été décrite *in vivo* alors que la conversion des cellules T CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻ en cellules CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ par le TGF-β était inhibée en absence d'IL-2 (195). Les Treg extrathymiques possèdent un phénotype activé caractérisé par l'expression de CD103, ce qui corrèle avec leur forte activité suppressive. Nous suggérons que les Treg CD103⁺ présents en proportions supérieures chez LckOM à ce qui est normalement observé créent par leur action suppressive, un environnement hostile à l'activation des cellules T extrathymiques. Ceci expliquerait l'incapacité des cellules T CD8⁺ extrathymiques à générer une réponse immune soutenue et efficace. Il est également possible que les Treg extrathymiques induisent directement l'apoptose des cellules T extrathymiques préalablement activées par les complexes CMH + peptides périphériques.

Nous avons privilégié l'étude de l'IL-2 et de l'IFN-γ afin d'expliquer l'apoptose des cellules T CD4⁺ extrathymiques. (Figures 14 et 15). Une pléiade de molécules telles que l'IL-15, l'IL-21 et les Reactive Oxygen Species reconnues pour stimuler l'apoptose des cellules T activées aurait également pu être analysée dans le cadre de ce projet. Cependant, nous avons limité notre étude à l'IL-2 et à l'IFN-γ, les cytokines les plus susceptibles d'intervenir dans notre modèle. Il aurait également été pertinent d'étudier l'IL-15 puisque cette cytokine joue un rôle de premier plan dans l'homéostasie des cellules T. L'IL-15 et l'IL-2 possèdent de nombreuses fonctions similaires étant donné que CD122 entre dans la composition des récepteurs de ces deux cytokines (196). L'IL-15 favorise la survie des Tm CD8⁺ et contribue à la PH des TN CD8⁺ conjointement avec l'IL-12 (195, 197). Dans un autre ordre d'idées, l'étude des ROS serait également justifiée. Les ROS sont produits par les lymphocytes T activés et sont constitués principalement d'anions superoxydes (O₂⁻) menant à la formation d'anions hydroxyles (OH⁻) dans le sang. L'apoptose induite par les ROS survient suite à une diminution de l'expression de Bcl-2, ce qui cause des

dommages à la membrane mitochondriale (77, 198). Il serait pertinent de vérifier l'abondance des ROS chez la souris LckOM et d'évaluer leur rôle dans l'induction de l'apoptose des cellules T CD4⁺ extrathymiques en particulier.

Pendant l'infection par le LCMV, l'apoptose des cellules T CD8⁺ extrathymiques survient selon une cinétique accélérée (Figures 5 et 6). Il est possible que cela soit une conséquence de l'épuisement (exhaustion) des cellules T CD8⁺ extrathymiques. Nous n'avons pas analysé l'expression de gènes reliés à l'épuisement chez les cellules T extrathymiques pendant l'infection au LCMV. Par contre, nous avons montré que les cellules T CD8⁺ extrathymiques retrouvées chez la souris LckOM expriment constitutivement de haut niveaux de transcrits codant pour Fas-L dont l'expression est significativement augmentée en situation d'épuisement (Figure 4) (199). Une autre molécule impliquée jouant un rôle significatif dans le processus d'épuisement des cellules T est PD1. Dans un contexte d'infection au VIH, une étude a démontré que PD-1 était sur-exprimé chez les cellules T CD8⁺ spécifiques au virus provenant de patients incapables de générer une réponse efficace contre le virus (200). De plus, une amélioration de la survie ainsi que des fonctions effectrices des cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH est observée lorsque l'interaction entre PD-1 et son ligand est bloquée. Nous avons observé une augmentation de l'expression de PD-1 chez les cellules T CD4⁺ extrathymiques, ce qui suggère que ces dernières sont maintenues constitutivement dans un état d'épuisement chez la souris LckOM (Figure 10e). Ceci explique l'incapacité des cellules CD4⁺ extrathymiques à activer la production d'IgG par les cellules B en réponse au LCMV (Figure 9).

La susceptibilité des cellules T extrathymiques à l'apoptose est différente selon leur appartenance à la lignée CD4 ou à la lignée CD8 (Figure 10d). Les cellules T CD4⁺ sont inférieures aux cellules T CD8⁺ extrathymiques en terme de survie et d'efficacité dans un contexte infectieux. Cette disparité est également retrouvée dans d'autres contextes où les cellules T sont sélectionnées sur des cellules hématopoïétiques. Par exemple, les cellules T CD4 sélectionnées sur les cellules hématopoïétiques thymiques dans un modèle de *tetraparental aggregation chimera*

sont incapables de sécréter de l'IFN- γ pendant l'infection au LCMV (124). Il est donc important de déterminer la cause de l'apoptose des cellules T CD4⁺ extrathymiques puisque les cellules de la lignée CD4⁺ jouent normalement un rôle essentiel dans l'élaboration des fonctions cytotoxiques des cellules T CD8⁺ ainsi que dans l'activation des cellules B menant à la génération de la réponse humorale. Considérant que les cellules T CD4⁺ extrathymiques n'exercent pas leur fonction centrale à cause de leur épuisement il n'est pas surprenant que l'homéostasie des cellules T soit sévèrement perturbée et que l'efficacité des réponses T et B soit diminuée en contexte infectieux. L'identification du mécanisme à l'origine de l'apoptose des cellules T CD4⁺ extrathymiques permettrait à long terme la réalisation d'études visant à rétablir leur survie et leur fonction. Ultimement, il serait pertinent d'évaluer si l'amélioration de la survie des cellules T CD4⁺ contribuerait au rétablissement de l'équilibre homéostatique ainsi que de l'efficacité de la réponse dans un contexte d'infection virale.

Lors de la réalisation des expériences de suppression décrites précédemment, nous avons tenté d'évaluer si les Treg induisaient l'apoptose des cellules T CD4⁺ extrathymiques. Nous avons utilisé l'Annexin V afin de quantifier en cytométrie en flux, les niveaux d'apoptose des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ effectrices mises en présence de ratios croissants de Treg thymiques ou extrathymiques préalablement triés. Les résultats de cette expérience ne sont pas présentés ici puisque nous avons obtenu au taux de mortalité élevé dans toutes les cultures, ce qui est attendu avec ce type de stimulation. Il fût donc impossible d'évaluer si l'apoptose des cellules TE augmentait selon des ratios croissants de Treg extrathymiques puisque les différences subtiles recherchées devaient certainement être masquées par les nombres élevés de cellules apoptotiques retrouvés dans les cultures. Toutefois, peu après l'acceptation de nos résultats pour fin de publication, une étude a démontré que les Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ peuvent tuer les cellules T CD4⁺ effectrices (CD25⁻FoxP3⁻) *in vitro* et *in vivo* (105). Le signal apoptotique induit par les Treg est de type intrinsèque et entraîne une diminution de l'expression de CD132 (chaîne γ_c) et de Bcl-2. L'induction de l'apoptose des TE CD4⁺ par les Treg nécessite une certaine proximité

ou même un contact entre les deux types cellulaires puisqu'elle est inhibée lors d'essais en chambres *Transwell*. Les auteurs ont proposé un modèle selon lequel les Treg sont attirés par les cellules T CD4⁺ produisant de grandes quantités d'IL-2 afin de s'approprier cette cytokine au détriment des cellules productrices (105). Finalement, l'induction de l'apoptose des cellules T CD4⁺ par les Treg serait active pendant une réponse impliquant des interactions de faible affinité entre les TCR et les peptides du soi plutôt que dans un contexte infectieux. Plusieurs résultats décrits ci-haut concordent avec ce que nous avons observé : les cellules T CD4⁺ produisent des quantités importantes d'IL-2 et sont stimulées via une interaction de faible intensité sur les peptides du soi. Cependant, un autre mécanisme permettrait d'expliquer l'anergie des cellules T CD4⁺ extrathymiques. Les Treg peuvent supprimer les cellules T CD4⁺ activées via une interaction entre PD-1 et son ligand (201). Nous n'avons pas évalué l'expression du ligand de PD-1 chez les cellules T CD4⁺ extrathymiques, mais nous savons que l'expression de PD-1 est augmentée chez cette population (Figure 10e). L'expression de PD-1 par les Treg leur permettrait d'inhiber l'activation des cellules T CD4⁺ extrathymiques par contact direct.

En plus d'une augmentation de la proportion de cellules CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, nous avons également observé une augmentation de la proportion de cellules CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ chez la souris LckOM comparativement aux souris WT (192) (Figure 17c et d). Il est difficile de catégoriser les cellules T CD4⁺FoxP3⁺ en tant que Treg *naturels* ou *induits* à l'intérieur des organes lymphoïdes secondaires puisque l'expression de CD25 chez les Treg *induits* est variable. Cependant il est généralement admis que les Treg *induits* n'expriment pas CD25 (202). Il est donc vraisemblable que les cellules CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ dont la fréquence est accrue chez les souris LckOM soient des Treg *induits*. Contrairement aux Treg *naturels* générés par le thymus, les Treg *induits* se développent en périphérie sous l'action de cytokines telles que le TGF-β, l'IL-10, l'IL-2 et l'IFN-γ (103, 178, 180, 194, 203). La génération des Treg *induits* est principalement régulée par le TGF-β, lequel induit l'expression de FoxP3 chez les cellules T CD4⁺CD25⁻ (204). Les effets du TGF-β sur les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ activées sont majeurs : inhibition de la prolifération,

réduction des fonctions effectrices et accélération du processus apoptotique (205, 206). Les cellules dendritiques myéloïdes immatures (iDC) exerçant une action tolérogène produisent le TGF- β suite à une stimulation par les peptides du soi. Nous n'avons pas analysé les types de cellules dendritiques retrouvés chez la souris LckOM : une telle analyse serait appropriée afin de déterminer si la proportion de iDC myéloïdes est augmentée chez ces souris comparativement aux souris WT. Les iDC myéloïdes induiraient la suppression des cellules T extrathymiques via une sécrétion de TGF- β . L'effet du TGF- β est amplifié par l'IL-2 chez les cellules T CD4⁺CD25⁺ et favorise la conversion des cellules T CD4⁺CD25⁻ activés en Treg bien qu'elles n'expriment pas l'IL-2R α (192, 207). Nous avons démontré que l'IL-2 et l'IFN- γ produits en quantités importantes par les cellules T extrathymiques s'accumulent chez les souris LckOM. Il est probable que la production et l'accumulation de ces cytokines soient accrues dans un contexte infectieux, ce qui stimulerait davantage la synthèse de TGF- β ainsi que la génération de nouveaux Treg, entraînant ultimement la totale suppression des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ extrathymiques activées au cours de l'infection.

Une approche permettant d'évaluer l'implication de ce mécanisme chez LckOM consisterait tout d'abord à quantifier la production de TGF- β par les iDC myéloïdes ainsi que la concentration de TGF- β soluble chez ces souris avant et pendant l'infection au LCMV. Afin de déterminer si les cellules T extrathymiques peuvent exercer leurs fonctions respectives lorsqu'elles sont libérées de l'activité suppressive du TGF- β elles seraient transférées dans un environnement où la cytokine n'est pas abondante. Par exemple, les cellules T CD8⁺ extrathymiques seraient transférées chez des receveuses CD8^{-/-} dépourvues de cellules T CD8⁺ mais où les autres types cellulaires sont présents et à l'équilibre. Suite au transfert, les receveuses seraient infectées à l'aide du LCMV et la capacité des cellules T CD8⁺ extrathymiques à éliminer le virus serait ensuite évaluée. La même approche pourrait être réalisée à l'aide de cellules T CD4⁺ extrathymiques transférées chez des receveuses CD4^{-/-}. Nous avons montré que la survie des cellules T CD4⁺ était améliorée suite à leur transfert chez une receveuse WT (Figure 13). Nous avons conclu que cela était causé

par un facteur soluble abondant chez la souris LckOM et absent d'une receveuse WT. Il est possible que le TGF- β soit ce facteur. L'IL-10 pourrait également être à l'origine de ce phénomène puisqu'elle est produite par les Treg et exerce une action suppressive puissante de façon similaire à celle du TGF- β (208). Nous avons évalué la capacité des cellules T extrathymiques à générer une immunité protectrice contre le LCMV lorsqu'elles étaient activées dans un environnement n'ayant pas préalablement été façonné par une sur-expression d'OM. Nous soupçonnons l'architecture des organes transgéniques de nuire à l'élaboration de la réponse. Nous avons conclu qu'il n'en était rien puisque l'efficacité des cellules T extrathymiques n'était pas améliorée suite à leur transfert chez une receveuse RAG^{-/-} (Figure 8). Cette expérience a été réalisée à partir d'une suspension cellulaire de rate transgénique, ce qui implique que près de 40 % des cellules T CD4⁺ injectées exerçaient une activité suppressive grâce à leur expression de FoxP3. Il est possible que sous l'effet de l'IL-2 produite pendant l'infection au LCMV, les Treg extrathymiques aient recréé un environnement supprimeur via la sécrétion de TGF- β . Le transfert de populations isolées de cellules T CD8⁺ et CD4⁺ extrathymiques chez des receveuses CD8^{-/-} ou CD4^{-/-} permettrait de déterminer si tel est le cas et si cela nuit à l'élimination du LCMV par les cellules T extrathymiques. La suppression des cellules T extrathymiques par un facteur soluble tel que le TGF- β subséquent amplifié par le contexte infectieux expliquerait plusieurs observations décrites dans la présente thèse :

- 1) La diminution de la survie et de l'expression de l'IL-7R α chez les cellules T CD4⁺ WT injectées chez des receveuses LckOM (Figure 13).
- 2) L'augmentation de la survie et de l'expression de l'IL-7R α chez les cellules T CD4⁺ extrathymiques suite à leur transfert chez une receveuse WT (Figure 13).
- 3) L'activité cytolytique inférieure *in vivo* des cellules T extrathymiques comparativement aux cellules T thymiques face à des cellules dendritiques présentant le peptide GP₃₃₋₄₁ (Figure 7).
- 4) L'épuisement (exhaustion) des cellules T CD8⁺ extrathymiques pendant l'infection au LCMV (Figures 5 et 6).

Deux études récentes réalisées chez l'humain et la souris ont démontré que l'expression de l'IL-7R α était réduite chez les Treg comparativement aux autres cellules T CD4⁺ (134, 209). Nous avons émis l'hypothèse que la faible expression d'IL-7R α chez les cellules T CD4⁺ était une conséquence de la forte proportion de Treg dans cette population. Nous avons donc comparé l'expression de l'IL-7R α chez les cellules FoxP3⁺ et FoxP3⁻. Nous avons observé que, contrairement à une souris WT, l'expression de l'IL-7R α n'est pas réduite chez les Treg extrathymiques (Figure 24). Ceci suggère que les Treg extrathymiques seraient d'excellents consommateurs d'IL-2 et d'IL-7. Dans ce cas, l'expression de l'IL-7R α chez les Treg extrathymiques serait proportionnelle au signal transmis par l'IL-7. Ces résultats concordent avec les études ayant montré qu'une forte expression de l'IL-7R α corrèle avec la réception d'un signal de survie.

4. Rôle du thymus et développement T extrathymique : mise en perspective

Nous avons proposé que les cellules T extrathymiques générées dans les ganglions de la souris LckOM soient considérées comme faisant partie de la lignée des cellules T innées. En conséquence, le terme cellules T innées fait référence aux cellules T sélectionnées sur les cellules hématopoïétiques à l'intérieur du thymus ainsi qu'aux cellules T extrathymiques en général. Les cellules T innées sont dotées constitutivement de fonctions effectrices leur permettant de proliférer rapidement en réponse aux pathogènes toutefois, elles sont incapables de générer une réponse immune efficace et durable par elles-mêmes. Les cellules T innées doivent tout de même profiter à l'organisme, lequel consacre plusieurs ressources à la régulation de cette voie de différenciation. En effet, le rôle de ITK consisterait à ralentir la production des cellules T innées afin d'éviter qu'elle ne nuise au développement T classique, ce qui permettrait d'établir un équilibre nécessaire à la co-habitation de ces deux différentes voies de maturation (151). Dans quel intérêt l'évolution a-t-elle favorisé la conservation de cette lignée? Le développement des cellules T innées a

probablement traversé les millions d'années d'évolution grâce aux puissantes fonctions effectrices dont sont dotées les cellules qui en sont issues. La réponse des cellules T innées suite à une stimulation est rapide et explosive, ce qui devait être un atout majeur pour la survie des populations lors des différentes épidémies qui ont jalonné l'Histoire. Il a été démontré que la production initiale d'IFN- γ au cours d'une réponse anti-virale est assurée par les cellules T innées (143, 210). Le rôle des cellules T innées consisterait donc à ralentir la réplication du pathogène en produisant de grandes quantités de cytokines, principalement l'IFN- γ (121, 126, 188). Ceci procurerait un délai nécessaire à l'élaboration de la réponse T classique lui permettant de prendre le relais et d'éliminer définitivement le pathogène par cytotoxicité directe et d'autres mécanismes d'immunité spécifique. La disparition des cellules T innées serait donc requise afin de libérer les niches nécessaires à la mise en place et à l'exécution de la réponse T conventionnelle, ce qui permettrait d'éviter que les deux réponses n'entrent en compétition (9). Nous avons observé que l'apoptose des cellules T extrathymiques pendant l'infection au LCMV semblait suivre une cinétique comparable à une celle d'une phase de contraction accélérée de la réponse (Figures 6b et 22). Cette mort précipitée serait en fait programmée afin de faciliter l'élaboration de la réponse T classique.

Les cellules T innées ne peuvent assumer à elles seules la réponse aux pathogènes en absence de la réponse T classique. Nous l'avons démontré dans le contexte des cellules T extrathymiques provenant de la souris LckOM et d'autres équipes l'ont également mis en évidence chez des souris Kb^{-/-}Db^{-/-} ainsi que dans un modèle de *tetraparental aggregation chimera* (111, 124, 147). Les cellules T innées étant extrêmement réactives, les probabilités qu'elles initient une réaction auto-immune sont extrêmement élevées. L'apoptose et/ou l'anergie des cellules T innées serait un moyen efficace et rapide de minimiser les risques de maladies auto-immunes. Les cellules T innées ne sont pas pour autant totalement dysfonctionnelles puisque des évidences montrent qu'elles interviennent dans le cadre de certaines réponses anti-bactériennes et anti-tumorales (44, 110, 114, 116, 117, 147). L'efficacité des cellules T innées serait maximale face à des cibles très sensibles à l'IFN- γ (bactéries, cellules

tumorales), une cytokine qu'elles produisent de façon massive (121, 188). En accord avec ceci, l'efficacité de la réponse est diminuée en absence des cellules T innées dans certaines situations (115, 116). La synergie entre les réponses T innées et classiques serait donc essentielle au maintien de l'homéostasie. Il est intéressant de noter que les deux types de réponses semblent avoir évolué pour exercer des fonctions spécialisées. Les cellules T innées représenteraient un système de réponse T ancestral spécialisé dans la lutte aux infections bactériennes et l'élimination des tumeurs, tandis que les cellules T classiques auraient co-évolué afin de lutter contre les multiples infections virales.

Il semble relativement simple de générer des cellules T fonctionnelles indépendamment de thymus. Toutefois, il est incontestable que les conditions optimales au développement des cellules T sont réunies à l'intérieur du thymus et que certaines molécules et structures spécialisées à cet effet ne sont pas retrouvées à l'extérieur de cet organe. Par contre, en absence des conditions idéales, certaines substitutions sont permises afin de permettre le développement efficace de cellules T fonctionnelles à l'extérieur du thymus. Par exemple, l'OM pallie à l'absence de signaux *Wnt* dans les ganglions de la souris LckOM pour permettre la transition des DN1 en DN2, les cellules hématopoïétiques soutiennent la sélection positive des thymocytes en absence des TEC, etc (123, 128). Par contre, il est impossible de produire des cellules T efficaces tout en limitant les risques de réaction auto-immune sans la participation du thymus (211). Dans de telles circonstances, l'organisme choisira d'induire la mort des cellules T plutôt que de risquer qu'elles ne se retournent contre lui. En accord avec ceci, des signes d'auto-immunité ont été détectés chez les souris LckOM sous la forme de glomérulonéphrite et d'insuffisance ovarienne (119). De plus, King *et al* ont démontré qu'en situation de PH, le faible taux de survie et la prolifération active des cellules T corrèle avec l'apparition d'auto-immunité (212). L'apoptose des cellules T périphériques brise l'équilibre précaire entre les trois paramètres régulant l'homéostasie des cellules T : la production, la prolifération et la mort des cellules. L'absence totale de TN observée dans un tel contexte contribue également à ce dérèglement.

Le rôle fondamental du thymus consisterait donc à limiter le potentiel d'attaque de l'hôte par ses propres cellules T. D'ailleurs, plusieurs complexes moléculaires retrouvés exclusivement à l'intérieur du thymus tels que le thymoprotéasome et le facteur de transcription AIRE sont spécialisés dans la mise en place de mécanismes de tolérance. Il est d'ailleurs probable que c'est dans l'atteinte de cette finalité que le développement des cellules T se soit approprié un organe exclusif plutôt que de prendre place dans la moëlle osseuse comme le font les autres populations découlant de la lignée hématopoïétique.

One autoreactive T lymphocyte, with unchecked capability for expansion, can kill the organism. That's why the game of cell survival is so hard to win.

DOUGLAS R. GREEN

Immunity 28, February 2008

CONCLUSION

Nous avons réalisé cette étude en utilisant un modèle transgénique unique chez lequel une sur-expression de l'Oncostatin M induit le développement extrathymique des cellules T à l'intérieur des ganglions. Nous avons démontré que la fonctionnalité des cellules T extrathymiques est inférieure à celle des cellules T conventionnelles produites dans le thymus. Les cellules T CD8⁺ extrathymiques prolifèrent plus rapidement que les cellules T CD8⁺ thymiques en réponse au LCMV et contrôlent efficacement la réplication du virus au début de l'infection. Toutefois, l'apoptose précoce des cellules T CD8⁺ extrathymiques pendant l'infection au LCMV mène à la résurgence du pathogène au cours de la phase tardive de l'infection. Les cellules T extrathymiques sont incapables d'éliminer complètement le LCMV malgré une production rapide et massive d'IL-2 et d'IFN- γ avant et après stimulation *in vitro* ainsi qu'une capacité proliférative supérieure à celles des cellules T thymiques. Nous avons constaté que les cellules T extrathymiques étaient déjà susceptibles à l'apoptose avant l'infection au LCMV, indiquant que l'homéostasie des cellules T était perturbée de façon constitutive.

Nous avons entrepris de déterminer pourquoi l'homéostasie des cellules T extrathymiques était constitutivement perturbée puisque ce déséquilibre empêche la génération d'une immunité protectrice par les cellules T extrathymiques. Les cellules T extrathymiques sont en constante situation de prolifération homéostatique, bien que les souris LckOM ne soient pas lymphopéniques, ce qui induit leur apoptose. Nous avons montré que l'apoptose des cellules T CD4⁺ extrathymiques est due à une faible expression de l'IL-7R α et de Bcl-2. L'IFN- γ produit massivement par les cellules T extrathymiques s'accumule et entraîne une augmentation de l'expression de Fas et de Fas-L chez les cellules T CD8⁺ extrathymiques, ce qui réduit considérablement leur

survie. Cette cytokine contribue également à la diminution de l'expression de l'IL-7R α et de Bcl-2 chez les cellules T CD4⁺ extrathymiques en conjonction avec un autre facteur soluble que nous n'avons pas identifié, mais que nous soupçonnons être l'IL-2. Il serait donc intéressant de vérifier si la survie des cellules T CD4⁺ serait rétablie suite à la neutralisation *in vivo* de cette cytokine.

Nous avons démontré que l'homéostasie des cellules T CD4⁺ extrathymiques est extrêmement bouleversée par une augmentation importante de la proportion de Treg FoxP3⁺, causée elle aussi par l'accumulation d'IFN- γ . Les Treg extrathymiques possèdent une activité suppressive *in vitro* supérieure à celles des Treg d'origine thymique, ce qui indique que les mécanismes de tolérance périphérique sont amplifiés chez la souris LckOM. Il est probable que les Treg extrathymiques induisent l'apoptose des cellules T CD4⁺ extrathymiques par un mécanisme direct nécessitant un contact entre les deux types de cellules ou par l'action d'une cytokine immunosuppressive telle que le TGF- β . Des études plus poussées permettront de déterminer le mécanisme précis responsable de l'apoptose des cellules T CD4⁺. Ces résultats démontrent que la production de cellules T munies de fonctions effectrices n'assure pas forcément l'immunocompétence de l'hôte.

Nous avons établi que lorsque les cellules T d'origine thymique se retrouvent dans un contexte de prolifération homéostatique induit suite à une lymphopénie, elles se comportent de la même façon que les cellules T extrathymiques, c'est-à-dire que 1) leur susceptibilité à l'apoptose est accrue 2) l'expression de IL-7R α et de Bcl-2 est diminuée chez les cellules T CD4⁺ et l'expression de Fas est augmentée chez les cellules T CD8⁺ 3) la proportion de Treg FoxP3⁺ est augmentée et 4) l'IFN- γ joue un rôle crucial dans ces processus. Ceci indique que la susceptibilité à l'apoptose des cellules en prolifération homéostatique et des cellules T extrathymiques corrèle avec leur phénotype mémoire. Les cellules T innées possèdent également un phénotype mémoire de façon constitutive ; il serait donc pertinent d'analyser l'expression de molécules de survie et la génération des cellules Treg FoxP3⁺ chez ces cellules. Nous avons d'ailleurs proposé que les cellules T extrathymiques fassent partie du

regroupement de cellules T innées puisque ces deux populations partagent plusieurs caractéristiques importantes en plus de leur phénotype soit : le fait qu'elles sont en prolifération homéostatique en absence de lymphopénie, leur capacité de produire rapidement de l'IFN- γ et leur sélection sur les cellules hématopoïétiques. En vertu du fait que le phénotype mémoire des cellules T innées est une conséquence directe de leur sélection sur les cellules hématopoïétiques, nous proposons que la nature des cellules impliquées dans la sélection positive détermine l'appartenance des cellules T soit à la lignée innée ou à la lignée conventionnelle.

Quelle est donc la différence entre la sélection positive sur les cellules épithéliales thymiques versus les cellules hématopoïétiques? La réponse repose peut-être sur l'expression du thymoprotéasome exclusive aux cellules épithéliales thymiques puisque ce complexe fournit des peptides uniques, lesquelles permettent les interactions de faible affinité requises à l'exécution de la sélection positive. Il serait donc intéressant de comparer la nature des peptides présentés par les cellules épithéliales thymiques et les cellules hématopoïétiques. Il serait également pertinent d'évaluer les signaux ainsi que l'intensité des interactions entre les cellules T immatures et les deux types de cellules exerçant la sélection positive. Ceci permettrait d'établir comment l'interaction entre les progéniteurs et les cellules épithéliales thymiques génère des cellules T fonctionnelles tandis qu'une interaction de ce type impliquant des cellules hématopoïétiques est infructueuse à ce niveau.

Dans leur ensemble, les résultats de nos travaux montrent que la production de cellules T est possible en absence du thymus, mais que cela survient au détriment de leur homéostasie et de leur efficacité face aux pathogènes. Dans un tel contexte, l'apoptose des cellules T devient alors une porte de sortie afin d'éviter le développement de réactions auto-immunes. Ceci devra être considéré dans l'élaboration de stratégies visant à prolonger la fonction thymique et à générer des substituts thymiques afin d'augmenter l'efficacité de la vaccination et de pallier à plusieurs immunodéficiences chez la population vieillissante.

Finalement, nous avons observé une mobilisation des mécanismes de tolérance chez les cellules T en contexte de prolifération homéostatique. La réalisation d'études visant à définir ces différents mécanismes mis en branle afin de contrer l'activation de clones auto-réactifs serait souhaitable. Cela permettrait potentiellement de mettre en évidence les causes de l'immunité défaillante associée à des contextes de lymphopénie causés par des syndromes héréditaires, l'infection par le VIH ou suite à l'administration de traitements immunosuppresseurs tels que l'irradiation et la chimiothérapie.

Contribution aux articles

PREMIER ARTICLE

Marie-Ève Blais*, Gwladys Gérard*, Marianne M. Martinic*, Guillaume Roy-Proulx, Rolf M. Zinkernagel and Claude Perreault. **Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses?** Blood, Volume 103, Number 8, 2004, p.3102-10.

*The first three authors contributed equally to this work.

Contribution à cette publication

Ma contribution à cette publication est majeure. Premièrement, j'ai réalisé les études de détection des cellules T spécifiques au LCMV à l'aide des tétramères GP33-41 (Figure 5). La moitié des tétramères GP33-41 utilisés dans cette étude provenaient d'une production maison tandis que le reste a été produit commercialement. J'ai participé à toutes les étapes de la production maison des tétramères GP33-41 en collaboration avec Guillaume Roy-Proulx.

Deuxièmement, j'ai effectué la détection du LCMV par *Immunological Focus Forming Assay* (Figure 6). Pour ce faire j'ai personnellement mis en place les procédures et installations respectant les règles de Biosécurité de Confinement de type 2. J'ai également contacté plusieurs équipes afin d'obtenir un aliquot de LCMV. De plus, j'ai mis au point le *Immunological Focus Forming Assay* utilisé pour la détection du LCMV à partir de surnageant d'organes de souris infectées.

Troisièmement, j'ai produit la totalité des chimères hématopoïétiques utilisées décrites dans le cadre des Figures 5, 6 et 9 de cette publication. Pour ce faire, j'ai mis au point avec succès la procédure de thymectomie des souris RAG^{-/-} au terme de deux mois d'essais à temps complet. J'ai également réalisé la reconstitution immunitaire

des ces souris en réalisant des greffes de foie fœtal. J'estime avoir généré plus de 200 chimères hématopoïétiques dont une partie a été envoyée à nos collaborateurs de Zurich. Ces chimères hématopoïétiques ont été utilisées par Marianne Martinic dans la réalisation des études impliquant le LCMV WE et le VSV (Figures 6b et 9).

Quatrièmement, j'ai initié la réalisation de l'essai de cytototoxicité *in vivo* (Figure 7). J'ai également effectué la totalité de la revue de littérature nécessaire à l'élaboration de cette technique. J'ai mis au point et réalisé cet essai en collaboration avec Gwladys Gérard (Figure 7). Cette dernière a réalisé les essais de stimulation et de production de cytokines *in vitro* représentés dans les Figure 3 et 4 ainsi que la Table 1.

J'ai également effectué les transferts adoptifs représentés dans la Figure 8. Finalement, conjointement avec mon directeur de recherche Claude Perreault ainsi que le Professeur Rolf Zinkernagel, j'ai participé activement à l'analyse de la totalité des résultats générés dans le cadre de ce projet ainsi qu'à la rédaction de l'article.

DEUXIÈME ARTICLE

Marie-Ève Blais, Sylvie Brochu, Martin Giroux, Marie-Pier Bélanger, Gaël Dulude, Rafick-Pierre Sékaly & Claude Perreault. **Why T cells of thymic versus extrathymic origin are functionally different.** The Journal of Immunology, Volume 180, Number 4, 2008, p.2299-312.

Contribution à cette publication

Ma contribution à cette publication dont je suis le premier auteur est majeure. J'ai planifié, élaboré et réalisé chacune des expériences effectuées dans le cadre de ce projet. J'ai également analysé la totalité des résultats inclus dans cet article. Martin Giroux a effectué le phénotypage des souris *Aly/Aly* X *LckOM* représenté dans la Figure 10a. Gaël Dulude a réalisé l'amplification des TRECs (Figure 10b et c) à partir des échantillons de populations cellulaires dont j'ai réalisé le tri ainsi que l'extraction de l'ARN. Sylvie Brochu a réalisé les expériences de suppression illustrées dans la Figure 18. Finalement, j'ai élaboré le concept et rédigé le texte de cette publication en collaboration avec mon directeur de recherche.

TROISIÈME ARTICLE

Marie-Ève Blais*, Isabelle Louis* & Claude Perreault. **T-cell development: an extrathymic perspective.** *Immunological reviews*, 209:103-114

*The first two authors contributed equally to this work.

Contribution à cette publication

Ma contribution à cette publication dont je suis le premier auteur est majeure. J'ai établi la structure, les concepts ainsi que les idées discutés dans le cadre de cet article en collaboration avec Isabelle Louis. J'ai également conçu la stratégie de présentation et participé à la réalisation de la totalité des figures de cet article. Finalement j'ai participé à la rédaction du texte de cette publication en collaboration avec Isabelle Louis et mon directeur de recherche, Claude Perreault.

Bibliographie

1. Tanchot, C., and B. Rocha. 1995. The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8+ T cell pools. *European journal of immunology* 25:2127-2136.
2. Bourgeois, C., G. Kassiotis, and B. Stockinger. 2005. A major role for memory CD4 T cells in the control of lymphopenia-induced proliferation of naive CD4 T cells. *J Immunol* 174:5316-5323.
3. Berzins, S.P., D.I. Godfrey, J.F. Miller, and R.L. Boyd. 1999. A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:9787-9791.
4. Scollay, R.G., E.C. Butcher, and I.L. Weissman. 1980. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *European journal of immunology* 10:210-218.
5. Almeida, A.R., J.A. Borghans, and A.A. Freitas. 2001. T cell homeostasis: thymus regeneration and peripheral T cell restoration in mice with a reduced fraction of competent precursors. *The Journal of experimental medicine* 194:591-599.
6. Almeida, A.R., B. Rocha, A.A. Freitas, and C. Tanchot. 2005. Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. *Seminars in immunology* 17:239-249.
7. Woodland, D.L., and M.A. Blackman. 2006. Immunity and age: living in the past? *Trends in immunology* 27:303-307.
8. Naylor, K., G. Li, A.N. Vallejo, W.W. Lee, K. Koetz, E. Bryl, J. Witkowski, J. Fulbright, C.M. Weyand, and J.J. Goronzy. 2005. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol* 174:7446-7452.
9. Tanchot, C., and B. Rocha. 1998. The organization of mature T-cell pools. *Immunology today* 19:575-579.
10. Jameson, S.C. 2002. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nature reviews* 2:547-556.
11. Rocha, B., N. Dautigny, and P. Pereira. 1989. Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *European journal of immunology* 19:905-911.
12. Rocha, B., and H. von Boehmer. 1991. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science (New York, N.Y)* 251:1225-1228.
13. Tough, D.F., and J. Sprent. 1994. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *The Journal of experimental medicine* 179:1127-1135.
14. Marrack, P., T. Mitchell, J. Bender, D. Hildeman, R. Kedl, K. Teague, and J. Kappler. 1998. T-cell survival. *Immunological reviews* 165:279-285.
15. Lalvani, A., R. Brookes, S. Hambleton, W.J. Britton, A.V. Hill, and A.J. McMichael. 1997. Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *The Journal of experimental medicine* 186:859-865.

16. 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 (New York, N.Y)* 276:2057-2062.
17. Ge, Q., A. Bai, B. Jones, H.N. Eisen, and J. Chen. 2004. Competition for self-peptide-MHC complexes and cytokines between naive and memory CD8+ T cells expressing the same or different T cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3041-3046.
18. Woodland, D.L., and R.W. Dutton. 2003. Heterogeneity of CD4(+) and CD8(+) T cells. *Current opinion in immunology* 15:336-342.
19. Goldrath, A.W., C.J. Luckey, R. Park, C. Benoist, and D. Mathis. 2004. The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:16885-16890.
20. Goldrath, A.W., L.Y. Bogatzki, and M.J. Bevan. 2000. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *The Journal of experimental medicine* 192:557-564.
21. Prlic, M., G. Hernandez-Hoyos, and M.J. Bevan. 2006. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response. *The Journal of experimental medicine* 203:2135-2143.
22. Gett, A.V., F. Sallusto, A. Lanzavecchia, and J. Geginat. 2003. T cell fitness determined by signal strength. *Nature immunology* 4:355-360.
23. 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.
24. Boyman, O., J.F. Purton, C.D. Surh, and J. Sprent. 2007. Cytokines and T-cell homeostasis. *Current opinion in immunology* 19:320-326.
25. Takeda, S., H.R. Rodewald, H. Arakawa, H. Bluethmann, and T. Shimizu. 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.
26. Polic, B., D. Kunkel, A. Scheffold, and K. Rajewsky. 2001. How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:8744-8749.
27. Seddon, B., and R. Zamoyska. 2002. TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells. *J Immunol* 169:2997-3005.
28. Seddon, B., P. Tomlinson, and R. Zamoyska. 2003. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nature immunology* 4:680-686.
29. Sprent, J., and C.D. Surh. 2001. Generation and maintenance of memory T cells. *Current opinion in immunology* 13:248-254.
30. Swain, S.L., H. Hu, and G. Huston. 1999. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science (New York, N.Y)* 286:1381-1383.
31. Kassiotis, G., S. Garcia, E. Simpson, and B. Stockinger. 2002. Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nature immunology* 3:244-250.

32. De Riva, A., C. Bourgeois, G. Kassiotis, and B. Stockinger. 2007. Noncognate interaction with MHC class II molecules is essential for maintenance of T cell metabolism to establish optimal memory CD4 T cell function. *J Immunol* 178:5488-5495.
33. Kassiotis, G., R. Zamoyska, and B. Stockinger. 2003. Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells. *The Journal of experimental medicine* 197:1007-1016.
34. Schluns, K.S., W.C. Kieper, S.C. Jameson, and L. Lefrancois. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nature immunology* 1:426-432.
35. Tan, J.T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K.I. Weinberg, and C.D. Surh. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:8732-8737.
36. Fry, T.J., and C.L. Mackall. 2005. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol* 174:6571-6576.
37. Mazzucchelli, R., and S.K. Durum. 2007. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nature reviews* 7:144-154.
38. Park, J.H., Q. Yu, B. Erman, J.S. Appelbaum, D. Montoya-Durango, H.L. Grimes, and A. Singer. 2004. Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* 21:289-302.
39. Thomis, D.C., and L.J. Berg. 1997. Peripheral expression of Jak3 is required to maintain T lymphocyte function. *The Journal of experimental medicine* 185:197-206.
40. Maraskovsky, E., L.A. O'Reilly, M. Teepe, L.M. Corcoran, J.J. Peschon, and A. Strasser. 1997. Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1^{-/-} mice. *Cell* 89:1011-1019.
41. Van Parijs, L., A. Biuckians, and A.K. Abbas. 1998. Functional roles of Fas and Bcl-2-regulated apoptosis of T lymphocytes. *J Immunol* 160:2065-2071.
42. Lodolce, J.P., D.L. Boone, S. Chai, R.E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin, and A. Ma. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9:669-676.
43. Malek, T.R., and A.L. Bayer. 2004. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nature reviews* 4:665-674.
44. Suzuki, H., T.M. Kundig, C. Furlonger, A. Wakeham, E. Timms, T. Matsuyama, R. Schmits, J.J. Simard, P.S. Ohashi, H. Griesser, and et al. 1995. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science (New York, N.Y)* 268:1472-1476.
45. Van Parijs, L., Y. Refaeli, J.D. Lord, B.H. Nelson, A.K. Abbas, and D. Baltimore. 1999. Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* 11:281-288.
46. Lenardo, M.J. 1991. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353:858-861.

47. Puel, A., S.F. Ziegler, R.H. Buckley, and W.J. Leonard. 1998. Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nature genetics* 20:394-397.
48. Kaech, S.M., J.T. Tan, E.J. Wherry, B.T. Konieczny, C.D. Surh, and R. Ahmed. 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature immunology* 4:1191-1198.
49. Wojciechowski, S., M.B. Jordan, Y. Zhu, J. White, A.J. Zajac, and D.A. Hildeman. 2006. Bim mediates apoptosis of CD127(lo) effector T cells and limits T cell memory. *European journal of immunology* 36:1694-1706.
50. Janas, M.L., P. Groves, N. Kienzle, and A. Kelso. 2005. IL-2 regulates perforin and granzyme gene expression in CD8+ T cells independently of its effects on survival and proliferation. *J Immunol* 175:8003-8010.
51. Park, J.H., S. Adoro, P.J. Lucas, S.D. Sarafova, A.S. Alag, L.L. Doan, B. Erman, X. Liu, W. Ellmeier, R. Bosselut, L. Feigenbaum, and A. Singer. 2007. 'Coreceptor tuning': cytokine signals transcriptionally tailor CD8 coreceptor expression to the self-specificity of the TCR. *Nature immunology* 8:1049-1059.
52. Marrack, P., J. Bender, D. Hildeman, M. Jordan, T. Mitchell, M. Murakami, A. Sakamoto, B.C. Schaefer, B. Swanson, and J. Kappler. 2000. Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells. *Nature immunology* 1:107-111.
53. Vella, A.T., S. Dow, T.A. Potter, J. Kappler, and P. Marrack. 1998. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:3810-3815.
54. Ku, C.C., M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler, and P. Marrack. 2000. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science (New York, N.Y)* 288:675-678.
55. Zeng, R., R. Spolski, S.E. Finkelstein, S. Oh, P.E. Kovanen, C.S. Hinrichs, C.A. Pise-Masison, M.F. Radonovich, J.N. Brady, N.P. Restifo, J.A. Berzofsky, and W.J. Leonard. 2005. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *The Journal of experimental medicine* 201:139-148.
56. Kondrack, R.M., J. Harbertson, J.T. Tan, M.E. McBreen, C.D. Surh, and L.M. Bradley. 2003. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *The Journal of experimental medicine* 198:1797-1806.
57. Min, B., H. Yamane, J. Hu-Li, and W.E. Paul. 2005. Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *J Immunol* 174:6039-6044.
58. Geiselhart, L.A., C.A. Humphries, T.A. Gregorio, S. Mou, J. Subleski, and K.L. Komschlies. 2001. IL-7 administration alters the CD4:CD8 ratio, increases T cell numbers, and increases T cell function in the absence of activation. *J Immunol* 166:3019-3027.
59. Bourgeois, C., and B. Stockinger. 2006. CD25+CD4+ regulatory T cells and memory T cells prevent lymphopenia-induced proliferation of naive T cells in transient states of lymphopenia. *J Immunol* 177:4558-4566.

60. Sandau, M.M., C.J. Winstead, and S.C. Jameson. 2007. IL-15 is required for sustained lymphopenia-driven proliferation and accumulation of CD8 T cells. *J Immunol* 179:120-125.
61. Tough, D.F., X. Zhang, and J. Sprent. 2001. An IFN-gamma-dependent pathway controls stimulation of memory phenotype CD8+ T cell turnover in vivo by IL-12, IL-18, and IFN-gamma. *J Immunol* 166:6007-6011.
62. Grossman, Z., B. Min, M. Meier-Schellersheim, and W.E. Paul. 2004. Concomitant regulation of T-cell activation and homeostasis. *Nature reviews* 4:387-395.
63. Marsden, V.S., and A. Strasser. 2003. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annual review of immunology* 21:71-105.
64. Badovinac, V.P., K.A. Messingham, S.E. Hamilton, and J.T. Harty. 2003. Regulation of CD8+ T cells undergoing primary and secondary responses to infection in the same host. *J Immunol* 170:4933-4942.
65. Haring, J.S., G.A. Corbin, and J.T. Harty. 2005. Dynamic regulation of IFN-gamma signaling in antigen-specific CD8+ T cells responding to infection. *J Immunol* 174:6791-6802.
66. Krammer, P.H., R. Arnold, and I.N. Lavrik. 2007. Life and death in peripheral T cells. *Nature reviews* 7:532-542.
67. Dhein, J., H. Walczak, C. Baumler, K.M. Debatin, and P.H. Krammer. 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373:438-441.
68. Opferman, J.T., and S.J. Korsmeyer. 2003. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature immunology* 4:410-415.
69. Boise, L.H., A.J. Minn, P.J. Noel, C.H. June, M.A. Accavitti, T. Lindsten, and C.B. Thompson. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3:87-98.
70. Strasser, A., and M. Pellegrini. 2004. T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends in immunology* 25:610-615.
71. Akbar, A.N., P.C. Beverley, and M. Salmon. 2004. Will telomere erosion lead to a loss of T-cell memory? *Nature reviews* 4:737-743.
72. Hodes, R.J., K.S. Hathcock, and N.P. Weng. 2002. Telomeres in T and B cells. *Nature reviews* 2:699-706.
73. Schmitz, I., A. Krueger, S. Baumann, H. Schulze-Bergkamen, P.H. Krammer, and S. Kirchhoff. 2003. An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *J Immunol* 171:2930-2936.
74. Baumann, S., A. Dostert, N. Novac, A. Bauer, W. Schmid, S.C. Fas, A. Krueger, T. Heinzel, S. Kirchhoff, G. Schutz, and P.H. Krammer. 2005. Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer. *Blood* 106:617-625.
75. Siegel, R.M., F.K. Chan, H.J. Chun, and M.J. Lenardo. 2000. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nature immunology* 1:469-474.

76. Refaeli, Y., L. Van Parijs, C.A. London, J. Tschopp, and A.K. Abbas. 1998. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 8:615-623.
77. Hildeman, D.A., Y. Zhu, T.C. Mitchell, P. Bouillet, A. Strasser, J. Kappler, and P. Marrack. 2002. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* 16:759-767.
78. Rossi, S.W., W.E. Jenkinson, G. Anderson, and E.J. Jenkinson. 2006. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature* 441:988-991.
79. Su, D.M., S. Navarre, W.J. Oh, B.G. Condie, and N.R. Manley. 2003. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nature immunology* 4:1128-1135.
80. Lind, E.F., S.E. Prockop, H.E. Porritt, and H.T. Petrie. 2001. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *The Journal of experimental medicine* 194:127-134.
81. Anderson, G., J.J. Owen, N.C. Moore, and E.J. Jenkinson. 1994. Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro. *The Journal of experimental medicine* 179:2027-2031.
82. Derbinski, J., A. Schulte, B. Kyewski, and L. Klein. 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature immunology* 2:1032-1039.
83. Ciofani, M., and J.C. Zuniga-Pflucker. 2007. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annual review of cell and developmental biology* 23:463-493.
84. Bhandoola, A., H. von Boehmer, H.T. Petrie, and J.C. Zuniga-Pflucker. 2007. Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity* 26:678-689.
85. Petrie, H.T., and J.C. Zuniga-Pflucker. 2007. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annual review of immunology* 25:649-679.
86. Rothenberg, E.V., J.E. Moore, and M.A. Yui. 2008. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nature reviews* 8:9-21.
87. Radtke, F., A. Wilson, G. Stark, M. Bauer, J. van Meerwijk, H.R. MacDonald, and M. Aguet. 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10:547-558.
88. Schmitt, T.M., M. Ciofani, H.T. Petrie, and J.C. Zuniga-Pflucker. 2004. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *The Journal of experimental medicine* 200:469-479.
89. Weerkamp, F., M.R. Baert, B.A. Naber, E.E. Koster, E.F. de Haas, K.R. Atkuri, J.J. van Dongen, L.A. Herzenberg, and F.J. Staal. 2006. Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:3322-3326.
90. Weerkamp, F., T.C. Luis, B.A. Naber, E.E. Koster, L. Jeannotte, J.J. van Dongen, and F.J. Staal. 2006. Identification of Notch target genes in

- uncommitted T-cell progenitors: No direct induction of a T-cell specific gene program. *Leukemia* 20:1967-1977.
91. Shah, D.K., A.L. Hager-Theodorides, S.V. Outram, S.E. Ross, A. Varas, and T. Crompton. 2004. Reduced thymocyte development in sonic hedgehog knockout embryos. *J Immunol* 172:2296-2306.
 92. Wang, H., L.J. Pierce, and G.J. Spangrude. 2006. Distinct roles of IL-7 and stem cell factor in the OP9-DL1 T-cell differentiation culture system. *Experimental hematology* 34:1730-1740.
 93. Di Santo, J.P., and H.R. Rodewald. 1998. In vivo roles of receptor tyrosine kinases and cytokine receptors in early thymocyte development. *Current opinion in immunology* 10:196-207.
 94. Wurbel, M.A., J.M. Philippe, C. Nguyen, G. Victorero, T. Freeman, P. Wooding, A. Miazek, M.G. Mattei, M. Malissen, B.R. Jordan, B. Malissen, A. Carrier, and P. Naquet. 2000. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *European journal of immunology* 30:262-271.
 95. Misslitz, A., O. Pabst, G. Hintzen, L. Ohl, E. Kremmer, H.T. Petrie, and R. Forster. 2004. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *The Journal of experimental medicine* 200:481-491.
 96. Canelles, M., M.L. Park, O.M. Schwartz, and B.J. Fowlkes. 2003. The influence of the thymic environment on the CD4-versus-CD8 T lineage decision. *Nature immunology* 4:756-764.
 97. Murata, S., K. Sasaki, T. Kishimoto, S. Niwa, H. Hayashi, Y. Takahama, and K. Tanaka. 2007. Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science (New York, N.Y)* 316:1349-1353.
 98. Bevan, M.J. 2007. Immunology. The cutting edge of T cell selection. *Science (New York, N.Y)* 316:1291-1292.
 99. Kyewski, B., and L. Klein. 2006. A central role for central tolerance. *Annual review of immunology* 24:571-606.
 100. Mathis, D., and C. Benoist. 2007. A decade of AIRE. *Nature reviews* 7:645-650.
 101. DeVoss, J., Y. Hou, K. Johannes, W. Lu, G.I. Liou, J. Rinn, H. Chang, R.R. Caspi, L. Fong, and M.S. Anderson. 2006. Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. *The Journal of experimental medicine* 203:2727-2735.
 102. Gavanescu, I., B. Kessler, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis. 2007. Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:4583-4587.
 103. Belkaid, Y. 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature reviews* 7:875-888.
 104. Williams, L.M., and A.Y. Rudensky. 2007. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nature immunology* 8:277-284.

105. Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M.J. Lenardo. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature immunology* 8:1353-1362.
106. Akbar, A.N., M. Vukmanovic-Stejic, L.S. Taams, and D.C. Macallan. 2007. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. *Nature reviews* 7:231-237.
107. Trede, N.S., D.M. Langenau, D. Traver, A.T. Look, and L.I. Zon. 2004. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* 20:367-379.
108. Schmitt, T.M., and J.C. Zuniga-Pflucker. 2006. T-cell development, doing it in a dish. *Immunological reviews* 209:95-102.
109. Suzuki, K., T. Oida, H. Hamada, O. Hitotsumatsu, M. Watanabe, T. Hibi, H. Yamamoto, E. Kubota, S. Kaminogawa, and H. Ishikawa. 2000. Gut cryptopatches: direct evidence of extrathymic anatomical sites for intestinal T lymphopoiesis. *Immunity* 13:691-702.
110. 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. *The Journal of experimental medicine* 182:759-767.
111. Rocha, B. 2007. The extrathymic T-cell differentiation in the murine gut. *Immunological reviews* 215:166-177.
112. Guy-Grand, D., O. Azogui, S. Celli, S. Darche, M.C. Nussenzweig, P. Kourilsky, and P. Vassalli. 2003. Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *The Journal of experimental medicine* 197:333-341.
113. Maillard, I., B.A. Schwarz, A. Sambandam, T. Fang, O. Shestova, L. Xu, A. Bhandoola, and W.S. Pear. 2006. Notch-dependent T-lineage commitment occurs at extrathymic sites following bone marrow transplantation. *Blood* 107:3511-3519.
114. Barreto, C.B., R.B. Azeredo, and R. Fuchs. 2003. Extrathymic T cells expand in nude mice following different allogeneic stimuli. *Immunobiology* 207:339-349.
115. Mannoor, M.K., R.C. Halder, S.R. Morshed, A. Ariyasinghe, H.Y. Bakir, H. Kawamura, H. Watanabe, H. Sekikawa, and T. Abo. 2002. Essential role of extrathymic T cells in protection against malaria. *J Immunol* 169:301-306.
116. Taniguchi, T., S. Tachikawa, Y. Kanda, T. Kawamura, C. Tomiyama-Miyaji, C. Li, H. Watanabe, H. Sekikawa, and T. Abo. 2007. Malaria protection in beta 2-microglobulin-deficient mice lacking major histocompatibility complex class I antigens: essential role of innate immunity, including gammadelta T cells. *Immunology* 122:514-521.
117. 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.
118. Gomez-Lechon, M.J. 1999. Oncostatin M: signal transduction and biological activity. *Life sciences* 65:2019-2030.
119. Clegg, C.H., H.S. Haugen, J.T. Rulffes, S.L. Friend, and A.G. Farr. 1999. Oncostatin M transforms lymphoid tissue function in transgenic mice by

- stimulating lymph node T-cell development and thymus autoantibody production. *Experimental hematology* 27:712-725.
120. 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.
 121. Blais, M.E., G. Gerard, M.M. Martinic, G. Roy-Proulx, R.M. Zinkernagel, and C. Perreault. 2004. Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses? *Blood* 103:3102-3110.
 122. Louis, I., G. Dulude, S. Corneau, S. Brochu, C. Boileau, C. Meunier, C. Cote, N. Labrecque, and C. Perreault. 2003. Changes in the lymph node microenvironment induced by oncostatin M. *Blood* 102:1397-1404.
 123. Terra, R., N. Labrecque, and C. Perreault. 2002. Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules. *J Immunol* 169:684-692.
 124. Martinic, M.M., T. Rulicke, A. Althage, B. Odermatt, M. Hochli, A. Lamarre, T. Dumrese, D.E. Speiser, D. Kyburz, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 2003. Efficient T cell repertoire selection in tetraparental chimeric mice independent of thymic epithelial MHC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1861-1866.
 125. Li, W., M.G. Kim, T.S. Gourley, B.P. McCarthy, D.B. Sant'Angelo, and C.H. Chang. 2005. An alternate pathway for CD4 T cell development: thymocyte-expressed MHC class II selects a distinct T cell population. *Immunity* 23:375-386.
 126. Blais, M.E., I. Louis, and C. Perreault. 2006. T-cell development: an extrathymic perspective. *Immunological reviews* 209:103-114.
 127. Krueger, A., and H. von Boehmer. 2007. Identification of a T lineage-committed progenitor in adult blood. *Immunity* 26:105-116.
 128. Terra, R., I. Louis, R. Le Blanc, S. Ouellet, J.C. Zuniga-Pflucker, and C. Perreault. 2005. T-cell generation by lymph node resident progenitor cells. *Blood* 106:193-200.
 129. Boehm, T., and C.C. Bleul. 2007. The evolutionary history of lymphoid organs. *Nature immunology* 8:131-135.
 130. Miller, R.A. 1996. The aging immune system: primer and prospectus. *Science (New York, N.Y)* 273:70-74.
 131. van Baarle, D., A. Tsegaye, F. Miedema, and A. Akbar. 2005. Significance of senescence for virus-specific memory T cell responses: rapid ageing during chronic stimulation of the immune system. *Immunology letters* 97:19-29.
 132. van den Brink, M.R., O. Alpdogan, and R.L. Boyd. 2004. Strategies to enhance T-cell reconstitution in immunocompromised patients. *Nature reviews* 4:856-867.
 133. Yager, E.J., M. Ahmed, K. Lanzer, T.D. Randall, D.L. Woodland, and M.A. Blackman. 2008. Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus. *The Journal of experimental medicine* 205:711-723.
 134. Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S.I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, and B. Fazekas de St Groth. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7

- receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of experimental medicine* 203:1693-1700.
135. Hickman-Miller, H.D., and W.H. Hildebrand. 2004. The immune response under stress: the role of HSP-derived peptides. *Trends in immunology* 25:427-433.
 136. Zinkernagel, R.M., and R.M. Welsh. 1976. H-2 compatibility requirement for virus-specific T cell-mediated effector functions in vivo. I. Specificity of T cells conferring antiviral protection against lymphocytic choriomeningitis virus is associated with H-2K and H-2D. *J Immunol* 117:1495-1502.
 137. Pinschewer, D.D., M. Perez, A.B. Sanchez, and J.C. de la Torre. 2003. Recombinant lymphocytic choriomeningitis virus expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:7895-7900.
 138. Murali-Krishna, K., J.D. Altman, M. Suresh, D.J. Sourdive, A.J. Zajac, J.D. Miller, J. Slansky, and R. Ahmed. 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8:177-187.
 139. Gallimore, A., A. Glithero, A. Godkin, A.C. Tissot, A. Pluckthun, T. Elliott, H. Hengartner, and R. Zinkernagel. 1998. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *The Journal of experimental medicine* 187:1383-1393.
 140. Berg, L.J. 2007. Signalling through TEC kinases regulates conventional versus innate CD8(+) T-cell development. *Nature reviews* 7:479-485.
 141. Tilloy, F., E. Treiner, S.H. Park, C. Garcia, F. Lemonnier, H. de la Salle, A. Bendelac, M. Bonneville, and O. Lantz. 1999. An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *The Journal of experimental medicine* 189:1907-1921.
 142. Kerksiek, K.M., D.H. Busch, I.M. Pilip, S.E. Allen, and E.G. Pamer. 1999. H2-M3-restricted T cells in bacterial infection: rapid primary but diminished memory responses. *The Journal of experimental medicine* 190:195-204.
 143. Berg, R.E., C.J. Cordes, and J. Forman. 2002. Contribution of CD8+ T cells to innate immunity: IFN-gamma secretion induced by IL-12 and IL-18. *European journal of immunology* 32:2807-2816.
 144. Seaman, M.S., C.R. Wang, and J. Forman. 2000. MHC class Ib-restricted CTL provide protection against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 165:5192-5201.
 145. Perarnau, B., M.F. Saron, B.R. San Martin, N. Bervas, H. Ong, M.J. Soloski, A.G. Smith, J.M. Ure, J.E. Gairin, and F.A. Lemonnier. 1999. Single H2Kb, H2Db and double H2KbDb knockout mice: peripheral CD8+ T cell repertoire and anti-lymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses. *European journal of immunology* 29:1243-1252.
 146. Anderson, G., N.C. Moore, J.J. Owen, and E.J. Jenkinson. 1996. Cellular interactions in thymocyte development. *Annual review of immunology* 14:73-99.

147. Urdahl, K.B., J.C. Sun, and M.J. Bevan. 2002. Positive selection of MHC class Ib-restricted CD8(+) T cells on hematopoietic cells. *Nature immunology* 3:772-779.
148. Atherly, L.O., J.A. Lucas, M. Felices, C.C. Yin, S.L. Reiner, and L.J. Berg. 2006. The Tec family tyrosine kinases Itk and Rlk regulate the development of conventional CD8+ T cells. *Immunity* 25:79-91.
149. Broussard, C., C. Fleischacker, R. Horai, M. Chetana, A.M. Venegas, L.L. Sharp, S.M. Hedrick, B.J. Fowlkes, and P.L. Schwartzberg. 2006. Altered development of CD8+ T cell lineages in mice deficient for the Tec kinases Itk and Rlk. *Immunity* 25:93-104.
150. Dubois, S., T.A. Waldmann, and J.R. Muller. 2006. ITK and IL-15 support two distinct subsets of CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:12075-12080.
151. Horai, R., K.L. Mueller, R.A. Handon, J.L. Cannons, S.M. Anderson, M.R. Kirby, and P.L. Schwartzberg. 2007. Requirements for selection of conventional and innate T lymphocyte lineages. *Immunity* 27:775-785.
152. Sharrow, S.O., B.J. Mathieson, and A. Singer. 1981. Cell surface appearance of unexpected host MHC determinants on thymocytes from radiation bone marrow chimeras. *J Immunol* 126:1327-1335.
153. Choi, E.Y., K.C. Jung, H.J. Park, D.H. Chung, J.S. Song, S.D. Yang, E. Simpson, and S.H. Park. 2005. Thymocyte-thymocyte interaction for efficient positive selection and maturation of CD4 T cells. *Immunity* 23:387-396.
154. den Haan, J.M., and M.J. Bevan. 2000. A novel helper role for CD4 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:12950-12952.
155. Li, W., M.H. Sofi, N. Yeh, S. Sehra, B.P. McCarthy, D.R. Patel, R.R. Brutkiewicz, M.H. Kaplan, and C.H. Chang. 2007. Thymic selection pathway regulates the effector function of CD4 T cells. *The Journal of experimental medicine* 204:2145-2157.
156. Karrer, U., A. Althage, B. Odermatt, C.W. Roberts, S.J. Korsmeyer, S. Miyawaki, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1997. On the key role of secondary lymphoid organs in antiviral immune responses studied in alymphoplastic (aly/aly) and spleenless (Hox11(-)/-) mutant mice. *The Journal of experimental medicine* 185:2157-2170.
157. Link, A., T.K. Vogt, S. Favre, M.R. Britschgi, H. Acha-Orbea, B. Hinz, J.G. Cyster, and S.A. Luther. 2007. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nature immunology* 8:1255-1265.
158. Sapozhnikov, A., J.A. Fischer, T. Zaft, R. Krauthgamer, A. Dzionek, and S. Jung. 2007. Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 204:1923-1933.
159. Blais, M.E., S. Brochu, M. Giroux, M.P. Belanger, G. Dulude, R.P. Sekaly, and C. Perreault. 2008. Why T cells of thymic versus extrathymic origin are functionally different. *J Immunol* 180:2299-2312.
160. Jabbari, A., and J.T. Harty. 2005. Cutting edge: differential self-peptide/MHC requirement for maintaining CD8 T cell function versus homeostatic proliferation. *J Immunol* 175:4829-4833.

161. Prlic, M., B.R. Blazar, A. Khoruts, T. Zell, and S.C. Jameson. 2001. Homeostatic expansion occurs independently of costimulatory signals. *J Immunol* 167:5664-5668.
162. McNally, J.M., C.C. Zarozinski, M.Y. Lin, M.A. Brehm, H.D. Chen, and R.M. Welsh. 2001. Attrition of bystander CD8 T cells during virus-induced T-cell and interferon responses. *Journal of virology* 75:5965-5976.
163. Min, B., R. McHugh, G.D. Sempowski, C. Mackall, G. Foucras, and W.E. Paul. 2003. Neonates support lymphopenia-induced proliferation. *Immunity* 18:131-140.
164. Marks-Konczalik, J., S. Dubois, J.M. Losi, H. Sabzevari, N. Yamada, L. Feigenbaum, T.A. Waldmann, and Y. Tagaya. 2000. IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:11445-11450.
165. Rathmell, J.C., and C.B. Thompson. 2002. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109 Suppl:S97-107.
166. Guimond, M., T.J. Fry, and C.L. Mackall. 2005. Cytokine signals in T-cell homeostasis. *J Immunother (1997)* 28:289-294.
167. Bosco, N., F. Agenes, and R. Ceredig. 2005. Effects of increasing IL-7 availability on lymphocytes during and after lymphopenia-induced proliferation. *J Immunol* 175:162-170.
168. Bach, E.A., S.J. Szabo, A.S. Dighe, A. Ashkenazi, M. Aguet, K.M. Murphy, and R.D. Schreiber. 1995. Ligand-induced autoregulation of IFN-gamma receptor beta chain expression in T helper cell subsets. *Science (New York, N.Y)* 270:1215-1218.
169. Refaeli, Y., L. Van Parijs, S.I. Alexander, and A.K. Abbas. 2002. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 196:999-1005.
170. Ge, Q., H. Hu, H.N. Eisen, and J. Chen. 2002. Different contributions of thymopoiesis and homeostasis-driven proliferation to the reconstitution of naive and memory T cell compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:2989-2994.
171. 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.
172. Ferreira, C., T. Barthlott, S. Garcia, R. Zamoyska, and B. Stockinger. 2000. Differential survival of naive CD4 and CD8 T cells. *J Immunol* 165:3689-3694.
173. Fortner, K.A., and R.C. Budd. 2005. The death receptor Fas (CD95/APO-1) mediates the deletion of T lymphocytes undergoing homeostatic proliferation. *J Immunol* 175:4374-4382.
174. Krupica, T., Jr., T.J. Fry, and C.L. Mackall. 2006. Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 120:121-128.
175. Vanasek, T.L., S.L. Nandiwada, M.K. Jenkins, and D.L. Mueller. 2006. CD25+Foxp3+ regulatory T cells facilitate CD4+ T cell clonal anergy induction during the recovery from lymphopenia. *J Immunol* 176:5880-5889.

176. Shen, S., Y. Ding, C.E. Tadokoro, D. Olivares-Villagomez, M. Camps-Ramirez, M.A. Curotto de Lafaille, and J.J. Lafaille. 2005. Control of homeostatic proliferation by regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation* 115:3517-3526.
177. Bosco, N., F. Agenes, A.G. Rolink, and R. Ceredig. 2006. Peripheral T cell lymphopenia and concomitant enrichment in naturally arising regulatory T cells: the case of the pre-Talpha gene-deleted mouse. *J Immunol* 177:5014-5023.
178. Wang, Z., J. Hong, W. Sun, G. Xu, N. Li, X. Chen, A. Liu, L. Xu, B. Sun, and J.Z. Zhang. 2006. Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4+ CD25- T cells to CD4+ Tregs. *The Journal of clinical investigation* 116:2434-2441.
179. Konieczny, B.T., Z. Dai, E.T. Elwood, S. Saleem, P.S. Linsley, F.K. Baddoura, C.P. Larsen, T.C. Pearson, and F.G. Lakkis. 1998. IFN-gamma is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T cell costimulation pathways. *J Immunol* 160:2059-2064.
180. Wood, K.J., and B. Sawitzki. 2006. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. *Trends in immunology* 27:183-187.
181. Hassan, A.T., Z. Dai, B.T. Konieczny, G.H. Ring, F.K. Baddoura, L.H. Abou-Dahab, A.A. El-Sayed, and F.G. Lakkis. 1999. Regulation of alloantigen-mediated T-cell proliferation by endogenous interferon-gamma: implications for long-term allograft acceptance. *Transplantation* 68:124-129.
182. Yu, X.Z., M.H. Albert, P.J. Martin, and C. Anasetti. 2004. CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN-gamma-dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. *The Journal of clinical investigation* 113:1624-1630.
183. Gran, B., N. Chu, G.X. Zhang, S. Yu, Y. Li, X.H. Chen, M. Kamoun, and A. Rostami. 2004. Early administration of IL-12 suppresses EAE through induction of interferon-gamma. *Journal of neuroimmunology* 156:123-131.
184. Peschon, J.J., P.J. Morrissey, K.H. Grabstein, F.J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B.C. Gliniak, L.S. Park, S.F. Ziegler, D.E. Williams, C.B. Ware, J.D. Meyer, and B.L. Davison. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 180:1955-1960.
185. Moxham, V.F., J. Karegli, R.E. Phillips, K.L. Brown, T.T. Tapmeier, R. Hangartner, S.H. Sacks, and W. Wong. 2008. Homeostatic proliferation of lymphocytes results in augmented memory-like function and accelerated allograft rejection. *J Immunol* 180:3910-3918.
186. Tang, Q., J.Y. Adams, A.J. Tooley, M. Bi, B.T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R.M. Locksley, M.F. Krummel, and J.A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nature immunology* 7:83-92.
187. Banz, A., A. Peixoto, C. Pontoux, C. Cordier, B. Rocha, and M. Papiernik. 2003. A unique subpopulation of CD4+ regulatory T cells controls wasting disease, IL-10 secretion and T cell homeostasis. *European journal of immunology* 33:2419-2428.

188. Blais, M.E., I. Louis, S. Corneau, G. Gerard, R. Terra, and C. Perreault. 2003. Extrathymic T-lymphocyte development. *Experimental hematology* 31:349-354.
189. Intlekofer, A.M., N. Takemoto, E.J. Wherry, S.A. Longworth, J.T. Northrup, V.R. Palanivel, A.C. Mullen, C.R. Gasink, S.M. Kaech, J.D. Miller, L. Gapin, K. Ryan, A.P. Russ, T. Lindsten, J.S. Orange, A.W. Goldrath, R. Ahmed, and S.L. Reiner. 2005. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nature immunology* 6:1236-1244.
190. van Grevenynghe, J., F.A. Procopio, Z. He, N. Chomont, C. Riou, Y. Zhang, S. Gimmig, G. Boucher, P. Wilkinson, Y. Shi, B. Yassine-Diab, E.A. Said, L. Trautmann, M.E. Far, R.S. Balderas, M.R. Boulassel, J.P. Routy, E.K. Haddad, and R.P. Sekaly. 2008. Transcription factor FOXO3a controls the persistence of memory CD4(+) T cells during HIV infection. *Nature medicine* 14:266-274.
191. Badovinac, V.P., B.B. Porter, and J.T. Harty. 2004. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nature immunology* 5:809-817.
192. Wan, Y.Y., and R.A. Flavell. 2006. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunological reviews* 212:114-130.
193. Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *The Journal of experimental medicine* 201:723-735.
194. Almeida, A.R., B. Zaragoza, and A.A. Freitas. 2006. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *J Immunol* 177:192-200.
195. Zheng, S.G., J. Wang, P. Wang, J.D. Gray, and D.A. Horwitz. 2007. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol* 178:2018-2027.
196. Lodolce, J., P. Burkett, R. Koka, D. Boone, M. Chien, F. Chan, M. Madonia, S. Chai, and A. Ma. 2002. Interleukin-15 and the regulation of lymphoid homeostasis. *Molecular immunology* 39:537-544.
197. Kieper, W.C., M. Prlic, C.S. Schmidt, M.F. Mescher, and S.C. Jameson. 2001. IL-12 enhances CD8 T cell homeostatic expansion. *J Immunol* 166:5515-5521.
198. Devadas, S., L. Zaritskaya, S.G. Rhee, L. Oberley, and M.S. Williams. 2002. Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *The Journal of experimental medicine* 195:59-70.
199. Wherry, E.J., S.J. Ha, S.M. Kaech, W.N. Haining, S. Sarkar, V. Kalia, S. Subramaniam, J.N. Blattman, D.L. Barber, and R. Ahmed. 2007. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27:670-684.
200. Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E.A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M.R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R.S. Balderas, J.P. Routy, E.K. Haddad, and R.P. Sekaly. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-

- specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature medicine* 12:1198-1202.
201. Kitazawa, Y., M. Fujino, Q. Wang, H. Kimura, M. Azuma, M. Kubo, R. Abe, and X.K. Li. 2007. Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4+CD25+ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses. *Transplantation* 83:774-782.
 202. von Herrath, M.G., and L.C. Harrison. 2003. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nature reviews* 3:223-232.
 203. Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature immunology* 6:1142-1151.
 204. Fantini, M.C., C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P.R. Galle, and M.F. Neurath. 2004. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172:5149-5153.
 205. Letterio, J.J., and A.B. Roberts. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual review of immunology* 16:137-161.
 206. Chung, E.J., S.H. Choi, Y.H. Shim, Y.J. Bang, K.C. Hur, and C.W. Kim. 2000. Transforming growth factor-beta induces apoptosis in activated murine T cells through the activation of caspase 1-like protease. *Cellular immunology* 204:46-54.
 207. Horwitz, D.A., S.G. Zheng, and J.D. Gray. 2003. The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. *Journal of leukocyte biology* 74:471-478.
 208. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
 209. Liu, W., A.L. Putnam, Z. Xu-Yu, G.L. Szot, M.R. Lee, S. Zhu, P.A. Gottlieb, P. Kapranov, T.R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D.M. Soper, S.F. Ziegler, and J.A. Bluestone. 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* 203:1701-1711.
 210. Das, G., S. Sheridan, and C.A. Janeway, Jr. 2001. The source of early IFN-gamma that plays a role in Th1 priming. *J Immunol* 167:2004-2010.
 211. Ford, M.S., Z.X. Zhang, W. Chen, and L. Zhang. 2006. Double-negative T regulatory cells can develop outside the thymus and do not mature from CD8+ T cell precursors. *J Immunol* 177:2803-2809.
 212. King, C., A. Ilic, K. Koelsch, and N. Sarvetnick. 2004. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* 117:265-277.