

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre INRS-Institut Armand-Frappier

RÔLE DE WNT4 DANS L'AMORÇAGE DE LA DIFFÉRENCIATION LYMPHOCYTAIRE

Par
Roxann Hétu-Arbour

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Pascale Duplay
INRS – Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Nathalie Labrecque
Centre de recherche
Hôpital Maisonneuve-Rosemont – Université
de Montréal

Directeur de recherche

Krista Heinonen
INRS – Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Le thymus, le seul organe qui génère des lymphocytes T, reçoit des cellules progénitrices de la moëlle osseuse. Ces progéniteurs ne se sont pas encore engagés dans la lignée lymphocytaire pour la plupart. Des signaux intrinsèques et extrinsèques contribuent à réguler le développement des lymphocytes T, dont font partie les signaux intrathymiques de Wnt, protéine sécrétée par les cellules épithéliales du thymus (TEC). Wnt4 est fortement exprimé par les TEC et les progéniteurs de TEC : il régule directement le nombre de TEC. De plus, les cellules progénitrices de la moëlle osseuse générées dans un environnement où Wnt4 est présent ne sont pas capables de se développer normalement dans un thymus où Wnt4 n'est pas exprimé. Cependant, l'importance de Wnt4 dans la moëlle osseuse pour la différenciation des lymphocytes T n'a pas été rigoureusement étudiée.

L'hypothèse de ce projet est que la délétion de Wnt4 dans la moëlle osseuse entraîne une diminution de la différenciation des lymphocytes T, qui est due à un nombre restreint de progéniteurs et par le fait même à une diminution des précurseurs dans le thymus.

À l'aide de souris $Vav1iCre^+Wnt4^{lox/lox}$ (Wnt4 KO), qui présentent une délétion de la protéine Wnt4 dans les cellules hématopoïétiques, nous avons pu observer une diminution dans le nombre de cellules à différents stades du développement lymphocytaire chez les souris Wnt4 KO. Cette différence est ciblée chez les lymphocytes T, puisque la population de lymphocytes B reste inchangée chez les souris KO. De plus, l'analyse de la moëlle osseuse nous a permis de constater qu'il n'y a pas de différence dans le nombre de cellules progénitrices, contrairement à ce que l'on croyait. Des résultats similaires ont été observés avec des chimères (greffes). Afin de déterminer pourquoi les cellules progénitrices ne sont pas capables de produire autant de lymphocytes T chez les souris Wnt4 KO que chez les souris WT, différents aspects mécanistiques ont été étudiés. Tout d'abord, nous avons vérifié l'expression de CCR9 et CD62L, deux marqueurs importants dans la migration des cellules progénitrices vers le thymus. Nous n'avons pas observé de différences significatives, donc cela ne semble pas être un problème de migration vers le thymus. Nous avons également vérifié si les résultats obtenus étaient dû à un problème d'engagement (ou *commitment*) vers la lignée T lymphocytaire. Premièrement, il y a une diminution de l'expression de IRF4 dans le noyau des souris KO. Il a

été démontré que IRF4 permettait l'engagement des cellules vers la lignée lymphocytaire. Deuxièmement, il y a une diminution de l'expression de Notch1, un récepteur important pour les premières étapes de la différenciation lymphocytaire, chez les précurseurs du thymus des souris KO. De plus, avec une coculture de cellules progénitrices sur une lignée stromale exprimant le ligand de Notch, Delta-like 1, nous avons également pu déterminer que l'effet de Wnt4 est intrinsèque aux progéniteurs, puisque la différenciation des cellules KO est affectée, comme pour les résultats *in vivo*.

Finalement, les résultats démontrent que la présence de Wnt4 dans la moëlle osseuse est importante pour la différenciation lymphocytaire et que cela pourrait être lié à son impact sur la régulation de Notch.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XI
CHAPITRE 1 – REVUE DE LITTÉRATURE	1
1 THYMOPOÏESE	3
1.1 Précurseurs dans la moëlle osseuse	5
1.2 Migration des progéniteurs	7
1.3 Différenciation intrathymique	8
1.4 Signaux impliqués dans l'engagement vers la lignée T	10
1.4.1 Flt3.....	10
1.4.2 Récepteur de l'interleukine-7 (IL-7R).....	11
1.4.3 cKit.....	11
1.4.4 Notch	12
2 LA SIGNALISATION INDUITE PAR WNT.....	18
2.1 Wnt	18
2.2 Les voies de signalisation.....	18
2.2.1 La voie canonique	18
2.2.2 La voie non-canonique : Wnt/PCP	20
2.2.3 La voie non-canonique : Wnt/Ca ²⁺	21
2.3 Wnt dans le développement des thymocytes.....	22
2.4 Wnt4 et le thymus	25
CHAPITRE 2 – PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS	29
CHAPITRE 3 – ARTICLE	33
3 BONE MARROW PROGENITOR CELL-INTRINSIC WNT4 PROMOTES T LYMPOPOIESIS	35
3.1 Résumé en français	36

3.2	Abstract.....	36
3.3	Introduction	37
3.4	Materials and methods	38
	3.4.1 Experimental Animals	38
	3.4.2 Flow cytometry	39
	3.4.3 Co-culture on OP9-DL1 cells.....	39
	3.4.4 Imaging flow cytometry.....	40
	3.4.5 Statistical analysis.....	40
3.5	Results.....	40
	3.5.1 <i>Wnt4</i> deficiency in hematopoietic cells results in decreased thymopoiesis	40
	3.5.2 <i>Wnt4</i> ^{Δ/Δ} progenitors fail at thymic reconstitution in a competitive setting	44
	3.5.3 <i>Wnt4</i> promotes T lineage fate in a cell-intrinsic manner by regulating Notch1 and IRF4.....	45
3.6	Discussion.....	49
3.7	Acknowledgements	51
3.8	Footnotes	52
	CHAPITRE 4 – DISCUSSION.....	53
	CHAPITRE 5 – CONCLUSION.....	61
	RÉFÉRENCES	65
	ANNEXE.....	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Expression des marqueurs de surface des progéniteurs dans la moëlle osseuse .	6
Tableau 1.2	Expression des marqueurs à la surface des thymocytes	8
Tableau 1.3	Rôle des facteurs de transcription	16

LISTE DES FIGURES

REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1.1	Développement des lymphocytes T de la moëlle osseuse au thymus	4
Figure 1.2	Voie de signalisation de Notch	13
Figure 1.3	Expression de différents facteurs de transcription lors du développement des lymphocytes T	15
Figure 2.1	Voie de signalisation canonique de Wnt.....	19
Figure 2.2	Voies de signalisation non-canonique de Wnt : PCP et Ca ²⁺	21

ARTICLE

Figure S3.1	Wnt4 is efficiently ablated in hematopoietic cells but expressed in thymic stroma.	41
Figure 3.1	Hematopoietic Wnt4 is required for T lymphopoiesis.	42
Figure 3.2	Wnt4-deficient HSPCs are present in normal numbers and express cell surface receptors associated with thymus homing.	43
Figure 3.3	Wnt4-deficient HSPCs cannot repopulate the thymus.	44
Figure 3.4	The impact of Wnt4 is cell intrinsic and independent of the thymic 3D structure. ...	46
Figure 3.5	Wnt4 is needed for normal Notch1 expression on ETPs.....	48

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
Bcl11b	<i>B cell lymphoma/leukemia 11B</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma-2</i>
BM	<i>bone marrow, moëlle osseuse</i>
β TRCP	<i>β-transducin-repeat-containing protein</i>
C/EBP α	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
Ca ²⁺	ion calcium
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand, ligand de chimiokines</i>
CCR	<i>chemokine receptor, récepteur de chimiokines</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD62L	L-sélectine
CK1	<i>casein kinase 1</i>
CLP	<i>common lymphoid progenitor, progéniteur lymphoïde commun</i>
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CSH	cellule souche hématopoïétique
cTEC	<i>cortical thymic epithelial cell, TEC du cortex</i>
DAAM	<i>dishevelled-associated activator of morphogenesis</i>
DAG	diacylglycerol
DKO	<i>double knock-out</i>
Dll	<i>delta-like protein</i>
DN	double négative

DP	double positive
Dvl	Dishevelled
Erg	<i>early growth factor</i>
ETP	<i>early thymic progenitor</i>
Flt3	<i>fms-like tyrosine kinase 3</i>
Flt3L	ligand de Flt3
Fzd	<i>frizzled</i>
GSK3 β	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HCT	<i>hematopoietic cell transplant</i>
HSPC	<i>hematopoietic stem/progenitor cell</i>
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule-1</i> , molécule d'adhésion intercellulaire
ICAT	<i>inhibitor of β-catenin and TCF interaction</i>
ICN	<i>intracellular Notch</i>
IFN	interféron
IL-7	interleukine 7
IL-7R	récepteur de l'interleukine 7
IP ₃	inositol triphosphate
IRF4	<i>interferon regulatory factor 4</i>
ISP	<i>immature single positive</i>
Iv	intraveineuse
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KO	<i>knock-out</i>
LEF-1	<i>lymphoid enhancer-binding factor-1</i>
LMPP	<i>lymphoid-primed multipotent progenitor</i> , progéniteur lymphoïde multipotent
LRP	<i>lipoprotein receptor-related</i>
LSK	Lin ⁻ Sca1 ⁺ cKit ⁺

mKitL	ligand membranaire de Kit
MO	moëlle osseuse
MPP	<i>multipotent progenitor</i> , progéniteur multipotent
mTEC	<i>medullary thymic epithelial cell</i> , TEC de la médulla
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NK	<i>natural killer</i>
PCP	<i>planar cell polarity</i> , polarité planaire des cellules
PIP ₂	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
polyIC	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RBPJ	<i>recombining binding protein suppressor of hairless</i>
S1P	sphingosine-1-phosphate
SCF	<i>stem cell factor</i>
sKitL	ligand sécrété de Kit
SP	simple positive
TCF-1	<i>T cell factor-1</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> , récepteur de cellule T
TEC	<i>thymic epithelial cell</i> , cellule épithéliale du thymus
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TSP	<i>thymus-settling progenitor</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i> , molécule d'adhésion cellulaire vasculaire
VEC	<i>vascular endothelial cell</i> , cellule endothéliale vasculaire
WT	<i>wild-type</i> , sauvage

CHAPITRE 1 – REVUE DE LITTÉRATURE

1 THYMOPOÏÈSE

Les lymphocytes T sont des cellules importantes du système immunitaire. Les lymphocytes T naïfs sont d'abord activés lorsqu'ils reconnaissent un antigène (molécule) d'un microorganisme étranger (pathogène) présenté par des cellules présentatrices d'antigènes. S'en suit la différenciation des lymphocytes et une prolifération, nécessaire pour éliminer le pathogène. Ils permettent également d'établir une mémoire contre le microorganisme, permettant à l'hôte de combattre ce dernier efficacement suite à une deuxième infection.

Le thymus est l'organe qui produit les lymphocytes T naïfs suite à l'entrée de progéniteurs qui proviennent de la moëlle osseuse. La genèse de ces cellules dans le thymus est nommée la thymopoïèse et elle est résumée à la Figure 1.1. Lors de ce processus, des progéniteurs lymphoïdes sortent de la moëlle osseuse et migrent vers le thymus. Ces cellules sont doubles négatives (DN) pour CD4 et CD8. Arrivées dans le thymus, elles passent par de multiples étapes de différenciation (DN1 à DN4) selon leur niveau d'engagement vers la lignée T et le réarrangement des chaînes β , γ et δ des récepteurs de cellules T, puis deviennent doubles positives (DP). Suite à la sélection positive et négative, les cellules simples positives (SP) pour CD4 ou CD8 sont prêtes à sortir du thymus et circuler dans le sang.

Étant donné que la thymopoïèse est importante pour maintenir un réservoir de lymphocytes T naïfs diversifiés et ainsi contrer un microorganisme ou un antigène étranger, il est primordial que le processus soit efficace. Malheureusement, plus on avance en âge, moins ce processus est efficace. Tout d'abord, le thymus s'atrophie avec le vieillissement. En effet, la taille du thymus diminue d'environ 3% par année dès l'âge adulte (Goronzy & Weyand, 2005). Cette atrophie est causée par une perte progressive de la production de thymocytes due à des progéniteurs hématopoïétiques de moins en moins nombreux dans la moëlle osseuse (Boehm & Swann, 2013), une diminution du nombre de cellules épithéliales du thymus, une détérioration du microenvironnement thymique et l'altération des facteurs en circulation, comme les hormones, les facteurs de croissance et les cytokines (Dixit, 2010). Cette involution du thymus entraîne un relâchement de la surveillance par le système immunitaire et augmente le risque de contracter des infections émergentes ou un cancer (Dixit, 2010). Les cellules épithéliales du thymus (TEC) sont importantes dans la thymopoïèse pour générer des lymphocytes T

possédant des récepteurs de cellules T (TCR) capable de différencier le soi du non-soi. Avec l'involution et la diminution du nombre de TEC dans le thymus, les lymphocytes T naïfs nouvellement produits, sont moins nombreux, diminuant ainsi la diversité du répertoire et augmentant le risque de ne pas reconnaître un microorganisme ou un antigène étranger.

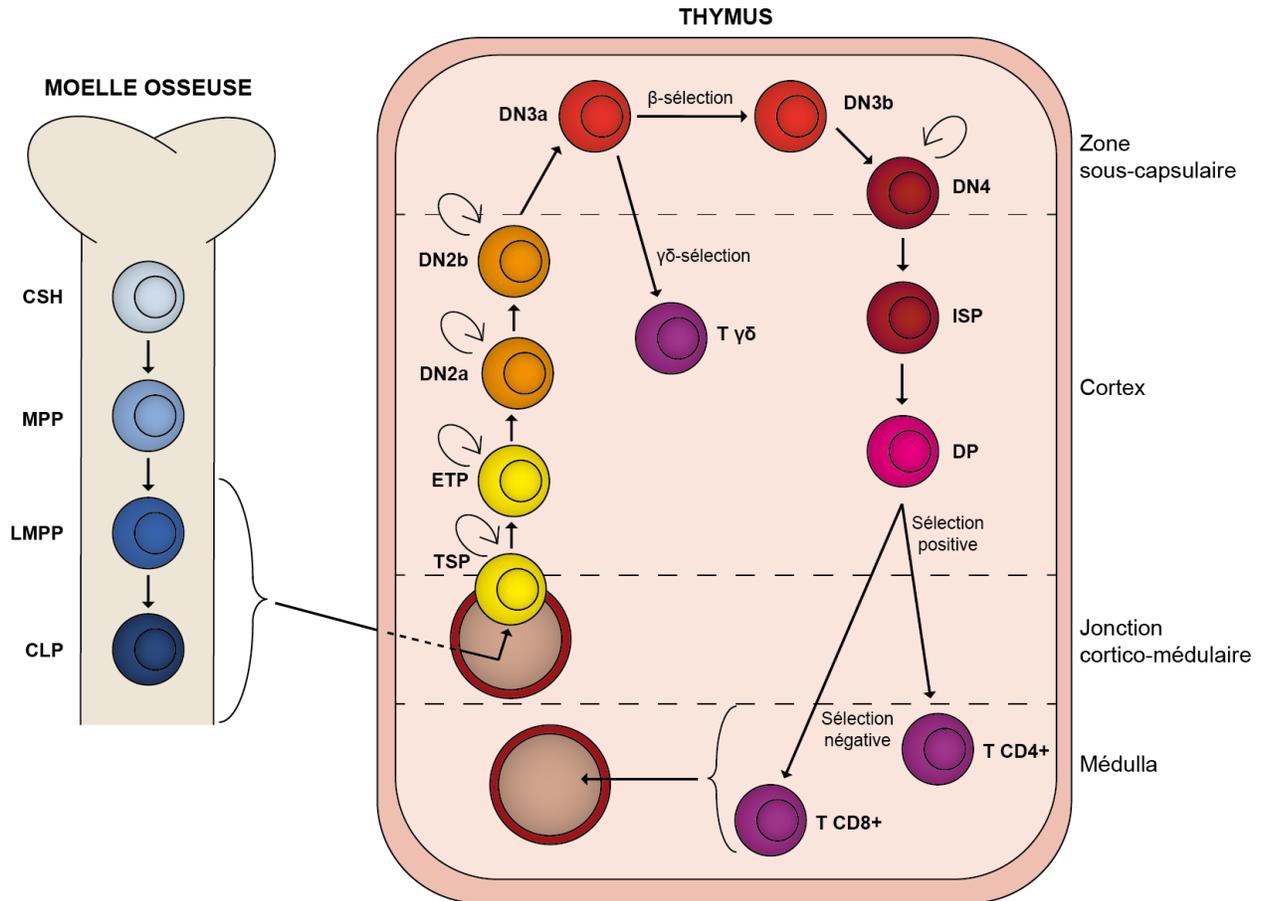


Figure 1.1 Développement des lymphocytes T de la moëlle osseuse au thymus

Dans la moëlle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) se différencient en progéniteurs qui pourront migrer dans le thymus : les LMPP et les CLP. Ils forment une population nommée TSP dans le thymus. Ces cellules sont doubles négatives (DN) pour CD4 et CD8 et, suite à divers étapes de différenciation et de sélection, deviennent des lymphocytes naïfs CD4+ ou CD8+. Chaque étape de la différenciation se produit dans une région précise du thymus, commençant par l'entrée à la jonction cortico-médullaire, la migration dans le cortex, la zone sous-capsulaire, le cortex puis la médulla. Figure inspirée de Love & Bhandoola, 2011.

De plus, l'atrophie du thymus retarde la reconstitution T lymphocytaire suite à une greffe de moëlle osseuse (Dixit, 2010). Cette reconstitution post-greffe repose sur deux mécanismes :

l'expansion périphérique homéostatique des lymphocytes T et la thymopoïèse (de Koning *et al.*, 2016). La personne qui reçoit une greffe doit être préparée à la transplantation en suivant des traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie. Ces traitements endommagent grandement le thymus, empêchant la reconstitution à court terme, particulièrement la thymopoïèse. La production de lymphocytes T après la greffe se fait d'abord par l'expansion des lymphocytes dans la périphérie, mais l'immunité est limitée par le nombre restreint de clones indépendants. La thymopoïèse pourra améliorer la diversité du répertoire, nécessaire à une bonne défense contre un agent étranger, en produisant de nouvelles cellules T naïves avec des TCR différents à leur surface, augmentant ainsi leur quantité (de Koning *et al.*, 2016).

Il serait donc intéressant de développer des stratégies pour améliorer la reconstitution thymique après la greffe de moëlle osseuse et les traitements préparatoires qui endommagent le thymus. Nous avons identifié un candidat intéressant qui permettrait d'atteindre cet objectif : Wnt4.

1.1 Précurseurs dans la moëlle osseuse

Les lymphocytes T, comme toutes les cellules du système sanguin, proviennent initialement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentes dans la moëlle osseuse (MO) (voir Figure 1.1). En plus de s'auto-renouveler pour maintenir le réservoir de cellules souches, les CSH se différencient en cellules progénitrices multipotentes (MPP : *multipotent progenitors*). L'étape de différenciation étant irréversible, les MPP pourront seulement s'engager vers des lignées de cellules matures, sans avoir un biais pour une lignée spécifique. Ces MPP peuvent notamment se différencier en progéniteurs lymphoïdes multipotents (LMPP : *lymphoid-primed multipotent progenitors*). Ces derniers expriment fortement le récepteur Flt3 (*fms-like tyrosine kinase 3*) et des gènes spécifiques aux cellules lymphoïdes. De plus, ils ont perdu la capacité de se différencier en érythrocytes et en mégacaryocytes (Zlotoff *et al.*, 2008). Chez la souris, ces trois types de cellules (CSH, MPP et LMPP) font partie d'un groupe de cellules nommé LSK, qui n'expriment aucun récepteur de cellules matures (Lin⁻) et qui expriment Sca-1 et cKit (voir Tableau 1.1). Les LMPP peuvent ensuite produire des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP : *common lymphoid progenitor*). Ces derniers ne font pas partie des LSK puisqu'ils expriment peu cKit (cKit^{+/-}), mais ils expriment Flt3. Les CLP sont définis comme étant des précurseurs de la lignée lymphoïde (Zlotoff *et al.*, 2008). Cependant, les CLP sont connus pour

produire surtout des lymphocytes B, des cellules NK et des cellules dendritiques plasmacytoïdes et peu de lymphocytes T (Famili *et al.*, 2017).

Tableau 1.1 Expression des marqueurs de surface des progéniteurs dans la moëlle osseuse

CELLULES PROGENITRICES		MARQUEURS DE SURFACE
LSK		Lin ⁻ Sca-1 ⁺ cKit ⁺
HSC	Cellule souche hématopoïétique <i>Hematopoietic stem cell</i>	LSK CD150 ⁺ CD135 ⁻ CD48 ⁻
MPP	Progéniteur multipotent <i>Multipotent progenitor</i>	LSK CD150 ⁻ CD135 ⁻ CD48 ⁺
LMPP	Progéniteur lymphoïde multipotent <i>Lymphoid-primed multipotent progenitor</i>	LSK CD150 ⁻ CD135 ⁺ CD48 ⁺
CLP	Progéniteur lymphoïde commun <i>Common lymphoid progenitor</i>	Lin ⁻ Sca-1 ^{+/-} cKit ^{+/-} CD135 ⁺ CD127 ⁺

CD135, Fms-related tyrosine kinase 3 (Flt3); CD127, récepteur α de l'IL-7 (IL-7R α)

Compilation de sources diverses (Adolfsson *et al.*, 2005; Bhandoola & Sambandam, 2006; Kondo *et al.*, 1997; Pietras *et al.*, 2015; Sitnicka *et al.*, 2002)

Toutes les cellules décrites précédemment peuvent se différencier en lymphocytes T lorsqu'elles sont dans l'environnement thymique. Cependant, seuls les LMPP et les CLP ont la capacité de générer rapidement (après trois semaines seulement) des lymphocytes T lorsqu'elles sont injectées par voie intraveineuse (iv) (Schwarz *et al.*, 2007). En effet, seul les LMPP et les CLP possèdent des récepteurs, dont CCR9, qui vont leur permettre de migrer et entrer dans le thymus (Love & Bhandoola, 2011; Sambandam *et al.*, 2008; Zlotoff *et al.*, 2008). Les CSH et les MPP pourront aussi générer des lymphocytes T, mais ils devront d'abord passer par la moëlle osseuse et acquérir les récepteurs requis pour entrer dans le thymus, ce qui retardera la thymopoïèse.

1.2 Migration des progéniteurs

Les cellules progénitrices qui entrent dans le thymus sont nommées *thymus-settling progenitors* (TSP) (voir Tableau 1.2). Cette population est composée de LMPP et de CLP. Elles arrivent dans le thymus à la jonction cortico-médullaire via des veinules post-capillaires. Tout d'abord, pour entrer dans le thymus, elles doivent exprimer à leur surface les récepteurs de chimiokines CCR7 et CCR9 et le ligand de la sélectine-P (PSGL-1). L'interaction de PSGL-1 avec la sélectine-P, qui est présente sur l'endothélium du thymus, va ralentir les progéniteurs qui circulent dans le sang. Cela leur permettra de répondre à un gradient de chimiokines CCL19, exprimé par les TEC de la médulla (mTEC), via son interaction avec CCR7 (Gossens *et al.*, 2009; Zlotoff *et al.*, 2010). Le récepteur CCR9 interagira avec la chimiokine CCL25, fortement exprimée sur l'endothélium et dans une moindre mesure sur les mTEC et les TEC du cortex (cTEC). Les TSP pourront ensuite adhérer fortement à la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM-1) et à la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire (VCAM-1) via des intégrines, s'arrêter sur l'endothélium thymique et entrer dans le thymus (Gossens *et al.*, 2009; Scimone *et al.*, 2006; Zlotoff *et al.*, 2010).

L'entrée de ces cellules ne se fait pas de façon continue, mais plutôt par vagues (Prockop & Petrie, 2004). En effet, l'expression de la sélectine-P sur les TEC est cyclique, tout comme celle de CCL25 (Gossens *et al.*, 2009). Le nombre de cellules doubles négatives pour CD4 et CD8 (DN) dans le thymus influence l'entrée de nouveaux TSP. Le nombre de cellules en phase DN3, qui n'expriment pas CD44 et expriment CD25 (voir Tableau 1.2), corrèle le mieux avec la capacité de reconstitution du thymus. En effet, suite à l'analyse des lignées de souris knockout (KO) pour différents éléments impliqués dans la différenciation lymphocytaire, le thymus est résistant à la reconstitution lorsque le nombre de DN3 est supérieur ou équivalent au nombre de DN3 chez la souris contrôle. Lorsque le nombre de DN3 est inférieur, il est sensible à la reconstitution par des TSP (Prockop & Petrie, 2004). L'importation de TSP est donc limitée par la disponibilité des cellules stromales de la niche et est initiée par la diminution de DN dans le thymus (Prockop & Petrie, 2004). De plus, l'expression de la sélectine-P et de CCL25 est augmentée lorsque le thymus est sensible à l'importation de TSP (Gossens *et al.*, 2009). L'émigration de lymphocytes T entraîne l'augmentation dans le plasma du niveau de sphingosine-1-phosphate (S1P). L'interaction de S1P à son récepteur à la surface des cellules du thymus régule à la hausse l'expression de la sélectine-P, ce qui favorise de nouveau l'entrée des TSP (Bunting *et al.*, 2011; Gossens *et al.*, 2009).

Tableau 1.2 Expression des marqueurs à la surface des thymocytes

POPULATIONS		MARQUEURS DE SURFACE
TSP ^a	<i>Thymus-settling progenitor</i>	
DN1 (ETP)	Double négative 1 / Early thymocyte progenitor	Lin ⁺ Sca1 ⁺⁺⁺ cKit ⁺⁺⁺ CD44 ⁺⁺⁺ CD25 ⁻ CD27 ⁺⁺⁺
DN2a	Double négative 2 (pré-engagement)	Lin ⁺ cKit ⁺⁺⁺ CD44 ⁺⁺⁺ CD25 ⁺⁺ CD27 ⁺⁺
DN2b	Double négative 2 (post-engagement)	Lin ⁺ cKit ⁺⁺ CD44 ⁺ CD25 ⁺⁺ CD27 ⁺⁺
DN3a	Double négative 3 (pré-β-sélection)	Lin ⁺ cKit ^{+/-} CD44 ⁻ CD25 ⁺⁺ CD27 ⁻
DN3b	Double négative 3 (post-β-sélection)	Lin ⁺ cKit ^{+/-} CD44 ⁻ CD25 ⁺⁺ CD27 ⁺⁺⁺
DN4	Double négative 4	Lin ⁺ cKit ⁺ CD44 ⁻ CD25 ⁻
ISP	Simple positive immature	CD3 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁺
DP	Double positive	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺

^a Les TSP regroupent les LMPP et les CLP, voir le Tableau 1.1 pour les marqueurs de surface.

Compilation de sources diverses (Love & Bhandoola, 2011; Rolink *et al.*, 2007; Rothenberg *et al.*, 2013; Taghon *et al.*, 2006; Yui & Rothenberg, 2014)

1.3 Différenciation intrathymique

Les TSP prolifèrent et génèrent des *early thymocyte progenitors* (ETP) (Love & Bhandoola, 2011) (voir Figure 1.1). Les ETP appartiennent à la première sous-population des cellules doubles négatives pour CD4 et CD8 (DN), soit les DN1 (voir Tableau 1.2). Traditionnellement, les différents sous-groupes de thymocytes DN sont définis par l'expression de CD44 et CD25. Le sous-groupe DN1 était alors défini comme CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ CD44⁺ CD25⁻. Cependant, cette définition regroupe les précurseurs des lymphocytes T et d'autres précurseurs, qui peuvent se différencier en cellules dendritiques, cellules NK ou lymphocytes B à ce stade du

développement. cKit (CD117) est devenue utile pour distinguer les précurseurs des lymphocytes T des autres précurseurs puisqu'il est exprimé sur la sous-population de DN1 qui a le meilleur potentiel de différenciation en lymphocytes T et les DN2. De plus, cKit permet de bien distinguer les DN2 (cKit⁺) et les DN3 (cKit⁻) (Ceredig & Rolink, 2002; Prockop & Petrie, 2004). Même si les ETP sont dans le thymus, ils ne sont pas encore engagés vers la lignée des lymphocytes T. Les ETP vont migrer vers la zone sous-capsulaire à travers le cortex, tout en proliférant et se différenciant en DN2 puis en DN3 (voir Figure 1.1). La population de DN2 est formée de 2 sous-groupes : DN2a et DN2b, divisés selon leur niveau d'expression de cKit (voir Tableau 1.2). L'engagement des cellules vers la lignée des lymphocytes T se fait lors de la transition de DN2a vers DN2b. Les DN2b ont donc perdu leur capacité de se différencier en d'autres lignées que les cellules T. Les cellules DN3 peuvent également être définies en DN3a et DN3b (voir Tableau 1.2). Un arrêt du cycle cellulaire survient pendant la phase DN3a (pré-sélection β) pour permettre le réarrangement de la chaîne β du récepteur de cellule T (TCR β). Le TCR β produit, couplé à la chaîne invariable pré-T α , forme le complexe pré-TCR. Survient alors la sélection β : un signal par le pré-TCR induit la survie, la prolifération et la différenciation de DN3b (post-sélection β) à DN4. Les cellules qui passent la sélection β poursuivent la différenciation vers les lymphocytes T $\alpha\beta$. Lorsque la chaîne β n'est pas exprimée à la surface, les DN3a peuvent devenir des lymphocytes T $\gamma\delta$ suite au réarrangement des TCR γ et TCR δ (Taghon *et al.*, 2006). Les DN3b migrent de nouveau dans le cortex, vers la médulla. La prolifération se poursuit pendant la phase DN4. Les DN4 commencent à exprimer CD8, devenant ainsi des ISP (*immature single positive*), puis CD4 pour devenir des cellules doubles positives pour CD4 et CD8 (DP). Les cellules DP représentent environ 80% des thymocytes (Fry & Mackall, 2002). Un second arrêt de prolifération survient pour permettre aux cellules de réarranger la chaîne alpha du TCR (TCR α). Un réarrangement efficace produira le récepteur TCR $\alpha\beta$. Survient alors les sélections positive et négative, nécessaire pour que les lymphocytes T matures soient restreints au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du soi et tolérants au soi.

La sélection positive survient dans le cortex, où le TCR $\alpha\beta$ est mis à l'épreuve : il doit reconnaître le CMH qui présente un antigène du soi. Les cellules qui possèdent un TCR qui ne reconnaît pas le CMH du soi meurent car elles ne reçoivent pas de signal de survi du TCR. Les DP qui réussissent la sélection positive deviendront simple positive (SP) pour CD4 ou CD8. S'ils reconnaissent le CMH de classe I, les lymphocytes seront SP pour CD8 et nommés

lymphocytes T cytotoxiques. S'ils reconnaissent le CMH de classe II, ils seront SP pour CD4 et nommés lymphocytes T auxiliaires. Les cellules qui survivent migrent ensuite vers la médulla où se produit la sélection négative. Lors de cette deuxième sélection, les mTEC et les cellules dendritiques présentent des antigènes du soi aux thymocytes. Si le TCR a une trop grande affinité avec le complexe CMH-peptide, la cellule entrera en apoptose. Pour survivre, les cellules doivent interagir faiblement avec le complexe CMH-peptide (Klein *et al.*, 2014). Les lymphocytes T naïfs ainsi produits sortiront du thymus pour aller dans la périphérie via le réseau sanguin (Famili *et al.*, 2017; Love & Bhandoola, 2011; Takaba & Takayanagi, 2017).

1.4 Signaux impliqués dans l'engagement vers la lignée T

1.4.1 Flt3

Flt3, un récepteur transmembranaire tyrosine kinase, est exprimé sur les LMPP et les ETP précoces. Ces derniers possèdent le potentiel de devenir des cellules B (Sambandam *et al.*, 2005). Ce potentiel est perdu lorsque les ETP n'expriment plus Flt3, ce qui coïncide avec l'activation de la signalisation de Notch dans le thymus (Sambandam *et al.*, 2008). La signalisation de Flt3 dans les LMPP est nécessaire pour l'expression de CCR9 (Sambandam *et al.*, 2008). Le ligand de Flt3 (Flt3L) est exprimé par les fibroblastes périvasculaires au site d'entrée des progéniteurs dans le thymus. L'interaction Flt3-Flt3L permet de maintenir le nombre de ETP et de DN2 dans le thymus après l'entrée des TSP, car les souris Flt3L^{-/-} ont une réduction d'environ 90% des ETP/DN2 comparativement aux souris contrôles (Kenins *et al.*, 2010; Sambandam *et al.*, 2005). Étant exprimé seulement au tout début de la thymopoïèse, Flt3 ne semble pas important lors de la différenciation.

Flt3 n'a pas le même rôle chez l'humain que chez la souris. Chez la souris, l'augmentation de l'expression de Flt3 sur les CSH entraîne la diminution de la capacité de la cellule à s'auto-renouveler. Le *stem cell factor* (SCF) est habituellement beaucoup plus important comme facteur de viabilité chez la souris que Flt3L. Au contraire, chez l'humain, Flt3L semble être un facteur de survie plus important que le SCF (Sitnicka *et al.*, 2003).

1.4.2 Récepteur de l'interleukine-7 (IL-7R)

L'interaction entre l'interleukine-7 (IL-7) et son récepteur est importante pour la prolifération et l'expansion des DN avant la sélection β (Balciunaite *et al.*, 2005). L'IL-7 est exprimé dans le thymus par les cellules épithéliales qui expriment également le CMH de classe II (Oosterwegel *et al.*, 1997). Il permet la survie et la prolifération des DN (Conlon *et al.*, 1989; von Freeden-Jeffry *et al.*, 1997) et favorise le réarrangement du TCR β et TCR γ en culture (Peschon *et al.*, 1994). La signalisation de l'IL-7R permet la génération de cellules T CD8+. Effectivement, lorsque cette signalisation est bloquée, il n'y a pas de lymphocytes T CD8+ produits, mais cela n'affecte pas la production de lymphocytes T CD4+ (Brugnera *et al.*, 2000). De plus, l'administration d'IL-7 suite à une greffe de moëlle osseuse améliore la thymopoïèse et régénère la population de lymphocytes T (de Koning *et al.*, 2016; Fry & Mackall, 2002; Mackall *et al.*, 2001).

Le récepteur de l'IL-7 (IL-7R) est composé de l'IL-7R α et de la chaîne commune γ . Il est exprimé sur les CLP. Les ETP expriment l'IL-7R faiblement, mais cette expression augmente avec le passage des ETP à DN2a (Yui & Rothenberg, 2014). La délétion de l'IL-7R α entraîne une diminution dans le nombre d'ETP (De Obaldia *et al.*, 2013a). De plus, une délétion de l'IL-7 dans le thymus mène à une diminution dans la taille du thymus, résultant en une diminution de la cellularité du thymus et de la rate, et une diminution du nombre de lymphocytes dans le sang. La structure du thymus est toutefois normale (Freeden-Jeffry *et al.*, 1995).

1.4.3 cKit

cKit est un récepteur tyrosine kinase présent à la surface des progéniteurs hématopoïétiques. C'est un récepteur de facteurs de croissance. Son ligand, le *stem cell factor* (SCF), est présent dans le microenvironnement hématopoïétique. Lorsque cKit est muté et n'est pas exprimé à la surface des cellules progénitrices ou que sa signalisation est bloquée par un inhibiteur, il y a une diminution dans le nombre de DN1 et DN2 (Massa *et al.*, 2006; Rodewald *et al.*, 1997). Le gène *cKit* est régulé positivement suite à l'activation de la signalisation de Notch (Massa *et al.*, 2006). Au niveau du thymus, il existe deux groupes de ligand pour cKit (KitL) : le KitL membranaire (mKitL) et le KitL sécrété (sKitL). Le KitL est plus fortement exprimé par les cellules endothéliales vasculaires (VEC : *vascular endothelial cell*) et les cTEC. La présence de mKitL sur les VEC est importante pour maintenir le nombre de thymocytes, particulièrement à

un stade précoce (DN1). C'est la niche des ETP. La présence de mKitL sur les cTEC permet aussi de maintenir le nombre de thymocytes, mais cette fois-ci plutôt au niveau des DN2. mKitL est important pour la survie des ETP en empêchant l'apoptose (Buono *et al.*, 2016). cKit est donc important pour les stades DN1 et DN2, puisqu'il permet aux précurseurs de se lier à la niche (VEC et cTEC respectivement) et de survivre.

1.4.4 Notch

Notch est un récepteur important pour l'engagement des progéniteurs vers la lignée des lymphocytes T. En effet, en absence de Notch1 sur les ETP, ceux-ci vont se différencier en cellules B plutôt qu'en lymphocytes T. De plus, lorsque Notch est surexprimé, un développement de lymphocytes T et une suppression du développement de lymphocytes B se produisent dans la moëlle osseuse. Lorsque le récepteur Notch1 est présent sur les thymocytes, il se lie à son ligand delta-like 4 (Dll-4) exprimé par les cellules épithéliales du thymus. Les phases ETP à DN3, soient les étapes pré- β -sélection, sont dépendantes de Notch. En effet, en absence de Notch, les cellules DN1, DN2 et DN3 ne prolifèrent pas (Balciunaite *et al.*, 2005). De plus, la signalisation de Notch entraîne l'expression de différents facteurs de transcription à différents niveaux au fil du développement, incluant les facteurs de transcription de la lignée des lymphocytes T GATA-3, TCF-1 et Bcl11b et les gènes du TCR, ce qui permet aux cellules de s'engager vers la lignée T (Rothenberg *et al.*, 2013).

La voie de signalisation Notch

La liaison de Notch avec un de ses ligands (Dll-1, -2, -3, -4 ou Jagged-1, -2), entraîne deux clivages protéolytiques du récepteur. Le premier clivage se fait par des métalloprotéinases de la famille ADAM (désintégrine et métalloprotéinase) près de la région transmembranaire à l'extérieur de la cellule, menant à la perte de la partie extracellulaire du récepteur (Radtke *et al.*, 2013). Le deuxième clivage se produit dans le cytoplasme, tout près de la région transmembranaire du récepteur, par un complexe qui comprend une γ -sécrétase (Radtke *et al.*, 2013). La partie intracellulaire du récepteur Notch (ICN : *intracellular Notch*) est alors libérée et transloquée au noyau. Dans le noyau, le ICN se lie au facteur de transcription RBPJ (ou CSL chez l'humain) et dissocie le corépresseur (ex : Mint, Nrarp) qui y est lié. Il recrute un coactivateur (ex : Mastermind/Mam1), permettant la transcription des gènes cibles comme les gènes du TCR et les facteurs de transcription GATA-3, TCF-1 et Bcl11b, essentiel à l'engagement des thymocytes vers la lignée des lymphocytes T. La voie de signalisation est

illustrée à la Figure 1.2 (Famili *et al.*, 2017; Radtke *et al.*, 2013; Rothenberg & Scripture-Adams, 2008; Zúñiga-Pflücker, 2004).

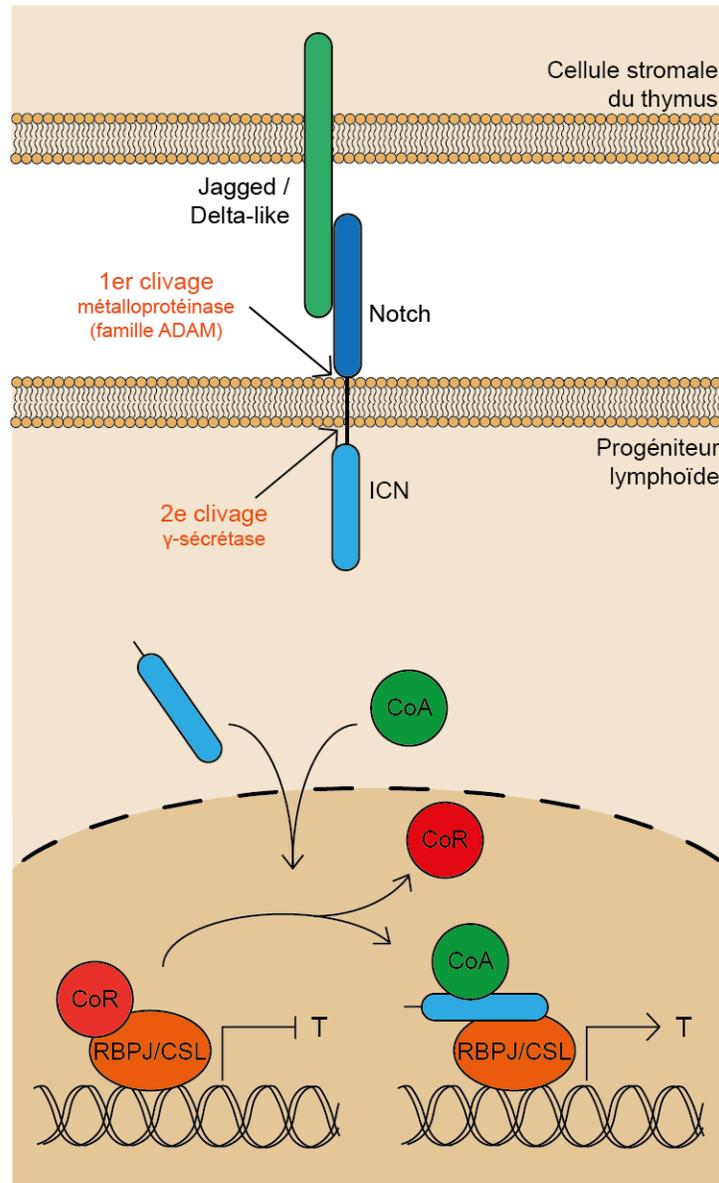


Figure 1.2 Voie de signalisation de Notch

Lorsque le récepteur Notch se lie à son ligand, Jagged ou Delta-like, deux clivages se produisent pour libérer le domaine intracellulaire de Notch (ICN). Le ICN va alors dans le noyau et déloge le co-récepteur sur le facteur de transcription, ce qui mène à la transcription de gènes (GATA-3, Bcl11b, TCF-1 et gènes du TCR) permettant à la cellule de devenir une cellule T. Figure inspirée de Zúñiga-Pflücker, 2004.

Les facteurs de transcription induits par Notch

L'engagement (ou *commitment*) des thymocytes vers la lignée des lymphocytes T se produit entre les phases DN2a et DN2b du développement. Notch active une panoplie de changements dans l'expression de facteurs de transcription, permettant aux cellules de se différencier et de s'engager vers la lignée T lymphocytaire (voir Figure 1.3) (Rothenberg *et al.*, 2013).

Les progéniteurs hématopoïétiques expriment différents facteurs de transcription, leur permettant d'avoir le potentiel de se différencier en cellules de différentes lignées. Ils expriment notamment PU.1 et Runx1 (voir Figure 1.3 et Tableau 1.3). Lorsque les progéniteurs hématopoïétiques entrent dans le thymus, la signalisation de Notch induit l'expression de GATA-3 et TCF-1, deux facteurs de transcription de la lignée des cellules T, chez les ETP. Les ETP, en exprimant GATA-3, perdent leur potentiel de devenir des lymphocytes B (Rothenberg *et al.*, 2013). Le facteur de transcription PU.1 est toujours exprimé, donc les cellules possèdent encore le potentiel de se développer en cellules *Natural killer* (NK) et en cellules dendritiques ou myéloïdes. L'expression de GATA-3 et TCF-1 augmente chez les ETP alors que ceux-ci avancent dans le développement. Arrivées en phase DN2a, les cellules vont dramatiquement augmenter l'expression de Bcl11b et diminuer l'expression de PU.1 et ainsi progresser à la phase DN2b. En perdant l'expression de PU.1, les cellules perdent le potentiel de devenir des cellules dendritiques (ou myéloïdes). Combiné à l'expression de Bcl11b qui réprime le régulateur de NK *Id2*, l'engagement vers la lignée des lymphocytes T est alors complété (Rothenberg *et al.*, 2013; Yui & Rothenberg, 2014). La signalisation de Notch permet l'expression de Bcl11b, mais elle est aussi supportée par GATA-3 et probablement TCF-1, également des produits de la signalisation de Notch. Cela pourrait expliquer le délai dans l'expression de Bcl11b (Rothenberg *et al.*, 2013). La Figure 1.3 illustre l'expression de différents facteurs de transcription selon le type de cellules et le Tableau 1.3 décrit les différents rôles et caractéristiques de ces facteurs de transcription.

La signalisation de Notch induit aussi l'expression de Hes1. Hes1 est nécessaire à l'inhibition du développement de cellules myéloïdes. En effet, il réprime C/EBP α , qui est un régulateur du développement des cellules myéloïdes et dendritiques (De Obaldia *et al.*, 2013b).

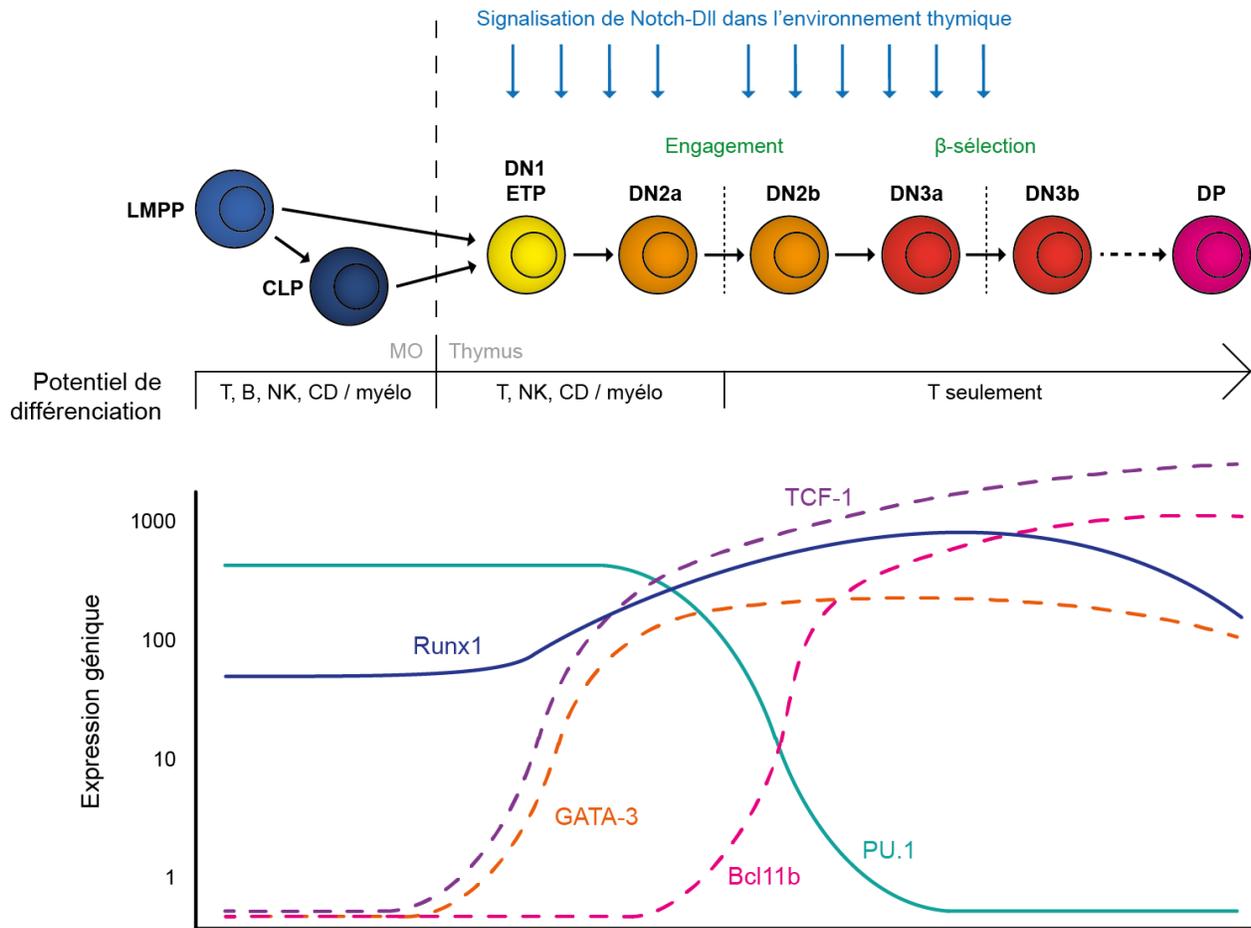


Figure 1.3 Expression de différents facteurs de transcription lors du développement des lymphocytes T

La signalisation de Notch au fil du développement des thymocytes est représentée par les flèches bleues dans la partie supérieure de la figure. Le potentiel de différenciation des différents précurseurs est indiqué au centre de la figure. Le niveau d'expression de différents gènes impliqués dans l'engagement des lymphocytes vers la lignée des lymphocytes T est illustré au bas de la figure. Les facteurs de transcription induits par Notch dans le thymus sont tracés en pointillé. Figure inspirée de Rothenberg *et al.*, 2013.

T, lymphocytes T ; B, lymphocytes B ; NK, cellules *natural killer* ; CD, cellules dendritiques ; myélo, cellules myéloïdes.

Tableau 1.3 Rôle des facteurs de transcription

FACTEURS DE TRANSCRIPTION	EXPRESSION / ROLES	REFERENCES
Runx1	Contrôle l'intensité de l'expression de Bcl11b, même après l'exportation des lymphocytes T du thymus	(Kueh <i>et al.</i> , 2016) (Huang <i>et al.</i> , 2008)
	Passe d'activateur de l'expression de PU.1 à répresseur	
PU.1	Facteur de transcription exprimé dans les ETP et DN2	(Rothenberg & Scripture-Adams, 2008) (Rothenberg <i>et al.</i> , 2013)
	Nécessaire pour générer des précurseurs capable d'aller dans le thymus	
	Affecte négativement l'expression de cKit et IL-7R α chez les ETP et DN2	
	Participe à l'initiation de la différenciation des cellules vers des lignées autre que celle des lymphocytes T	
TCF-1	Facteur de transcription induit par Notch dans les ETP	(Weber <i>et al.</i> , 2011) (Rothenberg & Scripture-Adams, 2008)
	Induction de gènes important pour la lignée T : composantes du TCR et facteurs de transcription (Gata3, Bcl11b)	
	Autorégulation positive : TCF-1 reste fortement exprimé après la β -sélection (même en absence de Notch)	
	Activé par la β -caténine (voie canonique de Wnt) : essentiel pour la β -sélection	
	Répresseur de PU.1 chez les DN2	
C/EBP α	Régulateur du développement des cellules myéloïdes et des cellules dendritiques	(De Obaldia <i>et al.</i> , 2013b)
	Réprimé par Hes1 pour induire le développement de lymphocytes T	

GATA-3	Un des premiers facteurs de transcription induit par Notch	(Rothenberg & Scripture-Adams, 2008)
	Affecte positivement l'expression de cKit et IL-7R α chez les ETP et DN2	
	Aussi induit par TCF-1	(Weber <i>et al.</i> , 2011)
	Restreint la différenciation vers des lignées alternatives en réprimant PU.1	(Famili <i>et al.</i> , 2017)
Hes1	Répresseur transcriptionnel induit par Notch	(De Obaldia <i>et al.</i> , 2013b)
	Expression augmente progressivement dans les ETP, DN2 et DN3	
	Aide Notch à inhiber le développement de MPP en cellules myéloïdes	
	Se lie à <i>Cepba</i> pour réprimer sa transcription dans les progéniteurs des cellules T	
Bcl11b	Inhibe les dernières chances des DN2 de devenir des NK en réprimant directement <i>Id2</i>	(Famili <i>et al.</i> , 2017; Rothenberg <i>et al.</i> , 2013)
	Répresseur transcriptionnel qui réprime des gènes associées à la lignée myéloïde (PU.1, C/EBP α)	(Ikawa <i>et al.</i> , 2010)
	Présent à partir de DN2a et indispensable pour la progression vers DN2b (engagement)	(Kueh <i>et al.</i> , 2016; Rothenberg <i>et al.</i> , 2013)
	Activé par GATA-3, TCF-1, Runx1 et Notch	

TCF-1, GATA-3, Hes1 et Bcl11b sont des facteurs de transcription importants pour l'engagement et induits par Notch.

Compilation de sources diverses.

2 LA SIGNALISATION INDUITE PAR WNT

2.1 Wnt

Wnt, la réduction de *Wingless integration site*, est une famille de glycoprotéines importantes dans le développement. Il existe 19 protéines Wnt répertoriées chez les mammifères (Staal *et al.*, 2008). Wnt est impliqué dans différents processus, dont la prolifération, la polarisation cellulaire, la migration et la différenciation (Clevers & Nusse, 2012; Seifert & Mlodzik, 2007; Staal *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2014). Le récepteur principal de Wnt est Frizzled (Fzd). Il existe 10 Fzd répertoriés chez l'humain (Niehrs, 2012).

Les différents Wnt et Fzd ne sont pas tous exprimés par ou sur toutes les cellules. Le nombre de combinaisons ligand/récepteur est donc limité. Par exemple, dans le thymus, les DN expriment principalement Fzd6, tandis que les DP expriment Fzd5 (Pongracz *et al.*, 2003). Leur expression est donc transitoire lors de la différenciation. De plus, quelques Wnt sont exprimés à de faibles niveaux par les DN, les DP et les SP. Cependant, les cellules épithéliales du cortex (cTEC) expriment différents Wnt à des niveaux plus élevés, dont Wnt4, Wnt7a, Wnt7b, Wnt10a et Wnt10b (Pongracz *et al.*, 2003). De ceux-ci, Wnt4 est la protéine Wnt la plus fortement exprimée par les cTEC (Pongracz *et al.*, 2003).

2.2 Les voies de signalisation

Wnt a trois voies de signalisation connues : une voie canonique et deux voies non-canoniques. La voie canonique est dépendante de la β -caténine, tandis que les voies non-canoniques sont indépendantes de la β -caténine (Staal *et al.*, 2008). De plus, les voies non-canoniques ne requièrent pas les récepteurs LRP5 et/ou LRP6 contrairement à la voie canonique.

2.2.1 La voie canonique

En l'absence de Wnt, la β -caténine, qui est présente dans le cytoplasme, peut se lier à la cadhérine à la membrane et aider à la formation de jonctions adhérentes entre les cellules (voir Figure 2.1a). La β -caténine est également maintenue à un faible niveau dans le cytoplasme. En effet, elle est séquestrée dans un complexe de dégradation. Ce complexe est formé des

protéines d'échafaudage Axin et *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) et des sérine/thréonine kinases glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) et caséine kinase 1 (CK1). La β -caténine est phosphorylée dans sa région N-terminale par CK1 puis par GSK3 β . Le nouveau motif est ensuite reconnu par une sous-unité de E3 ligase, β -*transducin-repeat-containing protein* (β TRCP), qui ubiquitine la β -caténine. Elle sera ensuite reconnue par le protéasome qui va la dégrader, diminuant le niveau de β -caténine dans le cytoplasme (Cruciat, 2014; Staal *et al.*, 2008; Stamos & Weis, 2013) (voir Figure 2.1a).

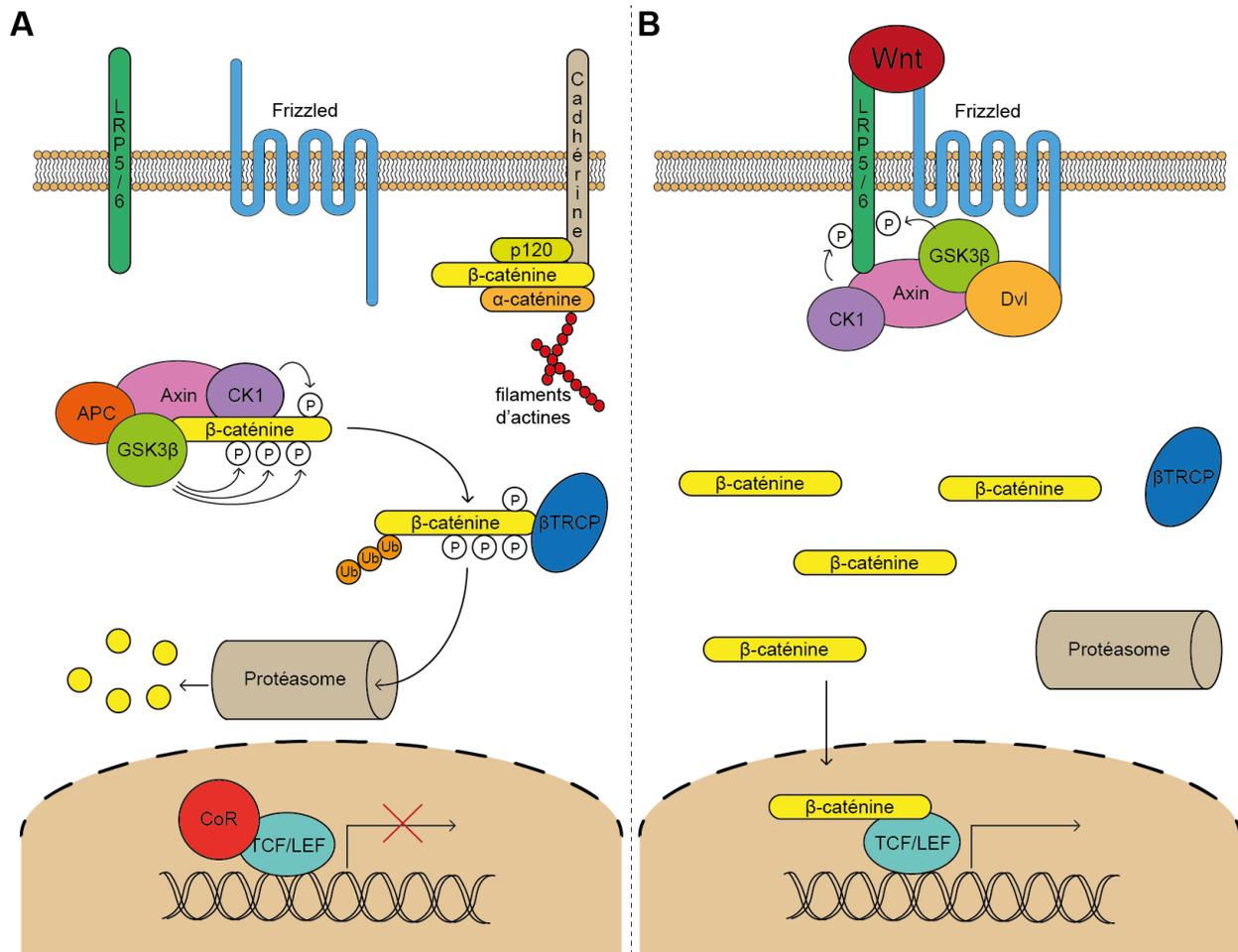


Figure 2.1 Voie de signalisation canonique de Wnt

A) En absence du ligand Wnt, la β -caténine est séquestrée dans un complexe de dégradation, est phosphorylée, est ubiquitinée puis dégradée par le protéasome. La dégradation de la β -caténine l'empêche de se transloquer au noyau pour activer la transcription de gènes cibles. La β -caténine, en se liant à la cadhérine, permet l'adhésion entre cellules via les filaments d'actine. B) En présence de Wnt, Wnt se lie à ces récepteurs Frizzled et LRP5/6. Les différents éléments du complexe de dégradation sont recrutés à la membrane. La β -caténine est alors libérée et n'est pas phosphorylée. Elle peut ainsi être

transloquée au noyau et activer la transcription des gènes cibles de la voie canonique de Wnt. Compilation d'après Staal *et al.*, 2008 et Zhan *et al.*, 2017.

Lorsque la protéine Wnt est présente, elle va se lier au récepteur Frizzled (Fzd) et LRP5/6. Cela va recruter la protéine d'échafaudage Dishevelled (Dvl) à la membrane, permettant la phosphorylation de LRP5/6 et le recrutement de CKI, GSK3 β et Axin à la membrane (Cruciat, 2014). Puisque les protéines et les kinases qui forment normalement le complexe de dégradation de la β -caténine ne sont plus disponibles dans le cytoplasme, la β -caténine ne peut plus être séquestrée et phosphorylée. Ne pouvant pas être reconnue et dégradée par le protéasome, la β -caténine pourra alors s'accumuler dans le cytoplasme et être transloquée dans le noyau, où elle permettra la transcription de différents gènes cibles en se liant et activant un facteur de transcription, tel un *T cell factor* (TCF-1, -3, -4) ou le *lymphoid enhancer-binding factor* (LEF-1). Les gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine incluent notamment Axin2, Cyclin-D1, c-fos et c-myc (Famili *et al.*, 2015; Staal *et al.*, 2008). Les différentes protéines Wnt reconnues pour activer la voie canonique sont Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt7b et Wnt8 (Pongracz & Stockley, 2006) (voir Figure 2.1b).

2.2.2 La voie non-canonique : Wnt/PCP

La voie de signalisation non-canonique de Wnt de polarité planaire des cellules (PCP : *Planar cell polarity*) est important pour l'adhésion cellulaire et la migration. Elle modifie le cytosquelette pour y arriver (Staal *et al.*, 2008). Cette voie peut également inhiber la voie de signalisation canonique de Wnt en diminuant les niveaux de β -caténine (Staal *et al.*, 2008). Wnt5a et Wnt11 sont connus pour activer cette voie de signalisation (Seifert & Mlodzik, 2007; Staal *et al.*, 2008). De plus, il a été démontré que Wnt4 est impliqué dans une voie non-canonique qui implique Rac1 et Jnk, qui est la voie PCP de Wnt (Heinonen *et al.*, 2011b).

Wnt se lie aux récepteurs Frizzled. Dans la cellule, Frizzled est lié à Dvl qui est associé à DAAM (*Dishevelled-associated activator of morphogenesis*). Cette association permet d'activer RHOA puis ROCK, menant à la réorganisation du cytosquelette. Dvl peut également activer RAC1 qui à son tour active JNK. JNK permet d'activer le complexe AP1 dans le noyau, qui est composé de petites protéines telles que cJun, JunB, JunD, cFos, ATF2 et CREB (Pongracz & Stockley, 2006). La voie PCP permet de répondre à un stress en modifiant le cytosquelette et la forme de la cellule (Staal *et al.*, 2008) (voir Figure 2.2a).

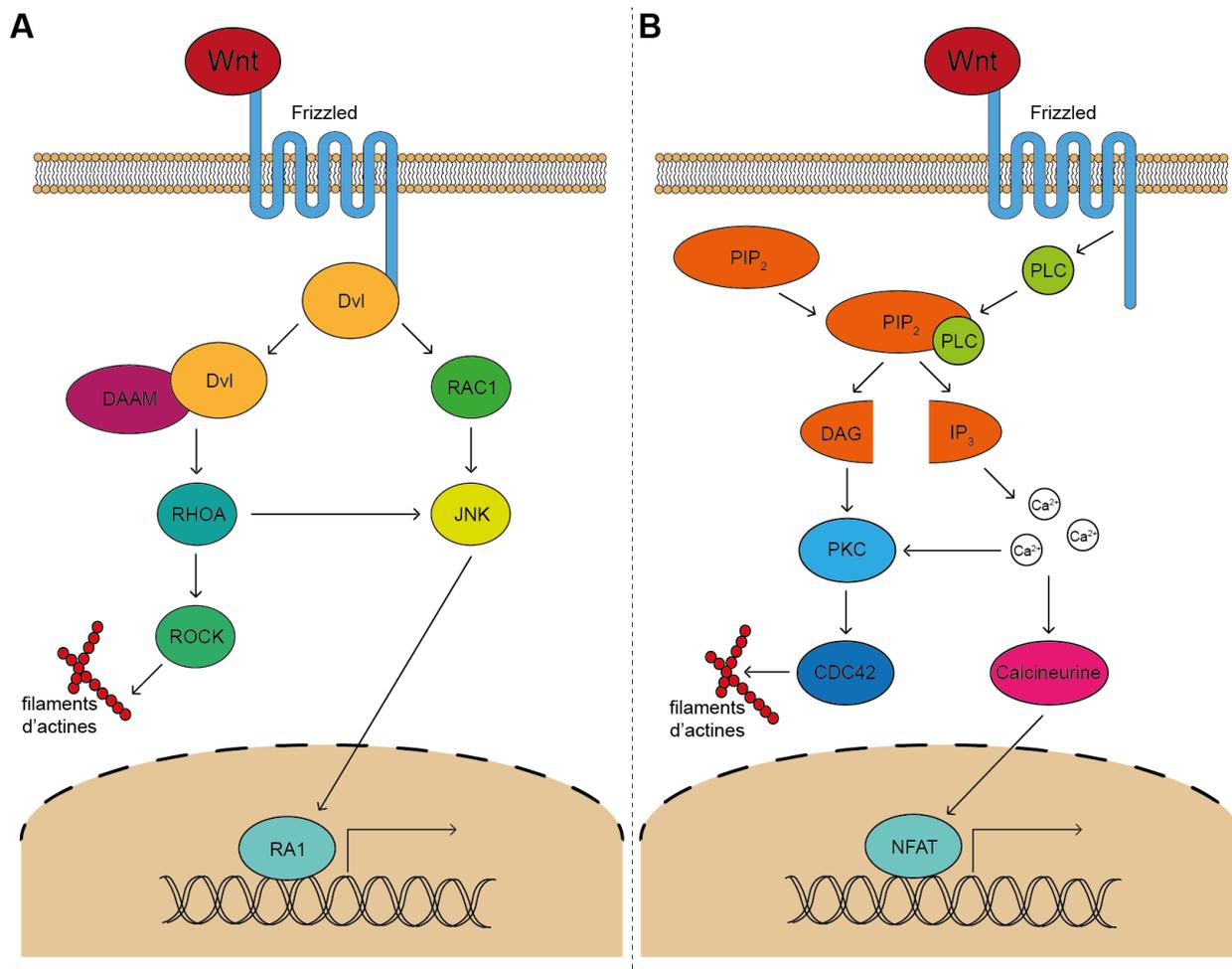


Figure 2.2 Voies de signalisation non-canonique de Wnt : PCP et Ca²⁺

A) La voie de signalisation PCP implique d'abord Dishevelled (Dvl) qui est recruté à la membrane. Cette voie mène à la réorganisation du cytosquelette et à l'activation de certains gènes. B) La voie de signalisation Wnt/Ca²⁺ implique le calcium. Les ions de calcium mène à la réorganisation du cytosquelette et à l'activation de gènes. Figure inspirée de Zhan *et al.*, 2017.

2.2.3 La voie non-canonique : Wnt/Ca²⁺

La liaison de Wnt5a au récepteur Fzd2 est une des combinaisons Wnt/Fzd connues pour activer la voie de signalisation non-canonique de Wnt-Ca²⁺. Avec l'aide d'une protéine G, Wnt5a-Fzd2 active la phospholipase C (PLC). La PLC va cliver la phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) en inositol triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). IP₃ se lie au récepteur de la réserve de Ca²⁺, libérant du Ca²⁺ dans le cytoplasme. Le Ca²⁺ et le DAG peuvent activer la

protéine kinase C (PKC), menant au réarrangement du cytosquelette. Le Ca^{2+} peut également activer la phosphatase sensible au calcium, la calcineurine, qui va à son tour activer NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) (Pongracz & Stockley, 2006; Staal *et al.*, 2008). NFAT est un facteur de transcription qui permet la transcription de gènes importants, dont l'IL-2, l'IL-4, l'IFN- γ et le TNF- α (Pongracz & Stockley, 2006) (voir Figure 2.2b).

2.3 Wnt dans le développement des thymocytes

Tel que présenté précédemment, la voie canonique de Wnt stabilise la β -caténine dans le cytoplasme des cellules, qui est transloquée au noyau et active la transcription de gènes cibles en interagissant avec les facteurs de transcription TCF-1 et/ou LEF-1. Notch, en induisant TCF-1, permet d'amplifier les signaux spécifiques à la lignée T avec Wnt : TCF-1 induit des facteurs de transcription (Gata-3 et Bcl11b) et les composantes du TCR (Famili *et al.*, 2017; Weber *et al.*, 2011). TCF-1 et LEF-1 sont redondants puisqu'un double knockout (DKO) pour ceux-ci entraîne un arrêt complet du développement au stade ISP, tandis qu'un knockout pour TCF-1 seulement produit qu'un arrêt partiel au début du développement qui se traduit par une diminution de la cellularité thymique (Famili *et al.*, 2015; Tiemessen *et al.*, 2012). TCF-1 agit de concert avec LEF-1 pour permettre la sélection β lorsque les thymocytes sont au stade DN3 (Yu *et al.*, 2012). TCF-1 agit aussi comme un répresseur de LEF-1, ce qui permet de prévenir l'apparition de lymphomes dans le thymus (Tiemessen *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012). Les thymus ne développent pas tous des lymphomes en absence de Tcf1. Par contre, les lymphomes montrent un dérèglement de la voie de signalisation de Wnt : une augmentation des gènes cibles Lef1, CyclinD1 et cMyc, et une diminution de Runx2, Id2, CD44 et Fn1. Ce dérèglement de la voie de Wnt prédispose les thymocytes à des mutations somatiques de Notch1, qui accélèrent le développement des lymphomes (Tiemessen *et al.*, 2012). TCF-1 et LEF-1 possèdent chacun un isoforme court et un isoforme long. Les isoformes longs possèdent le domaine de liaison à la β -caténine. L'isoforme long de TCF-1 est important pour la survie des thymocytes et une cellularité thymique optimal, mais l'isoforme court est suffisant pour une transition normal des étapes de maturation des thymocytes (Xu *et al.*, 2017). Le rôle de répresseur de TCF-1 vient de son isoforme court qui agit sur l'isoforme long de LEF-1 (Tiemessen *et al.*, 2012).

Une délétion de la β -caténine dans les cellules T au stade DN3 mène à une diminution du nombre de lymphocytes T dans la rate (Xu *et al.*, 2003). Ceci résulte d'un défaut dans la transition DN3 à DN4. Ce défaut de β sélection n'est pas dû à une diminution de l'expression de la chaîne β du TCR dans la cellule, mais plutôt à un défaut dans la signalisation du TCR, puisque la β -caténine est habituellement stabilisée suite à ce signal pour être transloquée dans le noyau. Puisque la β -caténine est absente, il y a une coupure dans le signal et la transcription génique ne peut pas se produire. La prolifération des DN4 suite à la β sélection est dépendante de la β -caténine (Xu *et al.*, 2003). De plus, lorsque la β -caténine est constitutivement active *in vivo* en supprimant l'exon 3 de l'extrémité N-terminal de la protéine, il y a une perturbation de l'hématopoïèse. Au niveau des cellules T, cette activation de la β -caténine mène à l'arrêt de la maturation des cellules en empêchant la différenciation des thymocytes vers le stade DN3 du développement (Scheller *et al.*, 2006). L'activation de la β -caténine dans les cellules ayant un signal pré-TCR mène à l'expression de Erg (*early growth factor*). Normalement, après la β -sélection, la β -caténine n'est plus activée, diminuant l'expression de Erg et permettant l'expression de ROR γ t, qui est essentiel pour la maturation vers le stade DP. Cependant, l'activation soutenue de la β -caténine empêche la différenciation des cellules vers le stade des DP en exprimant Erg et en bloquant ainsi l'expression de ROR γ t (Xu *et al.*, 2009). Une autre méthode pour exprimer constitutivement la β -caténine active est d'introduire une mutation S33Y dans la protéine. Cette mutation mène à un blocage dans la transition des cellules DN1 vers le stade DN2 (Kirstetter *et al.*, 2006). La β -caténine est donc importante pour le développement normal des lymphocytes T.

Cependant, différentes études montrent que la délétion de la β -caténine n'a aucun effet sur l'hématopoïèse et la lymphopoïèse. En effet, une double délétion (DKO) pour la β -caténine et la γ -caténine, qui peut aussi se lier à TCF-1, n'empêche pas le développement normal des cellules T et l'hématopoïèse. La reconstitution hématopoïétique à long terme suite à une greffe de moëlle osseuse DKO se déroule normalement, autant chez les cellules B, les cellules T et les progéniteurs de la moëlle osseuse. Ceci suggère que Wnt active TCF-1 par une voie non-identifiée qui ne passe pas par la β -caténine (Cobas *et al.*, 2004; Jeannet *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2008). Ces résultats ne concordent pas avec le reste de la littérature qui stipule que la β -caténine est importante pour l'hématopoïèse et la lymphopoïèse. Une des hypothèses qui pourrait expliquer ce résultat est le moment où la délétion de la β -caténine s'est produite. En effet, dans ces trois papiers, Cobas (2004), Jeannet (2008), Koch (2008) et leurs collègues

utilisent un système Mx-Cre-lox où Cre est induit par l'IFN- α,β suite à l'injection de poly-IC et permet la délétion de la β -caténine dans le système hématopoïétique. Le fait que les précurseurs se sont développés en présence de la β -caténine et que le développement des lymphocytes T débute avant l'injection de poly-IC peut expliquer la différence dans les résultats (Staal & Sen, 2008). De plus, suite à la délétion de la β -caténine par ce système, la partie tronquée de la β -caténine peut toujours se lier partiellement à TCF-1, mais aussi à une histone acétyltransférase (ex : CBP/p300) et à la protéine BRG1 qui permet de remodeler la chromatine. Si le rôle de la β -caténine est de faciliter l'expression génique en se liant à ces protéines, la délétion de la β -caténine pourrait n'avoir aucun effet (Staal & Sen, 2008).

Wnt3a, connue comme étant une protéine Wnt impliquée dans la voie canonique, active la voie différemment selon la dose perçue par la cellule. En effet, lorsque Wnt3a est fortement surexprimé, il induit un arrêt du développement au stade DN1 et entraîne une augmentation de cellules B et myéloïdes. Par contre, lorsque Wnt3a est faiblement surexprimé, il accélère le développement des T (Famili *et al.*, 2015). Pour évaluer l'effet du dosage de Wnt *in vivo*, des souris ayant différentes mutations hypomorphiques de la protéine APC ont été produites. APC fait partie du complexe de dégradation de la β -caténine. Des mutations de APC vont mener à surexprimer la β -caténine à différents niveaux selon les mutations, mimant ainsi une surexpression de la voie canonique de Wnt (Luis *et al.*, 2011). Du point de vue du développement des lymphocytes T, avec les souris mimant une surexpression élevée de Wnt, on remarque une augmentation de cellules DN3 et un défaut dans le réarrangement du gène du Tcrb. Toujours sous l'influence d'une surexpression élevée de Wnt, les cellules qui n'ont pas de réarrangement du TCR β peuvent échapper à la sélection β et progresser vers les étapes DP et SP (Luis *et al.*, 2011). Cependant, la différenciation induite par la β -caténine ne remplace pas la différenciation suite à la sélection β puisque qu'elle implique une prolifération réduite et un taux d'apoptose élevé comparativement à la différenciation suite à la β -sélection (Gounari *et al.*, 2001). Avec un « niveau modéré de surexpression de Wnt », les DN3 deviennent des DN4 avec un niveau d'expression normal du TCR β (Luis *et al.*, 2011). Le dosage de Wnt est donc très important pour le bon déroulement du développement lymphocytaire.

La β -caténine et TCF-1 contrôlent la transition du stade DN à DP suite à l'activation de Frizzled-6 (Gounari *et al.*, 2001; Pongracz *et al.*, 2003). L'interaction β -caténine/TCF-1 permet la survie des thymocytes en phase DP, leur permettant de procéder à la sélection positive puis de

devenir des CD4 SP ou des CD8 SP suite à l'activation de Frizzled-5 (Ioannidis *et al.*, 2001; Pongracz *et al.*, 2003). De plus, une déficience pour Wnt5a, qui active la voie de signalisation non-canonique de Wnt, protège les cellules DP contre l'apoptose suite à l'augmentation de Bcl-2 (Famili *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2007).

L'utilisation d'inhibiteurs de la voie de signalisation Wnt permet de bien comprendre l'impact qu'elle a sur le développement. Une augmentation de l'expression de l'inhibiteur de la β -caténine ICAT (*inhibitor of β -catenin and TCF interaction*), qui inhibe la voie de signalisation de Wnt en bloquant la liaison entre la β -caténine et TCF, mène à l'arrêt de la transition de DN4 à DP (Pongracz *et al.*, 2006). Dickkopf, DKK1, un inhibiteur de Wnt qui se lie au récepteur LRP pour empêcher l'interaction entre Wnt et ce dernier, entraîne l'arrêt de la différenciation des cellules DN1 en DN2 (Weerkamp *et al.*, 2006).

Globalement, la signalisation de Wnt est importante dans la prolifération et la survie des cellules aux stades DN et ISP, principalement via la voie canonique.

2.4 Wnt4 et le thymus

Wnt4 est la protéine Wnt la plus fortement exprimée par les TEC dans le cortex (cTEC), suivi par Wnt7a/b et Wnt10a/b (Pongracz *et al.*, 2003). Les souris qui sont déficientes pour Wnt1 et/ou Wnt4 meurent à la naissance. Dans le foie fœtal, Wnt1 et Wnt4 régulent la cellularité thymique de manière redondante, mais la différenciation des thymocytes n'est pas affectée et la maturation des cellules en SP se fait normalement. Wnt1 et Wnt4 sont importants pour l'expansion des précurseurs, mais ils ne sont pas essentiels puisque d'autres facteurs (ou protéines Wnt) peuvent compenser cet effet. Puisque le phénotype de ces souris KO est semblable à celui des souris *Tcf-1*^{-/-}, Mulroy *et al.* suggère que Wnt1 et Wnt4 fournissent des signaux de prolifération et/ou de survie permettant le développement des thymocytes via l'expression de gènes médiés par TCF-1 (Mulroy *et al.*, 2002).

L'expression de Wnt4 dans le thymus est restreinte aux cellules épithéliales du thymus (TEC) et les progéniteurs des TEC (Heinonen *et al.*, 2011a). Cependant, les cellules hématopoïétiques de la moëlle osseuse et du foie fœtal l'expriment aussi. Lors du développement du thymus dans

l'embryon, la surexpression de la protéine Wnt4 dérègle la différenciation des TEC. En effet, le thymus est de plus grande taille et Wnt4 semble favoriser la survie de TEC atypiques. De plus, la surexpression de Wnt4 dans les TEC perturbe la différenciation des TEC et empêche la migration normal du thymus vers son emplacement final lors de l'embryogenèse, résultant en un thymus ectopique (Swann *et al.*, 2017). À l'inverse, l'absence de Wnt4 pendant le développement du thymus résulte en un défaut architectural, affectant la qualité et l'organisation des TEC. Ce défaut lors de l'organogenèse affecte la taille du thymus et les premières étapes du développement des thymocytes. En effet, la diminution de la cellularité du thymus en absence de Wnt4 est causée par un défaut dans l'expansion des TEC (Heinonen *et al.*, 2011a).

Il a été démontré que la surexpression de Wnt4 par les cellules hématopoïétiques ne change pas la cellularité générale de la moëlle osseuse, mais elle augmente les proportions de LSK et de CLP. Wnt4 améliore la survie des cellules LSK Flt3⁺ (LMPP) et permet leur expansion. L'expansion des LMPP mène directement à l'augmentation du nombre de ETP dans le thymus, améliorant ainsi la thymopoïèse (Louis *et al.*, 2008).

La surexpression de Wnt4 a également permis de découvrir la voie de signalisation activée par Wnt4. L'analyse des gènes induits par Wnt4 révèle entre autres qu'il n'y a pas d'augmentation des gènes connus pour être des gènes cibles de la voie canonique de Wnt (Heinonen *et al.*, 2011b; Louis *et al.*, 2008). De plus, Wnt4 induit une augmentation de gènes qui supportent le maintien cellulaire, des inhibiteurs du cycle cellulaire et le gène anti-apoptotique *Bcl2l1* (Louis *et al.*, 2008). La voie de signalisation non-canonique PCP est privilégiée par Wnt4. Wnt4 active la voie de JNK dans les cellules progénitrices hématopoïétiques, menant notamment à l'augmentation de JNK phosphorylé (p-JNK). Wnt4 permet l'expansion et la survie des LSK via une voie dépendante de Jnk. En effet, la survie des LSK est diminuée en absence de Jnk2. En absence de Wnt4, l'expression des gènes du complexe de polarité est diminuée, suggérant un rôle de Wnt4 dans la polarisation des cellules (Heinonen *et al.*, 2011b).

Suite à ces résultats sur la surexpression de Wnt4, il serait logique de penser que la délétion de Wnt4 dans les cellules hématopoïétiques aura l'effet inverse de la surexpression et entraînera une diminution de la lymphopoïèse causée par une diminution du nombre de progéniteurs. Les

sections suivantes regroupent les résultats obtenus sur le développement lymphocytaire suite à la délétion de Wnt4 dans le système hématopoïétique.

CHAPITRE 2 – PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS

Le thymus, le seul organe où se produit la lymphopoïèse T, est colonisé des progéniteurs de la moëlle osseuse qui ne se sont pas complètement engagés vers la lignée des lymphocytes T. Des signaux extrinsèques et intrinsèques aux progéniteurs contribuent à réguler le développement des lymphocytes T. Les protéines Wnt font partie des signaux intrathymiques. Une de ces protéines, Wnt4, est fortement exprimée dans les cellules épithéliales du thymus (TEC) et elle régule directement le nombre de cellules épithéliales et l'expansion des progéniteurs thymiques précoces. De plus, la surexpression de Wnt4 dans les cellules hématopoïétiques facilite la récupération thymique suite à une greffe de foie foetal. Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires restent à être clarifiés.

Afin d'approfondir les connaissances sur Wnt4 dans la thymopoïèse, nous avons supprimé Wnt4 dans les cellules hématopoïétiques chez la souris et étudié l'effet de cette délétion. Le but de ce projet est d'étudier le rôle de Wnt4 et de sa délétion dans les cellules souches hématopoïétiques. Puisque la surexpression de Wnt4 induit l'expansion des progéniteurs thymiques dans la moëlle osseuse, nous pensons que la délétion de la protéine aurait l'effet inverse, c'est-à-dire que la délétion de Wnt4 réduirait la différenciation des lymphocytes T causé par une diminution du nombre de progéniteurs dans la moëlle osseuse. Pour étudier cette hypothèse, nous avons trois objectifs :

- 1) Étudier la différenciation des lymphocytes T dans le thymus des souris VaviCre⁺Wnt4^{lox/lox} (Wnt4 KO)
- 2) Étudier l'importance de Wnt4 hématopoïétique dans la reconstitution thymique après greffe
- 3) Étudier les mécanismes impliqués

Pour étudier la lymphopoïèse T, nous avons analysé les différentes populations du développement des lymphocytes T dans les thymus de souris Wnt4 KO et les avons comparées à des souris sauvages (WT). Nous avons également analysé l'impact du manque de Wnt4 sur le nombre et la proportion des progéniteurs présents dans la moëlle osseuse et des différentes lignées cellulaires présentes dans la rate.

Pour le deuxième objectif, nous avons transplanté par injection intraveineuse (iv) des cellules progénitrices de souris Wnt4 KO ou WT CD45.2⁺ en compagnie de cellules progénitrices

compétitrices CD45.1⁺ ou CD45.1⁺/CD45.2⁺ dans des souris receveuses CD45.1⁺/CD45.2⁺ létalement irradiées. Le sang des souris greffées a été analysé à 6, 12 et 18 semaines afin de déterminer l'efficacité de la transplantation et de la reconstitution immunitaire dans la circulation. La moëlle osseuse et le thymus ont été récoltés et analysés à 20 semaines post-greffe afin d'observer l'effet de Wnt4 sur la reconstitution du système hématopoïétique.

Afin d'étudier un possible mécanisme impliqué suite aux résultats obtenus lors des deux premiers objectifs, nous avons d'abord évalué un possible défaut dans la migration des progéniteurs de la moëlle osseuse vers le thymus en analysant différents marqueurs à leur surface. Nous avons également analysé l'expression de certaines protéines connues comme étant importantes dans l'engagement des progéniteurs vers la lignée T lymphocytaire. Nous avons notamment évalué l'expression de IRF4, de Notch1, du récepteur à l'IL-7 (CD127) et de Flt3 (CD135) dans ou sur différentes populations d'intérêts dans la moëlle osseuse et le thymus. Nous avons également comparé la différenciation des cellules progénitrices Wnt4 KO et WT en culture sur des cellules stromales exprimant le ligand de Notch, Delta-like-1, pour évaluer si l'effet de Wnt4 est intrinsèque ou extrinsèque aux cellules.

CHAPITRE 3 – ARTICLE

3 BONE MARROW PROGENITOR CELL-INTRINSIC WNT4 PROMOTES T LYMPHOPOIESIS

Running title : Wnt4 primes LMPPs for T lymphoid fate

Titre en français : Wnt4 favorise la lymphopoïèse T de manière intrinsèque dans les progéniteurs de la moëlle osseuse

Auteurs : Roxann Hétu-Arbour, Belma Melda Abidin, Edward O. Kwarteng, Krista M. Heinonen

Affiliation des auteurs : Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada

Contribution des auteurs :

RHA : Exécution des expériences, préparation des figures

BMA : Exécution des expériences

EOK : Exécution des expériences

KMH : Conception du projet, exécution des expériences, rédaction de l'article

Exécution des expériences :

Figure 1 : RHA (A, B, C), KMH (A, B, C, D, E)

Figure 2 : RHA (A, B, C), KMH (A, B, C)

Figure 3 : BMA (A, B), KMH (A, B, C, D)

Figure 4 : RHA (A, B, C)

Figure 5 : RHA (A, B, C, D, F, G), EOK (H), KMH (B, E, H)

Figure S1 : RHA (A, B, C)

Titre du journal : Journal of Immunology (soumis le 12 septembre 2017, voir Annexe)

Nous avons reçu les commentaires des *reviewers*. J'effectue des expériences supplémentaires pour pouvoir soumettre à nouveau le manuscrit.

3.1 Résumé en français

Le thymus, le seul organe où se produit la lymphopoïèse T, reçoit des progéniteurs de la moëlle osseuse qui ne se sont pas complètement engagés vers la lignée des lymphocytes T. Des signaux extrinsèques et intrinsèques aux progéniteurs contribuent à réguler le développement des lymphocytes T. Wnt4 est abondamment exprimé dans les cellules épithéliales du thymus et il régule directement le nombre de cellules épithéliales et l'expansion des progéniteurs thymiques précoces. De plus, la surexpression de Wnt4 dans les cellules hématopoïétiques facilite la récupération thymique suite à une greffe de foie foetal, mais les mécanismes restent à être clarifiés. Nous avons généré des souris déficientes pour Wnt4 dans les cellules hématopoïétiques pour mieux différencier les effets dépendants du stroma ou intrinsèques aux cellules progénitrices. Bien qu'il n'y ait pas de différence dans la proportion de progéniteurs lymphoïdes multipotents exprimant Flt3, la moëlle osseuse déficiente en Wnt4 ne parvient pas à contribuer à la lymphopoïèse T dans les chimères. Il y avait une diminution dans l'expansion de progéniteurs déficientes en Wnt4 en culture, démontrant un rôle intrinsèque aux progéniteurs pour Wnt4. Les progéniteurs thymiques précoces déficients en Wnt4 expriment un niveau réduit de Notch1, alors que les progéniteurs de la moëlle osseuse Flt3⁺ montrent une diminution de IRF4 dans le noyau à l'état de base et suite à une greffe. Nos résultats démontrent que Wnt4 dans le système hématopoïétique permet à la cellule progénitrice de la moëlle osseuse chez la souris de s'engager vers la lignée lymphoïde T de façon intrinsèque à la cellule. Nos observations peuvent être utiles pour le développement de nouvelles stratégies pour améliorer la récupération thymique post-greffe.

3.2 Abstract

Thymus, the unique site for T lymphopoiesis, is seeded by bone marrow progenitors that have not fully committed to the T lymphocytic lineage. Both progenitor cell intrinsic and extrinsic signals contribute to the regulation of T lymphocyte development. Wnt4 is abundantly expressed by thymic epithelial cells, and it directly regulates epithelial cell numbers and early thymocyte progenitor expansion. Furthermore, overexpression of Wnt4 in hematopoietic cells facilitates thymic recovery after fetal liver transplant, but the mechanisms for its effect remain unclear. We have now generated hematopoietic cell-specific Wnt4-deficient mice to better differentiate between stroma-dependent and progenitor cell-intrinsic effects. Although there was no difference in the proportion of Flt3-expressing lymphoid-primed progenitors, Wnt4-deficient bone

marrow could not contribute to T lymphopoiesis in mixed chimeras. There was a decreased expansion of Wnt4-deficient progenitors in culture, demonstrating a progenitor cell-intrinsic role for Wnt4. Wnt4-deficient early thymic progenitors expressed reduced levels of Notch1, while Flt3⁺ bone marrow progenitors displayed decreased nuclear IRF4 at steady state and after transplant. Our data collectively indicate that hematopoietic Wnt4 promotes murine bone marrow progenitor cell priming towards T lymphoid lineage in a cell-intrinsic manner. Our observations could be useful for the development of novel strategies for enhancing thymic recovery post-transplant.

3.3 Introduction

Lymphostromal crosstalk is a crucial feature of thymus organogenesis and recovery after hematopoietic cell transplant (HCT) (Awong *et al.*, 2013; Boehm & Swann, 2013; Buono *et al.*, 2016; Heinonen & Perreault, 2008; Love & Bhandoola, 2011; Nitta *et al.*, 2011; Zlotoff *et al.*, 2011). The thymus is seeded by bone marrow progenitor cells that have not yet committed to a T lymphoid fate (Buono *et al.*, 2016; De Obaldia *et al.*, 2013a; Luc *et al.*, 2012; Rothenberg *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2011). Thymic epithelial cells (TECs) provide growth and differentiation cues to the developing thymocytes, and guide them through a series of commitment and selection steps from early thymic progenitors (ETPs) to CD4⁺ and CD8⁺ single-positive T lymphocytes ready to leave the thymus (Heinonen & Perreault, 2008). Conversely, the presence of immature thymocytes is essential for TEC maturation during organogenesis and promotes the integrity and repair of thymic architecture in the adult (Awong *et al.*, 2013; Zlotoff *et al.*, 2011). Thymic recovery post-HCT, for example, has been directly linked to the number of progenitor cells able to seed the thymus immediately after transplant (Awong *et al.*, 2013; Zlotoff *et al.*, 2011). Strategies that expand the appropriate progenitor cell pool pre-graft or promote the generation of T lineage-primed progenitors in situ in the bone marrow could thus improve the recovery of T lymphocytes.

Wnt signaling remains an important participant in lymphostromal crosstalk in the thymus (Brunk *et al.*, 2015). We have previously shown that Wnt4 overexpression in hematopoietic cells improved thymic recovery post-HCT (Heinonen *et al.*, 2011b; Louis *et al.*, 2008). At steady state, Wnt4 is abundantly expressed by TECs (Brunk *et al.*, 2015; Buono *et al.*, 2016; Dumont-Lagacé *et al.*, 2014; Heinonen *et al.*, 2011a; St-Pierre *et al.*, 2013), but the developing

thymocytes express only low levels of Wnt4, if any (Brunk *et al.*, 2015; Heinonen *et al.*, 2011a; Pongracz *et al.*, 2003). Rather, Wnt4 regulates TEC numbers (Heinonen *et al.*, 2011a) and hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) generated in a Wnt4-sufficient environment cannot compensate for a Wnt4-deficient thymic stroma. The intrathymic impact of Wnt4 on T lymphopoiesis is thus mainly TEC-dependent. However, the physiological importance of prethymic Wnt4 on T lymphopoiesis has not been rigorously addressed, although Wnt4 is expressed in HSPCs as well as in the bone marrow (BM) stroma (Florian *et al.*, 2013; Heinonen *et al.*, 2011b; Louis *et al.*, 2008; Sugimura *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2014).

We report here that hematopoietic Wnt4 is necessary for steady state thymopoiesis and T cell recovery after transplant. Moreover, Wnt4-deficient HSPCs cannot repopulate the thymus in competitive chimeras despite being present in the BM. Wnt4-deficient ETPs fail to upregulate Notch1 and expand poorly on OP9-DL1 stromal cells. Our results demonstrate the importance of prethymic, hematopoietic Wnt4 in promoting T lymphoid fate.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Experimental Animals

C57BL/6 (B6 CD45.2⁺), B6.SJL-Ptprc^aPepc^b/BoyJ (B6 CD45.1⁺), B6.Cg-Tg(Vav1-icre)A2Kio/J (Vav-iCre), and B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos}/J (R26R-EYFP) mice were purchased from The Jackson laboratory (Bar Harbor, ME). Mice with a *Wnt4* conditional allele have been described elsewhere (Shan *et al.*, 2009) and were originally a kind gift from S. Vainio (Oulu University, Finland). Mice were bred and housed under specific pathogen-free conditions in sterile ventilated racks at the animal facility of INRS-Institut Armand-Frappier. Both males and females were included in the steady-state analysis, but chimeras were all done using female mice. Sex-matched littermates were used as controls. For mixed BM chimeras, Vav-iCre⁺ *Wnt4*^{fl/fl} (*Wnt4*^{Δ/Δ}) or control BM cells (CD45.2⁺) were combined with 5x10⁵ competitor cells (CD45.1⁺ or CD45.1⁺/CD45.2⁺) in a 1:1 Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ CD150⁺ cell equivalent ratio (as previously detailed (Kwarteng & Heinonen, 2016)) and injected into the lateral tail vein of lethally irradiated (2x450 rad) congenic recipient mice (CD45.1⁺/CD45.2⁺). The procedures were approved by the Comité institutionnel de protection des animaux in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

3.4.2 Flow cytometry

HSPC populations, thymocyte subsets, and donor chimerism were determined as previously described (Abidin *et al.*, 2015; Heinonen *et al.*, 2011a). The following fluorochrome-conjugated antibodies were used: PE-Cy7 CD3 ϵ (clone 145-2C11), APC-eFluor 780 CD4 (RM4-5), eFluor 450 CD8 α (53-6.7), PE CD19 (eBio1D3), PE CD25 (PC61.5), FITC CD45.1 (A20), eFluor 450 CD45.2 (104), APC CD62L (MEL-14), PE or Alexa Fluor 647 CD117 (cKit, 2B8), V450 CD127 (IL-7R α , SB/199), PerCP-eFluor 710 CD135 (Flt3, A2F10), Alexa Fluor 647 CD150 (TC15-12F12.2), FITC CD199 (CCR9, CW-1.2), PE-Cy7 Ly6A/E (Sca-1, D7), and APC-eFluor 780 Ly6C/Ly6G (GR1, RB6-8C5). Biotin-labeled antibodies used in the lineage cocktail included: NK1.1 (PK136), CD11c (HL3), CD3 ϵ , CD11b (Mac-1; M1/70), CD45R/B220 (RA3-6B2), Ly6C/Ly6G, and TER-119/erythroid cells. Biotinylated antibodies were detected with either BD Horizon-V500 or Brilliant Violet 711 conjugated streptavidin, depending on the combination of fluorochromes used. Antibodies were purchased from BD Biosciences (Mississauga, ON), eBioscience (San Diego, CA), or BioLegend (San Diego, CA) unless indicated otherwise. Cells were acquired on a four laser BD LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA) and analyzed using FACS DiVa (v. 6.1) or FlowJo (v. 10.1) software.

3.4.3 Co-culture on OP9-DL1 cells

Single cell suspensions of bone marrow cells or thymocytes were first enriched using the EasySep mouse HemProg enrichment kit (StemCell Technologies, Vancouver, BC; for BM) or EasySep Mouse Streptavidin RapidSpheres together with biotinylated CD8 α and CD3 ϵ (for thymus) according to manufacturer's instructions. BM cells were further stained with Lineage antibodies in combination with FITC-conjugated streptavidin, PE-Cy7 Ly6A/E, and PE CD117, and thymocytes with Lineage antibodies, FITC streptavidin, and PE CD117. Cells were sorted for purity on a two-laser BD FACSJazz, and 5-10x10³ progenitor cells were seeded on confluent OP9-DL1 stromal cell monolayers in α MEM supplemented with 12% FBS Premium (Wisent Bioproducts, St-Bruno, QC), 10mM HEPES, 1mM Sodium Pyruvate, 2mM Glutamax, 55 μ M 2-mercaptoethanol, antibiotics (gentamicin, penicillin, streptomycin), 5ng/ml Flt3-Ligand, and 1ng/ml IL-7. Developing T lymphocytes were passaged 1/3-1/4 once a week onto fresh monolayers, and the remaining cells were analyzed by flow cytometry.

3.4.4 Imaging flow cytometry

Single cell suspensions of bone marrow cells were prepared in PBS supplemented with 2% FBS Premium and 0.5mM EDTA. Cells were enriched for HSPCs using the EasySep mouse HemProg enrichment kit. HSPCs were further stained with PE-Cy7 Ly6A/E, and PE CD117. Surface-stained samples were fixed and permeabilized using the Foxp3 staining kit (eBioscience), washed and blocked with 5% normal Rat serum in PBS for 30min on ice, followed by staining with Alexa Fluor 647-conjugated anti-IRF4 (IRF4.3E4; BioLegend) for 1h. Cells were counter-stained with DAPI (Life Technologies) and acquired with Amnis ImageStream Mark II imaging flow cytometer (EMD Millipore). Analysis was done using the nuclear translocation function in the IDEAS v. 6.2 software. A translocation score >1 was considered positive.

3.4.5 Statistical analysis

Each value represents at least three independent experiments. Two-tailed student's t test was used to determine statistical significance. $P < 0.05$ was considered significant.

3.5 Results

3.5.1 *Wnt4* deficiency in hematopoietic cells results in decreased thymopoiesis

Although T lymphocyte progenitors generated in a *Wnt4*-sufficient BM could not compensate for the absence of *Wnt4* in thymic stroma (Heinonen *et al.*, 2011a), it has not yet been possible to completely disprove the hypothesis that BM *Wnt4* also promotes T cell development (Heinonen *et al.*, 2011a; Louis *et al.*, 2008). To better address this issue, we generated mice in which *Wnt4* was ablated from all hematopoietic cells by Vav-iCre-mediated excision (*Wnt4*^{Δ/Δ}). The deletion was highly efficient in hematopoietic cells including BM HSPCs, while *Wnt4* expression was maintained at essentially normal levels in the thymic capsule (Figure S3.1). *Wnt4*^{Δ/Δ} mice could thus be considered *Wnt4*-deficient in the BM but *Wnt4*-sufficient in the thymus, and should allow us to investigate the impact of prethymic *Wnt4* on thymopoiesis.

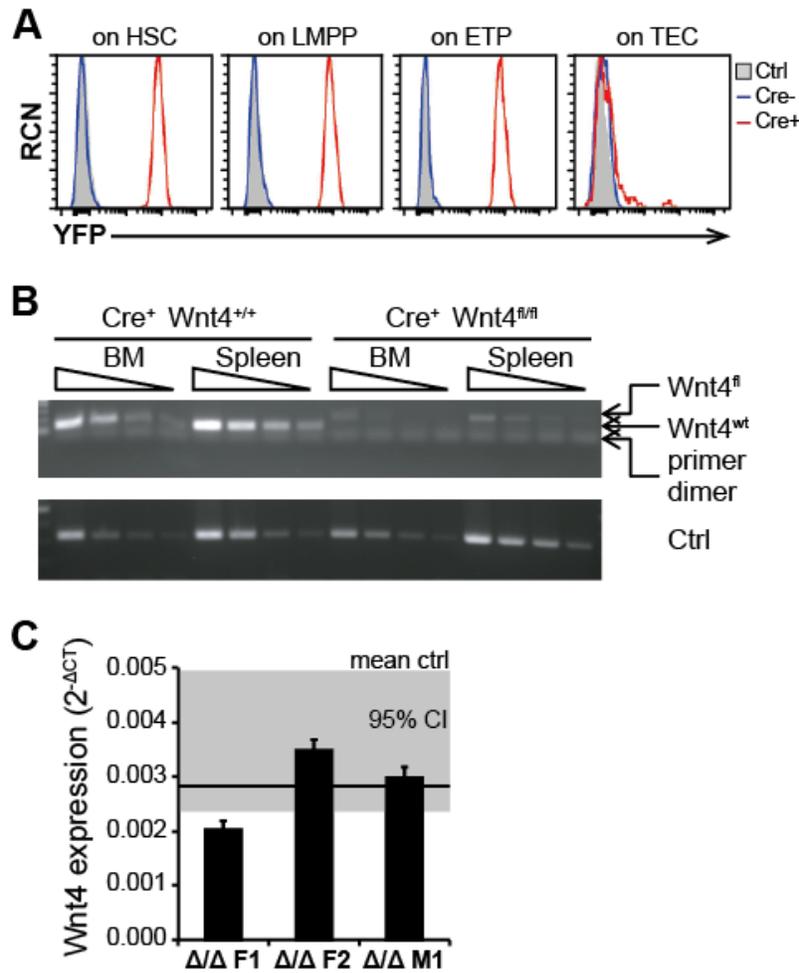


Figure S3.1 Wnt4 is efficiently ablated in hematopoietic cells but expressed in thymic stroma.

A) Overlays representing YFP expression in different cell populations by flow cytometry. B) Semiquantitative PCR on genomic DNA extracted from spleen and BM cells. C) Quantitative RT-PCR for Wnt4 expression in thymic capsules. The average level for control mice is indicated by the dashed line and the shaded area represents 95% confidence interval (student's t distribution). Results for three individual *Wnt4*^{Δ/Δ} mice are shown by black bars (mean+SD) with the average indicated by a solid line.

Thymus from young adult *Wnt4*^{Δ/Δ} mice was hypocellular (Fig. 3.1A), suggesting that BM Wnt4 was indeed important for T lymphopoiesis. There were no major alterations in the proportions of various thymocyte subsets (Fig. 3.1B, C), indicating that the defect was not due to problems with intrathymic differentiation but that *Wnt4*^{Δ/Δ} progenitor cells may present problems with thymus seeding and/or early T lineage commitment. Furthermore, the number and proportion of T lymphocytes were decreased in *Wnt4*^{Δ/Δ} spleen, similar to the thymus, but B lymphocytes presented no alterations (Fig. 3.1D, E), indicating that the differentiation defect was specific to T lymphocytes and not generalized to all lymphoid cells. There was no decrease in the number or

proportion of BM Flt3^{hi} lymphoid-primed multipotent progenitors (LMPPs) (Fig. 3.2A, B), in contrast to what was observed in the context of Wnt4 overexpression (Louis *et al.*, 2008). Moreover, there was no significant difference in the expression of surface molecules associated with thymus homing, including CD62L and CCR9 (Fig. 3.2C). Collectively, these results suggest that BM Wnt4 is necessary for the priming of progenitor cells toward T lymphocyte differentiation but not for B lymphopoiesis.

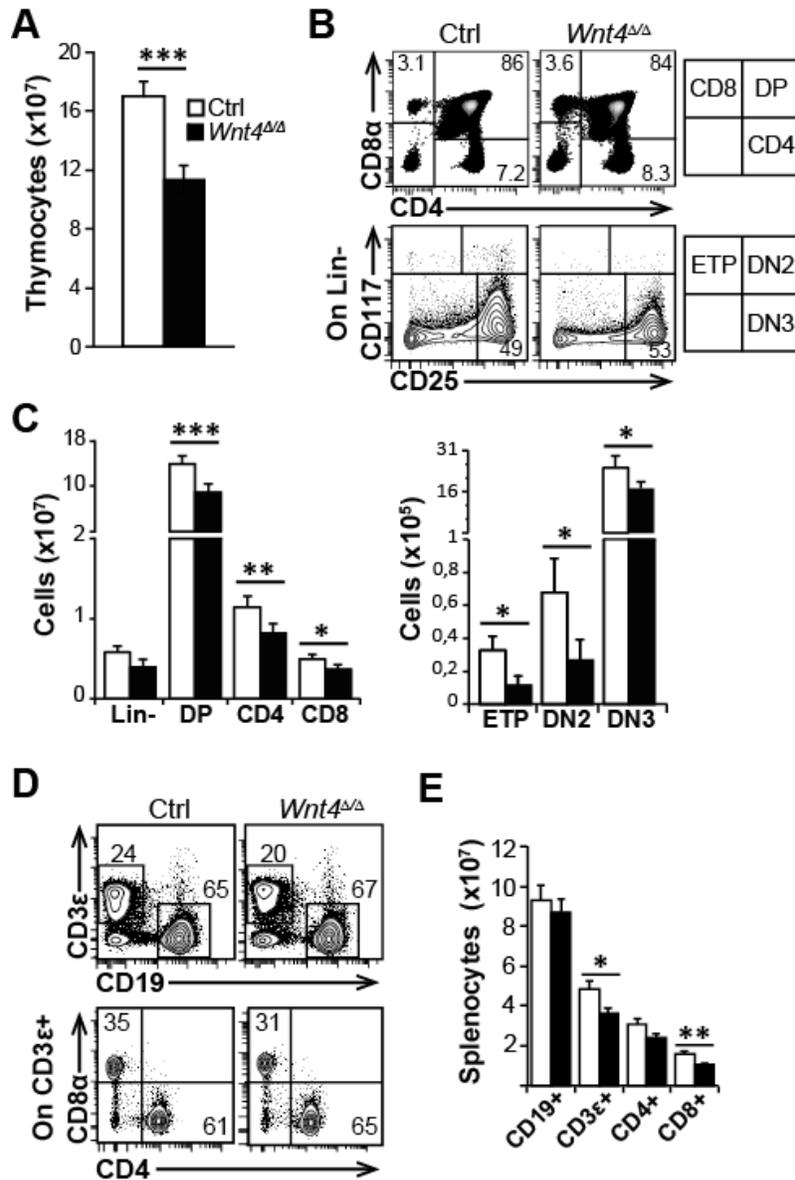


Figure 3.1 Hematopoietic Wnt4 is required for T lymphopoiesis.

A) Numbers of thymocytes in 2-month-old mice. B) Flow cytometry analysis of the thymocyte subpopulations from a representative 2-month-old Wnt4^{ΔΔ} mouse and a littermate Vav-iCre⁺ Wnt4^{fl/+} control. Numbers within the flow cytometry panels represent percentages of the different subsets over

total thymocytes (top panels) or within Lin⁻ cells (bottom panels). C) Numbers of various thymocyte subsets in 2-month-old mice. D) Flow cytometry analysis of the spleen T and B lymphocyte populations from a representative 2-month-old *Wnt4*^{ΔΔ} mouse and a littermate control. Numbers within the flow cytometry panels represent percentages of the different subsets over total splenocytes (top panels) or within CD3ε⁺ cells (bottom panels). E) Numbers of cells within different lymphocyte subsets in the spleen of 2-month-old mice. The histograms represent compiled data from 20 animals per group (mean + SEM) for the thymus and 12 animals per group for the spleen. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (two-tailed, unpaired student's t-test).

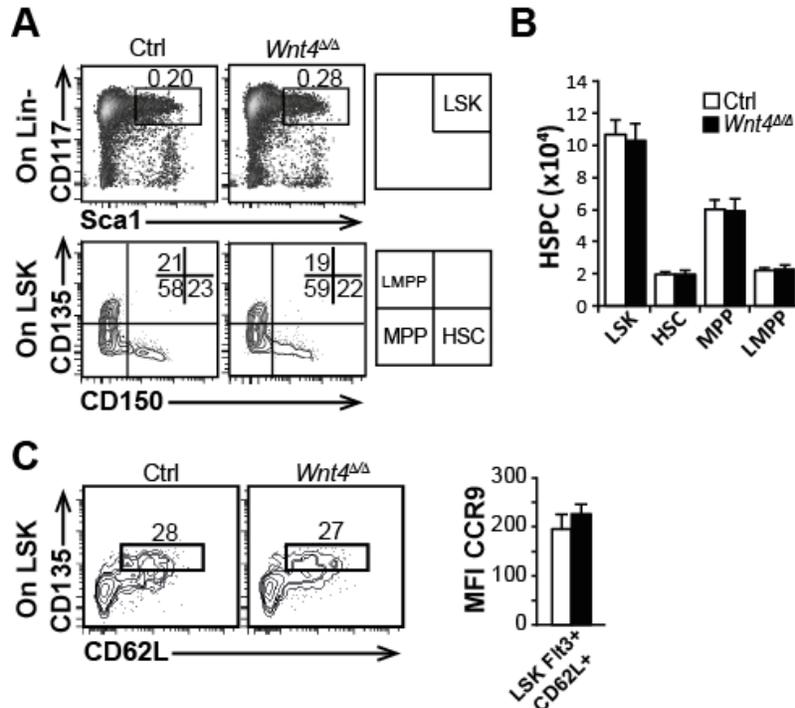


Figure 3.2 *Wnt4*-deficient HSPCs are present in normal numbers and express cell surface receptors associated with thymus homing.

A) Flow cytometry analysis of the bone marrow progenitor cell populations from a representative 2-month-old *Wnt4*^{ΔΔ} mouse and a littermate control. Numbers within the flow cytometry panels represent percentages of Lin⁻ cKit^{hi} Sca1⁺ (LSK) cells over total bone marrow (top panels) or subpopulations within LSKs (bottom panels). B) Numbers of cells within different progenitor subsets in two femora + two tibiae of 2-month-old mice. The histograms represent compiled data from 31 animals per group (mean + SEM). C) Flow cytometry analysis of CCR9 and CD62L expression on Flt3⁺ LSKs. Numbers within flow cytometry panels represent the percentage of selected cells over LSKs. The histogram represents compiled data from 5 animals per group (mean + SEM). None of the differences were considered statistically significant.

3.5.2 *Wnt4*^{Δ/Δ} progenitors fail at thymic reconstitution in a competitive setting

To differentiate between a true progenitor cell-autonomous defect and the potential role of other hematopoietic cells, such as dendritic cells or macrophages, or the impact of hematopoietic *Wnt4* in TEC maturation, we performed mixed BM chimeras and analyzed their hemato-lymphopoietic output over 20 weeks. *Wnt4*^{Δ/Δ} donor-derived cells generated myeloid and B lymphoid cells at near expected frequencies, but their contribution to T lymphocytes was significantly reduced (Fig. 3.3A, B), and in half of the mice represented less than 1% of all peripheral T lymphocytes. Thus the presence of *Wnt4*-sufficient hematopoietic cells did not rescue *Wnt4*^{Δ/Δ} T lymphocyte numbers. Rather, *Wnt4*^{Δ/Δ} HSPCs performed even more poorly in the face of competition, similar to what has been previously shown for CCR7 and CCR9-deficient cells (Krueger *et al.*, 2010; Zlotoff *et al.*, 2010).

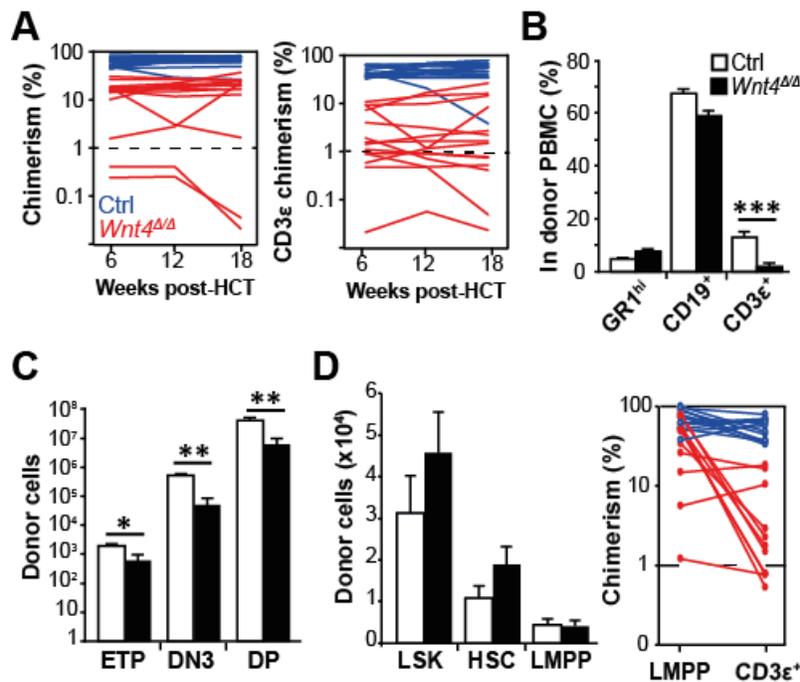


Figure 3.3 *Wnt4*-deficient HSPCs cannot repopulate the thymus.

A) Donor chimerism for all peripheral blood leukocytes (left panel) and CD3ε⁺ T lymphocytes (right panel) in individual recipient mice at different times after transplant. The data are compiled from three independent transplant experiments. B) Proportion of different cell types within donor-derived cells in peripheral blood at 18 weeks. Histograms indicate mean + SEM pooled from three independent groups of transplants. C) Average numbers (+SEM) of donor-derived thymocytes 20 weeks after transplant. The data represent 7-9 mice per group from three independent experiments. D) Average numbers (+SEM) of donor-derived HSPCs in two femora + two tibiae 20 weeks after transplant (left panel) and donor chimerism in BM LMPPs compared to peripheral T lymphocytes from individual mice (right panel). The data are compiled from three independent transplant experiments. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (two-tailed, unpaired student's t-test).

The reason behind decreased donor T lymphocyte production was largely prethymic as there was already a 10-fold decrease in the number of donor-derived ETPs, the most immature thymocyte subset (Fig. 3.3C), and three out of seven mice examined had no ETPs of *Wnt4*^{ΔΔ} donor origin. This fold difference was maintained in more mature thymocyte subsets (Lin⁻ CD25⁺ cKit⁻ double negative-3 (DN3) cells which represent the first T lineage-committed cells, or CD4⁺CD8⁺ double positive thymocytes that comprise the bulk of the thymus; Fig. 3.3C). However, *Wnt4*^{ΔΔ} donor-derived Flt3^{hi} LMPPs were present in the BM in numbers that were fully comparable to control chimeras (Fig. 3.3D). There was a slight decrease in the relative contribution of *Wnt4*^{ΔΔ} cells to LMPPs (43% ± 13% for *Wnt4*^{ΔΔ} vs. 71% ± 9% for controls; *p*=0.013), but overall their frequency was much greater than that of T lymphocytes (Fig. 3.3D, right panel), indicating that although present, *Wnt4*^{ΔΔ} LMPPs were not functionally apt to compete against wild-type LMPPs for thymic reconstitution.

3.5.3 Wnt4 promotes T lineage fate in a cell-intrinsic manner by regulating Notch1 and IRF4

One possible explanation for the inefficient generation of thymocytes from *Wnt4*^{ΔΔ} HSPCs is poor thymus seeding. However, we did not see significant differences in the expression of CCR9 or CD62L (Fig. 3.2C) on *Wnt4*^{ΔΔ} LMPPs, and our previous results using doxycyclin-inducible deletion of *Wnt4* in both thymus and BM also suggested that *Wnt4* did not affect progenitor cell homing to the thymus (Heinonen *et al.*, 2011a). Moreover, the frequency of ETPs or Lin⁻ cKit^{hi} CD25⁺ DN2 thymocytes was not disproportionately lower in the *Wnt4*^{ΔΔ} mice (Fig. 3.1C). To evaluate the potential cell-intrinsic role of *Wnt4* in T lineage priming, we purified BM LSKs as well as cKit^{hi} thymocytes and seeded them on OP9-DL1 stromal cells. There was a significant decrease in the expansion of *Wnt4*^{ΔΔ} progenitors in culture as well as in their differentiation toward CD4⁺CD8⁺ double positive cells, independent of the source of progenitor cells (Fig. 3.4A-C). These results suggest that the impact of *Wnt4* on T lineage differentiation does not depend on homing to the thymus or specific interactions within the three-dimensional thymic architecture. Rather, hematopoietic *Wnt4* could be important for the response of thymus settling cells to other instructive or growth factor signals.

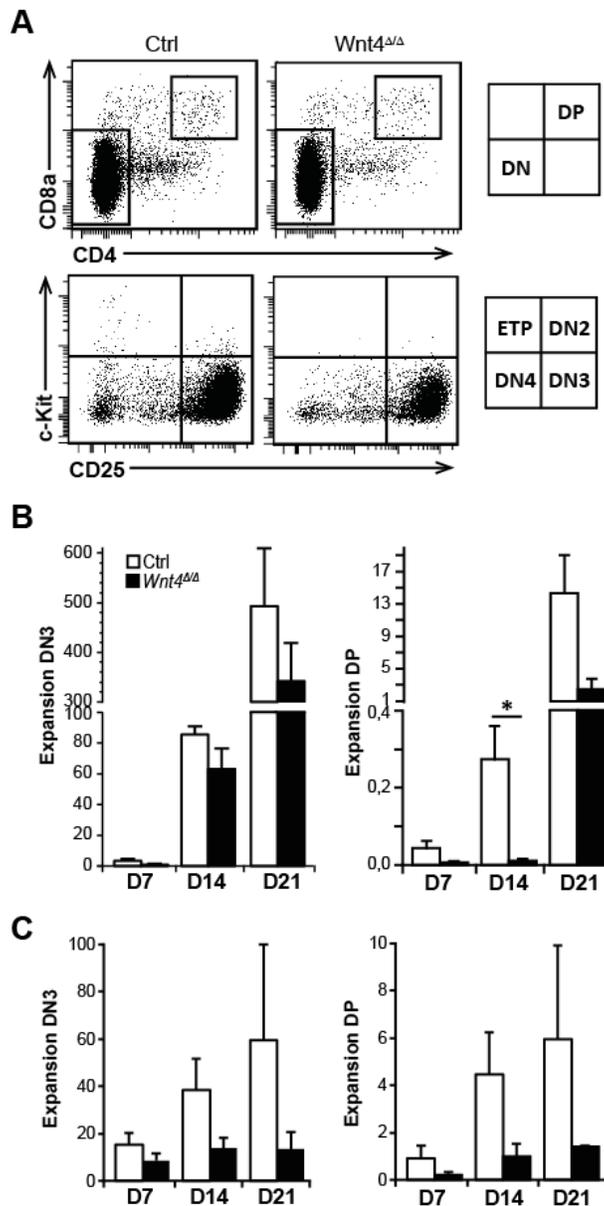


Figure 3.4 The impact of Wnt4 is cell intrinsic and independent of the thymic 3D structure.

A) Flow cytometry analysis on day 14 of the populations from representative *Wnt4^{Δ/Δ}* and control LSKs sorted from bone marrow put in culture on OP9DL1 cells. Double positive (DP) and double negative (DN) populations for CD8α and CD4 (top panels) and subpopulations within DN cells (bottom panels) were first pre-gated on GFP⁻ events. B, C) Expansion of DN3 and DP subpopulations based on the number of B) LSK cells sorted from bone marrow and C) cKit^{hi} cells sorted from thymus. The data are compiled from four independent experiments for the LSKs and from three independent experiments for the cKit^{hi} thymocytes. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (two-tailed, paired student's t-test).

Thymus settling progenitors receive signals from both TECs and endothelial cells that will promote their survival, proliferation, and T lineage fate decision. The main T lineage instructive

signaling pathway is undoubtedly Delta-like-4/Notch1 (Hozumi *et al.*, 2008; Mohtashami *et al.*, 2010; Schmitt & Zúñiga-Pflücker, 2002), while cytokines, such as SCF/Kit-ligand (Buono *et al.*, 2016; Rodewald *et al.*, 1997), Flt3-ligand (Kenins *et al.*, 2010), and IL-7 (De Obaldia *et al.*, 2013a) promote ETP/DN2 thymocyte proliferation and survival. We compared the expression of the respective receptors on the surface of T cell progenitors from *Wnt4^{ΔΔ}* mice and littermate controls, and found that *Wnt4^{ΔΔ}* ETPs expressed generally lower levels of Notch1 (Fig. 3.5A). There was an increase in Notch1 expression between LMPPs and ETPs in control mice, as seen by an increase in mean fluorescence, but only a subset of *Wnt4^{ΔΔ}* ETPs upregulated Notch1. There was no difference in Notch1 expression between *Wnt4^{ΔΔ}* and control LMPPs; nor was there a difference in Notch1 levels in T lineage-committed DN3 thymocytes. There was no difference in DN2 cell size, suggesting that a similar proportion of both *Wnt4^{ΔΔ}* and control DN2 thymocytes were proliferating (Fig. 3.5B). Moreover, we did not detect any difference in the expression of CD127/IL-7R α (Fig. 3.5C) or Flt3 (Fig. 3.5D) between *Wnt4^{ΔΔ}* and control ETPs or DN3 cells, suggesting that the decrease in *Wnt4^{ΔΔ}* progenitor cell expansion was not due to diminished cytokine receptor expression. Rather, we hypothesize that the decreased Notch1 expression could translate into a decrease in the proportion of *Wnt4^{ΔΔ}* thymus settling cells that would ultimately commit themselves into T lymphocyte fate.

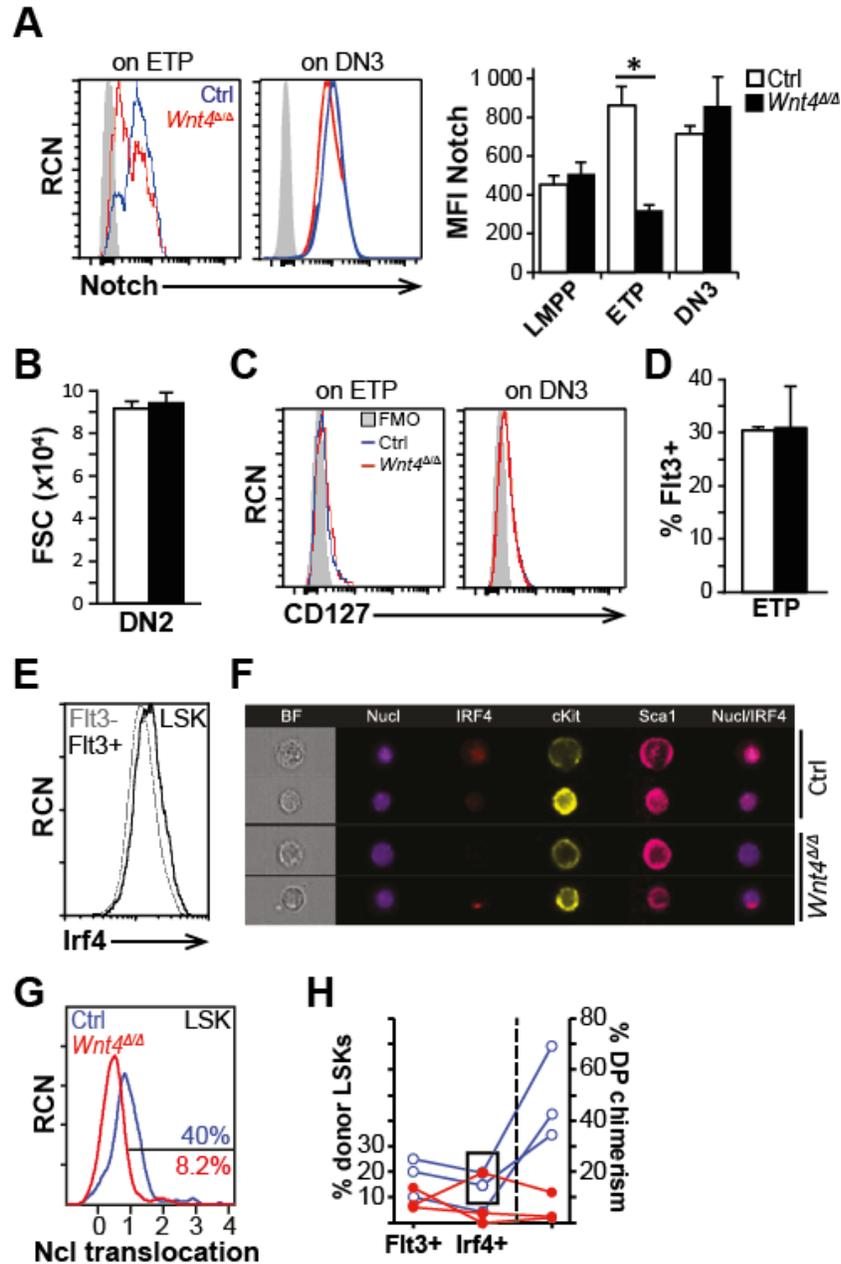


Figure 3.5 **Wnt4 is needed for normal Notch1 expression on ETPs.**

A) Overlays representing Notch expression on ETP and DN3 cells (left panels) and mean fluorescence intensity of Notch in different subpopulations of bone marrow and thymocytes (right panels). B) Analysis of cell size (as determined by forward scatter, FSC) in DN2 cells by flow cytometry. C) Overlays representing CD127 expression on ETP and DN3 cells. D) Analysis of Flt3 expression on ETPs by flow cytometry. E) Analysis of IRF4 expression in Flt3⁻ and Flt3⁺ HSPCs by flow cytometry. F, G) Analysis of IRF4 localization in the nucleus by imaging flow cytometry. F) Representative images for IRF4 staining. G) Overlay representing relative co-localization of IRF4 with nuclear stain from approximately 1000 cells per genotype. Similar results were obtained in a second independent experiment. H) Analysis of IRF4 expression in donor-derived HSPCs in relation to thymic repopulation in individual recipient mice. **P*<0.05, ***P*<0.1, ****P*<0.001 (two-tailed, unpaired student's t-test).

IRF4 has been shown to promote not only CCR9 expression and thymus seeding during embryogenesis but also to prevent LMPPs from adopting myeloid fates in zebrafish (Wang *et al.*, 2015). Total IRF4 levels were higher in LMPPs as compared to Flt3⁻ HSPCs, indicating that IRF4 is upregulated with differentiation in mouse progenitor cells as well (Fig. 3.5E) and could therefore play a similar role in promoting T cell fate. Nuclear IRF4 staining was significantly reduced in *Wnt4*^{ΔΔ} LSKs at steady state (Fig. 3.5F, G), suggesting that hematopoietic prethymic Wnt4 may support T lymphoid priming via IRF4. We also examined IRF4 expression and intracellular localization in the BM of chimeric mice. In controls, IRF4 expression in donor-derived LSKs correlated with LMPP frequency (Fig. 3.5H), and the majority of IRF4 was found in the nucleus. In comparison, *Wnt4*^{ΔΔ} chimeras displayed reduced IRF4⁺ donor LSK frequency, with the highest IRF4 expression correlating with the highest intrathymic donor chimerism (Fig. 3.5H). Collectively these results show that BM Wnt4 promotes T lymphocyte fate of HSPCs, likely by favoring Notch-1 and IRF4 expression and thereby increasing their commitment to T cell differentiation.

3.6 Discussion

Wnt4 is one of the most abundantly expressed *Wnt* family members in the thymic stroma (Dumont-Lagacé *et al.*, 2014; Mulroy *et al.*, 2002), and it is important for the cell-autonomous regulation of TEC numbers (Heinonen *et al.*, 2011a; Swann *et al.*, 2017). Previous studies have shown that hematopoietic overexpression of *Wnt4* promotes thymus recovery post-HCT (Heinonen *et al.*, 2011b; Louis *et al.*, 2008), but the underlying mechanisms, particularly prethymic events, have remained unclear. We report here that hematopoietic *Wnt4* is required for efficient T lymphopoiesis. *Wnt4*^{ΔΔ} HSPCs were able to engraft the bone marrow but could not repopulate the thymus when in competition with control HSPCs. This did not appear to be due to defective thymus seeding, as *Wnt4*^{ΔΔ} HSPCs displayed delayed T lymphoid differentiation and expansion also in culture on OP9-DL1 stromal cells. We rather propose that *Wnt4*^{ΔΔ} HSPCs seeding the thymus are not properly primed to commit to T lymphoid lineage, most likely due to their insufficient Notch1 expression. Given that *Wnt4* is primarily expressed by TECs in the thymus, the HSPC-intrinsic commitment defect is more likely to originate at a prethymic rather than an intrathymic stage.

It has been previously shown that fetal liver cells that were transduced to overexpress Wnt4 resulted in improved thymus reconstitution post-transplant (Heinonen *et al.*, 2011b; Louis *et al.*, 2008), and it appeared to be the result of an increase in BM LMPP numbers. However, neither LMPP expansion, nor the enhanced thymopoiesis, correlated directly with the frequency of Wnt4 overexpressing cells present at 16 weeks after transplant, suggesting that the impact of hematopoietic Wnt4 overexpression on thymopoiesis was most likely not cell-autonomous. We propose it would rather be the result of improved niche repair in BM as well as in the thymus (Heinonen *et al.*, 2011a; Heinonen *et al.*, 2011b), and the absence of Wnt4 in the thymic stroma certainly has a dominant effect on thymus size and cannot be compensated for by the presence of Wnt4 in the BM microenvironment (Heinonen *et al.*, 2011a). However, Wnt4 is expressed by both fetal and BM HSPCs (Florian *et al.*, 2013; Luis *et al.*, 2010) in addition to BM stromal components (Sugimura *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2014), and we speculated that hematopoietic Wnt4 could also play a role in T cell development. Although stromal Wnt4 was sufficient to maintain LMPP numbers in our hematopoietic-specific *Wnt4^{ΔΔ}* mice, in contrast to conventional *Wnt4^{-/-}* animals in which Wnt4 is absent also from the stroma (Louis *et al.*, 2008), Wnt4-deficient LMPP function in promoting T lymphopoiesis was greatly reduced as exemplified by their inability to participate in thymus repopulation after competitive transplant. We propose that hematopoietic Wnt4 contributes to T lymphoid priming by promoting Notch1 expression on the surface of thymus seeding cells. Interestingly, stromal Wnt4 did not enhance Notch1 signaling in otherwise Wnt4-sufficient ETPs (Heinonen *et al.*, 2011a), corroborating our current model, where stromal Wnt4 is present. We therefore conclude that both stromal and hematopoietic Wnt4 are important for promoting T lymphopoiesis and appear to act via discreet but complementary mechanisms. These observations further underline the importance of the context of a Wnt signal, and suggest that a localized, directional, paracrine signal during cell-cell contact may have a different impact than the same ligand presented in an autocrine or non-directional manner (Habib *et al.*, 2013).

There is clearly the aspect of the dose of Wnt4 that is also crucial. Our results presented here contrast with the overexpression model (Heinonen *et al.*, 2011b; Louis *et al.*, 2008) as they clearly suggest that Wnt4 has an HSPC-intrinsic role in promoting T lymphopoiesis. It would thus appear that normal, wild-type levels of Wnt4 are beneficial for T lymphoid development, but both its absence and cell-intrinsic overexpression lead to the development of less competitive T cell progenitors. Very similar observations have been previously reported for β -

catenin/canonical Wnt signaling in HSPCs (Luis *et al.*, 2011) as well as more recently for β -catenin and Wnt4 in TECs (Swann *et al.*, 2017). It must also be noted that we did not observe any significant differences between *Vav-iCre⁻* and *Vav-iCre⁺ Wnt4^{fl/+}* mice (that are heterozygous for Wnt4), and individuals from both genotypes were included as controls.

Preconditioning chemotherapy and irradiation damage thymic stroma, whose slow recovery post-HCT results in diminished *de novo* T lymphopoiesis and an increased susceptibility to opportunistic pathogens. Stromal recovery has been linked to the number of thymus seeding cells present in the graft, and our results presented here identify Wnt4 as an interesting regulator of not only LMPP numbers but most importantly their quality as thymocyte precursors. Further dissection of the apparently autocrine mechanism of Wnt4 signaling in HSPCs should allow us to develop novel strategies for enhancing thymic recovery post-transplant.

3.7 Acknowledgements

We are grateful to Drs. Claude Perreault (University of Montreal, QC) and Seppo Vainio (Oulu University, Finland) for the gift of *Wnt4^{fl/fl}* mice; to Jessy Tremblay at the INRS-IAF Imaging facility for advice on flow cytometry; to Dr. Géraldine Delbès (INRS-IAF) for access to cell sorting; and to the staff of the Centre National de Biologie Expérimentale for excellent animal care.

3.8 Footnotes

1) This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC Discovery grant #419226-2012), the Canada Foundation for Innovation (CFI Leaders Fund #31377), the Fonds de recherche du Québec – Santé (#32598) and the Cole Foundation.

2) Abbreviations used:

HCT, hematopoietic cell transplant

TEC, thymic epithelial cell

ETP, early thymic progenitor

HSPC, hematopoietic stem/progenitor cell

BM, bone marrow

Wnt4^{Δ/Δ}, *Vav-iCre*⁺ *Wnt4*^{fl/fl}

LMPP, lymphoid-primed multipotent progenitor

DN, double negative

CHAPITRE 4 – DISCUSSION

Un développement adéquat des lymphocytes T est important pour l'immunité de l'hôte contre un pathogène ou un agent étranger. Avec l'âge, la taille du thymus diminue et la lymphopoïèse en est moins efficace. De plus, le thymus est endommagé pendant l'irradiation ou la chimiothérapie qui précède une transplantation de cellules souches hématopoïétiques. La récupération du thymus face à ces dommages prend beaucoup de temps, rendant l'hôte susceptible à divers infections.

Wnt4 est une des protéines Wnt les plus abondantes dans l'environnement thymique et elle est importante pour maintenir le nombre de cellules épithéliales dans le thymus. De plus, la surexpression de Wnt4 dans les progéniteurs hématopoïétiques favorisent la récupération thymique suite à une greffe. Par contre, les mécanismes impliqués et l'importance de Wnt4 dans les étapes préthymiques du développement ne sont pas clairs. Les études précédentes utilisaient un système de surexpression de la protéine Wnt4. Nous nous sommes ici intéressées à l'importance de Wnt4 dans le développement lymphocytaire en utilisant un système différent, soit la délétion de Wnt4 dans les cellules hématopoïétiques.

Nos résultats montrent que Wnt4 est important dans les cellules hématopoïétiques pour la lymphopoïèse. En effet, nous observons un défaut dans la lymphopoïèse suite au retrait de Wnt4 dans les cellules hématopoïétiques : moins de lymphocytes T sont produits lorsque Wnt4 est absent. Cela ne semble pas provenir d'une diminution dans le nombre de progéniteurs dans la moëlle osseuse, ni d'un problème dans la migration des cellules vers le thymus, mais plutôt d'une diminution de l'engagement des précurseurs vers la lignée des lymphocytes T causée par une diminution de l'expression de Notch1 à leur surface.

Tout d'abord, il a été démontré que la surexpression de Wnt4 dans les cellules hématopoïétiques du foie fœtal favorise la reconstitution thymique après une greffe et que cette reconstitution semble liée à l'augmentation du nombre de cellules progénitrices LMPP dans la moëlle osseuse. Cependant, la surexpression de Wnt4 ne corrèle pas directement avec l'expansion des LMPP ni l'amélioration de la thymopoïèse 16 semaines après la transplantation. De plus, l'absence de Wnt4 dans l'environnement thymique induit une diminution dans la taille de l'organe, qui ne peut être récupérée par la présence de Wnt4 dans le microenvironnement de la moëlle osseuse. Nous croyons que Wnt4 joue aussi un rôle dans le développement des

cellules T. En effet, chez des souris qui n'expriment pas Wnt4 dans les cellules hématopoïétiques, nous observons une diminution de lymphocytes T dans la rate, en plus d'une diminution de thymocytes à différents stades du développement lymphocytaire. Nous n'observons pas de différence entre les souris Wnt4 KO et les souris contrôles au niveau des progéniteurs dans la moëlle osseuse. De plus, suite à une transplantation compétitive, les LMPP déficients en Wnt4 sont capables de reconstituer la moëlle osseuse, mais ils ne peuvent pas repeupler adéquatement le thymus et ainsi participer au développement des lymphocytes T efficacement. Contrairement à ce que nous croyions au départ suite aux résultats de la surexpression de Wnt4, la diminution de la lymphopoïèse n'est pas due à une réduction dans le nombre de progéniteurs dans la moëlle osseuse.

Cette diminution de la lymphopoïèse peut alors être causée par un défaut dans la migration des progéniteurs vers le thymus ou un problème au niveau de l'engagement des précurseurs vers la lignée des lymphocytes T.

Wnt4 ne semble pas lié à la migration des progéniteurs au thymus. En effet, nous n'observons pas de différence dans l'expression de différents récepteurs impliqués dans la migration, comme CCR9 et CD62L, à la surface des progéniteurs chez les souris Wnt4 KO. Nous avons tenté de vérifier l'expression de CCR7, qui est exprimé sur les LMPP et les CLP comme CCR9 et dont les ligands, CCL19 et CCL21, sont présents à la surface des mTEC (Zlotoff *et al.*, 2010). Cependant, le marquage avec l'anticorps n'était pas concluant. En plus de ces récepteurs, nous pourrions vérifier l'expression des intégrines $\alpha_L\beta_2$ et $\alpha_4\beta_1$, qui lient les molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 respectivement (Scimone *et al.*, 2006). Ces molécules d'adhésion sont présentes sur le thymus et permettent aux progéniteurs d'y adhérer et d'y entrer. Nous avons également fait des expériences de migration avec des greffes de moëlle osseuse. Cependant, on ne peut rien conclure à cause du nombre très limité de cellules qui se sont rendues dans le thymus, autant chez les souris injectées par des cellules progénitrices Wnt4 KO que leurs confrères injectés par les progéniteurs WT (contrôle). Il est difficile de tester la migration des progéniteurs vers le thymus de cette manière, parce que les récepteurs sur le thymus qui favorisent l'entrée des cellules sont exprimés par vagues. En effet, la sélectine-P et CCL25 ne sont pas toujours présents sur le thymus (Gossens *et al.*, 2009) et il est impossible de savoir s'ils sont exprimés ou non avant de faire l'expérience. De plus, nous avons observé le même défaut du développement lymphocytaire *in vitro* : les progéniteurs ont été mis en culture sur des

cellules stromales, ce qui ne requiert pas de migration. Cette expérience, en plus de confirmer que Wnt4 n'influence pas la migration des cellules vers le thymus, nous permet d'affirmer que l'effet de Wnt4 est intrinsèque aux cellules progénitrices, puisque nous observons une différence entre le développement des progéniteurs Wnt4 KO et celui des cellules normales dans les mêmes conditions.

Wnt4 semble donc avoir un impact au niveau de l'engagement des cellules vers la lignée des cellules T. Nous avons ensuite évalué l'impact de Wnt4 sur l'expression de différentes protéines ou récepteurs au cours du développement. Nous avons notamment regardé l'expression de cKit, du récepteur de l'interleukine-7 (IL-7R/CD127), de Flt3 (CD135), de Notch1 et de IRF4. Nous avons choisi de regarder l'expression de IL-7R et de Flt3 puisqu'ils sont connus pour aider à la prolifération et à la survie des précurseurs DN1 et DN2 (Conlon *et al.*, 1989; Kenins *et al.*, 2010; Sambandam *et al.*, 2005; von Freeden-Jeffry *et al.*, 1997). De plus, nous mettons leurs ligands dans le milieu de culture lorsque nous voulons obtenir des lymphocytes T *in vitro* à partir de progéniteurs (Zúñiga-Pflücker, 2004). Notch1 est également connu pour permettre le développement des thymocytes, notamment lorsqu'il est exprimé par les cellules stromales OP9 (Pear & Radtke, 2003; Schmitt & Zúñiga-Pflücker, 2002).

D'abord, nous n'avons observé aucun changement dans l'expression de l'IL-7R, de cKit et de Flt3 sur les précurseurs dans le thymus, ces récepteurs étant important pour la prolifération et la survie des cellules ETP et DN2. La diminution de l'expansion des progéniteurs Wnt4 KO n'est donc pas due à une diminution de l'expression des récepteurs de cytokines. De plus, il n'y a pas de différence dans la taille des cellules en phase DN2, suggérant que la division cellulaire se fait normalement. Nous pourrions faire des essais de prolifération avec le CFSE ou le BrdU pour confirmer que Wnt4 n'influence pas la prolifération des thymocytes.

Ensuite, nous avons analysé l'expression de IRF4 dans les progéniteurs de la moëlle osseuse. Il a été démontré chez le poisson zèbre (*zebrafish*) que IRF4 favorise l'expression de CCR9 à la surface des cellules et empêche les LMPP de s'engager vers la lignée myéloïde (Wang *et al.*, 2015). Nous avons montré que IRF4 est plus fortement exprimée dans les LMPP que les MPP, ce qui semble être normal puisque les MPP ont une tendance plus élevée à se différencier en cellules myéloïdes que les LMPP. Étant un facteur de transcription, IRF4 doit être dans le noyau

pour pouvoir jouer son rôle. Nous avons observé que Wnt4 favorise la localisation au noyau de IRF4, autant à l'état d'équilibre que chez les souris greffées. Cela suggère que IRF4 pourrait initier le développement des lymphocytes T chez les progéniteurs hématopoïétiques avant même leur entrée dans le thymus. Il est aussi connu que IRF8, de la même famille qu'IRF4, interagit avec la β -caténine. En effet, l'activation de la β -caténine mène à une augmentation de l'expression de IRF8 qui limite les fonctions oncogéniques de la β -caténine (Scheller *et al.*, 2013). IRF4 pourrait avoir un rôle similaire avec la β -caténine, qui est importante dans la voie canonique de Wnt. De plus, chez l'humain, un des types de cancer du poumon montre une surexpression de IRF4 qui mène à l'augmentation d'ARNm de Notch1 et Notch2 et à l'activation de la voie de signalisation Notch/AKT (Qian *et al.*, 2017). Il est donc possible que le lien entre Wnt4, IRF4 et Notch1 soit plutôt direct. Il serait donc intéressant de voir si l'ajout de Wnt4 en culture augmente l'expression de IRF4 et de Notch1.

La signalisation de Notch est essentielle pour l'engagement des thymocytes puisqu'elle permet l'expression des gènes du récepteur des cellules T (TCR) et de différents facteurs de transcription important pour la répression de la différenciation des cellules vers d'autres lignées potentielles. Nous avons donc analysé l'expression de Notch1 à la surface des cellules de la moëlle osseuse et du thymus. Nous n'avons détecté aucune différence sur les LMPP dans la moëlle osseuse. Nous avons également remarqué chez les souris contrôles que l'expression de Notch1 augmentent sur les cellules ETP comparativement aux LMPP. Cependant, nous avons observé un délai dans l'augmentation de l'expression de Notch1 sur les thymocytes Wnt4 KO. Cette réduction de l'expression de Notch1 chez les ETP Wnt4 KO comparativement aux ETP contrôles pourrait être responsable de la diminution dans la proportion de cellules ETP Wnt4 KO qui s'engageraient dans la lignée T lymphocytaire. Pour nous assurer que la diminution de l'expression du récepteur influence négativement l'activation de la voie de signalisation et n'est pas due à une augmentation de liaison avec le ligand, nous pourrions comparer l'expression du domaine intracellulaire de Notch1 à l'aide d'un anticorps anti-ICN qui se lie au ICN seulement lorsque celui-ci est clivé. En supposant qu'il y ait une différence, nous pourrions en déduire que l'expression des facteurs de transcription induits par Notch1 serait affectée, tout comme les différentes étapes de la différenciation lymphocytaire qui nécessitent ces facteurs de transcription. Cela expliquerait le défaut dans la différenciation lymphocytaire. Pour confirmer les résultats, nous pourrions comparer l'expression de différents facteurs de transcription (ex : Hes1, Gata3, Bcl11b) dans les thymocytes Wnt4 KO et WT.

Le dosage des protéines Wnt est connu comme étant important pour le bon déroulement du développement. Nous montrons que l'absence de Wnt4 dans les cellules hématopoïétiques a un impact négatif sur le développement normal des lymphocytes T. De plus, la surexpression de Wnt4 mène au développement de progéniteurs de cellules T moins efficaces chez des souris greffées lorsqu'elles sont en compétition. Cela confirme l'importance du bon dosage de Wnt4 pour permettre un développement efficace de lymphocytes T.

Avec les expériences de greffe, nous avons montré que le nombre de progéniteurs LMPP Wnt4 KO est normal, mais que ces derniers sont incapables de produire adéquatement des lymphocytes T. Wnt4 semble donc être important pour la qualité des précurseurs thymiques plutôt que pour leur nombre. De plus, nous suggérons que Wnt4 favorise l'engagement vers la lignée des lymphocytes T en augmentant l'expression de IRF4 dans les progéniteurs de la moëlle osseuse et de Notch1 sur les précurseurs dans le thymus.

De nouvelles études devront être réalisées pour déterminer le mécanisme exact par lequel Wnt4 régule l'expression de Notch1 à la surface des précurseurs thymiques, favorisant ainsi l'engagement des précurseurs vers la lignée des lymphocytes T. De plus, cela permettrait de développer de nouvelles stratégies pour améliorer la récupération thymique après une transplantation. Tel que mentionné précédemment, nous pourrions vérifier l'activation de Notch1 à l'aide d'un anticorps qui lie le domaine intracellulaire du récepteur lorsqu'il est activé. Nous pourrions également vérifier l'expression de différents facteurs de transcription impliqués dans le développement des lymphocytes T, dont certains sont induits par Notch1. Nous pourrions approfondir la question de la migration des progéniteurs vers le thymus en analysant l'expression d'intégrines à la surface des progéniteurs. Finalement, nous pourrions expérimenter l'effet de Wnt4 sur l'expression de IRF4 et Notch1 en l'ajoutant dans une culture cellulaire.

CHAPITRE 5 – CONCLUSION

Pour conclure, le développement des lymphocytes T semble dépendre de la signalisation de Wnt4. En effet, Wnt4 n'influence pas le nombre de progéniteurs de la moëlle osseuse capable de migrer dans le thymus, mais il influence leur qualité et leur engagement vers la lignée T lymphocytaire. Nous avons montré que la production réduite de lymphocytes T ne semble pas être causée seulement par l'incapacité des progéniteurs à migrer dans le thymus. Nous avons également démontré que l'effet de Wnt4 est intrinsèques aux cellules progénitrices et que cela se produit avant même que les cellules entrent dans le thymus. De plus, la diminution de l'expansion des progéniteurs lorsque Wnt4 est absent n'est pas due à une diminution de l'expression des récepteurs de cytokines qui sont importantes pour cette expansion. Wnt4 favorise l'engagement vers la lignée des lymphocytes T en augmentant l'expression de IRF4 globalement et sa localisation dans le noyau des progéniteurs de la moëlle osseuse. Wnt4 favorise également l'engagement en augmentant l'expression de Notch1, qui est un récepteur connu comme étant essentiel pour l'engagement des lymphocytes T, sur les précurseurs dans le thymus. De nouvelles études devront être réalisées pour approfondir ces résultats et déterminer le mécanisme exact par lequel Wnt4 régule l'expression de Notch1 à la surface des précurseurs thymiques, favorisant ainsi l'engagement des précurseurs vers la lignée des lymphocytes T.

RÉFÉRENCES

- Abidin BM, Owusu Kwarteng E & Heinonen KM (2015) Frizzled-6 Regulates Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Survival and Self-Renewal. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195(5):2168-2176.
- Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge O-JJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M & Jacobsen SE (2005) Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121(2):295-306.
- Awong G, Singh J, Mohtashami M, Malm M, Motte-Mohs RN, Benveniste PM, Serra P, Herer E, van den Brink MR & Zúñiga-Pflücker J (2013) Human proT-cells generated in vitro facilitate hematopoietic stem cell-derived T-lymphopoiesis in vivo and restore thymic architecture. *Blood* 122(26):4210-4219.
- Balciunaite G, Ceredig R, Fehling H-J, Zúñiga-Pflücker J-C & Rolink AG (2005) The role of Notch and IL-7 signaling in early thymocyte proliferation and differentiation. *European Journal of Immunology* 35(4):1292-1300.
- Bhandoola A & Sambandam A (2006) From stem cell to T cell: one route or many? *Nature reviews. Immunology* 6(2):117-126.
- Boehm T & Swann JB (2013) Thymus involution and regeneration: two sides of the same coin? *Nature reviews. Immunology* 13(11):831-838.
- Brugnera E, Bhandoola A, Cibotti R, Yu Q, Guinter TI, Yamashita Y, Sharrow SO & Singer A (2000) Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4⁺8⁺ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8⁺ T cells. *Immunity* 13(1):59-71.
- Brunk F, Augustin I, Meister M, Boutros M & Kyewski B (2015) Thymic Epithelial Cells Are a Nonredundant Source of Wnt Ligands for Thymus Development. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195(11):5261-5271.
- Bunting MD, Comerford I & McColl SR (2011) Finding their niche: chemokines directing cell migration in the thymus. *Immunology and cell biology* 89(2):185-196.
- Buono M, Facchini R, Matsuoka S, Thongjuea S, Waithe D, Luis TC, Giustacchini A, Besmer P, Mead AJ, Jacobsen SE & Nerlov C (2016) A dynamic niche provides Kit ligand in a stage-specific manner to the earliest thymocyte progenitors. *Nature cell biology* 18(2):157-167.
- Ceredig R & Rolink T (2002) A positive look at double-negative thymocytes. *Nature reviews. Immunology* 2(11):888-897.
- Clevers H & Nusse R (2012) Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 149(6):1192-1205.
- Cobas M, Wilson A, Ernst B, Mancini SJJ, MacDonald HR, Kemler R & Radtke F (2004) Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *The Journal of experimental medicine* 199(2):221-229.

- Conlon PJ, Morrissey PJ, Nordan RP, Grabstein KH, Prickett KS, Reed SG, Goodwin R, Cosman D & Namen AE (1989) Murine thymocytes proliferate in direct response to interleukin-7. *Blood* 74(4):1368-1373.
- Cruciat C-MM (2014) Casein kinase 1 and Wnt/ β -catenin signaling. *Current opinion in cell biology* 31:46-55.
- de Koning C, Nierkens S & Boelens JJ (2016) Strategies before, during, and after hematopoietic cell transplantation to improve T-cell immune reconstitution. *Blood* 128(23):2607-2615.
- De Obaldia ME, Bell JJ & Bhandoola A (2013a) Early T-cell progenitors are the major granulocyte precursors in the adult mouse thymus. *Blood* 121(1):64-71.
- De Obaldia ME, Bell JJ, Wang X, Harly C, Yashiro-Ohtani Y, DeLong JH, Zlotoff DA, Sultana DA, Pear WS & Bhandoola A (2013b) T cell development requires constraint of the myeloid regulator C/EBP- α by the Notch target and transcriptional repressor Hes1. *Nature immunology* 14(12):1277-1284.
- Dixit VD (2010) Thymic fatness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging. *Current opinion in immunology* 22(4):521-528.
- Dumont-Lagacé M, Brochu S, St-Pierre C & Perreault C (2014) Adult thymic epithelium contains non-senescent label-retaining cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192(5):2219-2226.
- Famili F, Naber BA, Vloemans S, de Haas EF, Tiemessen MM & Staal FJ (2015) Discrete roles of canonical and non-canonical Wnt signaling in hematopoiesis and lymphopoiesis. *Cell death & disease* 6.
- Famili F, Wiekmeijer A-SS & Staal FJ (2017) The development of T cells from stem cells in mice and humans. *Future science OA* 3(3).
- Florian MC, Nattamai KJ, Dörr K, Marka G, Uberle B, Vas V, Eckl C, Andrä I, Schiemann M, Oostendorp RA, Scharffetter-Kochanek K, Kestler HA, Zheng Y & Geiger H (2013) A canonical to non-canonical Wnt signalling switch in haematopoietic stem-cell ageing. *Nature* 503(7476):392-396.
- Freedden-Jeffry vU, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE & Murray R (1995) Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *Journal of Experimental Medicine* 181(4):1519-1526.
- Fry TJ & Mackall CL (2002) Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood* 99(11):3892-3904.
- Goronzy JJJ & Weyand CM (2005) T cell development and receptor diversity during aging. *Current opinion in immunology* 17(5):468-475.
- Gossens K, Naus S, Corbel SY, Lin S, Rossi FM, Kast J & Ziltener HJ (2009) Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25. *The Journal of experimental medicine* 206(4):761-778.

- Gounari F, Aifantis I, Khazaie K, Hoeflinger S, Harada N, Taketo MM & von Boehmer H (2001) Somatic activation of beta-catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development. *Nature immunology* 2(9):863-869.
- Habib SJ, Chen B-CC, Tsai F-CC, Anastassiadis K, Meyer T, Betzig E & Nusse R (2013) A localized Wnt signal orients asymmetric stem cell division in vitro. *Science (New York, N.Y.)* 339(6126):1445-1448.
- Heinonen KM & Perreault C (2008) Development and functional properties of thymic and extrathymic T lymphocytes. *Critical reviews in immunology* 28(5):441-466.
- Heinonen KM, Vanegas JR, Brochu S, Shan J, Vainio SJ & Perreault C (2011a) Wnt4 regulates thymic cellularity through the expansion of thymic epithelial cells and early thymic progenitors. *Blood* 118(19):5163-5173.
- Heinonen KM, Vanegas JR, Lew D, Krosi J & Perreault C (2011b) Wnt4 enhances murine hematopoietic progenitor cell expansion through a planar cell polarity-like pathway. *PLoS one* 6(4).
- Hozumi K, Mailhos C, Negishi N, Hirano K-i, Yahata T, Ando K, Zuklys S, Holländer GA, Shima DT & Habu S (2008) Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *The Journal of experimental medicine* 205(11):2507-2513.
- Huang G, Zhang P, Hirai H, Elf S, Yan X, Chen Z, Koschmieder S, Okuno Y, Dayaram T, Growney JD, Shivdasani RA, Gilliland DG, Speck NA, Nimer SD & Tenen DG (2008) PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nature genetics* 40(1):51-60.
- Ikawa T, Hirose S, Masuda K, Kakugawa K, Satoh R, Shibano-Satoh A, Kominami R, Katsura Y & Kawamoto H (2010) An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science (New York, N.Y.)* 329(5987):93-96.
- Ioannidis V, Beermann F, Clevers H & Held W (2001) The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nature immunology* 2(8):691-697.
- Jeannot G, Scheller M, Scarpellino L, Duboux S, Gardiol N, Back J, Kuttler F, Malanchi I, Birchmeier W, Leutz A, Huelsken J & Held W (2008) Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of beta-catenin and gamma-catenin. *Blood* 111(1):142-149.
- Kenins L, Gill JW, Holländer GA & Wodnar-Filipowicz A (2010) Flt3 ligand-receptor interaction is important for maintenance of early thymic progenitor numbers in steady-state thymopoiesis. *European journal of immunology* 40(1):81-90.
- Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE & Nerlov C (2006) Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nature immunology* 7(10):1048-1056.
- Klein L, Kyewski B, Allen PM & Hogquist KA (2014) Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature reviews. Immunology* 14(6):377-391.

- Koch U, Wilson A, Cobas M, Kemler R, Macdonald HR & Radtke F (2008) Simultaneous loss of beta- and gamma-catenin does not perturb hematopoiesis or lymphopoiesis. *Blood* 111(1):160-164.
- Kondo M, Weissman IL & Akashi K (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91(5):661-672.
- Krueger A, Willenzon S, Lyszkiewicz M, Kremmer E & Förster R (2010) CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood* 115(10):1906-1912.
- Kueh HY, Yui MA, Ng KK, Pease SS, Zhang JA, Damle SS, Freedman G, Siu S, Bernstein ID, Elowitz MB & Rothenberg EV (2016) Asynchronous combinatorial action of four regulatory factors activates Bcl11b for T cell commitment. *Nature immunology* 17(8):956-965.
- Kwarteng EO & Heinonen KM (2016) Competitive Transplants to Evaluate Hematopoietic Stem Cell Fitness. *Journal of visualized experiments : JoVE* 10.3791/54345(114).
- Liang H, Coles AH, Zhu Z, Zayas J, Jurecic R, Kang J & Jones SN (2007) Noncanonical Wnt signaling promotes apoptosis in thymocyte development. *The Journal of experimental medicine* 204(13):3077-3084.
- Louis I, Heinonen KM, Chagraoui J, Vainio S, Sauvageau G & Perreault C (2008) The signaling protein Wnt4 enhances thymopoiesis and expands multipotent hematopoietic progenitors through beta-catenin-independent signaling. *Immunity* 29(1):57-67.
- Love PE & Bhandoola A (2011) Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nature reviews. Immunology* 11(7):469-477.
- Luc S, Luis TC, Boukarabila H, Macaulay IC, Buza-Vidas N, Bouriez-Jones T, Lutteropp M, Woll PS, Loughran SJ, Mead AJ, Hultquist A, Brown J, Mizukami T, Matsuoka S, Ferry H, Anderson K, Duarte S, Atkinson D, Soneji S, Domanski A, Farley A, Sanjuan-Pla A, Carella C, Patient R, de Bruijn M, Enver T, Nerlov C, Blackburn C, Godin I & Jacobsen SE (2012) The earliest thymic T cell progenitors sustain B cell and myeloid lineage potential. *Nature immunology* 13(4):412-419.
- Luis TC, Naber BA, Fibbe WE, van Dongen JJ & Staal FJ (2010) Wnt3a nonredundantly controls hematopoietic stem cell function and its deficiency results in complete absence of canonical Wnt signaling. *Blood* 116(3):496-497.
- Luis TC, Naber BA, Roozen PP, Brugman MH, de Haas EF, Ghazvini M, Fibbe WE, van Dongen JJ, Fodde R & Staal FJ (2011) Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion. *Cell stem cell* 9(4):345-356.
- Mackall CL, Fry TJ, Bare C, Morgan P, Galbraith A & Gress RE (2001) IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood* 97(5):1491-1497.

- Massa S, Balciunaite G, Ceredig R & Rolink AG (2006) Critical role for c-kit (CD117) in T cell lineage commitment and early thymocyte development in vitro. *European journal of immunology* 36(3):526-532.
- Mohtashami M, Shah DK, Nakase H, Kianizad K, Petrie HT & Zúñiga-Pflücker JC (2010) Direct comparison of Dll1- and Dll4-mediated Notch activation levels shows differential lymphomyeloid lineage commitment outcomes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185(2):867-876.
- Mulroy T, McMahon JA, Burakoff SJ, McMahon AP & Sen J (2002) Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *European journal of immunology* 32(4):967-971.
- Niehrs C (2012) The complex world of WNT receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13(12):767-779.
- Nitta T, Ohigashi I, Nakagawa Y & Takahama Y (2011) Cytokine crosstalk for thymic medulla formation. *Current Opinion in Immunology* 23(2):190-197.
- Oosterwegel MA, Haks MC, Jeffry U, Murray R & Kruisbeek AM (1997) Induction of TCR gene rearrangements in uncommitted stem cells by a subset of IL-7 producing, MHC class-II-expressing thymic stromal cells. *Immunity* 6(3):351-360.
- Pear WS & Radtke F (2003) Notch signaling in lymphopoiesis. *Seminars in immunology* 15(2):69-79.
- Peschon JJ, Morrissey PJ & Grabstein KH (1994) Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *Journal of ...*
- Pietras EM, Reynaud D, Kang Y-AA, Carlin D, Calero-Nieto FJ, Leavitt AD, Stuart JM, Göttgens B & Passegué E (2015) Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell stem cell* 17(1):35-46.
- Pongracz J, Hare K, Harman B, Anderson G & Jenkinson EJ (2003) Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. *European journal of immunology* 33(7):1949-1956.
- Pongracz JE, Parnell SM, Jones T, Anderson G & Jenkinson EJ (2006) Overexpression of ICAT highlights a role for catenin-mediated canonical Wnt signalling in early T cell development. *European journal of immunology* 36(9):2376-2383.
- Pongracz JE & Stockley RA (2006) Wnt signalling in lung development and diseases. *Respiratory research* 7:15.
- Prockop SE & Petrie HT (2004) Regulation of thymus size by competition for stromal niches among early T cell progenitors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173(3):1604-1611.
- Qian Y, Du Z, Xing Y, Zhou T, Chen T & Shi M (2017) Interferon regulatory factor 4 (IRF4) is overexpressed in human non-small cell lung cancer (NSCLC) and activates the Notch signaling pathway. *Molecular medicine reports* 16(5):6034-6040.

- Radtke F, MacDonald HR & Tacchini-Cottier F (2013) Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nature reviews. Immunology* 13(6):427-437.
- Rodewald HR, Ogawa M, Haller C, Waskow C & DiSanto JP (1997) Pro-thymocyte expansion by c-kit and the common cytokine receptor gamma chain is essential for repertoire formation. *Immunity* 6(3):265-272.
- Rolink AG, Massa S, Balciunaite G & Ceredig R (2007) Early lymphocyte development in bone marrow and thymus. *Swiss medical weekly* 137 Suppl 155.
- Rothenberg EV, Champhekar A, Damle S, Del Real MM, Kueh HY, Li L & Yui MA (2013) Transcriptional establishment of cell-type identity: dynamics and causal mechanisms of T-cell lineage commitment. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 78:31-41.
- Rothenberg EV, Kueh HY, Yui MA & Zhang JA (2016) Hematopoiesis and T-cell specification as a model developmental system. *Immunological reviews* 271(1):72-97.
- Rothenberg EV & Scripture-Adams DD (2008) Competition and collaboration: GATA-3, PU.1, and Notch signaling in early T-cell fate determination. *Seminars in immunology* 20(4):236-246.
- Sambandam A, Bell JJ, Schwarz BA, Zediak VP, Chi AW, Zlotoff DA, Krishnamoorthy SL, Burg JM & Bhandoola A (2008) Progenitor migration to the thymus and T cell lineage commitment. *Immunologic research* 42(1-3):65-74.
- Sambandam A, Maillard I, Zediak VP, Xu L, Gerstein RM, Aster JC, Pear WS & Bhandoola A (2005) Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nature immunology* 6(7):663-670.
- Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, Taketo MM, Birchmeier W, Tenen DG & Leutz A (2006) Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nature immunology* 7(10):1037-1047.
- Scheller M, Schönheit J, Zimmermann K, Leser U, Rosenbauer F & Leutz A (2013) Cross talk between Wnt/ β -catenin and Irf8 in leukemia progression and drug resistance. *The Journal of experimental medicine* 210(11):2239-2256.
- Schmitt TM & Zúñiga-Pflücker JC (2002) Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17(6):749-756.
- Schwarz BA, Sambandam A, Maillard I, Harman BC, Love PE & Bhandoola A (2007) Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178(4):2008-2017.
- Scimone ML, Aifantis I, Apostolou I, von Boehmer H & von Andrian UH (2006) A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(18):7006-7011.
- Seifert JRK & Mlodzik M (2007) Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nature reviews. Genetics* 8(2):126.

- Shan J, Jokela T, Peltoketo H & Vainio S (2009) Generation of an allele to inactivate Wnt4 gene function conditionally in the mouse. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 47(11):782-788.
- Sitnicka E, Bryder D, Theilgaard-Mönch K, Buza-Vidas N, Adolfsson J & Jacobsen SE (2002) Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity* 17(4):463-472.
- Sitnicka E, Buza-Vidas N, Larsson S, Nygren JM, Liuba K & Jacobsen SE (2003) Human CD34+ hematopoietic stem cells capable of multilineage engrafting NOD/SCID mice express flt3: distinct flt3 and c-kit expression and response patterns on mouse and candidate human hematopoietic stem cells. *Blood* 102(3):881-886.
- St-Pierre C, Brochu S, Vanegas JR, Dumont-Lagacé M, Lemieux S & Perreault C (2013) Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Scientific reports* 3:1860.
- Staal FJ, Luis TC & Tiemessen MM (2008) WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nature reviews. Immunology* 8(8):581-593.
- Staal FJ & Sen JM (2008) The canonical Wnt signaling pathway plays an important role in lymphopoiesis and hematopoiesis. *European journal of immunology* 38(7):1788-1794.
- Stamos JL & Weis WI (2013) The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(1).
- Sugimura R, He XC, Venkatraman A, Arai F, Box A, Semerad C, Haug JS, Peng L, Zhong X-BB, Suda T & Li L (2012) Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell* 150(2):351-365.
- Swann JB, Happe C & Boehm T (2017) Elevated levels of Wnt signaling disrupt thymus morphogenesis and function. *Scientific reports* 7(1):785.
- Taghon T, Yui MA, Pant R, Diamond RA & Rothenberg EV (2006) Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* 24(1):53-64.
- Takaba H & Takayanagi H (2017) The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends in immunology* 38(11):805-816.
- Tan SH, Senarath-Yapa K, Chung MT, Longaker MT, Wu JY & Nusse R (2014) Wnts produced by Osterix-expressing osteolineage cells regulate their proliferation and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(49):71.
- Tiemessen MM, Baert MR, Schonewille T, Brugman MH, Famili F, Salvatori DC, Meijerink JPP, Ozbek U, Clevers H, van Dongen JJ & Staal FJ (2012) The nuclear effector of Wnt-signaling, Tcf1, functions as a T-cell-specific tumor suppressor for development of lymphomas. *PLoS biology* 10(11).
- von Freeden-Jeffry U, Solvason N, Howard M & Murray R (1997) The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 7(1):147-154.

- Wang S, He Q, Ma D, Xue Y & Liu F (2015) Irf4 Regulates the Choice between T Lymphoid-Primed Progenitor and Myeloid Lineage Fates during Embryogenesis. *Developmental Cell* 34(6):621-631.
- Weber BN, Chi AW, Chavez A, Yashiro-Ohtani Y, Yang Q, Shestova O & Bhandoola A (2011) A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. *Nature* 476(7358):63-68.
- Weerkamp F, Baert MRM & Naber BAE (2006) Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proceedings of the*
- Xu M, Sharma A, Hossain MZ, Wiest DL & Sen JM (2009) Sustained expression of pre-TCR induced beta-catenin in post-beta-selection thymocytes blocks T cell development. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182(2):759-765.
- Xu Y, Banerjee D, Huelsken J, Birchmeier W & Sen JM (2003) Deletion of beta-catenin impairs T cell development. *Nature immunology* 4(12):1177-1182.
- Xu Z, Xing S, Shan Q, Gullicksrud JA, Bair TB, Du Y, Liu C & Xue H-HH (2017) Cutting Edge: β -Catenin-Interacting Tcf1 Isoforms Are Essential for Thymocyte Survival but Dispensable for Thymic Maturation Transitions. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 198(9):3404-3409.
- Yu S, Zhou X, Steinke FC, Liu C, Chen S-CC, Zagorodna O, Jing X, Yokota Y, Meyerholz DK, Mullighan CG, Knudson CM, Zhao D-MM & Xue H-HH (2012) The TCF-1 and LEF-1 transcription factors have cooperative and opposing roles in T cell development and malignancy. *Immunity* 37(5):813-826.
- Yui MA & Rothenberg EV (2014) Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity. *Nature reviews. Immunology* 14(8):529-545.
- Zlotoff DA, Sambandam A, Logan TD, Bell JJ, Schwarz BA & Bhandoola A (2010) CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood* 115(10):1897-1905.
- Zlotoff DA, Schwarz BA & Bhandoola A (2008) The long road to the thymus: the generation, mobilization, and circulation of T-cell progenitors in mouse and man. *Seminars in immunopathology* 30(4):371-382.
- Zlotoff DA, Zhang SL, De Obaldia ME, Hess PR, Todd SP, Logan TD & Bhandoola A (2011) Delivery of progenitors to the thymus limits T-lineage reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood* 118(7):1962-1970.
- Zúñiga-Pflücker JC (2004) T-cell development made simple. *Nature reviews. Immunology* 4(1):67-72.

ANNEXE

17-01309-FL Approved MS Receive

infoji@aai.org

Envoyé : 12 septembre 2017 15:35

À : Hetu-Arbour, Roxann

CC: Prof. Heinonen

Dear Dr. Hétu-Arbour:

This e-mail is to notify you that you are listed as a co-author on a manuscript, titled "Bone marrow progenitor cell-intrinsic Wnt4 promotes T lymphopoiesis," submitted by Prof. Heinonen for consideration for publication in *The Journal of Immunology*. The manuscript has been assigned the manuscript identification number 17-01309-FL.

Currently, our records indicate that there is no ORCID associated with your account. ORCID stands for "Open Researcher and Contributor ID (Identification)". It is a unique number used by researchers to unambiguously assign published work to the correct person. More information about it can be found here: <http://orcid.org/>

Please click the link below if you wish to provide an ORCID:

<https://ji.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A2CJ3ZQJ5A2BVzb4Bh5B9ftdID00ugnmZfM47IwRYZfXAgZ>

Please note that the link to the ORCID account will cease to function if the manuscript is accepted. Please use the link now if you wish to update or add your ORCID number.

Regards,

Journal Staff

The Journal of Immunology