

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine

**LA MATURATION DES THYMOCYTES ÉTUDIÉE *IN SITU* À
L'AIDE DU CFSE ET DE L'ULEX EUROPAEUS AGGLUTINNIN-I**

Par
Monica Graziano

Thèse présentée comme exigence partielle
pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.)
en virologie et immunologie

2001

À mes parents, Emilia et Mario.....

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
CONTRIBUTION DE L'AUTEUR.....	xvi
SOMMAIRE	xviii
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
INTRODUCTION	5
1.0 LE THYMUS ET SES COMPOSANTES.....	6
1.1 Le thymus : son anatomie et sa colonisation.....	6
1.2 Les éléments non-lymphoïdes.....	8
1.2.1 Les cellules épithéliales.....	8
1.2.2 Les cellules dendritiques.....	11
1.2.3 Les macrophages.....	12
1.2.4 Les autres types cellulaires.....	13
1.3 Les cellules lymphoïdes autres que les thymocytes.....	14
1.3.1 Les lymphocytes B thymiques.....	14
1.3.2 Les cellules NK.....	15
1.3.3 Les NKT.....	16
1.4 Les thymocytes (et leur développement).....	16
1.4.1 Le précurseur de cellules lymphoïdes thymiques (PLT).....	17
1.4.2 Les cellules Pro-T.....	18
1.4.3 Les cellules Pré-T 'Précoces'.....	18

1.4.4	Les cellules Pré-T 'Tardives'.....	19
2.0	L'ÉDUCATION THYMIQUE.....	19
2.1	La sélection positive.....	20
2.1.1	Le rôle des cellules épithéliales thymiques dans la sélection positive.....	22
2.2	La sélection négative.....	23
2.2.1	Le rôle des cellules épithéliales thymiques dans la sélection négative.....	24
2.3	Généralités: L'apoptose.....	26
2.3.1	L'apoptose dans le thymus.....	27
2.3.2	La régulation de l'apoptose dans le thymus.....	27
2.3.3	L'apoptose et les interactions lympho-stromales thymiques.....	29
2.4	Les lymphocytes $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$	31
3.0	L'ÉMIGRATION DES THYMOCYTES.....	34
3.1	Le marquage de lymphocytes dans le but d'étudier la migration.....	34
3.1.1	Radio-isotopes.....	34
3.1.2	La fluorescéine et la rhodamine.....	34
3.1.3	Le Hoechst 33342 (H33342).....	35
3.1.4	Les colorants lipophiles : Exemple typique : le PKH-26.....	36
3.1.5	Les dérivés de la fluorescéine: les colorants intracytoplasmiques.....	37
3.2	L'émigration de thymocytes vers la périphérie.....	37
3.2.1	Mécanismes d'émigration.....	40
3.3	Les organes lymphoïdes secondaires.....	44
3.3.1	La rate.....	44
3.3.2	Les ganglions.....	45

3.3.3	Le réseau MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue).....	45
3.4	La recirculation de lymphocytes.....	47
4.0	LES MOLÉCULES ACCESSOIRES IMPLIQUÉES DANS LES INTERACTIONS LYMPHO-STROMALES.....	48
4.1	Introduction.....	48
4.2	Les molécules d'adhésion.....	48
4.2.1	La famille des intégrines.....	48
4.2.2	La superfamille des immunoglobulines.....	51
4.2.2.1	Les co-récepteurs CD4 et CD8.....	52
4.2.2.2	Les ICAMs.....	53
4.2.2.3	Le CD2 et son ligand, le LFA-3 (CD58).....	56
4.2.2.4	Le CD28, son homologue, le CTLA-4 (CD152) et leurs ligands, le B7.1 (CD80) et le B7.2 (CD86).....	57
4.2.3	Les sélectines.....	60
4.3	Les protéines de la matrice extracellulaire : autres molécules impliquées dans les interactions lympho-stromales.....	61
5.0	LES FACTEURS SOLUBLES.....	64
5.1	Interactions entre les cellules stromales et les thymocytes : plus qu'un lien physique.....	64
5.2	L'IL-7 : Une cytokine indispensable au développement de lymphocytes T.....	67
6.0	MODÈLES IN VITRO D'INTERACTION LYMPHO-STROMALE.....	68
6.1	La lignée de cellules épithéliales médullaires E-5.....	69
6.2	Culture de thymus foetal (FTOC).....	70
6.3	Des variations du même thème.....	71

7.0 LES CELLULES ÉPITHÉLIALES ET LES THYMOCYTES :	
« JAMAIS LES UNES SANS LES AUTRES ! ».....	73
L'HYPOTHÈSE, LA QUESTION, ET LES OBJECTIFS.....	76
CHAPITRE 2 : DÉVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE DE MARQUAGE DE THYMOCYTES <i>IN VIVO</i> PERMETTANT L'ÉTUDE, À LONG TERME, DE L'ÉMIGRATION THYMIQUE.....	77
Résumé article I.....	78
Article I : THE FATE OF THYMOCYTES LABELED <i>IN VIVO</i> WITH CFSE.....	79
Summary.....	80
Introduction.....	81
Materials and methods.....	84
Results.....	87
Discussion.....	93
References.....	98
CHAPITRE 3 : LES EFFETS DU BLOCAGE, PAR LA UEA-I, DE CELLULES ÉPITHÉLIALES MÉDULLAIRES THYMIQUES.....	121
Résumé article II.....	122
Article II : UEA-I ⁺ THYMIC MEDULLARY EPITHELIUM BLOCKAGE REDUCES THE RATE OF CORTICAL THYMOCYTE PROLIFERATION.....	123
Abstract.....	124
Introduction.....	125
Materials and methods.....	128

Results.....	134
Discussion.....	140
References.....	145
Résumé article III.....	167
Article III : UEA-I-BINDING TO THYMIC MEDULLARY EPITHELIAL CELLS SELECTIVELY REDUCES NUMBERS OF CORTICAL TCR $\alpha\beta$ ⁺ THYMOCYTES IN FTOCs.....	168
Summary.....	169
Introduction.....	170
Materials and methods.....	172
Results.....	175
Discussion.....	178
References.....	181
CHAPITRE 4: APPLICATION DE LA TECHNIQUE DE MARQUAGE DE THYMOCYTES IN VIVO: CARACTÉRISATION DE DEUX SOUCHES DE SOURIS DÉFICIENTES EN ICAM-1.....	193
Résumé article IV.....	194
Article IV : PROTRACTED DEVELOPMENT AND THYMIC EMIGRATION OF T CELLS IN ICAM-1-DEFICIENT MICE: CELLULAR EVIDENCE AND GENOMIC ANALYSIS.....	195
Abstract.....	196
Introduction.....	197
Materials and methods.....	199
Results.....	204
Discussion.....	208
References.....	213

CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	232
1.0 LÉ MARQUAGE <i>IN VIVO</i> DE THYMOCYTES AVEC LE CFSE : DÉVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE PERMETTANT L'ÉTUDE DE MIGRATION À LONG TERME ET SES APPLICATIONS.....	233
1.1 Établissements de conditions optimales de marquage	234
1.2 Le marquage des thymocytes au CFSE reflète la séquence des événements de différenciation et d'émigration.....	236
1.3 Étude de la cinétique des émigrants thymiques dans les ganglions et dans la rate.....	237
1.4 Les applications possibles: faits et perspectives.....	241
1.5 Impact de la technique de marquage <i>in situ</i> avec le CFSE.....	246
2.0 L'ATTACHEMENT DE LA UEA-I SUR DES CEM <i>IN VIVO</i> INFLUENCE LA PROLIFÉRATION DE THYMOCYTES CD3 ⁻ ET CD3 ^{lo} , MAIS N'INFLUENCE PAS LE TAUX D'ÉMIGRATION	249
2.1 En présence de la UEA-I, le pourcentage d'émigrants thymiques CFSE ⁺ est augmenté, mais on retrouve une accumulation de thymocytes CFSE ⁺ dans le thymus : le paradoxe est expliqué.....	250
2.2 L'ATTACHEMENT DE LA UEA-I SUR DES CEM DE THYMUS FÉTAUX, RÉDUIT LE NOMBRE DE THYMOCYTES CORTICAUX TCR $\alpha\beta$ ⁺	252
2.3 Les scénarios possibles.....	254
2.4 Perspectives.....	257
3.0 CONCLUSION GÉNÉRALE.....	260
BIBLIOGRAPHIE	261

REMERCIEMENTS.....	320
ANNEXE I : LISTE DE PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	322
ANNEXE II : TIRÉS À PART DES ARTICLES.....	324

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2; ARTICLE I:

Tableau 1:	Thymocyte counts ($\times 10^6$), at 2 and 24 h post-injection with PBS or with 400 μ M CFSE	118
Tableau 2:	Distribution of thymocyte subsets (%), 24 h after intrathymic injections	119
Tableau 3:	Mean absolute numbers of CFSE ⁺ /CD4 ⁺ and CFSE ⁺ /CD8 ⁺ thymic emigrants in the lymph nodes and in the spleen	120

CHAPITRE 3; ARTICLE II:

Tableau 1:	Viability of thymocytes (%) <i>in vitro</i>	164
Tableau 2:	Viability of thymocytes (%) <i>in situ</i>	165
Tableau 3:	Cell cycle analysis of thymocyte subsets, 3 days post-I.T. injection with either PBS or UEA-I	166

ARTICLE III:

Tableau 1:	Cells/lobe within CD3 subsets, derived from FTOCs cultured 12 days in medium alone or with UEA-I	191
Tableau 2:	TCR $\alpha\beta$ ⁺ and TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells/lobe, in FTOCs cultured for 12 days in medium alone or in medium with UEA-I	192

CHAPITRE IV; ARTICLE IV:

Tableau 1:	Lymphocyte counts and CD3 profiles of cells from spleen and lymph nodes	228
Tableau 2:	Thymocyte counts and CD3 ^{lo} /CD3 ^{hi} ratios 3 days post-injection with CFSE	229
Tableau 3:	Summary of differently expressed genes between C57Bl/6 and C57Bl/6 ^{<i>tm1.Jcgr</i>} mouse thymuses	230

Tableau 4:	Summary of differently expressed genes between resting and PMA-stimulated T cells	231
------------	---	-----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 2; ARTICLE I:

Figure 1:	Determination of the optimal concentration of CFSE for <i>in vivo</i> labeling	102
Figure 2:	Forward scatter overlay histograms of thymocytes from PBS- and CFSE-injected mice, 2 h post-I.T. injection with 400 μ M CFSE	104
Figure 3:	Evolution with time of the CD3 profile of CFSE-labeled thymocytes, as assessed by flow cytometry	106
Figure 4:	CFSE-labeled cells in lymph nodes, various times after intrathymic injection of the label	108
Figure 5:	CFSE-labeled cells in the spleen, various times after intrathymic injection of the label	110
Figure 6:	Noninterference of CFSE with the expression of CD3, CD4, and CD8	112
Figure 7:	Immunohistochemical detection of CFSE-labeled cells	114
Figure 8:	Restriction of CFSE labeling to thymus-derived cells	116

CHAPITRE 3; Article II:

Figure 1:	Immunohistochemical localization of UEA-I-labeled TMECs	152
Figure 2:	CFSE ⁺ CD3 ⁺ lymphocytes, various times after I.T. injection with either PBS, UEA-I or UEA-II	154
Figure 3:	CD3 profile of CFSE ⁺ thymocytes, following simultaneous I.T. injections with either PBS and CFSE, UEA-I and CFSE or UEA-II and CFSE	156
Figure 4:	Effects of UEA-I on the retention of CFSE within lymphocytes	158

Figure 5:	<i>In vitro</i> proliferation assay	160
Figure 6:	Rate of thymic emigration	162

ARTICLE III:

Figure 1:	Immunohistochemical localization of UEA-I-labeled cells in FTOCs.	187
Figure 2:	CD3 profiles of fetal thymocytes from FTOCs Cultured 12 days in medium alone or in Medium with UEA-I.	189

CHAPITRE 4; Article IV:

Figure 1:	Immunohistochemical detection of ICAM-1+ cells in thymus sections.	220
Figure 2:	Identification of differentially expressed genes in the thymus of C57BL/6 and ICAM-1 ^{tml Jcgr} mice.	222
Figure 3:	Identification of differentially expressed genes between resting and PMA-stimulated T lymphoma cells.	224
Figure 4:	Detection of c-src transcripts in normal and ICAM-1 ^{tml Jcgr} mice.	226

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ab:	anticorps (« antibody »)
CEM:	cellules épithéliales médullaires
CFSE:	diacétate de carboxyfluorescéine (« 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester »)
CMH:	complexe majeur d'histocompatibilité (« major histocompatibility complex »)
Con A:	concanavaline A
CPA:	cellule présentatrice d'antigènes
CPM:	compte par minute
CSH:	cellule souche hématopoïétique
DMSO:	diméthyl sulfoxyde
DN:	double négatif (CD4 ⁻ CD8 ⁻)
DP:	double positif (CD4 ⁺ CD8 ⁺)
ELISA:	test immuno-enzymatique (« enzyme-linked immunosorbent assay »)
FCS:	sérum de veau foetal (« fetal calf serum »)
FITC:	isothiocyanate de fluorescéine (« fluorescein isothiocyanate »)
FTOC:	culture de thymus foetal (« fetal thymus organ culture »)
HEV:	(« high endothelial venule »)
HSA:	(« heat-stable antigen »)
ICAM:	(« intercellular adhesion molecule »)
IL-:	interleukine-
IL-2R:	récepteur pour l'interleukine-2 (« IL-2 receptor »)

I.T.:	intrathymique (injection)
LFA-:	(« leukocyte function associated antigen-«)
mAb:	anticorps monoclonal (« monoclonal antibody »)
MDC:	(« macrophage-derived chemokine »)
PBS:	tampon phosphate salin (« phosphate-buffered saline »)
PLT:	précurseur de cellules lymphoïdes thymiques
PE:	phycoérythrine
RTOC:	culture de thymus foetal réagregée (« reaggregate thymus organ culture »)
SA:	streptavidine
SP:	simple positif (CD4 ⁺ CD8 ⁻ ou CD4 ⁻ CD8 ⁺)
TCR:	récepteur d'antigène de lymphocyte T (« T-cell receptor »)
TdT :	transférase désoxynucléotidyl terminale
TECK :	(« thymus-expressed chemokine »)
TMEC:	cellules épithéliales médullaires thymiques (« thymic medullary epithelial cell »)
TMF :	(« thymic microenvironmental factor »)
TN:	triple négatif (CD3 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁻)
TUNEL:	(« Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling »)
UEA-I:	(« Ulex Europaeus Agglutinin-I »)
UEA-II:	(« Ulex Europaeus Agglutinin-II »)

CONTRIBUTION DE L'AUTEUR

Les travaux effectués lors de mon doctorat sont présentés sous forme de quatre manuscrits. Afin de mettre en évidence ma contribution réelle, la contribution de chaque auteur sera exposée. Le docteur Edouard F. Potworowski a dirigé tous les travaux qui apparaissent dans les articles I, II et III, ceux qui constituent le cœur de cette thèse, et est ainsi l'auteur senior. Le docteur Yves St-Pierre a co-dirigé ces travaux, et se retrouve ainsi comme avant-dernier auteur de tous ces articles. L'article IV est issu d'un projet secondaire. Son sujet est étroitement relié au domaine de recherche du docteur Yves St-Pierre et justifie donc son rôle d'auteur senior.

L'article I, qui décrit la méthodologie de marquage de thymocytes *in vivo*, a été publié dans le journal scientifique avec comité de lecture, *Experimental Cell Research*. Madame Claire Beauchemin a effectué les coupes de tissus provenant de thymus, rate et ganglions de souris, et qui apparaissent dans les figures 7 et 8. Monsieur Marcel Desrosiers a fourni des conseils en cytométrie. Sous la supervision des docteurs Potworowski et St-Pierre, j'ai effectué toutes les expériences décrites dans cette étude incluant la rédaction du manuscrit.

Les articles II et III présentent les résultats obtenus des expériences d'interférences lympho-stromales *in vivo* et *in vitro* respectivement. Le premier sera soumis prochainement, tandis que le dernier a été publié dans le journal scientifique avec comité de lecture, *Immunology Letters*. J'ai effectué toutes les expériences et la rédaction de ces deux manuscrits, sous la supervision des docteurs Potworowski et St-Pierre.

L'article IV, qui a été soumis pour publication, décrit la caractérisation de deux souches de souris portant une ablation génétique au niveau du gène de l'ICAM-1. Monsieur Steve Moisan est co-auteur de ce manuscrit. Il a contribué à cette étude par la réalisation des profils génomiques par l'utilisation de matrices d'ADNc, et il a ainsi rédigé les parties directement reliées à ces expériences. Quant à Mademoiselle Mélanie Démers, elle a effectué les analyses de l'expression du gène *src* dans les thymocytes, par

rtPCR. Sous la supervision des docteurs St-Pierre et Potworowski, j'ai effectué les expériences *in vivo* et l'immunohistochimie, ainsi que la rédaction des parties directement reliées aux expériences.

SOMMAIRE

Le développement des lymphocytes T est dépendant de signaux fournis par le microenvironnement thymique. Ces signaux peuvent être transmis soit directement, via des contacts lympho-stromaux, soit indirectement via des facteurs solubles produits suite à ces interactions. L'objectif principal de ce projet de doctorat était d'examiner la participation des complexes lympho-stromaux, surtout ceux générés entre les thymocytes et les cellules épithéliales médullaires (CEM), dans le processus de la différenciation et l'émigration thymocytaire.

L'émigration thymique a été, à date, étudiée par l'emploi de divers réactifs. Toutefois, en raison des limitations concernant l'usage de ces réactifs, notamment à cause de leur instabilité, leur toxicité et leur manque de spécificité, nous avons développé une nouvelle technique pour étudier ce processus. Nous avons donc décrit une méthode qui est basée sur l'injection *in vivo* d'un colorant vital estérifié, le CFSE. Une fois hydrolysé par les estérases des cellules, le CFSE émet à 518 nm et les cellules ainsi marquées peuvent être facilement détectées et analysées par la cytométrie de flux. De plus, les cellules CFSE⁺ peuvent ensuite être marquées avec des anticorps conjugués à des fluorochromes, qui émettent à d'autres longueurs d'ondes, permettant ainsi une analyse multiparamétrique détaillée du phénotype cellulaire. De cette manière, nous avons démontré que les thymocytes marqués par l'injection du CFSE par voie intrathymique constituent un échantillon représentatif des sous-populations thymocytaires majeures, permettant de déterminer que le taux d'émigration des thymocytes matures est d'environ 2 à 3 millions de cellules par jour, tel que rapporté dans la littérature. En outre, nous avons étudié la cinétique des émigrants thymiques récents dans les organes lymphoïdes périphériques et démontré que le CFSE peut facilement être utilisé pour des études à long terme. Dans une étude connexe et conjointement avec une analyse de l'expression des gènes du thymus, nous avons finalement appliqué cette méthodologie pour étudier

l'émigration et la circulation des émigrants thymiques dans la périphérie, chez des souris déficientes en ICAM-1.

La lectine *Ulex Europaeus* Agglutinin-I (UEA-I) s'attache de façon sélective à une grande population de CEM. Nous avons exploité ce fait pour développer un modèle pour étudier *in situ* les fonctions des CEM. L'approche expérimentale que nous avons utilisée était d'interférer *in vivo* avec les interactions thymocytes-CEM par l'utilisation de la UEA-I, tout en gardant intacte l'architecture thymique. Ainsi, en combinant le CFSE, pour son utilité comme indicateur d'émigration thymique et de prolifération, et la UEA-I pour son attachement sélectif aux CEM, nous avons démontré que les CEM n'étaient pas directement responsables de l'émigration, mais que celles-ci sont impliquées dans le contrôle de la prolifération des thymocytes corticaux. Conjointement à cette étude *in vivo*, nous avons montré que le traitement de FTOC (fetal thymus organ culture) avec la UEA-I entraîne une diminution du nombre de cellules $\text{TCR}\alpha\beta^+$. En fait, les cellules CD3^- et CD3^{lo} étaient diminuées de façon marquée. Nous avons ainsi proposé deux scénarios possibles pour expliquer l'ensemble de ces données : 1) l'attachement de la UEA-I aux CEM pourrait provoquer l'activation de celles-ci, engendrant ainsi une production de signaux qui inhiberaient les thymocytes corticaux, et 2) en raison d'un contact inhibé, une activation moindre soit des CEM, soit des thymocytes médullaires qui normalement s'y attachent, entraîne une production atténuée de facteurs solubles qui seraient responsables de la prolifération des thymocytes.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dans le thymus les interactions lympho-stromales sont essentielles pour générer le répertoire de lymphocytes T matures, ainsi que pour le développement et l'organisation du microenvironnement thymique. Les cellules épithéliales médullaires (CEM) représentent le principal type de cellule stromale dans le thymus, quoique leur rôle reste peu connu. Cependant, l'on sait que les thymocytes résident dans la médulla pour une période d'environ une dizaine de jours avant d'émigrer dans la périphérie. L'on sait aussi que pendant cette période ces thymocytes médullaires acquièrent un phénotype de lymphocyte mature. De plus, quelques études suggèrent que les CEM puissent intervenir lors de la sélection négative des thymocytes. Il serait ainsi peu probable que la médulla soit simplement un réservoir passif pour les thymocytes en voie d'exportation.

Nous avons ainsi émis l'hypothèse suivante: Les CEM du thymus sont impliquées dans le développement et l'émigration des thymocytes. Dans le but de vérifier cette hypothèse nous avons, dans un premier temps, développé une approche expérimentale qui consiste essentiellement à interférer, *in vivo*, avec les contacts entre les thymocytes médullaires et une sous-population majeure de CEM, tout en conservant intacte l'architecture thymique. Pour ce faire nous avons injecté, par voie intrathymique, une lectine nommée Ulex Europaeus Agglutinin-I (UEA-I) qui s'attache de façon spécifique à des résidus de L-fucose se retrouvant sur une sous-population majeure de CEM. Pour évaluer les effets de cette inhibition sur l'émigration des thymocytes vers la périphérie, nous avons employé simultanément, une technique de marquage de thymocytes *in vivo* que nous avons développée préalablement, utilisant un réactif dérivé de la fluorescéine, le CFSE (5-(and-6)-carboxyfluoresceine diacetate, succinimidyl ester). L'injection simultanée de la UEA-I et du CFSE nous a donc permis à la fois de cibler les CEM, et d'étudier leurs fonctions au sein des sous-populations de lymphocytes dans le thymus ainsi que l'émigration thymique. Dans le but de corroborer nos résultats *in vivo*, nous nous sommes servis du système "clos" des FTOC, où il n'y aurait aucun influx de cellules précurseurs ni de sortie significative de cellules matures, pour étudier les effets d'une interférence constante de contacts lympho-stromaux, due à la présence de la UEA-I, sur le

développement des thymocytes. L'analyse des lymphocytes a été effectuée par la cytométrie en flux.

Nous verrons ainsi dans les prochaines pages le premier chapitre, constitue une revue bibliographique générale touchant le thymus et ses composantes, l'éducation thymique, l'émigration des thymocytes, les molécules accessoires impliquées dans les interactions lympho-stromales, les facteurs solubles, les modèles *in vitro* d'interaction lympho-stromale, et finalement l'interdépendance des thymocytes et des cellules stromales. Ensuite, le deuxième chapitre décrit le développement d'une technique permettant l'étude, à long terme, de l'émigration des thymocytes dans les tissus lymphoïdes de la périphérie. Ceci est présenté sous forme d'un article scientifique publié dans *Experimental Cell Research*. Le troisième chapitre décrit les résultats obtenus par rapport aux expériences investiguant les activités thymocytaires qui résultent des interactions entre les thymocytes et une population majeure de (CEM). Ces résultats sont, eux aussi, présentés sous forme de deux papiers scientifiques. L'étude *in vivo* n'a pas encore été soumise pour publication, tandis que l'étude *in vitro*, utilisant des FTOC comme modèle, a été publiée dans *Immunology Letters*. Le quatrième chapitre, quant à lui, porte sur l'application de notre technique de marquage de thymocytes *in vivo* dans un autre système. On décrit ici la caractérisation de deux souches de souris portant une ablation génétique au niveau du gène de l'ICAM-1, par rapport à l'émigration thymique, à la circulation lymphocytaire, ainsi qu'à l'expression des gènes du thymus. Un article scientifique, qui a été soumis pour publication, présente ces résultats. Finalement, le cinquième chapitre portera sur une discussion et conclusion générale des résultats obtenus dans les quatre articles scientifiques présentés dans les chapitres précédents.

CHAPITRE 1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Le thymus est la source unique de lymphocytes T. Leur développement est strictement dépendant des signaux fournis par le microenvironnement thymique. Ces signaux sont transmis soit directement par des contacts lympho-stromaux, soit par l'intermédiaire de facteurs solubles qui résultent de ces contacts.

Le but de cette thèse était d'examiner la participation des complexes lympho-stromaux, surtout ceux générés entre thymocytes et cellules épithéliales médullaires (CEM) du thymus, dans la différenciation et l'émigration des thymocytes. Dans ce contexte, ce chapitre vise ainsi à examiner les rôles que les cellules épithéliales thymiques jouent dans les différentes étapes qui constituent le développement des thymocytes. En effet, nous allons suivre le trajet des thymocytes dès l'entrée de leurs précurseurs dans le thymus, jusqu'à la sortie, où ils coloniseront les organes lymphoïdes secondaires de la périphérie.

En premier lieu, nous reverrons la morphologie du thymus et ses diverses composantes et nous poursuivrons avec une description des différents stades phénotypiques du thymocyte : de cellule précurseur à lymphocyte T mature. La série d'événements se traduisant par la génération de lymphocytes T matures sera décrite dans la section qui s'intitule « L'ÉDUCATION THYMIQUE ». Ici, les événements majeurs de la sélection positive et négative, ainsi que de l'apoptose seront présentés et appuyés par les résultats de différentes études suggérant que les interactions lympho-stromales sont essentielles à tous ces processus.

Puisque le sujet de l'émigration thymique a fait partie intégrante de ce projet de doctorat, nous discuterons des différentes catégories de colorants qui ont été employés au cours des années, pour étudier ce phénomène. Ceci permettra de bien évaluer notre contribution dans ce domaine ainsi que dans la mise en évidence des mécanismes d'émigration des thymocytes.

Il est très bien connu que les facteurs solubles, tels que les cytokines et les hormones, influencent les thymocytes et les cellules stromales à plusieurs niveaux. Quelques exemples seront exposés dans le but d'illustrer leur importance. De plus, un survol non-exhaustif des molécules accessoires (divisées en familles) impliquées dans les différentes interactions lympho-stromales sera aussi présenté. Ceci sera suivi d'exemples des différentes techniques qui ont été employées pour caractériser la participation des cellules épithéliales thymiques dans le développement des lymphocytes T, telles que les lignées cellulaires et les FTOC (fetal thymus organ culture).

Finalement, dans la dernière section de ce chapitre, j'illustrerai, en donnant des exemples concrets, comment les cellules stromales sont étroitement impliquées dans le développement des thymocytes et vice versa.

1.0 LE THYMUS ET SES COMPOSANTES

1.1 Le thymus : son anatomie et sa colonisation

Le thymus est un organe en deux lobes situé dans le médiastin supérieur, dorsalement au sternum. La base de l'organe repose à la surface du cœur. Il est enveloppé d'une mince capsule de tissu conjonctif qui le pénètre, à maintes reprises, pour diviser les lobes thymiques en lobules. Les vaisseaux sanguins, les fibres nerveuses et les vaisseaux lymphatiques efférents s'insèrent dans ces travées conjonctives. Chaque lobule thymique se subdivise en une région externe, dite corticale, et une interne, dite médullaire. On constate également une zone sous-capsulaire qui logerait, croit-on, les thymocytes les plus immatures, soit ceux provenant de la moelle osseuse (Penit et Vasseur, 1988).

Pendant l'embryogenèse, le thymus se forme à partir de deux couches de tissu embryonnaire : l'ectoderme, dérivant de la troisième fente branchiale et qui donnerait naissance aux cellules épithéliales du cortex, et l'endoderme, dérivant de la troisième poche pharyngienne et qui donnerait naissance aux cellules épithéliales médullaires (Cordier et Haumont, 1980). Ainsi, le stroma thymique est constitué principalement de

cellules épithéliales. Ce thymus rudimentaire chez la souris, apparent au 11^{ème} jour de gestation, est colonisé par des cellules hématopoïétiques dont des cellules dendritiques thymiques, des thymocytes, des macrophages, et d'autres types cellulaires (Owen et Ritter, 1969, Fontaine-Perus *et al.*, 1981).

La plupart des premières études traitant de l'embryogenèse du thymus ont été effectuées chez les oiseaux. En 1967, Moore et Owen (1967) ont démontré que la source de précurseurs lymphoïdes était extrinsèque à cet organe rudimentaire : des cellules souches provenant probablement du sac vitellin. Plusieurs groupes ont suggéré un mécanisme chimiotactique pour la régulation de l'entrée des précurseurs lymphoïdes dans le rudiment thymique, dont le(s) facteur(s) proviendrait(en)t des cellules épithéliales du thymus (Jotereau *et al.*, 1980, Potworowski et Pyke, 1985, Champion *et al.*, 1986, Wilkinson *et al.*, 1999). De plus, la prolifération et la différenciation de ces précurseurs seraient dépendantes des cellules épithéliales fournies par le thymus « primitif » (Moore et Owen, 1967).

Ainsi, chez la souris, on sait que les précurseurs lymphoïdes provenant du foie foetal commencent à entrer dans le thymus non-vascularisé, via la capsule, par l'intermédiaire de différentes molécules d'adhésion (Dunon et Imhof, 1993, Savino *et al.*, 1993, Wilkinson *et al.*, 1999) à 10.5 jours de gestation (Fontaine-Perus *et al.*, 1981). Ces cellules se différencient en thymocytes Thy-1⁺, qui sont à l'origine de toutes les sous-populations. Par contre, les précurseurs qui entrent dans le thymus après le jour 13, ne se différencient en thymocytes Thy-1⁺ qu'une semaine après la naissance de la souris. (L'antigène Thy-1 était considéré comme étant le premier marqueur de surface « spécifique » aux lymphocytes T. Cependant, il est maintenant établi que les précurseurs de cellules lymphoïdes thymiques, exprimant faiblement le Thy-1, peuvent donner naissance à d'autres lignées de cellules. Voir la section 1.4.1). Ainsi, ces cellules, qui donnent naissance à la deuxième vague de thymocytes, remplaceraient totalement les cellules du premier influx, qui elles ont colonisé les organes lymphoïdes secondaires (Fontaine-Perus *et al.*, 1981).

1.2 Les éléments non-lymphoïdes

1.2.1 Les cellules épithéliales

La trame thymique est constituée majoritairement de cellules épithéliales. Les cellules épithéliales thymiques se distinguent des autres populations cellulaires du thymus par le fait qu'elles démontrent une vaste hétérogénéité morphologique ainsi que phénotypique. La plupart des cellules épithéliales corticales sont de 'type-I', ayant de longs prolongements cytoplasmiques ainsi qu'un petit corps cellulaire. Contrairement aux cellules épithéliales du cortex, celles de la médulla sont de 'type-II' et possèdent des prolongements cytoplasmiques plus courts et un corps cellulaire plus imposant. Bien que très rares, on retrouve également dans la médulla des cellules épithéliales de 'type III'. Ces cellules se différencient des deux autres types par la présence d'une vaste cavité qui occupe la presque totalité du cytoplasme (Nabarra et Andrianarison, 1987). Toutefois, toutes les cellules épithéliales possèdent deux caractéristiques communes: des tonofilaments cytoplasmiques, composés de cytokératine (Henderson et Weber, 1981, Moll *et al.*, 1982) et des desmosomes (Nabarra et Andrianarison, 1987).

Composées de cellules épithéliales et retrouvées dans la zone sous-capsulaire corticale, certaines structures appelées les 'thymic nurse cells' (initialement identifiées *in vitro* chez la souris) se distinguent par leur capacité d'envelopper jusqu'à 200 thymocytes ayant le phénotype $CD4^+CD8^+$ (Wekerle *et al.*, 1980, Li *et al.*, 1992). En effet, l'ajout d'un anticorps spécifique pour les cellules 'nurse' a inhibé l'adhésion de thymocytes $TCR^{lo}CD4^+CD8^+$ en culture, et a réduit la viabilité de cellules immatures (surtout les thymocytes $TCR^+CD4^+CD8^+$) d'environ 70% (Pezzano *et al.*, 1998). Lorsqu'isolé du microenvironnement thymique afin de le mettre en culture, le complexe 'nurse' relâche des thymocytes. Il a été démontré que cette structure utilise des lysosomes pour dégrader les thymocytes apoptotiques retrouvés dans les complexes 'nurse' (Samms *et al.*, 1999).

Le corpuscule de Hassall, situé dans la médulla, est une autre structure composée de cellules épithéliales. Celles-ci sont arrangées en couches concentriques, ce qui les rend très distinctes et facilement visibles en microscopie (Nabarra et Andrianarison, 1987). Le

rôle de ces structures reste toutefois obscur, mais on les surnomme « cimetières thymiques » puisqu'on y retrouve des cellules nécrotiques (Nabarra et Andrianarison, 1987, Blau, 1973). Assez récemment, l'expression de plusieurs éléments de la voie de signalisation JAK-STAT par les corpuscules de Hassall (Nishio *et al.*, 2000, Nishio *et al.*, 2001) donne plus de poids à la suggestion que ceux-ci pourraient représenter un stade terminal de la maturation des CEM (Nicolas *et al.*, 1989).

Plusieurs anticorps disponibles réagissent avec différents éléments des cellules épithéliales du thymus, notamment la kératine et les molécules du CMH. Ces divers antigènes seraient distribués de façon différente par les cellules épithéliales, ce qui permettrait de les classer. Par conséquent, une nomenclature a été désignée pour regrouper les anticorps ayant les mêmes caractéristiques de marquage en CTES (Clusters of Thymic Epithelial Staining) (Kampinga *et al.*, 1989). Le groupe I comporte les anticorps qui marquent toutes cellules épithéliales. Le groupe II, plus hétérogène, inclut tous les anticorps spécifiques pour les cellules épithéliales sous-capsulaires/périvasculaires, médullaires, incluant les corpuscules de Hassall et certaines cellules éparses du cortex. Les anticorps classés dans le groupe III concernent ceux qui marquent toutes les cellules épithéliales corticales. Le groupe IV inclut les anticorps spécifiques pour les cellules épithéliales médullaires, incluant les corpuscules de Hassall. Le groupe V, quant à lui, comporte tous les anticorps qui marquent surtout les corpuscules de Hassall. De plus, il faut mentionner que chaque groupe inclut aussi des sous-groupes. Ainsi, les cellules épithéliales thymiques, peu nombreuses dans le cortex et plus abondantes dans la médulla, peuvent être divisées en au moins cinq groupes distincts selon leurs réactivités immunohistochimiques avec divers anticorps.

Toutefois, une des lacunes par rapport à la majorité de ces anticorps est le manque de spécificité pour un seul type cellulaire (Von Gaudecker *et al.*, 1997, Kampinga *et al.*, 1989). Ainsi, le chevauchement de réactivité parmi différentes cellules ne permet pas de cibler exclusivement toutes les cellules épithéliales sous-capsulaires. Par exemple, les cellules épithéliales thymiques du cortex et de la médulla expriment les molécules classiques du CMH classe II (Rouse *et al.*, 1979, Farr et Nakane, 1983). En outre,

certaines CEM expriment la I-O, une molécule du CMH classe II non-classique qui exhibe très peu de polymorphisme (Karlsson *et al.*, 1991). Surh et collaborateurs (1992) ont montré que l'expression du I-A et du I-O chez la souris adulte permet de distinguer deux sous-populations phénotypiquement distinctes dans l'épithélium médullaire. Dans le thymus foetal par contre, la majorité des CEM possèdent les deux molécules.

Les cellules épithéliales thymiques expriment plusieurs différents types de récepteurs qui soulignent l'importance du lien entre le thymus et le système neuroendocrinien. Seulement quelques exemples seront brièvement présentés. Des récepteurs de nucléotides P2 (tel que pour l'ATP extracellulaire), ont été rapportés sur des thymocytes (Koshiba *et al.*, 1997, Alves *et al.*, 1999, Freedman *et al.*, 1999, Glass *et al.*, 2000) ainsi que sur des cellules épithéliales du thymus (Glass *et al.*, 2000, Bisaggio *et al.*, 2001). Le largage de métabolites intracellulaires, tel que l'ATP, peut induire l'apoptose de thymocytes, en augmentant la concentration intracellulaire de calcium (Zheng *et al.*, 1991). En effet, il a été reporté que des récepteurs P2 sont sur-exprimés chez les thymocytes lors de l'apoptose induite par des corticostéroïdes (Chvatchko *et al.*, 1996). Puisque les cellules épithéliales thymiques sont essentielles aux processus de sélection de lymphocytes, il est fort probable que l'expression de récepteurs P2 par ces premières cellules joue un rôle important dans l'apoptose de thymocytes non sélectionnés (suite à la sélection positive) ou éliminés lors de la sélection négative.

Les androgènes sont des hormones qui provoquent l'apparition des caractères sexuels masculins. Dans le thymus, les récepteurs des androgènes ont été retrouvés sur les thymocytes (Viselli *et al.*, 1995) ainsi que sur les cellules épithéliales (Olsen *et al.*, 2001). Le traitement de FTOC avec des androgènes accroît l'apoptose des thymocytes, alors qu'aucun changement dans le taux d'apoptose n'a été observé chez les FTOC provenant de souris Tfm/Y (« androgen-resistant testicular feminization mice »). (Olsen *et al.*, 1998). Ces souris, qui possèdent une mutation dans le gène qui code pour le récepteur de l'androgène, sont réfractaires aux actions des androgènes et elles démontrent aussi un grossissement de thymus (Olsen et Kocvacs, 1989). Cependant, l'incubation de thymocytes isolés d'un thymus normal avec des androgènes, ne provoque aucune hausse

dans le taux de cellules apoptotiques (Dulos et Bagchus, 2001). Dans le but de démontrer le rôle des récepteurs des androgènes sur les cellules épithéliales, Olsen et collaborateurs (2001) ont produit des souris chimères qui possédaient les récepteurs des androgènes soit sur les thymocytes, soit sur les cellules épithéliales thymiques. Ainsi, des souris normales ayant reçues des cellules de moelle osseuse provenant de souris Tmf, avaient des thymus normaux, et démontraient une involution thymique suivant un traitement avec des androgènes, alors que des souris Tmf ayant reçues des cellules de moelle osseuse provenant de souris normales possédaient de gros thymus, et une insensibilité aux androgènes. De toute évidence alors, les récepteurs des androgènes sur les cellules épithéliales sont impliqués dans le développement des thymocytes, entre autres, par l'induction de l'apoptose, probablement lors de la sélection de ces derniers.

1.2.2 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont d'efficaces cellules présentatrices d'antigène. Elles jouent un rôle clé dans l'établissement de diverses réponses immunitaires menant à une série d'événements, qui conduit à l'activation de lymphocytes T. Elles se localisent à des sites stratégiques dans plusieurs organes, surtout là où l'on retrouve une entrée importante d'antigènes (Chestnut et Grey, 1985). Dans le thymus, les cellules dendritiques représentent environ 0.1% de toutes les cellules thymiques provenant de la moelle osseuse (Ardavin, 1997). Ces cellules, que l'on appelle cellules dendritiques interdigitées, possèdent des prolongements cytoplasmiques irréguliers et se retrouvent surtout dans la médulla thymique, parmi les cellules lymphoïdes et épithéliales (Ardavin 1997). Leur étroite association physique avec les thymocytes est très bien démontrée par un phénomène de 'rosettes' thymiques (Kyewski *et al.*, 1982, Shortman *et al.*, 1989). Ainsi, lorsqu'on dissocie les cellules du tissu thymique par digestion enzymatique, on isole des complexes de 10 à 15 lymphocytes attachés à une cellule interdigitée centrale. Étant donné ce lien physique, il n'est pas surprenant d'apprendre que les cellules dendritiques thymiques, exprimant de hauts niveaux d'antigènes du CMH de classe I et II (Ardavin *et al.*, 1993^a) sont, elles aussi, d'excellentes cellules présentatrices d'antigène *in vitro* ou *in vivo*, (Stockinger et Hausmann, 1994, Guery et Adorini, 1995). Par contre,

leur rôle principal est d'éliminer les thymocytes potentiellement autoréactifs, intervenant donc dans la sélection négative (Sprent et Webb, 1995, Carlow *et al.*, 1992, Volkman *et al.*, 1997, Brocker *et al.*, 1997). Ces cellules possèdent plusieurs antigènes de surface ainsi qu'intracellulaires qui les caractérisent, tels que le CD11b (Ilic *et al.*, 1994-95), le CD11c (Crowley *et al.*, 1990), et le DEC-205, détecté par l'anticorps NLDC-145 (Witmer-Pack *et al.*, 1995). Homologue du « macrophage mannose receptor », cette dernière molécule est impliquée dans la présentation d'antigènes, par l'endocytose de ligands glycosylés (Jiang *et al.*, 1995). En plus de ces marqueurs, les cellules dendritiques thymiques expriment aussi plusieurs antigènes T-spécifiques tel que le CD4 (Winkel *et al.*, 1994), le CD8 (Winkel *et al.*, 1994, Potworowski *et al.*, 1996, Vremec et Shortman, 1997) et le CD25 (Vicente *et al.*, 1994). Il avait été suggéré auparavant que les cellules dendritiques thymiques représentaient des cellules d'origine lymphoïde (CD11c⁺, CD8α⁺, CD11b⁻) (Vremec et Shortman, 1997). Cependant, il a été démontré très récemment qu'une deuxième population, représentant environ 20% des cellules dendritiques thymiques totales, démontrent un phénotype myéloïde (CD11c⁺, CD8α⁻, CD11b⁺) (Martinon-Ego *et al.*, 2001, Bendriss-Vermare *et al.*, 2001).

1.2.3 Les macrophages

Il est estimé que les macrophages, qui dérivent possiblement d'un précurseur commun des thymocytes (Lee *et al.*, 2001), représentent environ 3% de toutes les populations cellulaires thymiques (Epstein *et al.*, 1985). Différents types de macrophages sont identifiés dans le thymus, selon leur morphologies distinctes ainsi que par l'expression de différents marqueurs de surface (Soga *et al.*, 1997). Ils se retrouvent surtout dans le cortex et à la jonction cortico-médullaire du thymus (Mueller *et al.*, 1987). Les macrophages sont de puissantes cellules phagocytaires. Ainsi, en plus des débris cellulaires, les macrophages sont impliqués dans l'élimination des thymocytes apoptotiques (Surh et Sprent, 1994, Savill *et al.*, 1993) par la reconnaissance, entre autres, de la phosphatidylsérine (Schlegel *et al.*, 1999, Schlegel *et al.*, 2000). On sait qu'environ 95% des thymocytes meurent *in situ*, et en effet, des cellules lymphoïdes en voie de dégénérescence ont été identifiées dans les vacuoles phagocytaires des

macrophages thymiques (Bowen et Lewis, 1980). Puisque les macrophages thymiques expriment aussi les molécules du CMH de classe II, ces cellules peuvent agir comme cellules présentatrices d'antigènes. De plus, les macrophages produisent un éventail de cytokines (Gallily *et al.*, 1985, Suda *et al.*, 1990) pouvant agir à différents niveaux de la différenciation des thymocytes.

1.2.4 Les autres types cellulaires

Plusieurs autres types de cellules sont présents dans le thymus. On y retrouve ainsi des fibroblastes, des adipocytes, des éosinophiles, des cellules endothéliales et des cellules nerveuses. Essentiels pour le développement du thymus rudimentaire en culture (Itoi et Amagai, 1998), les fibroblastes représentent le type cellulaire majeur de la capsule thymique, bien qu'on en retrouve aussi dans le cortex et dans la médulla (Van Vliet *et al.*, 1984). Utilisant des cultures de thymus réagrégué (Voir la section 6.3), Anderson et collaborateurs (1997) ont démontré que la maturation des thymocytes $CD44^+CD25^+$ est dépendante des fibroblastes et des cellules épithéliales. Cependant, leurs descendants immédiats, les cellules $CD44^-CD25^+$, n'ont besoin que de cellules épithéliales thymiques pour se rendre au stade $CD4^+CD8^+$. Quant aux adipocytes, on en retrouve près des vaisseaux sanguins, dans quelques secteurs de la capsule, et aussi associés aux parties inférieures des travées conjonctives (Sainte-Marie *et al.*, 1986). De plus, une des caractéristiques de l'involution physiologique du thymus est le remplacement des espaces périvasculaires, donc du tissu conjonctif, par du tissu adipeux (Steinmann *et al.*, 1985). Muller (1977) a démontré par immunohistochimie que le thymus d'une souris normale possédait des éosinophiles distribués un peu partout dans la médulla. Ces éosinophiles, qui se définissent par le phénotype $CD11b^+/CD11c^+CD25^+CD69^+$, et qui se retrouvent surtout à la jonction cortico-médullaire, sont recrutés surtout durant la période néonatale (Throsby *et al.*, 2000). Utilisant un modèle de souris transgénique de sélection négative, Throsby et collaborateurs (2000) ont démontré que le nombre d'éosinophiles thymiques avait augmenté de deux fois lors d'une injection de peptide spécifique. De plus les éosinophiles étaient associés à des groupes de corps apoptotiques, suggérant un rôle dans la sélection négative.

Le thymus est vascularisé par une artère thymique qui se divise en artérioles. Celles-ci se subdivisent pour former un complexe capillaire dans le cortex et dans la médulla. Ce circuit est complété par des veinules post-capillaires situées à la jonction cortico-médullaire et dans la médulla. Les vaisseaux sanguins sont constitués de cellules endothéliales, ceux du cortex étant enveloppés d'une couche additionnelle de cellules « non-endothéliales », forment la barrière sang-thymus (Kendall, 1989).

La présence de cellules nerveuses dans le thymus (Leposavic *et al.*, 1992, Micic *et al.*, 1992) suggère qu'il y ait un lien direct entre cet organe et le système neuroendocrinien (Dardenne, 1999, Savino et Dardenne, 2000, Botham *et al.*, 2001). Il a été démontré que les fibres nerveuses pénètrent le thymus via la capsule et entrent dans le cortex où elles sont non seulement associées aux vaisseaux sanguins thymiques, mais aussi à d'autres cellules, dont les thymocytes. On retrouve aussi ces fibres nerveuses à la jonction cortico-médullaire, mais peu dans la médulla (Felten *et al.*, 1985).

1.3 Les cellules lymphoïdes autre que les thymocytes

1.3.1 Les lymphocytes B thymiques

Représentant environ 0.2 à 1% des lymphocytes totaux (Andreu-Sanchez *et al.*, 1990), les lymphocytes B thymiques se retrouvent surtout à la jonction cortico-médullaire et dans la médulla thymique (Surh *et al.*, 1992^b). Il est suggéré que la différenciation des ces lymphocytes B est dépendante du microenvironnement thymique (Sugihara *et al.*, 2000), et que ceux-ci émigrent du thymus à un taux d'environ 2×10^4 cellules/jour (Akahashi *et al.*, 2000). Distincts de leurs confrères périphériques (Miyama-Inaba *et al.*, 1988), les lymphocytes B thymiques jouent possiblement un rôle dans l'élimination de thymocytes autoréactifs (Ferrero *et al.*, 1999, Kleindienst *et al.*, 2000, Touma *et al.*, 2000).

1.3.2 Les cellules NK

On croit que les lymphocytes T et les cellules NK dérivent d'un précurseur commun des thymocytes (Williams *et al.*, 1998^a, Carlyle et Zuniga-Pflucker, 1998, Spits *et al.*, 1998). En effet, de tels précurseurs ont été retrouvés dans le thymus et le foie fœtal (Leclercq *et al.*, 1996, Carlyle *et al.*, 1997, Michie *et al.*, 2000, Kawamoto *et al.*, 2000). En présence de différentes cytokines (tel que l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15) ainsi que de facteurs de croissance (tel que le SCF : « stem cell factor »), ces précurseurs peuvent se différencier en cellules NK *in vitro* (Williams *et al.*, 1998^a). Cependant, l'IL-15 semble être la cytokine critique pour la différenciation des cellules NK *in vivo*, car les souris déficientes en la chaîne α du récepteur de l'IL-15 sont déficientes en cellules NK (ainsi qu'en cellules NK-T et en cellules T TCR $\gamma\delta^+$) (Lodolce *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 2000). De plus, le fait que le lieu principal du développement de cellules NK soit la moelle osseuse (Roth *et al.*, 2000, Williams *et al.*, 2000), et que les cellules stromales de la moelle osseuse produisent l'IL-15 (Mrozek *et al.*, 1996), soulignent davantage son importance. Très récemment, Rosmaraki et collaborateurs (2001) ont identifié des précurseurs de cellules NK, dans la moelle osseuse de souris adulte, qui sont restreints uniquement à cette lignée de cellules.

Les cellules NK reconnaissent différentes molécules du CMH classe I (classiques et non-classiques) utilisant des récepteurs appartenant à la famille des immunoglobulines (KIR : « killer immunoglobulin-like receptors » chez les humains) ainsi que des récepteurs possédant des propriétés de lectines (ceux-ci incluent la famille des récepteurs CD94-NKG2 chez l'homme et la souris, et les familles des récepteurs Ly49 et NKR-P1 chez la souris). En effet, la reconnaissance d'une cellule cible par une cellule NK se fait par l'entremise de récepteurs activateurs ainsi que de récepteurs inhibiteurs. Brièvement, les récepteurs activateurs reconnaissent des molécules exprimées sur la cellule cible, et ceux-ci transmettent des signaux intracellulaires pour entamer la cytotoxicité de la cellule NK. Contrairement, les récepteurs inhibiteurs engendrent des signaux qui bloquent l'induction de cytotoxicité. (Pour des revues plus exhaustives sur les différents récepteurs de cellules NK, le lecteur est référé aux manuscrits suivants : Lanier, 1998, Raulet, 1999, López-Botet *et al.*, 2000, Moretta *et al.*, 2000, Barten *et al.*, 2001, Soloski, 2001.).

1.3.3 Les NKT

Les NKT représentent une population de lymphocytes T qui co-expriment certains récepteurs propres aux cellules NK, tels que le Ly49 et le NK1.1. Ces cellules sont surtout constituées de TCR⁺CD4⁺CD8⁻ et de TCR⁺CD4⁺ (Bendelac *et al.*, 1997). Leur développement est contrôlé par la molécule CD1d, une molécule du CMH classe I non-classique (Bendelac *et al.*, 1995, Bendelac, 1995) retrouvée sur les CPA. (Il est à noter que la rate et la moelle osseuse contiennent des NKT qui sont CD1d-indépendants (Eberl *et al.*, 1999)). Cependant, il existe une sous-population de lymphocytes T qui, comme les NKT 'classiques', est restreinte par le CD1d, mais elle ne possède par le marqueur NK1.1. Ce qui les rend remarquables, c'est qu'elles engagent leur propre CD1d (qui est exprimé fortement par ces cellules), et ainsi s'auto-activent si on leur fournit un ligand approprié (Hameg *et al.*, 2000). Le répertoire de TCR exprimé par les NKT est très restreint : il est surtout constitué d'une chaîne α invariante (V α 14J281), associée à une chaîne β (V β 2, V β 7 ou V β 8) (Lantz et Bendelac, 1994). Les cellules NKT sont présentes dans le thymus, et dans la plupart des tissus où l'on retrouve des lymphocytes T, mais leur origine reste toutefois controversée (Bendelac *et al.*, 1994, Shimamura *et al.*, 1997, Ohteki *et al.*, 1999). Il est à noter que récemment, une troisième sous-population de NKT a été décrite, la NKT CD8⁺, ayant des propriétés distinctes (Emoto *et al.*, 2000).

1.4 Les thymocytes (et leur développement)

Chez la souris, les précurseurs des thymocytes proviennent du foie fœtal et migrent dans le thymus au 11^{ème} jour de gestation. Le développement des thymocytes, suite à cette colonisation par les cellules souches, se manifeste par une prolifération massive et par l'acquisition et la perte de plusieurs antigènes de surface. Leur profil phénotypique, à un moment donné, les définit et les place dans une sous-population distincte. Aux jours 16 à 17 de gestation, certains thymocytes commencent à exprimer le CD4 et le CD8 de même que de faibles niveaux de TCR. Des lymphocytes T fonctionnels, soit ceux n'exprimant que l'un des deux antigènes, CD4 ou CD8, ainsi que le TCR en grandes quantités, sont apparents au 18^{ème} jour. À la naissance, au terme de 20 jours de gestation, le thymus néonatal ressemble grandement à celui d'un jeune adulte.

Ainsi, le type cellulaire constituant la majeure partie du thymus est le thymocyte. Distribués dans un filet tridimensionnel de cellules épithéliales, les thymocytes se répartissent en grande partie dans le cortex et en moindre quantité dans la médulla, pour ensuite coloniser les organes lymphoïdes secondaires, c'est-à-dire, principalement la rate et les ganglions. Les différents stades de la thymocytopoïèse seront brièvement exposés dans les sections suivantes.

1.4.1 Le précurseur de cellules lymphoïdes thymiques (PLT)

Le précurseur de cellules lymphoïdes thymiques (PLT), provenant d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) et représentant la population la plus immature de thymocytes, s'identifie par le phénotype Thy-1^{lo}CD117^{hi}CD44^{hi}HSA^{lo}CD25⁻ (Zlotnik et Moore, 1995, Zuniga-Pflucker et Lenardo, 1996). Chez la souris adulte, on détecte aussi de très faibles niveaux d'expression du co-récepteur CD4. En outre, la présence du récepteur pour l'IL-7 est importante pour promouvoir la survie et la croissance de la cellule (Zlotnik et Moore, 1995, Zuniga-Pflucker et Lenardo, 1996, Moore et Zlotnik, 1995). Lorsque cette population cellulaire (provenant d'un adulte) est injectée par voie intraveineuse, elle peut se différencier en lymphocytes B et en cellules dendritiques CD8 α (Ardavin *et al.*, 1993^b, Antica *et al.*, 1993). Par contre, les PLT provenant de thymus fœtal peuvent aussi devenir des cellules B et des cellules NK (Moore et Zlotnik, 1995). De plus, très récemment, Lee et collaborateurs (2001) ont démontré que les cellules PLT (ainsi que les cellules Pro-T : voir Section 1.4.2) ont le potentiel de générer des macrophages lorsqu'elles sont mises en culture en présence de M-CSF (« macrophage-colony stimulating factor »), de l'IL-6 et de l'IL-7. Les lymphocytes T et les macrophages pourraient donc provenir du même précurseur. Même si la cellule PLT n'est pas encore exclusivement engagée dans la lignée des lymphocytes T, elle est plus restreinte que la CSH pluripotente, cette dernière pouvant se différencier en toutes les cellules des types lymphoïde, myéloïde, magakaryocytaire et érythroïde (Spangrude *et al.*, 1988, Shortman et Wu, 1996).

1.4.2 Les cellules Pro-T

L'acquisition de la chaîne α du récepteur pour l'IL-2, soit le CD25, engage maintenant la cellule PLT dans la lignée des lymphocytes T (Zuniga-Pflucker et Lenardo, 1996, Godfrey *et al.*, 1993). Cette nouvelle désignation, soit de cellule Pro-T, décrit la cellule comme étant 'activée', et l'on note alors l'induction de plusieurs protéines régulatrices de la transcription des gènes, tel que le NF- κ B (Ivanov et Ceredig, 1992, Zuniga-Pflucker *et al.*, 1993). Même si le réarrangement des gènes β et γ du TCR n'a pas eu lieu (Hozumi *et al.*, 1994, Godfrey *et al.*, 1994), on voit à ce stade une période de prolifération vigoureuse (Penit *et al.*, 1995). Ainsi on a proposé l'hypothèse que la cellule Pro-T, contrairement aux cellules T matures, franchit une étape d'activation qui est indépendante du TCR (Zuniga-Pflucker et Lenardo, 1996, Zuniga-Pflucker *et al.*, 1993). Les cellules Pro-T peuvent être sous-divisées, selon l'absence ou la présence du récepteur pour l'IL-7 (IL-7R). L'injection intrathymique de cellules Pro-T IL-7R^{-lo} provoque surtout le développement de thymocytes TCR $\alpha\beta$ ⁺, tandis que les cellules Pro-T IL-7R⁺ ont plus tendance à générer des thymocytes TCR $\gamma\delta$ ⁺ (Kang *et al.*, 2001).

1.4.3 Les cellules Pré-T 'Précoces'

Les thymocytes Pré-T sont des thymocytes triple négatifs (TN), n'exprimant pas de CD3, de CD4 ou de CD8, et ayant le phénotype Thy-1^{hi}CD117⁺CD44⁺HSA^{hi}CD25^{hi} (Zlotnik et Moore, 1995, Zuniga-Pflucker et Lenardo, 1996). On détecte un ralentissement de l'activité proliférative chez ces cellules, ainsi que le début du réarrangement des gènes β du TCR (Penit *et al.*, 1995, Wilson *et al.*, 1999). La liaison covalente de la protéine β du TCR à une glycoprotéine 'pré-T α ', définit le 'complexe pré-TCR' (Saint-Ruf *et al.*, 1994). Ce 'complexe pré-TCR' semble être indispensable pour que la cellule (TCR $\alpha\beta$) puisse recevoir des signaux de prolifération et de différenciation. Il est à noter que ce 'complexe pré-TCR' ne semble pas être nécessaire au développement des thymocytes TCR $\gamma\delta$ (Fehling *et al.*, 1995).

1.4.4 Les cellules Pré-T 'Tardives'

Les cellules Pré-T tardives se distinguent des cellules précédentes, les pré-T précoces, par la perte de l'antigène CD25 (Zlotnik et Moore, 1995, Zuniga-Pflucker et Lenardo, 1996). Contrairement aux cellules PLT, Pro-T et Pré-T précoces, la survie des cellules Pré-T tardives est indépendante de l'IL-7 (Kim *et al.*, 1998). Elles reprennent une prolifération intense, et c'est à ce stade qu'on détecte le réarrangement et l'expression du TCR α (Zlotnik et Moore, 1995). Ces nouvelles chaînes α du TCR remplacent les pré-T α , et le complexe pré-TCR est remplacé par le nouveau complexe TCR $\alpha\beta$ (Saint-Ruf *et al.*, 1994). On voit simultanément l'expression des deux co-récepteurs, CD4 et CD8 (DP : double positifs). Ces cellules qui étaient en état de prolifération, changent leur morphologie blastique pour devenir des petites cellules DP, maintenant au repos. Ces nouveaux thymocytes DP expriment de faibles niveaux de TCR $\alpha\beta$. Leur affinité pour des molécules du CMH du soi détermine s'ils sont sélectionnés pour se différencier en thymocytes SP ou bien éliminés par apoptose.

2.0 L'ÉDUCATION THYMIQUE

Le développement d'un lymphocyte T commence avec la migration, dans le thymus, d'un précurseur provenant du foie fœtal ou de la moelle osseuse. Ici, les précurseurs subissent une série d'événements conduisant à la génération de lymphocytes T matures. Ainsi, le développement d'un thymocyte procède en étapes. Chaque étape se distingue par l'expression différentielle de divers antigènes de surface, notamment le TCR et les molécules CD4 et CD8. Les précurseurs n'exprimant pas de TCR, ni les antigènes CD4 ou CD8 s'avancent à un stade défini par le phénotype TCR^{lo}CD4⁺CD8⁺ (double positif : DP) avant de se différencier en cellules matures TCR^{hi}CD4⁺CD8⁻ ou TCR^{hi}CD4⁻CD8⁺ (simple positif : SP). Les thymocytes DP sont assujettis à deux processus que l'on appelle la sélection positive et négative. La sélection positive mène au développement d'une population de cellules capable de répondre à un antigène présenté dans le contexte de molécules de CMH du soi. La sélection négative, par contre, élimine les thymocytes qui seraient potentiellement nuisibles, soit auto-réactifs. Les deux processus de sélection sont dépendants de l'interaction du TCR avec des complexes

peptides-molécules du CMH, qui sont présentés sur des cellules stromales thymiques. Mais comment le même TCR, qui est engagé dans des interactions CMH/peptides, peut-il transmettre à la fois des signaux de survie, menant à la sélection positive de la cellule, et des signaux qui induisent la mort programmée (apoptose) de la cellule, tel que l'on voit dans la sélection négative ? Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce paradoxe. Brièvement, le destin du thymocyte est dépendant de plusieurs facteurs : 1) de l'affinité/l'avidité du TCR pour le ligand qui lui est présenté, soit la qualité du ligand (Teh *et al.*, 1997, Suzuki *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 1998, Ober *et al.*, 2000), du moment auquel se produit la signalisation via le TCR (Davey *et al.*, 1998, Hogquist, 2001), et du type de cellule qui présente le ligand (Amsen et Kruisbeek, 1998, Yasutomo *et al.*, 2000, Capone *et al.*, 2001). Puisque le sujet de la sélection thymique est excessivement vaste, et les hypothèses et modèles sont nombreux, les sections suivantes expliqueront brièvement les processus de sélection. Cependant, plus d'emphase est mise sur les rôles que les cellules épithéliales thymiques y jouent.

2.1 La sélection positive

La sélection positive des thymocytes est basée sur le principe que le TCR reconnaît le CMH du soi (Kruisbeek *et al.*, 1983). Ceci entraîne l'engagement du TCR, qui est présent sur les thymocytes, avec des cellules du microenvironnement thymique qui présentent des peptides endogènes associées aux molécules du CMH de classe I ou de classe II. La spécificité du TCR pour les molécules de CMH du soi détermine lequel des deux co-récepteurs, le CD4 ou le CD8, sera sélectionné par un thymocyte donné. Comme règle générale, les cellules CD4⁺ reconnaissent un antigène donné qui est associé aux molécules du CMH classe II, tandis que les cellules CD8⁺ le reconnaissent dans un contexte de molécules du CMH classe I. En effet, des souris déficientes en molécules du CMH classe II sont presque totalement dépourvues de cellules CD4⁺ dans la périphérie (Cosgrove *et al.*, 1991, Grusby *et al.*, 1991). De façon semblable, l'absence de cellules CD8⁺ matures périphériques est typique de souris déficientes en molécules du CMH classe I (Koller *et al.*, 1990, Zijlstra *et al.*, 1990). Quant aux souris déficientes en molécules de classe I et de classe II, aucun lymphocyte T mature est décelable dans les

organes lymphoïdes périphériques (Grusby *et al.*, 1993). Donc, lors de la sélection positive, l'expression d'une des deux protéines, CD4 ou CD8, est supprimée. Mais cette décision est-elle aléatoire ou prédéterminée?

Deux modèles, qui ne sont pas nécessairement mutuellement exclusifs (Lundberg *et al.*, 1995, Suzuki *et al.*, 1995), sont suggérés : le modèle 'instructif' (Borgulya *et al.*, 1991, Kersh et Hedrick, 1995, Itano et Robey, 2000) et le modèle 'stochastique' (van Meerwijk et Germain, 1993, Davis *et al.*, 1993, Corbella *et al.*, 1994, Muller et Kyewski, 1995). D'après le modèle 'instructif' l'engagement du lymphocyte T vers les lignées CD4 ou CD8 est déterminé par l'interaction TCR-CMH :peptide. Ainsi, lors du co-engagement du TCR et co-récepteur (CD4 ou CD8) à une molécule du CMH, le co-récepteur transmet des signaux intracellulaires distincts de telle sorte que le signal transmis par le CD4 supprimerait automatiquement l'expression des gènes du CD8, et vice-versa pour le signal transmis par le CD8. Selon le modèle 'stochastique', les thymocytes s'engageraient vers les lignées CD4 ou CD8 indépendamment de la spécificité de leur TCR pour les molécules CMH de classe I ou II. Ainsi, la suppression des gènes pour le CD4 ou pour le CD8 se ferait au hasard et serait suivie d'une vérification pour s'assurer qu'il y a eu mariage exact entre le TCR et la spécificité du co-récepteur. Donc si un thymocyte $CD4^+CD8^+$ (DP), possédant un TCR spécifique pour les molécules du CMH classe I, supprimait les gènes pour l'expression du CD8, la disparité du TCR avec le CD4 inhiberait la maturation du thymocyte. Tandis que la suppression des gènes pour le CD4 ferait en sorte que le co-récepteur CD8 puisse interagir avec les molécules du CMH classe I, et la maturation du thymocyte continuerait ainsi. De cette façon, la sélection positive mène à la génération de thymocytes matures, soit les $CD4^+CD8^-$ (SP), soit les $CD4^-CD8^+$ (SP).

Le phénomène de la sélection positive a été démontré pour la première fois, et de façon élégante, par des expériences *in vivo* avec des souris 'chimères' de moelle osseuse. Ce modèle implique un transfert de moelle osseuse provenant d'une souris d'un haplotype donné ((A x B) F1), à une souris hôte d'un haplotype différent (A), mais qui a été préalablement irradiée. L'irradiation détruit les thymocytes, les cellules dendritiques,

ainsi que les macrophages de l'hôte. Par conséquent, les thymocytes de ces souris 'chimères' reconnaissent des antigènes présentés par un composant dit 'radio-résistant' du stroma thymique associé au CMH^A seulement. Ce composant s'est avéré être la cellule épithéliale du cortex (Cosgrove *et al.*, 1992, Fowlkes et Schweighoffer, 1995).

2.1.1 Le rôle des cellules épithéliales thymiques dans la sélection positive

Sans aucun doute, l'efficacité du processus de la sélection positive semble être influencée, entre autres, par les molécules du CMH. Chez des souris transgéniques pour le TCR, l'utilisation soit de différents haplotypes du CMH, soit de variants de molécules du CMH (où des mutations ont été introduites), abrogeait ou diminuait l'ampleur de la sélection positive (Berg *et al.*, 1990, Kaye *et al.*, 1992). L'affinité du TCR pour le complexe CMH-antigène est donc d'une importance primordiale lors de ce processus. En effet, le « modèle d'avidité différentielle » indique que la sélection positive est le résultat d'une réaction, de faible avidité, entre le TCR d'un thymocyte et le complexe peptide-CMH d'une cellule stromale. L'avidité est définie comme étant le nombre de molécules de TCR engagées par thymocyte. Ainsi, ceci dépend de plusieurs facteurs : 1) l'affinité, proprement dite, entre le TCR et le complexe CMH :peptide, 2) la densité de molécules de TCR, et 3) la densité de complexes CMH :peptide (Ashton-Rickardt et Tonegawa, Girao *et al.*, 1997). Toutefois, le type de cellule possédant ces molécules du CMH est aussi important.

Utilisant le système de RTOC (Reaggregated thymus organ culture) (Voir la section 6.3) pour identifier les constituants cellulaires de la sélection positive, le groupe de Anderson et collaborateurs (1994^b) a démontré que seules les cellules épithéliales thymiques du cortex étaient aptes à conduire la maturation de thymocytes DP en SP de façon efficace, et que ceci requérait un contact physique entre les deux éléments. En effet, des études ultérieures (Ernst *et al.*, 1996) ont montré que, dépourvues de molécules du CMH, les cellules épithéliales étaient incapables d'induire la sélection positive de thymocytes immatures *in vitro*. En outre, cette sélection ne pouvait pas être renversée ni par des cellules dendritiques ni par des lymphocytes B, les deux ayant une expression

normale de CMH. Pour ce qui est d'études effectuées *in vivo*, la même règle semble s'appliquer (Fort et Pardoll, 1996). Cependant, la spécialisation des cellules épithéliales pour la sélection positive n'est pas simplement due à l'expression des complexes CMH-peptides, mais aussi à leur expression de différentes molécules accessoires (Lucas et Germaine, 2000, Hare *et al.*, 2001).

Toujours dans le contexte de la sélection positive, Anderson et collaborateurs (1997) ont déterminé que la nécessité d'interactions entre les thymocytes et les cellules épithéliales est toutefois dépendante du stade de différenciation de ces premières cellules. Ainsi, pour les thymocytes en stade de « pré-sélection », soit ceux ayant un phénotype TCR⁻CD69⁻CD4⁺CD8⁺ (Anderson *et al.*, 1994^a), les cellules épithéliales s'avèrent essentielles (Anderson *et al.*, 1997). Cependant, la maturation des cellules CD69⁺CD4⁺CD8⁺, soit celles qui ont commencé (mais pas complété) l'étape de sélection positive, peut survenir en absence de cellules épithéliales, mais les thymocytes ne sont pas fonctionnellement compétents. Ceux-ci ne prolifèrent pas suite à une stimulation par la Con A (Anderson *et al.*, 1997). En effet, la maturation de ces dernières cellules peut survenir en absence totale de molécules du CMH (Hare *et al.*, 1999^a).

2.2 La sélection négative

Les thymocytes qui rencontrent et interagissent fortement avec des antigènes de soi, associés aux molécules du CMH, doivent être éliminés; ainsi ces thymocytes potentiellement auto-réactifs subissent une sélection négative. L'existence de ce processus a été révélée suite à la constatation que la reconnaissance, par des thymocytes, de certains antigènes du soi, était restreinte dans l'utilisation de V_β (le domaine variable de la chaîne β du TCR). Utilisant des anticorps spécifiques de V_β particuliers, on a constaté que la périphérie était dépourvue de lymphocytes T possédant certains de ces V_β et qu'il y avait une corrélation directe entre ceux-ci et des composants du soi dans le thymus. En effet, Kappler et collaborateurs (1987) ont démontré que chez les souris exprimant le I-E, une large proportion de lymphocytes T V_β17a⁺ était significativement réduite dans la périphérie.

Plusieurs souris possèdent des superantigènes endogènes (produits, entre autres, par des rétrovirus tels que les MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus), et incorporés dans leur génome), qui s'attachent de façon spécifique à la portion V_{β} du TCR $\alpha\beta$ (Acha-Orbea et Palmer, 1991, Tomonari *et al.*, 1992). Ainsi, lorsqu'un thymocyte en développement rencontre un de ces superantigènes endogènes, qui est considéré comme étant du soi, il subit les conséquences de la sélection négative et est éliminé. Chez ces souris, on observe des thymocytes exprimant des TCR qui réagissent avec des superantigènes, mais ces cellules, même si elles sont abondantes, se retrouvent parmi les thymocytes DP ; dans le cortex thymique. L'absence totale de ces cellules dans la médulla thymique et dans la périphérie suggère aussi que la sélection négative est localisée soit à la jonction cortico-médullaire, soit dans la médulla, où se retrouve une abondance de cellules dendritiques, de macrophages et de cellules épithéliales.

Chez les souris RelB déficientes (le RelB étant un facteur de transcription) (Ryseck *et al.*, 1992), la plupart des CEM et des cellules dendritiques matures sont absentes (Burkly *et al.*, 1995). De plus, la sélection négative est affaiblie (DeKoning *et al.*, 1997). Donc, puisque ces cellules stromales dans la médulla thymique expriment des taux élevés de molécules du CMH, elles pourraient ainsi servir d'excellentes cellules présentatrices d'antigènes (CPA) pour les thymocytes en voie de sélection négative.

2.2.1 Le rôle des cellules épithéliales thymiques dans la sélection négative

Il avait été rapporté que la sélection négative peut avoir lieu dans le cortex thymique (Berg *et al.*, 1989, Murphy *et al.*, 1990). Depuis, de plus en plus d'études suggèrent qu'elle a lieu dans la médulla (Surh et Sprent, 1994, Naquet *et al.*, 1999, Annunziato *et al.*, 2000, Kishimoto et Sprent, 2000), et que les cellules dendritiques sont responsables de ce processus (Von Boehmer et Schubiger, 1984, Sprent *et al.*, 1988, Jenkinson *et al.*, 1992). Cependant, il est important de noter que quelques chercheurs attribuent le rôle de la sélection négative aux CEM. Les exemples suivants traitent en effet cette dernière observation.

Burkly et collaborateurs (1993) ont démontré que les CEM I-E⁺ sont capables d'induire la sélection négative de thymocytes V β 5⁺ reconnaissant des superantigènes endogènes. Dans le but d'analyser davantage ce mécanisme, ces mêmes chercheurs (Degermann *et al.*, 1994) ont construit différentes chimères de moelle osseuse ; la moelle osseuse provenant de souris transgéniques pour le TCR V β 5⁺, était injectée chez différentes souris receveuses exprimant le I-E sur des populations distinctes d'épithélium thymique. Les données ont clairement démontré que la sélection négative de thymocytes V β 5⁺ s'est produite surtout dans la région médullaire, et que le degré de sélection était dépendant de la densité d'expression de la molécule I-E sur ces CEM.

Utilisant un modèle de souris transgéniques (restreintes pour le CMH classe I) et des cellules de drosophile transfectées avec différentes combinaisons de cDNA pour le CMH classe I, B7-1 et ICAM-1, Kishimoto et collaborateurs (1996) ont montré que les molécules co-stimulatrices B7-1 et ICAM-1 exercent des fonctions opposées dans le processus de sélection négative. La sélection négative de thymocytes CD4⁺CD8⁺ était augmentée en présence de B7-1 mais inhibée en présence de ICAM-1. L'expression simultanée de ces deux molécules provoque une synergie, induisant ainsi une forte sélection négative. Puisque le B7-1 est restreint à une sous-population de CEM, tandis que le ICAM-1 est exprimé à travers le thymus, les auteurs suggèrent que la sélection négative a lieu dans la médulla. Par contre, la présence seulement de l'ICAM-1 dans le cortex réduit la possibilité de sélection négative, encourageant ainsi la sélection positive dans ce compartiment.

Utilisant des souris déficientes en molécules CMH de classe II, Laufer et collaborateurs (1996) ont exploité un promoteur d'une kératine (K14) pour ré-exprimer des molécules du CMH classe II uniquement sur les cellules épithéliales du cortex. Ils ont observé que la population périphérique de cellules CD4 SP était augmentée par rapport aux témoins, et que ces cellules étaient fortement autoréactives. De plus, le transfert de ces cellules autoréactives chez des souris de type sauvage induit des maladies auto-immunes (Laufer *et al.*, 1999). Ainsi, l'absence de sélection négative dans ces souris K14

reflète le manque de contact entre les thymocytes DP et les molécules de classe II présentes sur les CEM (et/ou les cellules dendritiques).

Faisant partie de la famille des récepteurs pour le TNF (Smith *et al.*, 1990), la molécule CD30 est exprimée, entre autres, par des thymocytes DP chez l'humain. Le ligand de cette molécule, le CD30L, est exprimé surtout sur les CEM (et les corpuscules de Hassal) (Romagnani *et al.*, 1998). Il est intéressant de noter que la sélection positive chez les souris déficientes pour le CD30 est normale, mais la sélection négative est défectueuse (Amakawa *et al.*, 1996). Il est donc possible que l'interaction entre thymocyte et CEM via CD30/CD30L soit nécessaire pour la sélection négative.

2.3 Généralités : L'Apoptose

L'équilibre entre la mort et la prolifération cellulaire constitue l'état d'homéostasie d'un organisme. Il existe principalement deux procédés de mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose (Kerr *et al.*, 1972). Considérablement différente de la nécrose classique, l'apoptose ou mort cellulaire programmée conduit à un rétrécissement de la cellule, par l'effondrement du cytosquelette, par la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN génomique produisant un patron très caractéristique sur gel d'agarose : une 'échelle' de fragments d'ADN d'environ 200 paires de bases chacun (Shi *et al.*, 1990). De plus, la membrane cytoplasmique devient convolutive de sorte que la cellule se sépare en « corps apoptotiques » (Kerr *et al.*, 1972). Ces changements de la membrane cytoplasmique mènent à la phagocytose excessivement rapide des cellules apoptotiques (Kerr *et al.*, 1972), sans toutefois susciter de réaction inflammatoire (Savill *et al.*, 1993, Vaux, 1993).

L'apoptose est ainsi un processus de différenciation terminale, utilisé par l'organisme dans le but de se libérer de cellules potentiellement délétères ou bien de cellules qui ne sont plus nécessaires à un stade de développement donné. Dans ce dernier contexte on note que l'apoptose est le mécanisme responsable de la disparition des membranes interdigitales lors de la formation des phalanges (Pautou, 1975), de la

résorption de la queue de têtard (Kerr *et al.*, 1974), et dans le remplacement normal du tissu mammaire (Anderson *et al.*, 1982). De plus, l'apoptose est le principal mécanisme de mort cellulaire dans le thymus.

2.3.1 L'apoptose dans le thymus

Chez la souris, le thymus du jeune adulte contient environ 100 à 200 millions de thymocytes. Pourtant, des analyses révèlent qu'avec un taux très élevé de nouvelles cellules produites chaque jour, seulement 1 à 5 % des cellules sont sélectionnées pour émigrer du thymus (Scollay *et al.*, 1980, Egerton *et al.*, 1990, Scollay et Godfrey, 1995), les autres mourant *in situ* par un mécanisme d'apoptose. Les thymocytes DP, ayant une faible affinité pour un complexe de CMH-peptide-de-soi sur des cellules stromales thymiques, ne subissent pas de sélection positive et ainsi meurent. Par contre, ceux qui reconnaissent le complexe de CMH-peptide-de-soi avec une affinité excessive sont éliminés par la sélection négative. Ainsi l'apoptose est le mécanisme de mortalité physiologique qui opère dans ces deux cas, et qui s'avère être critique pour l'homéostasie du thymus. Les changements dans les membranes cytoplasmiques mènent à la phagocytose excessivement rapide des cellules apoptotiques (Schlegel *et al.*, 2000, Hamon *et al.*, 2000). En effet, ce n'est qu'en 1994 que Charles Surh et Johnathan Sprent ont démontré pour la première fois, des thymocytes apoptotiques *in situ*, par une méthode qui détecte les bris d'ADN, soit le TUNEL ((TdT)-mediated dUTP-biotin nick-end labelling).

2.3.2 La régulation de l'apoptose dans le thymus

Les cellules de mammifères possèdent plusieurs enzymes qui peuvent promouvoir ou inhiber l'apoptose. Parmi celles-ci on retrouve la protéine bcl-2 et l'antigène Fas. Puisque la régulation de l'apoptose est très complexe et dépasse les objectifs de cette thèse, seul un bref sommaire sera présenté.

Le *bcl-2* est un proto-oncogène qui a comme fonction de bloquer la mort cellulaire programmée, soit l'apoptose. La protéine *bcl-2* est liée à la membrane interne des mitochondries (Hockenbery *et al.*, 1990), et un des phénomènes reliés à l'apoptose est la perte du potentiel membranaire des mitochondries (Golstein, 1997). Conséquemment, Li et collaborateurs (1997) ont suggéré que *bcl-2* est en mesure de contrôler l'apoptose en régulant la perméabilité de la membrane mitochondriale et ainsi la libération de facteurs pro-apoptotiques, tel que le cytochrome C, un activateur de la cascade des caspases (Yang *et al.*, 1997).

L'expression de la protéine *bcl-2* semble être restreinte dans certaines zones d'un tissu, surtout là où la mortalité par apoptose est caractéristique (Hockenbery *et al.*, 1991). D'ailleurs, il a été démontré que dans le thymus, les thymocytes matures médullaires exprimaient la *bcl-2*, tandis que presque tous les thymocytes immatures corticaux ne l'exprimaient pas (Hockenbery *et al.*, 1991). Dans le but de déterminer le rôle de cette protéine dans le développement des lymphocytes T, Sentman et collaborateurs (1991) ont généré des souris transgéniques où la *bcl-2* était maintenant exprimée dans les thymocytes corticaux. Essentiellement, ils ont inséré un ADNc, codant pour le *bcl-2*, en aval du promoteur du gène *lck* tyrosine kinase, qui est exprimé dans ces thymocytes immatures (Wildin *et al.*, 1991). Une multitude de stimuli peuvent induire l'apoptose chez les thymocytes. Les thymocytes immatures sont sensibles à l'apoptose suite à des traitements avec les glucocorticoïdes (Cohen et Duke, 1984), telle que la dexaméthasone. Ces thymocytes sont également radio-sensibles (Sellins et Cohen, 1987), éprouvant des dommages qui mènent à leur mort par apoptose. De même, lors d'un traitement de souris *in vivo* avec des anticorps anti-CD3, l'apoptose chez ces thymocytes immatures est induite (Smith *et al.*, 1989, Shi *et al.*, 1991). Ainsi, tel qu'attendu, dans les souris transgéniques générées par l'équipe de Sentman mentionnées ci-haut, la présence de *bcl-2* a permis la survie des thymocytes corticaux suivant les traitements aux glucocorticoïdes, à l'irradiation et aux traitements par des anti-CD3 (Sentman *et al.*, 1991). Par contre, l'élimination de thymocytes potentiellement autoréactifs, a quand même eu lieu chez ces souris exprimant le I-E, soit les V β 5, V β 11 et les V β 17a, ainsi la sélection négative de ces cellules n'a pas été inhibée lorsque la *bcl-2* était exprimée dans

les thymocytes corticaux (Sentman *et al.*, 1991). Il semblerait alors que pour ce qui est de la sélection négative, le processus serait indépendant de la bcl-2 ou, pour le moins, nécessiterait une autre voie en association avec celle de la bcl-2.

Quant à l'antigène Fas, une protéine ayant un poids moléculaire d'environ 36 kD (Itoh *et al.*, 1991), il appartient à la famille des récepteurs du TNF (Itoh *et al.*, 1991). L'interaction de Fas avec son ligand FasL, conduit à la transduction d'un signal apoptotique menant à la mort de la cellule (Nagata, 1997). Fas est exprimé à la surface de plusieurs cellules provenant de différents tissus tels que le thymus, le foie, les ovaires et le cœur (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992). Moulian et collaborateurs (1999) ont démontré que dans le thymus humain, les CEM expriment de façon constitutive l'antigène Fas. De plus, lorsque ces CEM sont mises en culture avec des thymocytes activés, l'expression de Fas est augmentée. Puisque l'apoptose est un événement crucial lors de la sélection des thymocytes, plusieurs chercheurs ont tenté de montrer un lien entre celle-ci et l'antigène Fas dans le thymus.

Il avait été suggéré auparavant que la sélection négative chez les souris *lpr* était défectueuse (Matsumoto *et al.*, 1991, Zhou *et al.*, 1991). Ces souris se démarquent par le fait qu'on retrouve de nombreux lymphocytes T autoréactifs dans leur périphérie. Ces derniers sont à l'origine de l'auto-immunité très caractéristique chez les souris *lpr*. En effet, les chercheurs Watanabe-Fukunaga et collaborateurs (1992) ont montré que la mutation *lpr* influence bel et bien l'expression de l'antigène Fas. Chez la souris *gld* par contre, qui, elle aussi, manifeste des symptômes de maladie auto-immune, c'est le ligand FasL qui est muté (Takahashi *et al.*, 1994). Ainsi, il a été proposé que Fas et FasL semblent jouer un rôle important dans la sélection de thymocytes potentiellement autoréactifs, mais ceci reste toutefois sujet à discussion (Singer et Abbas, 1994, Adachi *et al.*, 1996, Kishimoto *et al.*, 1998, Kurasawa *et al.*, 1999).

2.3.3 L'apoptose et les interactions lympho-stromales thymiques

De nombreuses molécules interviennent lors de l'induction ou de l'inhibition de l'apoptose chez les thymocytes. Les exemples suivants signalent l'importance des interactions lympho-stromales, soit physiques (récepteur-ligand), soit par intermédiaire de produits solubles contribuant au processus de l'apoptose.

Il a été démontré auparavant que les thymocytes peuvent adhérer aux cellules épithéliales thymiques via le Thy-1. Dans le but d'examiner la fonction possible de cette interaction, Hueber et collaborateurs (1994) ont montré que les thymocytes immatures DP, cultivés sur des pétris préalablement traités avec des anticorps contre des épitopes spécifiques de la molécule Thy-1, étaient induits en apoptose. Il est ainsi possible que l'apoptose puisse être induite *in vivo*, entre autres, par le Thy-1 et que cette molécule puisse intervenir lors de la sélection négative de thymocytes auto-réactifs. Cependant, le Thy-1 n'est probablement pas, à lui seul, essentiel à ce processus, car les souris déficientes en cette molécule ne démontrent aucune aberration de la sélection négative (Page *et al.*, 1997).

La galectine-1 est une lectine endogène exprimée, entre autres, par des cellules épithéliales du thymus humain (Baum *et al.*, 1995). Perillo et collaborateurs (1997) ont démontré que l'exposition, *in vitro*, à la galectine-1 induit l'apoptose de thymocytes immatures. Cette mort cellulaire est amplifiée lorsque les thymocytes sont d'abord traités avec des anti-CD3. Ainsi, les cellules les plus susceptibles à une stimulation par la galectine-1 sont les thymocytes DP. Cependant, en présence de la galectine-1, l'engagement simultanée du CD3 provoque l'apoptose des autres sous-populations, soit les DN et les SP et l'apoptose des cellules DP est intensifiée (Vespa *et al.*, 1999). Ceci suggère que la galectine-1, possiblement via l'interaction avec le CD45 (Baum *et al.*, 1995, Perillo *et al.*, 1997) participe à l'apoptose faisant suite à l'engagement du TCR avec les molécules du CMH présentes sur les cellules épithéliales thymiques.

L'antigène CD30 est normalement exprimé, entre autres, par une sous-population de thymocytes médullaires activés. Par contre, son ligand, le CD30L est exprimé par des

CEM (et par des corpuscules de Hassal) (Romagnani *et al.*, 1998). Les thymocytes de souris transgéniques sur-exprimant le CD30 sont induits en apoptose lors d'un «cross-linking» de cette molécule. En plus, l'engagement simultané du TCR augmente davantage l'apoptose. Ainsi, il est fort probable que le CD30 agit comme molécule co-stimulatrice lors de la sélection des thymocytes (Chiarle *et al.*, 1999), mais il ne s'avère pas essentiel (DeYoung *et al.*, 2000).

Schreiber et collaborateurs (1996) ont démontré l'importance d'un contact direct entre les thymocytes et les cellules épithéliales thymiques via l'interaction CD2-LFA-3, respectivement. La co-culture de ces deux types cellulaires a induit l'apoptose des thymocytes immatures, celle-ci pouvant être inhibée en utilisant des anticorps bloquant la fonction d'adhésion de CD2 et de LFA-3. Ainsi, les cellules épithéliales thymiques peuvent transmettre des signaux apoptotiques à des thymocytes immatures *in vitro* lors d'un contact direct.

2.4 Les lymphocytes $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$

Les lymphocytes T peuvent exprimer un des deux variants du TCR, soit $\alpha\beta$ (population représentée par la majorité des lymphocytes T) soit $\gamma\delta$ (Cheng *et al.*, 1991, Allison, 1993). Autre que l'expression du TCR, ces deux lignées diffèrent aussi dans : 1) leur expression d'antigènes de surface, tels que le CD4 et le CD8, 2) leur distribution anatomique, et 3) possiblement leur fonction. Les lymphocytes matures $\alpha\beta^+$ expriment soit le CD4, soit le CD8, en dépendance de leur reconnaissance des molécules du CMH classe II et I respectivement. Les lymphocytes $\text{TCR}\gamma\delta^+$, par contre, sont presque exclusivement $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$. Cependant ils expriment environ deux fois plus de molécules TCR/CD3 que les lymphocytes $\text{TCR}\alpha\beta^+$ (Nicolas *et al.*, 2001). Le $\gamma\delta$ est exprimé sur une faible proportion de thymocytes, et de lymphocytes dans tous les organes lymphoïdes secondaires. Cependant, chez la souris, les lymphocytes T $\gamma\delta^+$ semblent se localiser surtout dans la peau (lymphocytes intraépithéliaux), dans l'intestin, dans le système reproducteur de la femelle, et dans les poumons.

Le réarrangement des gènes qui codent pour les TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ joue un rôle capital dans le développement de ces deux lignées, car les souris déficientes en RAG (recombinase activating genes), incapables de réarranger ces gènes, présentent un blocage total dans le développement des deux lignées (Shinkai *et al.*, 1992, Mombaerts *et al.*, 1992). Cependant, il a été démontré que des mutations dans les gènes codant soit la chaîne α soit la chaîne β , ainsi que la chaîne δ , ne semblent pas influencer le développement de cellules $\gamma\delta$, et $\alpha\beta$ respectivement (Philpott *et al.*, 1992, Mombaerts *et al.*, 1992). On soupçonne donc que les populations cellulaires $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ se développent de façon indépendante. Pendant l'ontogenèse, on sait que le réarrangement du gène TCR α a lieu après les réarrangements des gènes TCR γ , δ , et β (Pardoll *et al.*, 1987), et ceci cause l'apparition de cellules $\gamma\delta$ en une série de vagues précédant l'arrivée de cellules $\alpha\beta$ (Dunon *et al.*, 1997). Cependant, la façon dont le réarrangement des gènes du TCR influence la décision $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ est plus controversée. Il est suggéré qu'un réarrangement productif des gènes γ du TCR pourrait empêcher le développement de la cellule TCR $\alpha\beta^+$ (Kang *et al.*, 1995). Par contre, d'autres études utilisant des souris transgéniques exprimant des gènes réarrangés du TCR $\gamma\delta$, ont démontré que des quantités normales de lymphocytes T $\alpha\beta$ étaient quand même produites (Ishida *et al.*, 1990), faisant sous-entendre que l'expression endogène de TCR $\gamma\delta$ pourrait même promouvoir le développement de lymphocytes T $\alpha\beta$.

En effet, le TCR lui-même semble jouer un rôle en ce qui concerne l'engagement d'une cellule vers les lignées $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. Lorsque les PLT acquièrent le CD25, et deviennent ainsi des cellules Pro-T, ceux-ci commencent à réarranger leurs gènes β , γ et δ du TCR. Les cellules qui ont réussi à réarranger les gènes γ et δ , exprimeront le TCR $\gamma\delta$ et procéderont donc le long de la lignée $\gamma\delta$. Les cellules qui réussissent à réarranger le gène β , exprimeront un pré-TCR et peuvent ainsi procéder le long de la lignée $\alpha\beta$. Le pré-TCR est constitué de la chaîne β du TCR, de la chaîne invariante pré-Talpha (pT α) et des protéines du CD3 (Saint-Ruf *et al.*, 1994). Deux modèles sont proposés pour expliquer la participation du TCR $\gamma\delta$ et du pré-TCR dans l'engagement de la cellule vers une des deux lignées : le modèle instructif et le modèle sélectif. Selon le premier modèle, l'expression

du TCR $\gamma\delta$ ou bien du pré-TCR est suffisante pour diriger une cellule vers la lignée $\alpha\beta$ ou la lignée $\gamma\delta$ (Aifantis *et al.*, 1998, MacDonald et Wilson, 1998). Selon le deuxième modèle, l'engagement vers une des deux lignées se fait indépendamment du TCR, mais un signal (du TCR ou du pré-TCR) est quand même requis pour que les cellules puissent survivre et se différencier vers une des deux voies pré-déterminées (Mombaerts *et al.*, 1992, Leduc *et al.*, 2000). En effet, Terrence et collaborateurs (2000) suggèrent que le TCR $\alpha\beta$ puisse substituer pour le TCR $\gamma\delta$ durant l'engagement vers la lignée $\gamma\delta$ et/ou la maturation de la cellule.

Quant à la sélection des cellules TCR $\gamma\delta^+$, les molécules du CMH ne semblent pas participer au développement de ces cellules tel qu'observé pour les cellules TCR $\alpha\beta^+$. Des souris déficientes pour l'expression de la β_2 -microglobuline ne démontrent aucune anomalie dans le développement de cellules $\gamma\delta$ compétentes (Correa *et al.*, 1992). Une autre étude a démontré que, nonobstant le manque total de CMH chez des souris déficientes en molécules de classe I et II, le développement de cellules $\gamma\delta$ a eu lieu quand même (Schleussner et Ceredig, 1993). Ces observations nous mènent à la question de la nature de la reconnaissance d'antigènes par les cellules $\gamma\delta$. Contrairement aux lymphocytes $\alpha\beta^+$, les lymphocytes $\gamma\delta^+$ peuvent être stimulés par des ligands solubles, sans avoir été préalablement 'traités' par des CPA, ni présentés dans un contexte des antigènes du CMH (Hayday, 2000). En effet, les lymphocytes T $\gamma\delta^+$ peuvent reconnaître des antigènes non-peptidiques (Tanaka *et al.*, 1996), tel que des phosphoantigènes (Belmant *et al.*, 1999, Morita *et al.*, 2001^a, Sireci *et al.*, 2001). Ces molécules sont généralement produites par des mycobactéries et autres types de pathogènes microbiens. Toutefois, il a été démontré que les cellules $\gamma\delta$ peuvent aussi reconnaître, des antigènes peptidiques tels que des protéines dérivées de la molécule Hsp-60 de la mycobactérie *M. leprae* (O'Brien *et al.*, 1992), la glycoprotéine I du virus Herpes simplex (Johnson *et al.*, 1992), ainsi que différents types de superantigènes (Ferens *et al.*, 1998, Fikri *et al.*, 2001, Morita *et al.*, 2001^b).

3.0 L'ÉMIGRATION DES THYMOCYTES

3.1 Le marquage de lymphocytes dans le but d'étudier la migration

La question des mécanismes contrôlant la migration des lymphocytes dans les tissus lymphoïdes est loin d'être résolue, mais on a fait du progrès grâce à des réactifs permettant de marquer des lymphocytes et de les suivre *in vivo*. Néanmoins, la tâche de trouver la méthode idéale permettant à la fois de colorer les cellules à étudier, sans toutefois nuire à leur métabolisme ou bien causer de l'encombrement stérique, n'a pas été sans obstacle. Dans les prochaines sections, nous présentons un survol des différents marqueurs de cellules utilisés dans le but d'étudier la migration.

3.1.1 Radio-isotopes

Les premières études concernant la migration *in vivo* de lymphocytes impliquaient l'injection de cellules marquées avec des radio-isotopes (Field et Stanley, 1966, Weissman, 1967, Joel *et al.*, 1972), tels que le Cr^{51} et l' In^{111} . Cependant, un certain nombre de désavantages sont associés à ceux-ci. La localisation histologique des cellules doit être détectée par autoradiographie; une méthode laborieuse. L'identification de marquage n'est pas faite sur des cellules viables (Butcher *et al.*, 1980). Le principal désavantage c'est que l'analyse de cellules individuelles ne peut pas être faite (Brenan et Parish, 1984).

3.1.2 La fluorescéine et la rhodamine

Les limitations associées à l'utilisation de radio-isotopes ont nécessité l'adoption d'un nouveau réactif qui répondrait à différents critères. Ce réactif permettrait de marquer des lymphocytes viables, de façon aléatoire, tout en pouvant facilement les visualiser. Ainsi, en 1980, les chercheurs E. Butcher, R. Scollay et I. Weissman, dans le but d'étudier la maturation et la migration de lymphocytes, ont publié les résultats d'une étude portant sur une nouvelle méthode de marquer des cellules viables *in vitro* avec soit de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), ou de rhodamine (RITC) (Butcher *et al.*,

1980). Ce marquage permettait aux cellules viables d'être identifiées par microscopie de fluorescence ou bien par cytofluorométrie en flux. De plus, l'utilisation d'anticorps conjugués à des molécules fluorescentes (émettant à des longueurs d'ondes différentes du FITC), dirigés contre des antigènes de surface, permet d'étudier de façon simultanée plusieurs antigènes cellulaires à la fois. Ceci permet ainsi un phénotypage plus précis. Une fois marquées, les cellules étaient injectées par voie intraveineuse, et il était donc possible de suivre les cellules FITC⁺ dans les organes lymphoïdes de la périphérie. Mais ceci nécessitait l'introduction de cellules exogènes dans l'animal. Par conséquent, ces mêmes chercheurs ont combiné la technique de l'injection intrathymique avec le FITC et ont fait la preuve de l'efficacité du marquage *in situ* de thymocytes avec le FITC (Scollay *et al.*, 1980). Essentiellement, des souris ont été injectées par voie intrathymique avec du FITC. À un maximum de 6 heures plus tard, les animaux ont été sacrifiés, les organes lymphoïdes périphériques récoltés, et les cellules ont été analysées par la cytométrie de flux. C'est ainsi qu'en extrapolant les données obtenues par cette méthode, ils ont démontré que le taux d'émigration de thymocytes du thymus était de l'ordre de 2 millions de cellules par jour. Des extrapolations étaient nécessaires car l'intensité de fluorescence des cellules marquées au FITC était faible, et elles ne pouvaient être détectées que pour quelques heures suivant l'injection. Mais il a été démontré plus tard que le FITC, même s'il ne semblait pas être mitogénique en soi, possédait un pouvoir co-stimulateur, vérifié par la réponse proliférative avec des mitogènes (Samlowski *et al.*, 1991). Ceci suggérait que ce marquage, à la surface de la cellule, puisse interférer avec l'état d'activation de celle-ci. Néanmoins, cette méthode fut la plus fréquemment utilisée, et ceci jusqu'à aujourd'hui, car les nombreux autres essais pour améliorer la détection de cellules émigrantes, à l'aide d'autres réactifs ont été inefficaces sur plusieurs aspects.

3.1.3 Le Hoechst 33342 (H33342)

Un des désavantages reliés à l'utilisation des fluorochromes s'attachant aux protéines de surface d'un lymphocyte, tel que le FITC, est que cela pourrait nuire à ou bien altérer sa migration. Brenan et collaborateurs étaient les pionniers dans l'utilisation d'un colorant intracellulaire qui se lie à des régions de l'ADN, concentrées en résidus

AT, notamment, le H33342. Une fois lié, ce colorant, qui est absorbé par des cellules viables, devient fortement fluorescent et il n'est dilué que lorsque les cellules se divisent (Durand et Olive, 1982). Les cellules gardent leur fluorescence pendant une période maximale d'environ sept jours; il est donc possible d'utiliser le H33342 dans le but d'étudier la migration de cellules à long terme. En outre, le H33342 peut être injecté directement *in situ* ou bien être utilisé pour marquer des cellules *in vitro* qui seront subséquemment injectées. Mais un des très grands désavantages du H33342 est la possibilité de fuite, car le colorant n'est pas attaché de façon covalente à la cellule (Brenan et Parish, 1984). Ainsi des cellules adjacentes pourraient passivement l'absorber. De plus, ce colorant montre des effets inhibiteurs sur la prolifération des cellules, probablement dus à son interaction avec l'ADN (Erba *et al.*, 1988, Samlowski *et al.*, 1991).

3.1.4 Les colorants lipophiles. Exemple typique : le PKH-26

Il existe un autre type de colorant, qui lui, s'incorpore dans la membrane lipidique de la cellule (Horan et Slezak, 1989). Ce marquage est très stable dans les membranes de cellules qui ne prolifèrent pas, tels que les globules rouges. Par contre, le marquage est partagé également parmi les cellules descendantes, lors d'une division cellulaire. Le plus commun parmi cette catégorie s'avère être le PKH-26. La fluorescence émise par le PKH-26 est facilement détectable par cytométrie en flux. Ce réactif peut aussi être associé à des anticorps conjugués au FITC, même si un léger chevauchement existe au niveau de leur spectre d'émission, car l'émission maximale du FITC est à 525 nm (Pachmann et Killander, 1976) et celle du PKH est à 575 nm (Chung *et al.*, 1995). La plus grande faiblesse du PKH-26 est, notamment, sa toxicité cellulaire. Lors de sa préparation, le colorant est dilué dans une solution d'éthanol (Samlowski *et al.*, 1991). Ainsi, suivant le marquage, les cellules sont lavées maintes fois pour minimiser son effet toxique. Conséquemment, seules des cellules exogènes, préalablement marquées au PKH-26, peuvent être injectées dans un animal; un marquage direct, *in situ*, est impossible.

3.1.5 Les dérivés de la fluorescéine : Les colorants intracytoplasmiques

Dans la catégorie de colorants intracytoplasmiques, on retrouve, entre autres, le CFDA-AM, le Calcéine-AM, et le CFSE. Ces composés, dérivés de la fluorescéine, nécessitent une transformation métabolique par les cellules qui les ont absorbés. Ainsi, pour qu'ils puissent émettre leur fluorescence, ces composés, suite à une courte période d'incubation à 37°C pendant une quinzaine de minutes, sont clivés par les estérases des cellules. Cependant, cette propriété des colorants fait en sorte que seules les cellules viables deviennent fluorescentes. Dorénavant on s'attardera sur le dernier de ces colorants, soit le CFSE, car c'est lui qui fait l'objet d'une grande partie de cette thèse. Grâce à son groupement ester de succinimidyl, le CFSE s'attache de façon covalente à des macromolécules intracellulaires et ainsi persiste pendant des périodes prolongées. En effet, il a été démontré que des lymphocytes, ayant été colorés préalablement avec du CFSE et ensuite injectés par voie intraveineuse, pouvaient encore être détectés huit semaines suivant l'injection (Weston et Parish, 1990). C'est en effet cette caractéristique qui rend le CFSE très utile pour des études de migration à long terme, comme celles effectuées lors de ce projet de doctorat. Aucune toxicité cellulaire n'a été détectée lors de marquages de cellules *in vitro* par le CFSE, notamment suite à des tests de viabilité et de potentiel prolifératif (Weston et Parish, 1990). Puisque les spectres d'émission du FITC et du CFSE sont semblables (excitation : 488 et 491 nm, émission 525 et 518 nm, respectivement) (Pachmann et Killander, 1976, Weston et Parish, 1990), les cellules marquées au CFSE peuvent facilement être détectées par cytométrie en flux. De plus, ces cellules peuvent aussi être marquées avec d'autres anticorps conjugués à des fluorochromes, permettant ainsi des analyses phénotypiques.

3.2 L'émigration de thymocytes vers la périphérie

Le rôle ultime du thymus est celui de fournir au système immunitaire, des lymphocytes T matures, capables d'être activés en cellules effectrices lors d'une rencontre avec un antigène dans la périphérie. Ainsi, la compréhension du processus dynamique de l'émigration thymique est essentielle, et au cours des années, différentes approches expérimentales ont mené à une idée globale des événements cellulaires qui y

sont impliqués. Les questions auxquelles ces diverses études ont répondu (au moins en partie) sont : Les émigrants thymiques, où résident-ils et pour combien de temps? Quel est leur phénotype ? Est-ce qu'ils se divisent ? etc.. Ainsi, les prochaines sections énonceront les résultats de quelques-unes des études effectuées pour tenter de répondre à ces interrogations.

Scollay et collaborateurs (1980) furent les premiers à estimer quantitativement l'émigration de thymocytes vers la périphérie. Utilisant le FITC comme marqueur de thymocytes *in situ*, et en extrapolant les résultats obtenus, ils ont démontré qu'environ 1% des thymocytes du jeune adulte murin, soit 2×10^6 cellules, sortent du thymus par jour, et que ceux-ci se retrouvent dans des zones T-dépendantes des ganglions, de la rate et des plaques de Peyer.

Plus tard, il a été déterminé que les émigrants thymiques récents étaient d'origine médullaire, phénotypiquement matures, (Scollay, 1982), et immunocompétents, tels que définis par des essais *in vitro* (Scollay *et al.*, 1984). Cependant, s'ils ressemblent aux lymphocytes de la périphérie, les émigrants thymiques récents possèdent des caractéristiques permettant de les identifier comme une population distincte. Ces derniers sont en effet légèrement plus grands, moins denses, et démontrent une susceptibilité à être tués, en présence de complément, par l'anticorps B2A2 (Scollay *et al.*, 1984), qui reconnaît l'antigène HSA (Ewing *et al.*, 1988). En effet, les émigrants thymiques récents possèdent une forte ressemblance aux thymocytes « matures » de la médulla thymique. Ainsi les auteurs ont suggéré que ces cellules proviennent de la médulla thymique et qu'ils subissent possiblement des étapes de maturation subtiles post-émigration (Scollay *et al.*, 1984).

En acceptant le fait que les émigrants thymiques proviennent bel et bien de la région médullaire du thymus, il devient important de définir la composition des différentes sous-populations de cellules dites « matures », afin de pouvoir étudier quelles sont les exigences à satisfaire avant qu'un thymocyte ne puisse sortir vers la périphérie. Vernachio et collaborateurs (1989) ont montré que la population de thymocytes

médullaires « matures » était hétérogène quant à l'expression d'un antigène membranaire, le Qa-2. Le Qa-2 est une glycoprotéine appartenant aux antigènes du CMH classe I, non-classique; elle exhibe très peu de polymorphisme. Cette molécule est exprimée sur quelques lymphocytes B, mais sur toutes les cellules T périphériques (Kincade *et al.*, 1980). Cette information, considérée conjointement avec le fait que quelques thymocytes expriment aussi cet antigène, indique peut-être bien que ces thymocytes Qa-2⁺ sont phénotypiquement matures. Effectivement, Vernachio et collaborateurs (1989) ont démontré que cette sous-population thymocytaire avait toutes les caractéristiques de thymocytes matures, soit qu'ils étaient CD3^{hi}, HSA^{lo}, et CD4 ou CD8 SP. Enfin, parmi tous les thymocytes qui sont CD3^{hi}, seulement 40% expriment le Qa-2. Ainsi, les cellules dites « matures » peuvent être divisées en au moins deux populations, les Qa-2 positives et les Qa-2 négatives.

Utilisant l'expression de HSA et de Qa-2, Ramsdell et collaborateurs (1991) ont isolé les différentes sous-populations de thymocytes CD4⁺CD8⁻ dans le but de déterminer leur capacité proliférative face à diverses stimulations. Cependant, il s'est avéré que seuls les thymocytes CD4⁺CD8⁻ exprimant le Qa-2 avaient la capacité de proliférer suivant une stimulation par des anticorps anti-CD3 immobilisés. Ni l'ajout exogène de la cytokine IL-2, ni la présence de CPA syngéniques, procurant ainsi une source de co-stimulation, n'a réussi à induire une telle prolifération des thymocytes Qa-2⁻. Cependant, lorsque les thymocytes Qa-2⁻ ont été stimulés avec des anti-CD3 solubles en présence de CPA syngéniques, ils ont démontré une capacité de prolifération. Ainsi, il semblerait que ces thymocytes Qa-2⁻ aient besoin de molécules accessoires (telles que celles présentes sur des CPA), pour une activation complète. Ainsi les auteurs ont conclu que les thymocytes Qa-2⁻ sont fonctionnellement immatures comparés à ceux exprimant le Qa-2. Cependant, il est important de noter que parmi les émigrants thymiques récents, quelques-uns ont le phénotype HSA⁺, et sont ainsi moins matures (Kelly et Scollay, 1990).

Ge et Chen (1999) ont en effet révélé que l'hétérogénéité des thymocytes médullaires CD4⁺CD8⁻, et fort probablement des émigrants thymiques CD4⁺, s'avère être encore plus complexe que l'on croyait. Analysant plusieurs combinaisons de marqueurs,

il a été constaté que ces cellules peuvent être sous-divisées en sept populations distinctes selon leur expression de Qa-2, de HSA, de CD69, un marqueur d'activation qui identifie les cellules qui ont récemment subi la sélection positive (Yamashita *et al.*, 1993), de 3G11 (un marqueur de cellules CD4⁺ de type Th1 (Greer *et al.*, 1993) : ces cellules sécrètent l'IL-2 et l'IFN- γ), et de 6C10, un épitope de la molécule Thy-1 (Gui *et al.*, 1999). Très récemment, ce même type d'analyse a été effectuée avec les thymocytes médullaires CD4⁺CD8⁺ (Tian *et al.*, 2001). Chaque sous-population définit un stade particulier de maturation (Ge et Chen, 1999). Cette maturation post-sélection n'est pas surprenante compte tenu du fait que les thymocytes SP résident dans la médulla pendant une période d'environ deux semaines avant de sortir dans la périphérie (Egerton *et al.*, 1990). Ainsi, les thymocytes parmi les sous-populations les plus « matures », soit 3G11⁺HSA^{-/lo}Qa-2^{lo} et 3G11⁺HSA^{-/lo}Qa-2^{hi}, sont ceux qui, vraisemblablement, émigrent du thymus (Ge et Chen, 1999, Hayakawa et Hardy, 1991).

Assez récemment, Holder et collaborateurs (1999) ont rapporté l'identification de deux groupes majeurs d'émigrants thymiques, soit les cellules L-sélectine⁺ et les cellules L-sélectine⁻. La première population, constituée surtout de cellules CD4⁺, se dirige de préférence vers les ganglions, tandis que la deuxième, constituée surtout de CD8⁺, s'oriente plutôt vers la rate. Ainsi le destin des émigrants thymiques vers une voie d'immigration donnée semble dépendant de l'expression ou non de la molécule d'adhésion L-sélectine. La L-sélectine (CD62L) est une molécule d'adhésion qui appartient à la famille des lectines de type-C (soit Ca²⁺-dépendantes) (McEver, 1994). Parmi les populations immatures et matures, la L-sélectine est exprimée sur à peu près 80% des lymphocytes dans le thymus (Iwabuchi *et al.*, 1991, Shortman *et al.*, 1987). (Voir la section 4.2.3).

3.2.1 Mécanismes d'émigration

Il est maintenant incontestable que les émigrants thymiques proviennent directement de la médulla thymique. La façon dont ils le font n'est toutefois pas claire. Les tentatives faites par Rolland Scollay et Dale Godfrey (1995) pour répondre à cette

question ont abouti à la proposition de deux modèles : 1) le modèle stochastique, soit le « Lucky dip », et 2) le modèle du « Conveyor belt ».

Le cortex thymique est constitué surtout de thymocytes DP. Il est connu que leur espérance de vie est d'environ 3 à 4 jours, tandis que celle des thymocytes SP qui résident dans la partie médullaire du thymus est d'environ 12 à 14 jours (Egerton *et al.*, 1990, Bryant, 1972, Huesmann *et al.*, 1991, Lucas *et al.*, 1994). De ce scénario émergent les deux questions suivantes. Les cellules qui émigrent de la médulla, sortent-elles de façon aléatoire, soit à n'importe quel moment pendant leur séjour de deux semaines ? Ou bien sortent-elles de manière systématique, de sorte que chaque cellule destinée à être exportée demeure ainsi dans la médulla pour la totalité de 14 jours ? La première question réfère au modèle stochastique, et la deuxième au modèle du « convoyeur ou tapis roulant ». Les données disponibles sur des études dynamiques de thymocytes médullaires s'avèrent être discordantes.

Une étude effectuée par Gabor et collaborateurs (1997) a montré que malgré le fait que la plupart des émigrants thymiques récents sont SP et expriment fortement le complexe CD3/TCR, une hétérogénéité existe quant à leur expression des antigènes HSA et Qa-2. Ainsi la suggestion que des thymocytes n'ayant pas atteint un phénotype complètement mature seraient quand même habilités à émigrer serait en accord avec le premier modèle, soit le modèle stochastique. Par contre, Dyall et Nikolic-Zugic (1995) ont démontré que lorsqu'une sous-population thymocytaire ayant le phénotype $CD4^+CD8^{lo}TCR^{hi}$ était injectée par voie intraveineuse, celle-ci ne survivait pas dans la périphérie, tandis que la sous-population $CD4^+CD8^-TCR^{hi}$, plus mature que la première, était capable de survivre. Les auteurs ont alors suggéré que cette première cohorte de cellules, étant moins mature que la deuxième, ne serait probablement pas apte à sortir. Cette étude serait donc plus en accord avec le deuxième modèle, soit le modèle du « Conveyor Belt ».

Pour ce qui est des mécanismes par lesquels les thymocytes matures émigrent du thymus pour se rendre à la périphérie, très peu de données sont disponibles. Ces quelques

informations seront toutefois exposées dans les prochains paragraphes. Il a été démontré auparavant que les thymocytes possèdent des niveaux importants de certaines protéines G (Beals *et al.*, 1987, Kim *et al.*, 1988), ces protéines étant impliquées dans les signaux de transduction. En effet, il a été suggéré que la signalisation provenant du complexe TCR-CD3 implique les protéines G (Linch *et al.*, 1987). Ainsi il a été démontré que l'activation dépendante du TCR de lymphocytes mis en culture a été bloquée suivant l'ajout de la toxine « pertussis » (Stanley *et al.*, 1989). De plus, des souris transgéniques, exprimant seulement la sous-unité catalytique de la toxine « pertussis » dans tous les thymocytes, ont été générées. Même si la signalisation à travers le TCR ne semble pas affectée, on a observé une accumulation de thymocytes matures dans le thymus et une lymphopénie dans les organes lymphoïdes de la périphérie (Chaffin et Perlmutter, 1991). Utilisant une nouvelle approche pour étudier l'émigration thymique, Lee et collaborateurs (2001) ont démontré que la sortie des thymocytes provenant de FTOC pouvait aussi être inhibée, entre autres, par la toxine « pertussis ». Il est ainsi probable qu'un processus dépendant des protéines G soit impliqué dans l'émigration thymique.

Utilisant la souche de souris CTS, déficiente en lymphocytes T périphériques, Yagi et collaborateurs (1996) ont démontré qu'il y avait une accumulation accrue de thymocytes matures dans le thymus. Par immunohistologie, on a pu voir une forte concentration de thymocytes à la jonction cortico-médullaire. De plus, ces cellules, ayant un phénotype ressemblant largement aux lymphocytes T périphériques, et ayant la capacité de répondre aux mitogènes de façon comparable à ceux-ci, étaient également aptes à se diriger vers les organes lymphoïdes secondaires lorsque injectées par voie intraveineuse. Ainsi, dans le but de détecter des émigrants thymiques, on a injecté par voie intrathymique du CFSE à des souris CTS. Presque aucune cellule n'a été détectée. Les auteurs ont suggéré que ces souris présentent probablement une carence dans le thymus empêchant le déclenchement du « signal » de sortie.

Il avait été montré auparavant que le traitement de rats avec le THI (2-acétyl-4-tétrahydroxybutylimidazole), un composé trouvé dans un colorant alimentaire, avait comme effets sur le thymus d'accroître le nombre de thymocytes SP tout en diminuant le

nombre de thymocytes DP. Cependant, ces changements étaient indépendants de la prolifération et de la différenciation des thymocytes (Gobin et Paine, 1992). Cette observation a ainsi incité les chercheurs Gugasyan et collaborateurs (1998) à vérifier l'hypothèse selon laquelle le THI empêchait probablement l'émigration des thymocytes vers la périphérie. Le traitement de souris avec le THI a alors produit une légère baisse du nombre de thymocytes DP ainsi qu'une augmentation prononcée du nombre de thymocytes SP. L'augmentation du nombre de thymocytes exprimant fortement le CD44, une molécule d'adhésion qui s'avère être importante pour le « homing » de lymphocytes (Lesley *et al.*, 1993), indiquait également qu'ils étaient prêts pour la sortie. En outre, les auteurs ont observé que le THI a provoqué une diminution dans le nombre d'émigrants thymiques récents soit dans la rate, soit dans les ganglions (Gugasyan *et al.*, 1998). Le traitement de souris avec l'immunosuppresseur FTY720 a induit des résultats semblables à l'étude précédente. Essentiellement, l'augmentation significative de thymocytes médullaires matures exprimant fortement le CD44, et la baisse de thymocytes DP, suggèrent que les lymphocytes aient été empêchés de sortir du thymus. En effet, une baisse d'environ 75% dans le nombre d'émigrants thymiques récents a été constatée chez ces souris traitées comparativement aux souris témoins (Yagi *et al.*, 2000). En somme, l'ensemble des données observées suite au traitement de souris avec le THI et avec le FTY720 indique un dérèglement de l'émigration de thymocytes, et suggère qu'il ne s'agit pas d'un événement aléatoire, mais plutôt d'un processus actif, sujet à un mécanisme régulateur.

La plupart des thymocytes en division se retrouvent parmi les cellules immatures qui expriment faiblement le TCR. Ainsi, sauf chez les souris nouveau-nées (Ceredig, 1990), une quantité infime de thymocytes matures prolifèrent. Néanmoins, utilisant un mélange d'anticorps et de BrdUrd, Pénit et Vasseur (1997) ont réussi à identifier des thymocytes matures, soit des TCR^{hi} qui étaient en division. Ils ont démontré qu'un nombre important de thymocytes matures prolifèrent immédiatement avant leur émigration. Cette prolifération n'est toutefois pas obligatoire pour la sortie car des thymocytes HSA⁺Qa-2^{lo} se retrouvant parmi les émigrants thymiques récents ne se

divisent pas. On ne connaît pas les cellules responsable de l'induction de cette prolifération.

3.3 Les organes lymphoïdes secondaires

Après avoir réussi à survivre les processus de sélection, le séjour d'un lymphocyte dans le thymus prend finalement fin. Le résultat : un lymphocyte T mature possédant un TCR spécifique pour la reconnaissance d'un antigène étranger dans un contexte du 'soi', et qui est réfractaire à l'auto-immunité. Ce lymphocyte T dit naïf, parce qu'il n'a pas encore été en contact avec l'antigène, peut maintenant sortir du thymus et migrer vers les tissus lymphoïdes secondaires de la périphérie, principalement la rate et les ganglions. Ils s'ajoutent ainsi au « pool » de lymphocytes recirculants (LR) et migrent continuellement d'un organe lymphoïde à l'autre via les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

3.3.1 La rate

Contenant environ 25% des lymphocytes totaux, la rate est le plus grand des organes lymphoïdes (Brown, 1992). (Il y a présentement controverse concernant la définition du foie comme étant un organe lymphoïde (Doherty et O'Farrelly, 2000, Knolle et Gerken, 2000, Seki, 2000)). De plus, contrairement aux ganglions, la rate contient également des cellules provenant de plusieurs lignées hématopoïétiques, telles que les globules rouges, les polynucléaires neutrophiles et les monocytes. En effet, cette hétérogénéité résulte d'un accès « non-spécifique » à la rate (Voir la section 4.2.3). Des coupes histologiques démontrent clairement deux compartiments distincts nommés pulpe rouge et pulpe blanche. C'est dans ce dernier compartiment que l'on retrouve les lymphocytes T (et B). La rate filtre le sang et capte les antigènes présents dans le système vasculaire ainsi que les globules rouges sénescents. Ceux-ci se localisent immédiatement dans la pulpe rouge et y demeurent piégés pour une période de temps après laquelle seuls les lymphocytes entrent dans la pulpe blanche. Ici, les lymphocytes T se réunissent autour des petites artères et forment les PALS (periarteriolar lymphoid sheaths), soit les zones T-dépendantes (van Ewijk *et al.*, 1981). Les PALS sont munies d'un réseau CPA qui

engendrent la rencontre d'un lymphocyte T vierge et d'un antigène, enclenchant ainsi un processus de différenciation qui permet le développement d'une cellule effectrice.

3.3.2 Les ganglions

Les ganglions sont des structures lymphoïdes qui se retrouvent à la jonction des vaisseaux lymphatiques. Les vaisseaux lymphatiques afférents captent la lymphe (liquide extracellulaire) provenant de la plupart des tissus du corps, et « ramassent » ainsi les antigènes qui y logent, pour les amener aux ganglions. Exclusifs aux ganglions, les HEV (high endothelial venules) sont de petits vaisseaux revêtus d'une monocouche de grosses cellules endothéliales. Via des molécules d'adhésion, telle que la L-sélectine, les lymphocytes naïfs possèdent la faculté de reconnaître et de se lier aux ligands présents sur les HEV. Ce mécanisme de reconnaissance spécifique permet aux lymphocytes de s'infiltrer entre les cellules endothéliales et ainsi d'avoir accès au paracortex du ganglion. Cette région, dite T-dépendante, est fonctionnellement comparable aux PALS de la rate; elle renferme donc un réseau de CPA, composé surtout de cellules dendritiques, qui présentent ainsi les antigènes provenant de la lymphe dans le but de stimuler une réponse immunitaire. On voit donc une transition de la cellule T vierge en cellule T effectrice/mémoire.

3.3.3 Le réseau MALT (« Mucosa- Associated Lymphoid Tissue »)

En plus de la rate et des ganglions, les lymphocytes T s'accumulent dans d'autres organes qui sont, strictement parlant, non-lymphoïdes. Il s'agit de tous les tissus qui peuvent être colonisés par des microorganismes et qui requièrent ainsi d'être aptes à effectuer une réponse immunitaire. En effet, les tissus qui peuvent avoir un contact direct avec l'environnement externe constituent les organes lymphoïdes les plus « immunologiquement actifs ». L'ensemble de ces tissus constitue le réseau MALT. On peut, en effet diviser le réseau MALT en 'sous-réseaux'. Brièvement, l'appendice et les plaques de Peyers de l'intestin grêle, font partie du réseau de tissu lymphoïde appelé GALT (« Gut-associated lymphoid tissue »). Ces structures sont spécialisées pour piéger

les antigènes provenant de la surface de l'épithélium de la voie gastro-intestinale (Shields, 2000). La peau constitue le SALT (« Skin-associated lymphoid tissue ») (Streilein, 1983), et l'épithélium muco-sal des voies pulmonaire et naso-pharyngienne constituent le BALT (« Bronchus-associated lymphoid tissue ») (Pabst et Tschernig, 1995) et le NALT (« Nasal-associated lymphoid tissue »), respectivement. Le réseau BALT n'est pas constitutif chez toutes les espèces. En effet, il n'est pas présent chez l'humain adulte, mais peut être développé lors de pathologies (Tschernig et Pabst, 2000). Le réseau NALT (aussi appelé « Waldeyer's ring » chez les humains), qui se retrouve à l'entrée des voies respiratoire et alimentaire, comporte surtout les amygdales palatines, l'amygdale pharyngienne, et l'amygdale linguale (pour des revues complètes sur le réseau NALT, voir : Kuper *et al.*, 1992, Hellings *et al.*, 2000). Les voies urogénitales (Brandtzaeg, 1997), et les membranes muqueuses qui tapissent les paupières (CALT : « conjunctiva-associated lymphoid tissue ») (Knop et Knop, 2000), font aussi partie du réseau MALT.

L'épithélium qui recouvre les tissus du réseau MALT possède des cellules spécialisées, que l'on appelle des cellules M ou des cellules « M-like », qui transportent des antigènes à travers la membrane muco-sale pour qu'une réponse immunitaire locale ou systémique puisse être déclenchée (Hathaway et Kraehenbuhl, 2000, Niedergang et Kraehenbuhl, 2000). Par immunohistochimie, il a été démontré que les cellules M reconnaissent différents types de glyco-conjugués dans le réseau NALT chez les animaux élevés dans des conditions SPF (« Specific Pathogen-Free ») comparé à ceux élevés dans des conditions conventionnelles. En effet, le patron d'expression des différents sucres reconnus par les diverses lectines suggèrent fortement que les cellules M soient très sensibles à des variations dans l'environnement de l'animal (Jeong *et al.*, 1999). De plus, l'administration de lectines spécifiques aux cellules M présentes dans le réseau NALT entraîne un blocage de l'adsorption de pathogènes (Takata *et al.*, 2000). Pour que les lymphocytes puissent avoir accès à ces tissus du réseau MALT, ils doivent pénétrer dans les vaisseaux sanguins; ceci est restreint aux cellules T activées/mémoires qui expriment plusieurs molécules d'adhésion peu représentées sur les cellules T naïves. Par exemple, l'antigène CLA (« cutaneous lymphocyte antigen »), exprimé par une sous-

population de lymphocytes T mémoire (ainsi que par des cellules B mémoire), permet la migration élective de ces cellules vers la peau via son ligand E-sélectine, qui est exprimé par des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Yoshino *et al.*, 1999).

3.4 La recirculation de lymphocytes

Ainsi, un lymphocyte activé ayant subi la transformation en cellule effectrice peut maintenant se diriger vers des sites tertiaires, la rate, et bien que rarement, recirculer dans le thymus.

Environ 10% des thymocytes sont considérés matures, et ceux-ci se situent exclusivement dans la médulla thymique. Parmi ces cellules naïves, un certain nombre sont immunocompétentes et donc prêtes pour émigrer vers la périphérie. Cependant, il a été rapporté dans la littérature que des lymphocytes matures (Michie et Rouse, 1989) provenant d'organes lymphoïdes secondaires peuvent migrer dans le thymus lorsque injectés en grand nombre par voie intraveineuse (Michie *et al.*, 1988). Fort probablement, ces lymphocytes matures traversent l'endothélium thymique via l'interaction VLA-4-VCAM-1 (Bell *et al.*, 1995). Il a été établi que cette recirculation de lymphocytes dans le thymus était restreinte aux lymphocytes T activés, et que ceux-ci se localisent surtout dans la région médullaire. On retrouve une exception à cette règle générale chez les nouveau-nés : ici, des lymphocytes T matures, ayant un phénotype de cellule naïve/non-activée, entrent dans le thymus suite à une injection intraveineuse; comme chez l'adulte, ces immigrants thymiques se retrouvent exclusivement dans la médulla. Les auteurs suggèrent que ces cellules matures migrent probablement dans le thymus des nouveau-nées pour assurer l'induction de tolérance à différents antigènes exprimés spécifiquement sur des lymphocytes T matures (Surh *et al.*, 1993).

4.0 LES MOLÉCULES ACCESSOIRES IMPLIQUÉES DANS LES INTERACTIONS LYMPHO-STROMALES

4.1 Introduction

La reconnaissance d'un antigène par un lymphocyte T comporte l'interaction entre son TCR (et le complexe associé, le CD3) et le peptide en question, qui lui, est associé aux molécules de classe I ou de classe II du CMH exprimées sur les CPA. Cette interaction obligatoire est toutefois insuffisante pour l'activation complète du lymphocyte, car elle est généralement accompagnée de plusieurs autres paires de molécules qui contribuent à l'efficacité de l'ensemble. On fera ainsi un survol non-exhaustif de ces molécules accessoires impliquées dans plusieurs interactions lympho-stromales thymiques.

4.2 Les molécules d'adhésion

4.2.1 La famille des intégrines

La famille des intégrines comporte des protéines de surface hétérodimériques composées d'une chaîne α liée de façon non-covalente à une chaîne β . Impliquées dans des interactions cellule-cellule, ainsi que de cellule-protéines de la matrice extracellulaire (PMEC), les intégrines assurent un lien entre l'environnement extracellulaire et le cytosquelette (Hynes, 1992). Chez les mammifères on retrouve huit sous-familles d'intégrines, définies essentiellement par leur chaîne β . Les intégrines β_1 , (la plupart sont aussi nommées VLA: very late antigens) sont exprimées par tout type de cellule. Dans le thymus, par exemple, les interactions entre l'intégrine VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) exprimée par des thymocytes, et la fibronectine (FN) exprimé par des cellules stromales, contribuent à la différenciation de ces premières cellules (Sawada *et al.*, 1992). L'expression et l'avidité de VLA-4 sont modulées selon l'état de maturation des thymocytes (St-Pierre *et al.*, 1996).

L'expression des intégrines β_2 est restreinte aux leucocytes. Ainsi, dans la famille des leucointégrines de type β_2 , on retrouve le $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1: lymphocyte function-

associated antigen-1 ou CD11a/CD18), le $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1 ou CD11b/CD18), le $\alpha_X\beta_2$ (p150,95 ou CD11c/CD18) et le $\alpha_D\beta_2$ (CD11d/CD18) (Kreis et Vale, 2000).

L'intégrine $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1), qui est surtout impliquée dans la recirculation lymphocytaire et dans le recrutement de cellules aux sites d'inflammation, se lie aux ICAM-1 (CD54), -2 (CD102), -3 (CD50), -4 (LW), et -5 (TLN) (Springer, 1995, Mizuno *et al.*, 1997, Hermand *et al.*, 2000). Les intégrines $\alpha_M\beta_2$ et $\alpha_X\beta_2$ se lient à de multiples ligands: on y retrouve, entre autres, ICAM-1 (Diamond *et al.*, 1991, Diamond *et al.*, 1993), ICAM-2 (*et al.*, 1995), le fibrinogène (Altieri *et al.*, 1988, Diamond *et al.*, 1993) et le iC3b (Bilsland *et al.*, 1994), une protéine du complément. Quant à l'intégrine $\alpha_D\beta_2$, elle se lie préférentiellement à ICAM-3 (Van der Vieren *et al.*, 1995).

Une synthèse défectueuse de la chaîne β_2 est à la source de la maladie LAD-I (leucocyte adhesion deficiency-I) (Kishimoto *et al.*, 1987, Dimanche-Boitrel *et al.*, 1988, Wardlaw *et al.*, 1990). Chez ces patients, la migration des neutrophiles et des monocytes aux sites d'inflammation demeure restreinte et leurs fonctions qui sont dépendantes de l'adhésion sont aussi défectueuses (Majima *et al.*, 1993). Ainsi, le degré d'immunodéficience est variable, mais dans le pire des cas, l'immunité contre certaines bactéries est complètement inefficace.

L'intégrine β_4 est un récepteur de la laminine, une protéine de la matrice extracellulaire. Elle est exprimée par la plupart des cellules épithéliales, par certaines cellules endothéliales ainsi que par les cellules de Schwann (Sonnenberg *et al.*, 1990, Feltri *et al.*, 1997, Giancotti, 1996). Les intégrines de type β_3 , $-\beta_5$, $-\beta_6$, et $-\beta_8$ reconnaissent divers ligands tels que le fibrinogène, la vitronectine, et la fibronectine (^bSmith *et al.*, 1990, Pasqualini *et al.*, 1993). Ces intégrines sont exprimées sur différents types cellulaires et sont souvent associées à des états pathologiques (Breuss *et al.*, 1995). Finalement, tout comme les β_2 , les intégrines de type β_7 sont exprimées surtout par des leucocytes. Elles sont impliquées dans la recirculation de leucocytes (via le ligand MadCAM-1) (Berlin *et al.*, 1993) et dans la localisation de lymphocytes intraépithéliaux (via le ligand E-cadherin) (Cepek *et al.*, 1994).

La LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) est l'intégrine la plus importante quant à l'adhésion intercellulaire entre les lymphocytes et les cellules stromales. LFA-1 est aussi présente sur les macrophages et les neutrophiles et sur environ 50% des cellules provenant de la moelle osseuse (Kurzinger *et al.*, 1981, Tamatani *et al.*, 1991). Pour ce qui est de la relation entre cette intégrine et ses ligands, on s'attardera surtout sur LFA-1 et ICAM-1 (Voir la section 4.2.2.2), car ils jouent un rôle important dans les interactions lympho-stromales dans le thymus.

Les thymocytes peuvent adhérer aux cellules épithéliales thymiques via l'interaction LFA-1/ICAM-1 (Singer *et al.*, 1990). L'étude effectuée par Revilla et collaborateurs (1997) a montré que cette interaction semble être très importante pour la différenciation des thymocytes. En effet, le traitement de souris nouveau-nées avec des anticorps dirigés contre la chaîne α de LFA-1 a réduit le pourcentage de cellules CD8 SP dans le thymus et dans la périphérie.

Fine et Kruisbeek (1991) ont utilisé des FTOC dans le but d'étudier le rôle de l'interaction LFA-1/ICAM-1 thymique pendant l'embryogenèse. Ils ont démontré que l'ajout d'anticorps anti-LFA-1 (ou anti-ICAM-1) aux FTOC diminuait le nombre de cellules par lobe d'environ 50%. Cette réduction était surtout évidente parmi les thymocytes $CD4^+CD8^+$. L'interaction LFA-1/ICAM-1 semble, donc, être importante pour le développement de thymocytes DP.

La LFA-1 semble aussi être impliquée dans le processus de la sélection négative, car le traitement de souris nouveau-nées avec des anticorps anti-LFA-1 entraîne l'émigration de lymphocytes auto-réactifs (Quddus *et al.*, 1994). Ainsi, l'interaction des thymocytes avec le microenvironnement thymique, via la molécule d'adhésion LFA-1 semble importante, mais par indispensable pour le développement de lymphocytes T, car l'ablation génétique du gène ICAM-1 (Sligh *et al.*, 1993, Xu *et al.*, 1994) ou du gène CD11a (Shier *et al.*, 1996) ne semble pas engendrer de perturbations notables dans la différenciation des lymphocytes T.

Dans le but de déterminer les rôles de différentes molécules d'adhésion dans le développement de précurseurs thymiques, Wada et collaborateurs (1996) ont ajouté l'anticorps anti-LFA-1 (entre autres) à une co-culture de thymus fœtal (qui avait été préalablement traité à la désoxyguanosine ; voir la Section 6.3), et de cellules provenant du foie fœtal. L'inhibition du développement de ces dernières cellules suggère fortement que leur l'interaction avec le microenvironnement du thymus embryonnaire, via les molécules LFA-1-ICAM-1, soit indispensable.

4.2.2 Les protéines de la superfamille des immunoglobulines

Les protéines de la superfamille des immunoglobulines sont caractérisées par la présence d'une ou de plusieurs boucles de structures compactes ayant deux résidus de cystéine séparés par environ 55 à 75 acides aminés (Aplin *et al.*, 1998). Typiquement, ces protéines possèdent un domaine extra-cellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Les membres de la superfamille des immunoglobulines se retrouvent parmi plusieurs types cellulaires et sont d'ailleurs, impliqués dans de nombreux processus biologiques. Dans cette catégorie de protéines se retrouvent, entre autres, le N-CAM (« neural cell adhesion molecule ») (Cunningham *et al.*, 1987), le PECAM (« platelet endothelial cell adhesion molecule » : CD31) (Newman *et al.*, 1990), le MAdCAM-1 (« mucosal addressin cell adhesion molecule-1 ») (Briskin *et al.*, 1993), le CD4 (Parnes et Hunkapiller, 1987) et CD8 (Panaccio *et al.*, 1987) et le ICAM-1 (CD54) (Staunton *et al.*, 1988). (Pour des revues plus complètes qui incluent d'autres membres de la superfamille des immunoglobulines, le lecteur est invité à consulter les publications suivantes : Hawke *et al.*, 1999, Wang et Springer, 1998, Colonna, 1997, Huang *et al.*, 1997). Dans les prochains paragraphes, les trois dernières molécules mentionnées ci-haut seront surtout présentées, car elles jouent des rôles importants dans la différenciation et l'activation des thymocytes.

4.2.2.1 Les co-récepteurs CD4 et CD8

Les deux molécules CD4 et CD8, conjointement avec le TCR, jouent le rôle de co-récepteurs pour la reconnaissance des complexes CMH-peptides. Les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ démontrent très clairement des différences quant à leur restriction d'utilisation des molécules du CMH. Alors que les cellules CD4⁺ sont restreintes par des molécules du CMH classe II, les CD8⁺ sont restreintes par des molécules du CMH classe I (Swain, 1983). Les premières se lient au domaine β_2 de la molécule de classe II (Cammara *et al.*, 1992), et les dernières, au domaine α_3 de la classe I (Salter *et al.*, 1990). Les interactions entre ces co-récepteurs et les molécules du CMH, non seulement augmentent l'avidité du complexe de reconnaissance de l'antigène, contribuant à la stabilité du complexe, mais sont aussi nécessaires pour les signaux de transduction qui se manifestent lors de l'engagement du TCR (Julius *et al.*, 1993). Le complexe TCR est constitué des chaînes $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ associées aux chaînes invariantes (sous-unités) CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , ainsi que ζ : Pour des revues complètes voir Kappes *et al.*, 1995, Garcia, 1999, Alcover et Alarcon, 2000, Teyton *et al.*, 2000. Puisque les seuls ligands des molécules CD4 et CD8 dans le thymus sont les molécules du CMH classe II et I respectivement, toutes les interactions lymphostromales qui engagent le TCR, impliquent aussi un des deux co-récepteur. Lorsque les protéines CD4 et CD8 interagissent avec les molécules du CMH, elles interagissent simultanément avec la tyrosine kinase intracellulaire p56^{Lck}, via leur domaine cytoplasmique. La transduction de signaux, via les chaînes invariantes du complexe TCR, qui survient lorsque le TCR est engagé, induit l'activation (entre autres) de cette kinase, et cette dernière est ensuite recrutée vers le TCR activé, via le domaine cytoplasmique du CD4 ou du CD8. La tyrosine kinase induit ensuite la phosphorylation des sous-unités du complexe TCR et ceci est suivi par la mobilisation du calcium et l'activation de multiples voies biochimiques (Weil et Veillette, 1996, Isakov et Biesinger, 2000, Basson et Zamoyska, 2000. Zhang et Samelson, 2000, Berg et Kang, 2001, Hogquist, 2001).

4.2.2.2 Les ICAMs

Les molécules d'adhésion nommées ICAMs (intercellular adhesion molecules) font partie de la superfamille des immunoglobulines. On retrouve cinq ICAMs, soit l'ICAM-1, -2, -3, -4, et -5 (Marlin et Springer, 1987, Staunton *et al.*, 1989, de Fougères et Springer, 1992, Bailly *et al.*, 1995, Hermand *et al.*, 2000, Tian *et al.*, 1997, Kilgannon *et al.*, 1998). Des études de blocage ont révélé que l'adhésion via le LFA-1 n'était inhibée que partiellement avec des anticorps bloquants anti-ICAM-1. Ainsi l'existence d'un deuxième ligand pour le LFA-1 a été mise en évidence, soit l'ICAM-2. L'ICAM-3 a aussi été identifié par ce procédé. Seules ICAM-1 et ICAM-2 sont exprimées sur l'épithélium thymique (Nonoyama *et al.*, 1989, Singer, 1990, St-Pierre, résultats non-publiés). Cependant aucun travail a été fait sur le rôle de ce dernier dans le thymus. ICAM-2 est aussi exprimée sur des thymocytes (Fine *et al.*, 1991, Zhao *et al.*, 2001). ICAM-4 est exprimée sur des globules rouges (Bailly *et al.*, 1994) et ses ligands physiologiques sont les intégrines LFA-1, Mac-1 (Hermand *et al.*, 2000), VLA-5 et $\alpha_5\beta_5$ (Spring *et al.*, 2001). ICAM-5, qui est exprimé dans le cerveau (Tian *et al.*, 1997), peut se lier à LFA-1 (Tian *et al.*, 1997, Tian *et al.*, 2000^b) et aussi à une autre molécule d'ICAM-5 via une interaction homotypique (Tian *et al.*, 2000^a). Quant à ICAM-3, elle n'est pas exprimée sur les cellules du stroma thymique, mais peut être exprimée à la surface des lymphocytes T (Cordell *et al.*, 1994), et en ce sens, pourrait intervenir lors de contacts intercellulaires entre les thymocytes. Toutefois, ICAM-3 n'a pas été, jusqu'à maintenant, retrouvée chez la souris. Dorénavant seule ICAM-1 sera traitée, car elle fait l'objet d'une partie de cette thèse.

ICAM-1 (CD54) est une molécule ayant un poids moléculaire pouvant varier entre 90 et 115 kDa, selon son niveau de glycosylation. La forme commune d'ICAM-1 contient cinq domaines extracellulaires de type immunoglobuline où l'on observe plusieurs sites de glycosylation (Staunton *et al.*, 1988). ICAM-1 possède aussi un domaine transmembranaire se terminant en un petit domaine cytoplasmique fortement chargé (Staunton *et al.*, 1988). ICAM-1 se lie à plusieurs ligands, dont LFA-1 qui se lie aux domaines extracellulaires 1 et 2 (Staunton *et al.*, 1990), Mac-1, qui se lie au

domaine 3 (Diamond *et al.*, 1991), CD43 (Rosenstein *et al.*, 1991), et le fibrinogène (Languino *et al.*, 1995), qui lui aussi se lie au domaine 1 (D'Souza *et al.*, 1996).

ICAM-1 est exprimée sur plusieurs types cellulaires tels que des leucocytes, des cellules épithéliales, des fibroblastes et des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Son expression peut être augmentée suivant une stimulation avec certaines cytokines telles que l'IFN- γ ou l'IL-1 (Dustin *et al.*, 1986, Galy et Spits, 1991). De plus, son expression sur les cellules épithéliales de la muqueuse nasale est impliquée dans les infections par le rhinovirus humain. En effet, ce virus, qui reconnaît le domaine 1 de l'ICAM-1, exploite cette molécule comme récepteur pour son attachement aux cellules cibles (McClelland *et al.*, 1991, Sethi *et al.*, 1997).

L'ICAM-1 est impliquée dans l'extravasation des leucocytes (Springer, 1994), ainsi que dans plusieurs autres processus cellulaires. Chez les souris portant une ablation génétique au niveau du gène de l'ICAM-1, on voit une diminution sévère du recrutement de neutrophiles et d'autres cellules effectrices vers des sites d'inflammation (Sligh *et al.*, 1993). Par conséquent, ces animaux démontrent, entre autres, une résistance au choc septique (Xu *et al.*, 1994) ainsi que des rejets de greffes retardés (Tang *et al.*, 1997). On s'attardera plutôt, bien que brièvement, sur ses rôles dans le thymus.

Nonoyama et collaborateurs (1989) ont montré que la molécule d'adhésion ICAM-1 est présente sur des cellules épithéliales fraîches, provenant de tissu thymique digéré. Cependant, lorsqu'elles sont mises en culture, leur expression d'ICAM-1 diminue. L'ajout de l'IFN- γ aux cultures ré-induit l'expression de la molécule et ces cellules épithéliales ressemblent maintenant à celles que l'on retrouve *in vivo*. Les résultats démontrent que la capacité d'adhésion entre celles-ci et des thymocytes augmentent lors du traitement à l'IFN- γ , et que cette augmentation semble être due à l'interaction LFA-1/ICAM-1, car des anticorps anti-ICAM-1 ont inhibé cette liaison.

Il a été rapporté que les complexes Nurse sont impliqués dans la sélection positive (Penninger et Wick, 1992), et en effet ceux-ci sont les premiers complexes lympho-

stromaux formés lors du développement des thymocytes (Cordes *et al.*, 1997, Oliveira-dos-Santos *et al.*, 1997) L'expression de ICAM-1 a été observée sur la membrane cytoplasmique et sur la membrane des cavéoles (les vacuoles dans lesquelles on retrouve les thymocytes) des cellules Nurse (Oliveira-dos-Santos *et al.*, 1997, Cordes *et al.*, 1997). Puisque l'adhésion de thymocytes à des cellules épithéliales *in vitro* se fait, entre autres, par LFA-1/ICAM-1 (Singer *et al.*, 1990), il est fort possible que cette même interaction intervienne *in vivo*.

Colic et Drabek (1991) ont démontré que 80% des macrophages thymiques (corticaux ainsi que ceux qui se retrouvent à la jonction cortico-médullaire) isolés et mis en culture expriment la molécule ICAM-1. La co-culture de ceux-ci avec des thymocytes forme des complexes caractéristiques appelés rosettes. Il s'est avéré que ICAM-1 est un des ligands impliqué dans cette interaction lympho-stromale (Oliveira-dos-Santos *et al.*, 1997), car le pré-traitement des macrophages avec de l'anti-ICAM-1 a inhibé cette adhésion (Colic et Drabek, 1991).

On sait que les cellules dendritiques du thymus peuvent favoriser le processus de sélection négative. Carlow et collaborateurs (1992) ont montré que la sélection négative de thymocytes DP en coculture avec des cellules dendritiques pouvait être partiellement inhibée lors d'un ajout d'anticorps bloquant anti-ICAM-1. Ainsi, cette molécule joue probablement un rôle important dans la sélection de thymocytes.

Les individus atteints de trisomie 21 (Down Syndrome) démontrent plusieurs anomalies quant à la maturation des thymocytes. On note une réduction dans le nombre de cellules corticales (Larocca *et al.*, 1988) ainsi que dans celui des cellules exprimant fortement les chaînes α et β du TCR (Murphy et Epstein, 1990). Murphy et Epstein (1992) ont montré une déficience dans le nombre de cellules $\text{TCR}\alpha\beta^+$ et de cellules CD4^+ naïves (CD45RA^+), représentant des émigrants thymiques récents, dans la périphérie. En outre, les sujets atteints de trisomie 21 présentent une proportion élevée de cellules $\text{TCR}\gamma\delta^+$ dans la périphérie.

Assez récemment, cette même équipe a aussi noté que le thymus de patients atteints de trisomie 21 surexprime l'IFN- γ et le TNF (Murphy *et al.*, 1992); ces deux cytokines augmentent l'expression d'ICAM-1 sur des cellules en culture (Dustin *et al.*, 1986). En effet, suite à cette dernière observation, ils ont constaté que l'expression aberrante de cytokines était accompagnée d'une surexpression d'ICAM-1 et ce, surtout dans la médulla (par des CEM et des thymocytes). De plus, l'expression de LFA-1 sur les thymocytes était aussi augmentée. Ainsi, Murphy et collaborateurs (1993) suggèrent que ces surexpressions puissent mener à des interactions lympho-stromales, via les molécules LFA-1 et ICAM-1, excessives et/ou anormales conduisant à la perturbation de la maturation thymocytaire.

4.2.2.3 Le CD2 et son ligand, le LFA-3 (CD58)

Utilisant des cultures de cellules épithéliales thymiques humaines, Singer et collaborateurs (1986) ont démontré que ces cellules pouvaient se lier à des thymocytes humains formant ainsi des structures appelées « rosettes ». Ce modèle de contact lymphostromale a rendu possible l'investigation de différentes molécules impliquées dans les interactions entre les cellules épithéliales et les thymocytes.

Ainsi, le groupe de Vollger (1987) a établi que des anticorps dirigés soit contre la molécule CD2 (membre de la superfamille des immunoglobulines) (Sewell *et al.*, 1986) présente sur les thymocytes, soit contre son ligand le LFA-3 (aussi membre de la superfamille des immunoglobulines) (Dustin *et al.*, 1987) présent sur les cellules épithéliales en culture, inhibaient leur adhésion. De plus, la liaison entre ces cellules a permis l'expression du récepteur de l'IL-2 chez les thymocytes, suggérant ainsi que les cellules épithéliales intervenaient dans l'activation des thymocytes (Denning *et al.*, 1987). Une autre étude a démontré que la coculture de thymocytes avec des cellules épithéliales se traduit par une production augmentée d'IL-1 par ces dernières. En effet, utilisant un anticorps anti-LFA-3, simulant ainsi le ligand CD2, le même phénomène s'est produit (Le *et al.*, 1990).

En plus de leur fonction adhésive, des études ont démontré que ces molécules d'adhésion, soit le CD2 et le LFA-3 (en plus du LFA-1 et du ICAM-1), jouent des rôles considérables quant à l'activation de thymocytes. En effet, en présence de cellules épithéliales, des anticorps dirigés contre chacune de ces molécules ont inhibé la prolifération de thymocytes induite par le mitogène PHA (Denning *et al.*, 1987, Singer *et al.*, 1990).

Cibotti et collaborateurs (1997) ont démontré qu'en absence d'épithélium thymique, le co-engagement du TCR avec la molécule CD2 (entre autres) induit la différenciation des thymocytes du stade DP au stade SP. Puisque cet engagement de molécules co-stimulatrices imite la fonction des cellules épithéliales *in vivo*, on peut suggérer que CD2 soit impliqué dans la sélection des thymocytes. En effet, chez des souris déficientes en CD2, la sélection positive des thymocytes est augmentée. Les auteurs suggèrent ainsi que le CD2 rend les thymocytes moins sensibles à la sélection positive et, en ce sens, améliore l'efficacité de ce processus (Teh *et al.*, 1997).

Utilisant des cultures de cellules épithéliales thymiques humaines, Jrgensen et collaborateurs (1996) ont montré que la capacité de ces cellules à présenter des superantigènes (sAg) à des thymocytes, était dépendante de la présence, entre autres, de la molécule LFA-3. Ainsi, l'interaction CD2-LFA-3 lors d'un contact lympho-stromal pourrait participer à la sélection négative de thymocytes spécifiques pour des sAg.

4.2.2.4 Le CD28, son homologue, le CTLA-4 (CD152), et leurs ligands, le B7.1 (CD80) et le B7.2 (CD86)

Pour que les lymphocytes T puissent être activés, leurs TCR, accompagnés par l'un des deux co-récepteurs, le CD4 ou le CD8, se lient aux complexes du CMH :peptide. Cependant, les signaux transmis sont insuffisants pour induire le lymphocyte T naïf dans un état de différenciation et de prolifération. Des signaux supplémentaires, appelés signaux co-stimulateurs, sont essentiels pour une activation optimale. En effet, leur absence conduit la cellule à un état d'anergie.

À titre d'exemple, les molécules appartenant à la famille B7 (B7.1: CD80 et B7.2: CD86, entre autres) sont des molécules co-stimulatrices. Membre de la superfamille des immunoglobulines (Aruffo et Seed, 1987), le B7 est exprimé surtout par des cellules dendritiques (thymiques et autres) (Reiser et Schneeberger, 1994, Larsen *et al.*, 1992) et, entre autres, par des lymphocytes B activés (Freeman *et al.*, 1989, Freeman *et al.*, 1991), par des monocytes et des lymphocytes T activés (Freedman *et al.*, 1991). Son ligand physiologique, le CD28, aussi membre de la famille des immunoglobulines, est exprimé de façon constitutive par les lymphocytes T naïfs et par les lymphocytes T activés (Gross *et al.*, 1992). Ces deux types de molécules fournissent les principaux signaux co-stimulateurs pour l'activation d'un lymphocyte T naïf de la périphérie. Une fois le lymphocyte activé, la molécule CTLA-4 est induite (Oosterwegel *et al.*, 1999).

Homologue du CD28, le CTLA-4 (Linsley *et al.*, 1991) possède une avidité fort supérieure (Peach *et al.*, 1994, Mueller, 2000) et sa liaison avec son ligand, le B7, émet des signaux inhibiteurs, limitant ainsi la réponse proliférative du lymphocyte T activé (Waterhouse *et al.*, 1996, Greenfield *et al.*, 1998). En effet, l'absence totale de la molécule CTLA-4 chez les souris déficientes en CTLA-4 mène au développement d'une maladie lymphoproliférative létale (Oosterwegel *et al.*, 1999). Trouve-t-on ces mêmes molécules dans le thymus, soit dans le développement des lymphocytes T, et quelles sont leurs fonctions?

Le groupe de Gross et collaborateurs (1992) a démontré que chez la souris, les thymocytes $\gamma\delta$ ainsi que les thymocytes $\alpha\beta$ de phénotype DP, expriment très fortement l'antigène CD28, tandis que les thymocytes plus matures en expriment moins. Quant à la distribution intrathymique de son ligand, le B7, cet antigène semble être restreint aux cellules dendritiques et aux cellules épithéliales médullaires (Nelson *et al.*, 1993). Chez les souris SCID, l'état de déficience presque totale de la molécule B7 peut être renversé lorsque ces mêmes souris sont reconstituées avec de la moelle osseuse (Degermann *et al.*, 1994). Ainsi l'expression de cette molécule co-stimulatrice semble nécessiter la présence de lymphocytes T.

Utilisant des souris chimères, chez qui les cellules épithéliales thymiques I-E⁺ étaient localisées et dans le cortex et dans la médulla, reconstituées avec des cellules souches de souris transgéniques pour le TCR V_β5, le groupe de Degermann (1994) a rapporté une corrélation directe entre le niveau de sélection négative de lymphocytes T V_β5⁺ et le niveau d'expression de l'antigène I-E sur les cellules épithéliales médullaires, soit celles qui expriment le B7. DE plus, la molécule CD28 semble être nécessaire pour l'induction de l'apoptose lors de la sélection négative (Amsen et Kruisbeek, 1996). Par conséquent, l'interaction lympho-stromale entre la CEM, possédant la molécule co-stimulatrice B7, et le thymocyte, exprimant le ligand CD28/CTLA-4, joue un rôle dans la sélection négative.

Cilio et collaborateurs (1998) ont montré que le traitement de souris avec de l'anti-CD3 induit l'expression de la molécule CTLA-4 sur toutes les sous-populations de thymocytes. De plus, l'injection de souris, par voie intrathymique, d'un anti-CTLA-4 a inhibé l'apoptose de thymocytes DP normalement observé lors d'un traitement avec de l'anti-CD3. Cette même inhibition a été observée *in vitro*. Ainsi, la molécule CTLA-4 pourrait, elle aussi, jouer un rôle dans la sélection des thymocytes *in vivo*. Cependant, elle ne semble pas indispensable, car le développement des thymocytes chez les souris déficientes en CTLA-4 est normal (Chambers *et al.*, 1997, Waterhouse *et al.*, 1997).

Il a été démontré assez récemment que la surexpression de la molécule B7 chez des souris transgéniques provoque une diminution de l'expression du CD28 sur les thymocytes et sur les lymphocytes périphériques, ainsi qu'une diminution de cellules CD4⁺, et dans le thymus et dans la périphérie (Burns *et al.*, 1999). Les souris déficientes en B7 par contre, manifestent des changements réciproques: on voit donc une augmentation de l'expression du CD28, et un accroissement du ratio CD4/CD8 (Yu *et al.*, 2000). Ainsi la co-stimulation due à l'interaction B7-CD28 est impliquée aussi dans la régulation de l'homéostasie de lymphocytes T.

4.2.3 Les sélectines

Les sélectines représentent une troisième famille de molécules d'adhésion. Celles-ci sont primordiales pour le 'homing' des leucocytes naïfs vers les organes lymphoïdes. On retrouve trois membres dans cette famille de molécules, dont la L-sélectine (CD62L) exprimée par les leucocytes, et les P- (CD62P: originalement identifié comme étant la sélectine de plaquettes) et E-sélectines (CD62E), exprimées par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Gonzalez-Amaro et Sanchez-Madrid, 1999). Les trois membres de sélectines se différencient par le fait que leurs domaines extracellulaires agissent comme lectines, et peuvent ainsi former des liaisons avec différentes glycoprotéines ou sucres à la surface des cellules. Ainsi, les ligands pour la L-sélectine sont les addressines vasculaires. Les addressines CD34 et GlyCAM-1 se retrouvent sur les HEV (high endothelial venules) des ganglions (Baumhueter *et al.*, 1993, Baumhueter *et al.*, 1994, Kikuta et Rosen, 1994) tandis que l'addressine MadCAM-1 est exprimée sur les cellules endothéliales des tissus lymphoïdes de type muqueux (Sikorski *et al.*, 1993). Le ligand pour la P-sélectine est le PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) (CD162) (Asa *et al.*, 1995). Quant aux ligands pour la E-sélectine, sont constitués, entre autres, de ESL-1 (E-selectin ligand-1) (Steegmaier *et al.*, 1995) et de PSGL-1 (Asa *et al.*, 1995).

Dans le thymus, environ 80% des lymphocytes expriment l'antigène L-sélectine au sein des sous-populations matures et immatures (Iwabuchi *et al.*, 1991, Shortman *et al.*, 1987). Parmi les cellules immatures, environ 85% des précurseurs CD4^{lo} (TCR⁻CD8⁻) sont L-sélectine⁺. Wu et D'Amico (1994) ont démontré que l'injection intrathymique de ces précurseurs L-sélectine⁺ chez la souris a généré 5 fois plus de cellules progénitres (T, B, et cellules dendritiques) que les cellules L-sélectine⁻. Ainsi, parmi les thymocytes immatures, l'antigène L-sélectine semble être relié à une plus grande capacité à générer des cellules, probablement lors de contacts lympho-stromaux.

Dans le but de mettre en évidence l'importance de la L-sélectine dans le « homing » de lymphocytes naïfs, Lepault et collaborateurs (1994) ont procédé à une injection *in vivo* chez des souris de l'anticorps MEL-14, dirigé contre la L-sélectine. La diminution de l'expression de la L-sélectine a inhibé l'entrée des lymphocytes vers les

ganglions, de telle façon à les orienter plutôt vers la rate (et la moelle osseuse), où l'immigration se fait par une voie HEV-indépendante. En effet, cette redistribution a entraîné une augmentation de lymphocytes d'environ 200% dans les rates de souris traitées, comparé aux animaux témoins. Ainsi, le blocage *in vivo* de la L-sélectine a mené à une modification du patron normal de la circulation lymphocytaire. Chez les souris portant une ablation génétique au niveau du gène de la L-sélectine, un phénomène semblable s'est produit. Le manque d'expression de la L-sélectine empêche presque totalement (de 95-99%) l'attachement des lymphocytes aux HEV et entraîne donc une diminution de cellules de plus de 70% (Arbonés *et al.*, 1994). Ainsi, la L-sélectine joue un rôle crucial dans la régulation de la migration lymphocytaire. Ceci est surtout évident dans l'exemple suivant : Luettig et collaborateurs (2001) ont démontré que les émigrants thymiques récents ($CD4^+$) qui se retrouvent dans les tissus lymphoïdes de la périphérie, diminuent leur expression de la L-sélectine. On pourrait possiblement imaginer ceci comme étant un mécanisme de rétention, permettant l'interaction de ces cellules naïves avec les CPA présentes dans l'organe. Cependant, l'expression de cette molécule est ré-augmentée lorsque ces cellules re-circulent dans le sang (Luettig *et al.*, 2001).

4.3 Les protéines de la matrice extracellulaire : autres molécules impliquées dans les interactions lympho-stromales

Les interactions intrathymiques peuvent être exercées par des protéines de la matrice extracellulaire (PMEC) et leurs récepteurs respectifs. Parmi les PMEC, qui sont surtout produites par les cellules épithéliales du thymus, on retrouve, entre autres, la fibronectine (FN), la laminine (LN), et le collagène (Berrih *et al.*, 1985, Lannes-Vieira *et al.*, 1991). Plusieurs classes de molécules agissent comme ligands pour ces protéines, mais dans le thymus, ce sont surtout les intégrines qui combinent cette fonction. À titre d'exemple, le VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$), exprimé principalement par les thymocytes immatures (Sawada *et al.*, 1992, St-Pierre *et al.*, 1996), est un des récepteurs de la FN (Shimizu *et al.*, 1990).

L'équipe de Utsumi (1991) a démontré qu'environ 60-70% de thymocytes DN s'attachent de façon spécifique à des pétris sur lesquels la FN avait été adsorbée. Cet attachement, qui est induit par les molécules VLA-4 et VLA-5 (les récepteurs de la FN qui sont aussi présents sur les thymocytes DN), a été bloqué par des anticorps anti-FN et par un mélange de peptides spécifiques pour les sites de liaison de la VLA-4 et la VLA-5. De plus, l'adhésion de ces thymocytes à une lignée de cellules stromales exprimant la FN a aussi été inhibée par un mélange d'anticorps et de peptides mentionnés ci-haut. D'ailleurs, l'empêchement de cette adhésion a entraîné une inhibition de la différenciation des thymocytes. Ainsi, l'interaction entre les thymocytes et les cellules stromales via la FN pourrait jouer un rôle critique dans le développement des lymphocytes T.

Meco et collaborateurs (1994) ont rapporté que la coculture de thymocytes DP avec des cellules provenant d'une lignée de cellules stromales thymiques a augmenté la production de FN par ces dernières. De plus, cette production a induit la différenciation des thymocytes. Par contre, une baisse dans l'expression de la FN, induite par l'acide rétinoïque, sur les cellules stromales a inhibé ce processus. Ces données suggèrent donc que l'interaction entre les molécules FN et VLA-4 pourrait être importante lors de la différenciation des thymocytes.

VCAM-1 est une protéine appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Osborn *et al.*, 1989). Cette protéine, qui est exprimée, entre autres, sur les cellules épithéliales corticales du thymus (Salomon *et al.*, 1997) se lie à l'intégrine VLA-4, présente sur les thymocytes immatures (Salomon *et al.*, 1994). La FN, par contre, un autre ligand de la VLA-4, est surtout exprimée par des CEM (Salomon *et al.*, 1997). L'expression de la FN dans la médulla, ainsi que d'autres molécules dans le cortex qui provoquerait la 'dé-adhésion' des thymocytes en diminuant leur interaction avec le microenvironnement cortical, pourrait donc jouer un rôle dans la migration intrathymique de thymocytes, de sorte que les cellules qui ont subi la sélection positive dans le cortex seraient dirigées vers la médulla, le lieu où s'effectue la sélection négative (Salomon *et al.*, 1997, Villa-Verde *et al.*, 1999, Savino *et al.*, 2000).

Dans le but d'étudier le rôle des PMEC dans les interactions lympho-stromales, Villa-Verde et collaborateurs (1994) ont utilisé le complexe Nurse comme modèle. Ils ont démontré que les cellules Nurse produisent plusieurs PMEC, incluant la FN, la LN, et le collagène. De plus, leurs récepteurs sont exprimés par les constituants épithéliaux et lymphoïdes des complexes. En culture, les complexes Nurse relâchent les thymocytes (Andrews et Boyd, 1985). Lors d'un traitement avec des anticorps anti-PMEC ou anti-récepteurs, les auteurs ont observé une inhibition de ce relâchement. Le traitement de cellules épithéliales, provenant d'une culture de cellules Nurse, avec ces mêmes anticorps bloquants a interféré avec la reconstitution de complexes Nurse, lors d'une coculture avec des thymocytes. Ainsi, la migration des thymocytes vers les cellules Nurse et l'émigration vers le milieu semblent dépendre de l'interaction lympho-stromale induite par les PMEC et leurs récepteurs.

La laminine-5, une PMEC, est exprimée par des cellules épithéliales dans la région sous-capsulaire du thymus humain et murin (Virtanen *et al.*, 1996, Kim *et al.*, 2000). Chez l'humain, elle est aussi exprimée par des CEM (Vivinus-Nebot *et al.*, 1999). Un des récepteurs de la laminine-5 est l'intégrine $\alpha_6\beta_4$, exprimé par les thymocytes DN (Wadsworth *et al.*, 1992, Kim *et al.*, 2000). Kim et collaborateurs (2000) ont démontré que l'ajout d'un anticorps anti-laminine-5 à des FTOC inhibe (à environ 40%) le développement des thymocytes au stade DN. De plus, le marquage des thymocytes avec de l'annexine-V (une protéine qui s'attache à la phosphatidylsérine présente sur les membranes de cellules à un stade précoce de l'apoptose (Vermes *et al.*, 1995), a confirmé que ces thymocytes mouraient par apoptose. Ces données suggèrent que les interactions entre les thymocytes DN et la laminine-5 sont cruciales pour la survie de ces cellules.

Enfin, les interactions dépendantes des PMEC semblent être cruciales quant à la survie, à la différenciation et à la migration intrathymique des thymocytes.

5.0 LES FACTEURS SOLUBLES

5.1 Interactions entre les cellules stromales et les thymocytes : plus qu'un lien physique

Le développement et la régulation des thymocytes, ainsi que celui des cellules stromales, implique plusieurs interactions lympho-stromales. Ces interactions auraient comme but de fournir aux cellules des signaux intracellulaires, suite à un contact direct ou par la production de facteurs solubles. Ces derniers incluent les cytokines, les chimiokines, les facteurs de croissance, les hormones, ou autres, produits par le thymocyte ou la cellule stromale. Ces médiateurs solubles, impliqués dans le contrôle et le maintien de la physiologie du thymus, peuvent influencer les différents types de cellules à plusieurs niveaux. Seulement quelques exemples de facteurs solubles retrouvés dans le thymus seront exposés dans le but d'illustrer leur importance.

La cytokine LIF (Leukemia Inhibitory Factor) est impliquée dans l'embryogenèse et dans l'hématopoïèse (Hilton et Gough, 1991, Shen et Leder, 1992, Escary *et al.*, 1993). Produite, entre autres, dans le thymus (Le *et al.*, 1990, Fukada *et al.*, 1997, Sempowski *et al.*, 2000), ainsi que par des lignées de cellules épithéliales thymiques (Sakata *et al.*, 1992), la LIF semble ainsi jouer un rôle important dans la suppression de la thymopoïèse lors du vieillissement. En effet, le traitement de souris avec cette cytokine induit l'involution du thymus (Sempowski *et al.*, 2000). Le groupe de Shen et collaborateurs (1994) a produit des souris transgéniques qui surexpriment la LIF spécifiquement dans les lymphocytes T. La population de thymocytes DP est presque totalement absente chez ces souris. Par contre ces cellules immatures se retrouvent en grandes quantités dans les ganglions. Leur thymus démontrent aussi une désorganisation considérable des cellules épithéliales. Une greffe de moelle osseuse provenant de souris sauvages n'a pas permis de retrouver une distribution normale de thymocytes chez ces souris transgéniques. Ceci suggère ainsi que la perturbation sévère de l'épithélium thymique ait restreint les interactions lympho-stromales normalement nécessaires pour la maturation de thymocytes DP.

La conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine (PG) est catalysée par les cyclooxygénases (COX) (Hemler et Lands, 1976). Plusieurs études suggèrent que les PG soient indirectement impliquées dans le développement de thymocytes, car des récepteurs pour celles-ci, ainsi que des COX, ont été révélés dans le thymus (Ushikubi *et al.*, 1993, Appasamy *et al.*, 1991). De plus, des cellules stromales provenant du thymus sécrètent des PG (McCormack *et al.*, 1991, Pendino *et al.*, 1992). Utilisant des lignées de cellules épithéliales, Rocca et collaborateurs (1999) ont démontré que l'IFN- γ a induit une augmentation de l'expression de COX-2 qui est exprimée de façon constitutive par la lignée de CEM. Conséquemment, ceci a augmenté la production de PG, accroissant ainsi l'adhésion de thymocytes CD4 SP. Par contre, l'inhibition de COX-2 par un agent pharmacologique a empêché cette adhésion. Ces données suggèrent donc que les interactions entre des thymocytes et des cellules épithéliales peuvent être influencées par la production de PG. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que des souris transgéniques sur-exprimant l'IFN- γ démontrent une augmentation dans le nombre de thymocytes SP dans leurs thymus, et une réduction d'environ 50% dans le nombre de lymphocytes dans la rate (Young *et al.*, 1997). Ainsi, un dérèglement de la production d'un lymphokine, tel que l'IFN- γ , pourrait modifier les interactions lympho-épithéliales thymiques de sorte à ce que le développement des thymocytes soit altéré.

Plusieurs chimiokines sont exprimées de façon constitutive dans le thymus, telle que la TECK/CCL25 (thymus-expressed chemokine), et la MDC/CCL22 (macrophage-derived chemokine), ainsi que leurs récepteurs (Pour une revue plus complète, voir Zlotnik *et al.*, 1999, Campbell et Butcher, 2000). Puisque les chimiokines sont impliquées dans le contrôle de la migration des leucocytes par l'induction de chimiotactisme (Murphy, 1994, Cyster, 1999), leur présence dans le thymus suggère leur implication dans la migration intrathymique de thymocytes.

Norment et collaborateurs (2000) ont démontré que l'expression du récepteur CCR9, le ligand de TECK/CCL25, est augmentée lors du développement de thymocytes DN en DP. De plus, puisque le TECK/CCL25 est produit par des cellules dendritiques thymiques (Vicari *et al.*, 1997), les auteurs suggèrent que l'augmentation de l'expression

de CCR9, suite au réarrangement des gènes du TCR, puisse être un mécanisme fondamental pour la migration cortico-médullaire. En effet ces mêmes auteurs ont démontré que TECK/CCL25 était chimiotactique pour les thymocytes. Cependant, la capacité chimiotactique de TECK semble être inversement corrélée à l'expression de la molécule L-sélectine sur les thymocytes (Campbell *et al.*, 1999). Puisque la plupart des émigrants thymiques récents sont L-sélectine^{high}, et les thymocytes médullaires exprimant cette molécule sont considérés comme étant parmi les cellules les plus matures (Gabor *et al.*, 1997), le TECK influence peu les lymphocytes thymiques matures en voie de sortie (Campbell *et al.*, 1999). En outre, l'expression de TECK/CCL25 par des cellules épithéliales de thymus fœtal (Wilkinson *et al.*, 1999) indique que cette chimiokine pourrait aussi être associée au recrutement de précurseurs hématopoïétiques.

La MDC est une chimiokine exprimée par des CEM du thymus humain (Chantry *et al.*, 1999, Annunziato *et al.*, 2000). Il a été montré que la MDC était chimiotactique surtout pour les thymocytes CD3⁺/CD4⁺/CD8^{lo}, et que le récepteur pour cette chimiokine était le CCR4 (Imai *et al.*, 1998). Il est ainsi suggéré que la MDC attire les thymocytes du cortex vers la médulla. Cette chimiokine est alors fort probablement impliquée dans la migration intrathymique des thymocytes.

À de fortes concentrations, les hormones glucocorticoïdes peuvent induire l'apoptose de thymocytes immatures. Par contre, à de faibles concentrations, ces hormones peuvent contrebalancer des signaux provoquant l'élimination de thymocytes, et ainsi permettre leur survie. Vacchio et collaborateurs (1998) signalent dans leur revue que la diminution de l'expression de récepteurs de glucocorticoïdes dans les thymocytes de souris transgéniques mène à une différenciation thymocytaire anormale. Tout récemment, Lechner et collaborateurs (2000) ont démontré que le thymus murin détenait tous les enzymes et cofacteurs nécessaires pour la production de glucocorticoïdes. De plus, les cellules responsables de cette production sont les cellules épithéliales corticales et médullaires. Ainsi, plusieurs données suggèrent que les glucocorticoïdes soient nécessaires à la différenciation et à la survie de thymocytes (Pour des revues complètes voir : Ashwell *et al.*, 2000^a, Vacchio et Ashwell, 2000, Ashwell *et al.*, 2000^b).

Parmi les hormones thymiques on retrouve, entre autres, la thymopoiétine, la thymuline et la thymosine alpha 1. Ces hormones sont produites par les cellules épithéliales du thymus (Kurz *et al.*, 1996, Savino *et al.*, 1984, Fabien *et al.*, 1988), et la plupart d'entre elles sont impliquées dans l'induction de l'activité enzymatique de la transférase désoxynucléotidyl terminale (TdT) (Pazmino *et al.*, 1978. Low *et al.*, 1979, Gelabert *et al.*, 1982), l'enzyme responsable de l'ajout de nucléotides à la jonction des régions V et J des chaînes α et β du TCR. Ceci est un mécanisme impliqué dans la génération de diversité du TCR (Komori *et al.*, 1993). Ainsi, ces hormones agissent de façon importante sur les thymocytes immatures.

5.2 L'IL-7 : Une cytokine indispensable au développement de lymphocytes T

Parmi l'ensemble de cytokines potentiellement impliquées dans le développement de lymphocytes T, seule l'IL-7, produite par des cellules épithéliales du cortex (Moore *et al.*, 1993), semble non-redondante et essentielle (von Freeden-Jeffry *et al.*, 1995). Le récepteur de l'IL-7 est un complexe composé d'une chaîne α et d'une chaîne γ ('gamma-common chain'), cette dernière sous-unité étant commune à d'autres récepteurs de cytokines, telles que l'IL-2, -4, -9 et -15 (Di Santo *et al.*, 1995). Les exemples suivants signalent l'importance de l'IL-7 dans le développement des thymocytes.

L'abrogation, chez la souris, de l'expression de l'IL-7 ou de l'un des composants de son récepteur, a défini son importance *in vivo*. Moore et collaborateurs (1996) ont démontré que les souris portant une ablation génétique au niveau du gène de l'IL-7 présentent des perturbations lors de la différenciation des cellules B et T aux stades de pro-B et pro-T, respectivement. Mais il est à noter que passé ce stade crucial dans les cellules T, l'IL-7 ne semble plus indispensable, car la maturation, au moins pour ce qui est des lymphocytes T $\alpha\beta^+$, continue même en son absence. Cependant, le développement des lymphocytes T $\gamma\delta^+$ thymiques et extra-thymiques, chez ces mêmes souris, est inhibé (Maki *et al.*, 1996, Moore *et al.*, 1996, Laky *et al.*, 1998). Il s'avère que la signalisation via le récepteur de l'IL-7 est primordiale pour le réarrangement de la chaîne γ du TCR

(Candeias *et al.*, 1997), ainsi que pour l'expression des gènes γ du TCR (Kang *et al.*, 1999).

La signalisation via le récepteur de l'IL-7 semble aussi jouer un rôle important dans la prolifération des lymphocytes T. Effectivement, dans un travail publié par l'équipe de von Freeden-Jeffrey et collaborateurs (1997), les auteurs ont démontré que la capacité de thymocytes immatures à entrer en cycle cellulaire était inhibée chez les souris déficientes en IL-7. Surtout chez les souris néonatales, l'IL-7 est aussi critique pour la prolifération de thymocytes plus matures, c'est-à-dire, ceux ayant déjà subi la sélection positive (Hare *et al.*, 2000). En plus de promouvoir la prolifération cellulaire, la signalisation via le récepteur de l'IL-7 semble aussi jouer un rôle important dans la survie du thymocyte. Par ce fait, il a été démontré que l'expression de la protéine anti-apoptotique, *bcl-2*, par des thymocytes CD44⁺CD25⁺ provenant de souris déficientes en l'IL-7, était considérablement réduite. Cependant, un ajout d'IL-7 exogène dans les cultures a induit une augmentation considérable de l'expression de la protéine *bcl-2*, et ainsi de la survie des cellules (von Freeden-Jeffrey *et al.*, 1997). En effet, l'expression du transgène *bcl-2* chez les souris déficientes en récepteur de l'IL-7 rétablit considérablement la thymopoïèse (Akashi *et al.*, 1997). En somme, une déficience dans la signalisation via le récepteur de l'IL-7, soit suite à une carence de la cytokine même, soit suite à une ablation d'une des deux sous-unités du récepteur perturbe la différenciation des thymocytes.

6.0 MODÈLES *IN VITRO* D'INTERACTION LYMPHO-STROMALE

Plusieurs rôles ont été proposés pour les cellules épithéliales du thymus lors de « l'éducation thymique ». Leur production de diverses hormones thymiques, ainsi que celle de cytokines, semblent être nécessaires à la croissance et à la différenciation de thymocytes (Voir section 5.2). De même, ces cellules s'avèrent indispensables pour la présentation d'antigènes (Kasai *et al.*, 1996). Toutefois, la tâche de caractériser la participation des cellules épithéliales dans le développement de lymphocytes T a été compliquée par le fait que ce type de cellule thymique démontre une grande

hétérogénéité. Ainsi la culture de cellules épithéliales (parmi ces cellules épithéliales on retrouve aussi des structures appelées des complexes Nurse et des rosettes) fut l'approche privilégiée par plusieurs chercheurs dans le but de mieux caractériser le(s) rôle(s) des diverses composantes de ces cellules dans l'éducation thymique. Il est à noter que plusieurs lignées de cellules épithéliales ont été développées dans différents laboratoires, mais seules les propriétés de la E-5, une lignée établie dans notre laboratoire, seront brièvement exposées. En plus des lignées cellulaires, d'autres systèmes expérimentaux ont été élaborés pour étudier le développement des thymocytes. Ceux-ci avaient comme but de garder intacte l'architecture tridimensionnelle du thymus, afin de permettre les interactions lympho-stromales normalement présentes *in vivo*. Le système des FTOC sera donc décrit, ainsi que plusieurs variations de ce même concept.

6.1 La lignée de cellules épithéliales médullaires E-5

Dans le but d'élucider le phénomène des complexes lympho-stromaux, une lignée de cellules épithéliales médullaires a été développée et caractérisée dans notre laboratoire. Provenant d'une culture primaire de cellules stromales thymiques de souris C57BL/6J, les cellules ont été transformées à l'aide d'un cancérigène chimique, le MNNG, et subséquemment clonées (Potworowski *et al.*, 1986). Mise à l'épreuve pour l'expression de cytokératine, de l'antigène Ia, ainsi que de la glycoprotéine TMF (Thymic Microenvironmental Factor) (Potworowski et Pyke, 1985), cette nouvelle lignée cellulaire E-5 s'est avérée conforme à l'épithélium thymique médullaire.

Notre laboratoire a fait plusieurs observations démontrant l'importance des interactions lympho-stromales, lors de co-cultures de thymocytes avec les cellules E-5. Il a été démontré que les thymocytes adhèrent de façon spécifique aux CEM E-5, via, entre autres, la glycoprotéine TMF, et que cette adhésion pouvait être bloquée avec des anticorps anti-TMF (Potworowski *et al.*, 1986). Hugo et collaborateurs (1990) ont montré que la plupart des thymocytes qui adhèrent aux E-5 ont un phénotype de cellules immatures corticales DP. Cette adhésion spécifique semble dépendante du stade de différenciation des thymocytes car les DN ne démontrent aucun potentiel adhésif, et les

SP, très peu. Il a aussi été démontré qu'une des molécules impliquée dans l'attachement des thymocytes aux cellules E-5 est une glycoprotéine de 16 kDa, qui interagit avec un complexe d'adhésion présent sur les E-5, le gp23/45/90 (Amarante-Mendes *et al.*, 1993). La formation de complexes thymocytes/E-5 mène à l'activation de ces dernières, comme le démontre la phosphorylation de la gp90 (Potworowski *et al.*, 1994), induite sans doute par l'une des protéines tyrosines kinases identifiées par Hébert et coll. (1994). De plus, l'adhésion entre les deux types cellulaires entraîne une augmentation de l'expression de la gp23 (Potworowski *et al.*, 1994).

6.2 Culture de thymus fœtal (FTOC)

La culture de thymus fœtal est un système expérimental qui permet une étude *in vitro* contrôlée des processus cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement de lymphocytes T (Hare *et al.*, 1999). Ce modèle implique l'excision du thymus murin rudimentaire provenant d'un fœtus de 13 à 15 jours de gestation. À ce stade de développement, les cellules souches immatures, provenant de tissus hématopoïétiques, ont déjà colonisé le thymus. Ces précurseurs peuvent subséquemment se différencier en thymocytes, en cellules dendritiques et en macrophages. Une éponge de gélatine est imbibée dans du milieu de culture et un filtre de polycarbonate, sur lequel on dépose le thymus rudimentaire, repose sur l'éponge, permettant à la fois de garder l'architecture tridimensionnelle de l'organe et de fournir tous les nutriments essentiels à sa croissance. L'aspect tridimensionnel de ce système est d'une importance cruciale puisque ceci permet que les interactions lymphostromales existant normalement *in vivo*, soient présentes aussi *in vitro*, contribuant ainsi au développement normal de thymocytes. Ce n'est donc pas surprenant, que la culture de thymus fœtal s'avère être le seul système *in vitro* capable de supporter toute la gamme d'activités impliquées dans le développement et la différenciation de lymphocytes T, soit la prolifération, les réarrangements du TCR et les sélections positive et négative.

Grâce à la facilité avec laquelle on peut manipuler le système de culture de thymus fœtaux, les effets de plusieurs traitements sur le développement des thymocytes ont été rapportés dans la littérature. Quelques exemples seront exposés.

Afin d'identifier l'importance de divers facteurs de croissance (tel que les cytokines) impliqués dans la signalisation pendant le développement des thymocytes, l'ajout de cytokines recombinantes, d'anticorps contre les récepteurs pour les cytokines ou bien d'anticorps neutralisants a été exploité. En utilisant cette approche, on a démontré que l'ajout de faibles concentrations d'IL-15 à des FTOC entraîne une augmentation de toutes les sous-populations de cellules T, surtout les cellules $\gamma\delta^+$. Par ailleurs, l'ajout de fortes concentrations de cette même cytokine bloque le développement de cellules T $\alpha\beta^+$ et favorise plutôt le développement des cellules NK (Leclercq *et al.*, 1996). Il est intéressant de noter que les cellules NK sont absentes chez les souris déficientes en IL-15 (Kennedy *et al.*, 2000). Ainsi, la différenciation des précurseurs T/NK bi-potentiels vers l'une ou l'autre lignée est dépendante, entre autres, des cytokines produites par le microenvironnement thymique (Leclercq *et al.*, 1996).

Dans le but de démontrer le rôle des peptides dans la sélection du répertoire de lymphocytes T, Sebzda et collaborateurs (1994) ont ajouté un peptide viral aux cultures de thymus fœtaux, dont les thymocytes exprimaient un TCR transgénique spécifique pour ce peptide. Ainsi, il a été montré que de faibles concentrations du peptide aboutissent à la sélection positive, tandis que de fortes concentrations conduisent à la sélection négative. L'affinité/l'avidité des TCR pour un antigène influence donc le sort d'un thymocyte.

6.3 Des variations du même thème

En vue d'étudier le développement des précurseurs de lymphocytes T ou bien d'une sous-population donnée, dans le même système de FTOC décrit précédemment, des lobes de thymus fœtal peuvent être vidés de leur contenu lymphoïde par un traitement à la désoxyguanosine. Ces lobes peuvent maintenant être reconstitués avec une ou des population(s) lymphoïde(s), prédéterminée(s) soit par une sélection (positive ou négative)

utilisant des billes magnétiques enrobées d'un anticorps donné, ou bien par l'utilisation d'un trieur cellulaire. Les cellules lymphoïdes choisies pour l'étude sont introduites dans les lobes soit par microinjection, soit par 'goutte suspendue'. La technique de la 'goutte suspendue' est constituée d'une co-culture, dans un plateau de Terasaki inversé, de lobes traités à la désoxyguanosine avec les cellules lymphoïdes. L'inversion du plateau force la co-culture vers le fond de la goutte, créant ainsi un environnement tridimensionnel dans lequel tout contact se fait uniquement entre cellules. Après quelques heures de co-culture, les lobes se reforment et peuvent ainsi être transférés en culture habituelle (Watanabe *et al.*, 1989, Hare *et al.*, 1999).

Une adaptation du système des FTOC est la technique des RTOC (« reaggregate thymic organ culture »), développée par Mandel et Kennedy (1978). Celle-ci consiste en un pré-traitement des lobes thymiques fœtaux à la désoxyguanosine, suivi d'une désagrégation du tissu par trypsinisation. Les cellules stromales choisies pour l'étude sont ensuite purifiées par sélection positive ou négative, en utilisant des billes magnétiques conjuguées avec des anticorps spécifiques. Des thymocytes (totaux ou choisis parmi une sous-population) sont mélangés avec les cellules stromales, centrifugés pour former un culot, et ce culot est mis en culture. Après quelques heures de culture, on obtient la reformation du lobe (Hare *et al.*, 1999). Utilisant des RTOC, Hare et collaborateurs (2001) ont démontré que la nécessité des cellules épithéliales corticales du thymus pour la sélection positive des thymocytes ne réside pas simplement dans le fait qu'elles fournissent des complexes CMH-peptides, mais aussi qu'elles présentent des molécules accessoires essentielles à ce processus. En effet, l'ajout de cellules CMH⁺ provenant de la moelle osseuse, dans des RTOC dérivant de cellules épithéliales déficientes en molécules du CMH classe I et classe II, n'induit aucune sélection de thymocytes DP (Ernst *et al.*, 1996). Ainsi, avec les RTOC, non seulement peut-on étudier le développement d'une cellule lymphoïde donnée, mais on peut également sélectionner une population de cellules stromales définie, et examiner son effet sur le développement des thymocytes.

7.0 LES CELLULES ÉPITHÉLIALES ET LES THYMOCYTES : « JAMAIS LES UNES SANS LES AUTRES ! »

Les interactions lympho-stromales dans le thymus sont bidirectionnelles ; les cellules stromales sont étroitement impliquées dans le développement des thymocytes et inversement, les thymocytes influencent le développement des cellules stromales. Les exemples suivants tenteront de montrer cette interdépendance cruciale entre les deux populations cellulaires.

Les souris SCID se démarquent par leur incapacité de réarrangement des gènes des récepteurs d'antigènes pour les cellules B et T (Schuler *et al.*, 1986). Ainsi, la lymphopoïèse en général est déficiente (Bosma *et al.*, 1983). Lorsqu'on examine l'histologie du thymus SCID, on s'aperçoit que les cellules épithéliales du cortex semblent intactes, tandis que celles de la médulla sont peu nombreuses et dispersées à travers l'organe. Cependant, l'injection chez ces souris de cellules de moelle osseuse, induit une maturation et une organisation des cellules épithéliales médullaires (Shores *et al.*, 1991). En effet, Surh et collaborateurs (1992) ont démontré que l'injection intraveineuse de lymphocytes T matures, soit TCR⁺, à des souris SCID, génère un thymus composé uniquement de thymocytes matures s'accumulant exclusivement dans la région médullaire. De plus, il y a eu régénération des CEM. Ainsi, la présence de cellules TCR⁺ semble être essentielle au développement d'une médulla intacte. Ce même phénomène est observé pendant l'embryogenèse ; ici on voit que la formation d'un compartiment médullaire thymique coïncide avec l'apparition de lymphocytes T matures (Boyd *et al.*, 1993). Les mécanismes à l'origine de ce phénomène ne sont pas clairs, mais à part le besoin potentiel d'un contact direct, il est fort probable que l'interaction entre les deux types cellulaires induit la production de cytokines nécessaires pour le développement d'une médulla thymique intacte.

Meilin et collègues (1995) ont démontré que la co-culture de cellules épithéliales thymiques avec des thymocytes a induit une augmentation de la production d'IL-6 par les cellules épithéliales. Cette hausse dans la production de cytokine était dépendante d'un

contact direct entre les deux types cellulaires, car des anticorps dirigés contre soit le CD2, soit le LFA-1 l'ont supprimée. Cependant, le TGF- β produit par les thymocytes a inhibé la prolifération des cellules épithéliales. Il est donc évident que les fonctions et/ou développement des cellules stromales et des thymocytes sont dépendants du dialogue qui existe entre ces deux types cellulaires.

Le facteur de transcription RelB, une sous-unité du complexe NF- κ B, est nécessaire pour le développement de cellules dendritiques thymiques ainsi que de CEM UEA-I⁺ (Burkly *et al.*, 1995). Le thymus de souris déficientes en RelB est dépourvu d'une région médullaire, et ces souris manifestent une absence de sélection négative (Laufer *et al.*, 1996). Donc, le manque de ces CEM influence le développement des thymocytes. Cependant, il a été démontré que cette absence influence aussi l'organisation des CEM UEA-I⁺, car ces cellules sont dispersées à travers le thymus ; les régions corticales et médullaires ne sont pas délimitées. De plus, les cellules épithéliales corticales CDR1⁺ semblent aussi affectées (Naspetti *et al.*, 1997). Ainsi, on observe que l'interaction nécessaire entre les cellules lymphoïdes et les cellules stromales semble aussi être cruciale pour les différentes sous-population de cellules stromales.

Le développement des thymocytes de souris immunodéficientes tge26 est bloqué au stade caractérisé par le phénotype DN CD44⁺CD25⁻ (PLT; Voir la section 1.4.1) (Wang *et al.*, 1994). Leur thymus contient un très faible nombre de lymphocytes (environ 1×10^6) et les cellules épithéliales sont désorganisées, de sorte que les régions corticales et médullaires ne sont pas délimitées (Hollander *et al.*, 1995). Comparé aux souris tge26, le développement des thymocytes de souris déficientes en gène *rag-2* (RAG-2^{null}) est bloqué à un stade postérieur, défini, cette fois-ci, par le phénotype DN CD44⁺CD25⁺ (pré-T précoces; Voir la section 1.4.3) (Shinkai *et al.*, 1992). De plus, on retrouve chez ces thymus un plus grand nombre de lymphocytes ($3-5 \times 10^6$), ainsi qu'une région corticale bien développée, bien que la région médullaire est absente (van Ewijk *et al.*, 2000). van Ewijk et collaborateurs (2000) ont démontré que si l'on injectait des cellules provenant de la moelle osseuse de souris RAG^{null} à des souris tge26, on verrait, chez ces nouvelles souris "chimères", une augmentation du nombre de thymocytes, leur différenciation en

cellules DN CD44⁻CD25⁺, ainsi qu'une architecture thymique semblable à celle des souris RAG^{null}. Si l'on injectait maintenant des cellules provenant de la moelle osseuse de souris sauvages aux souris "chimères", on verrait un rétablissement complet du développement des thymocytes, une augmentation dramatique de ces mêmes cellules (environ 100 x 10⁶), ainsi qu'une organisation des régions corticales et médullaires. De toute évidence alors les thymocytes agissent en concert avec le microenvironnement thymique. La différenciation des cellules DN CD44⁻CD25⁺ à des cellules DN CD44⁻CD25⁺, semble donc être critique pour le développement du microenvironnement cortical. Ce cortex organisé permet la progression de la thymopoïèse, qui aboutit en le développement de thymocytes DP exprimant le TCR. Ces derniers peuvent maintenant transmettre des signaux pour le développement et l'organisation de la région médullaire, qui à son tour mène à la maturation des thymocytes SP.

L'HYPOTHÈSE, LA QUESTION, ET LES OBJECTIFS

L'hypothèse de départ de ce projet de doctorat était la suivante:

- ❖ Les CEM du thymus sont impliquées dans l'émigration des thymocytes.

Puisque l'on sait que les cellules stromales thymiques sont impliquées dans la différenciation des thymocytes, nous nous sommes posés la question suivante:

- ❖ Comment les CEM influencent-elles le processus de différenciation des lymphocytes T?

Les principaux objectifs dans le but de vérifier notre hypothèse et de répondre à notre question étaient de :

1. Développer une technique de marquage de thymocytes *in vivo*, dans le but de permettre l'étude, à long terme, de l'émigration de ces cellules dans les organes lymphoïdes de la périphérie.
2. Développer une stratégie par laquelle on pouvait établir quelles activités thymocytaires résultent de leur contact avec les CEM *in vivo*, l'interférence avec ces contacts devant se faire tout en conservant intacte l'architecture thymique.
3. Utiliser l'approche d'interférence de contacts CEM-thymocytes dans des FTOC dans le but d'étudier la différenciation thymique.

CHAPITRE 2

**DÉVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE DE MARQUAGE DE
THYMOCYTES *IN VIVO* DANS LE BUT D'ÉTUDIER, À LONG
TERME, L'ÉMIGRATION THYMOCYTAIRE**

RÉSUMÉ ARTICLE I

Le destin des immigrants thymiques a été, à date, étudié à l'aide d'une multitude de marqueurs, chacun ayant des limites intrinsèques quant à sa stabilité, sa toxicité ou bien à sa sélectivité. Nous décrivons ici, une nouvelle technique qui se base sur l'injection *in vivo* de CFSE, un colorant vital estérifié, jusqu'ici utilisé, à une concentration 80 fois moindre, pour marquer des cellules *in vitro*. Nous démontrons que le CFSE marque un échantillon représentatif de toutes les sous-populations thymocytaires, et que celles-ci migrent aux organes lymphoïdes de la périphérie, à un taux approximatif de 2 à 3 x 10⁶ cellules/jour. Nous démontrons qu'elles entrent dans les ganglions 1 jour post-injection et y demeurent pour au moins 21 jours, alors que le renouvellement dans la rate est plus rapide. De plus, nous démontrons par immunohistochimie, utilisant des anticorps anti-FITC conjugués à la peroxydase, que les émigrants thymiques marqués au CFSE sont restreints aux zones T-dépendantes des organes lymphoïdes périphériques.

ARTICLE I

THE FATE OF THYMOCYTES LABELED IN VIVO WITH CFSE

Monica Graziano, Yves St-Pierre, Claire Beauchemin, Marcel Desrosiers and Edouard F. Potworowski

Centre de Recherche en Immunologie, Institut Armand-Frappier, Laval, Qc, Canada

Running title: The fate of thymocytes labeled in vivo with CFSE

Correspondence: Dr. E.F. Potworowski, Centre de Recherche en Immunologie, Institut Armand Frappier, P.O. Box 100, Laval, Qc, Canada,

H7N 4Z3

Fax: (514) 686-5501

Telephone: (514) 686-5370

e-mail: edouard_potworowski@iaf.quebec.ca

Experimental Cell Research **240**, 75-85 (1998)

SUMMARY

The fate of thymic emigrants had so far been studied using a variety of markers, each of which had inherent limitations as to stability, toxicity or selectivity. We describe a new technique which relies on the *in vivo* injection of CFSE, an esterified vital dye hitherto used at 80 times lower concentrations for *in vitro* cell labeling. We show that CFSE labels a representative sample of all thymocyte subsets, that these migrate at a rate of approximately $2-3 \times 10^6$ cells/day to peripheral lymphoid organs. We show that they enter lymph nodes at day 1 post injection and stay for at least 21 days, whereas the turnover in the spleen is more rapid. We also show by immunohistochemistry, using peroxidase-labeled anti-FITC antibodies, that CFSE-labeled thymic emigrants are confined to T-dependent areas of peripheral lymphoid organs.

INTRODUCTION

Cell migration studies using various markers, have led to fundamental insights into such fields as the development of tissues and organs, metastatic processes and the physiology of the immune system. In the context of the present work, these studies can be roughly divided into two large categories. The first consists of introducing into a living organism, cells recognizable by their karyotype [1], their staining properties [2], their phenotype [3] or by a marker introduced into their plasma membrane, or into the cell. The latter include fluorescent stains such as PKH-26 [4], viral antigens [5], or a radioactive isotope [6, 7, 8].

The second category consists of introducing a label directly into the organism, where cell labeling occurs. Both categories serve specific purposes. The introduction of recognizable cells into an organism allows the proper pre-identification of the inoculated cells. In the case of cells from a congenic strain, and cells from a species, strain or karyotype, different from that of the recipient, even long-term progeny of the introduced cells will be readily identified, barring rejection. In the case of direct label injection, the staining may not be as accurate, may be restricted to dividing cells (as in the case of BrdU) or may include all cells in the vicinity. This approach is preferable when minimal disturbance of the microenvironment and of inter-cellular interactions is of essence. Fluorescein isothiocyanate (FITC), has been used extensively to follow thymocyte emigration and characterize, by flow cytometry, the phenotype of early emigrants [9]. While FITC labels randomly 20-50% of thymocytes, the labeling is not stable, and the cells have been followed with any degree of accuracy usually for up to six hours and at the most for 16-48 hours [9, 10, 11]. One aspect which must be carefully controlled with molecules attaching to

plasma membranes is their possible interference with cell surface receptors. In the case of FITC though, this was shown not to be a problem, but this same group also reported that FITC has a potent costimulatory effect on lymphocyte proliferation responses to mitogens, suggesting that it may activate normally resting lymphocytes [12].

For migration studies of thymocytes, a suitable marker would therefore be one which 1) could be injected intra-thymically and stain cells spontaneously, 2) would not interfere with plasma cell receptors, 3) would not cause cell death or interfere with cellular metabolism and 4) would not detach from, or leave the cell prematurely.

In examining existing stains, it appears that those that bind to cells spontaneously, such as FITC, detach from the cells just as spontaneously. Those that attach more firmly, such as PKH-26 [13] necessitate *in vitro* labeling, using a toxic solvent which must be rapidly removed (Sigma Immunochemicals data sheet; [12]), and are therefore unsuitable for *in vivo* injection. Esterified dyes, which include fluorescein diacetate [14, 15] and its derivatives, such as CFDA [16], CFDA-AM [17], and calcein-AM [17, 18], combine the suitability for flow cytometry analysis of FITC and the stability of PKH-26. On their own, these molecules are non-fluorescent, but become so after hydrolysis by esterases within the cytoplasm of living cells which have incorporated them; these molecules are retained by cells for 1-3 days [17], thus allowing the tracing of migrating cells for a period of at least three times that of FITC. In spite of the fact that no particular pre-treatment of cells for labeling is required, these dyes have been applied exclusively *in vitro*. They have been useful to assess the adherence of human leukocytes to endothelial cells [19], the adherence of thymocytes to thymic epithelial cells [15], and to

determine how the migration of fluorochrome-labeled cells can be quantitated by flow cytometry [17]. CFSE is also an esterified vital dye, which, by virtue of its succinimidyl ester group, binds covalently to lysine residues of intracellular proteins [17, 19]. It too has been used to measure the adherence of human leukocytes to endothelial cells, as well as lymphocyte migration [11]. Like other esterified dyes, it has only been used for pre-labeling cells *in vitro*. One of its characteristics is that there is a rapid loss of 80-90% of fluorescence intensity within the first 15 hours, with the remaining cells keeping their label for a considerable time. In fact, CFSE-labeled peripheral lymphocytes were detected in the murine spleen for up to eight weeks post-injection [17]. This dye, emitting at a wavelength of 518 nm, is suitable for flow cytometry after extended periods, in combination with antibodies labeled with fluorochromes emitting at other wavelengths.

In the present study, we show that CFSE injected intrathymically can reliably be used to provide important new information concerning the long term fate of labeled thymic emigrants in the peripheral lymphoid tissues. This reagent, at 80 times the concentration used for *in vitro* labeling, is non-toxic and labels randomly approximately 15% of thymocytes 24 hours after injection. We show that medullary thymocytes leave the thymus at the rate of approximately $2-3 \times 10^6$ cells per day. Evidence is also presented that the turnover rate of labeled thymic emigrants in the lymph nodes is in the order of 21 days, while in the spleen, the CD4⁺ lymphocytes have a turnover rate of 9 days and the CD8⁺ lymphocytes of 5 days.

MATERIALS AND METHODS

Animals

C57Bl/6 mice, aged 5-8 weeks, were used in all experiments. Mice were housed in the Institute's specific pathogen-free animal facility, and cared for in compliance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

Fluorescent dye

The dye used in the present work, 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE), was purchased from Molecular Probes, Eugene, ORE, USA. A stock solution (25 mM in DMSO) of the dye was stored at -20°C and diluted in PBS prior to injection.

In vivo labeling of thymocytes

Mice were anesthetized with i.p. ketamine/xylazine ([10 mg/ml / 1 mg/ml]; 0.1 ml/10 g. body weight). A mediastinal incision was made to expose the thymus. CFSE (10 μM) was then injected into each thymic lobe using a 30-gauge needle, after which, the skin overlying the chest wall was closed with surgical clips. This procedure consistently labeled over 95% of thymocytes, 2 hours post-injection. Control mice received the same volumes of PBS with DMSO at the appropriate dilution.

Lymphocyte Preparation

At various times post-injection, (2 hours to 21 days) mice were killed by CO₂ inhalation and the thymus, spleen and axillary and inguinal lymph nodes were removed and placed into mouse tonicity PBS (MT-PBS) on ice, containing 1% fetal calf serum (FCS). Cell suspensions were prepared by gently mincing the organs. Erythrocytes were removed from the spleen cell suspensions by osmotic shock; the cells were washed twice with cold MT-PBS, and viability was determined by trypan blue exclusion.

Detection of CFSE-labeled lymphocytes

CFSE-labeled lymphocytes found in the spleen and lymph nodes were detected using a Coulter XL flow cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Erythrocytes and dead cells were excluded by forward and side scatter analysis, and by propidium iodide labeling. Thymic emigrants were further characterized using the following antibodies: PE-conjugated anti-CD4 (H129.19) and anti-CD8 (53-6.7) were purchased from GIBCO BRL and Boehringer Mannheim, respectively. The biotin-conjugated anti-CD3 (145-2C11) mAb was purchased from Pharmingen. A streptavidin-conjugated tandem, RED-670 (GIBCO BRL) was used to reveal the anti-CD3. Thymic cell suspensions were stained with a biotinylated anti-CD3 mAb. Lymphocytes from both spleen and lymph nodes were stained with either PE-conjugated anti-CD4 or anti-CD8 and with a biotinylated anti-CD3 mAb for two-color analysis. Appropriate gates based on individual controls, defining the CFSE-labeled cells, were used to determine the percentage of immigrant T lymphocytes, for each phenotypic subset.

Immunohistochemistry

Frozen thymus and lymph node sections (5 μm) were air-dried, briefly fixed in acetone at room temperature, and allowed to react in a humid chamber with a peroxidase-conjugated anti-FITC mAb (DAKO AS, Copenhagen), for 30 min, rinsed in PBS-Tween (0.05% Tween 20). The reaction was revealed by a 15 min. incubation with the substrate (AEC ; an amino carbazole substrate kit from Zymed). The preparations were then mounted in buffered glycerol and sealed.

Statistical analyses

Data are presented as means \pm SD. Student's *t* test was used to test for statistical significance.

RESULTS

Establishment of optimal conditions for in situ labeling of thymocytes

Direct injection of CFSE into the thymus at the concentration used for *in vitro* labeling (5 μM), did not result in any detectable staining of thymocytes (not shown). A range of concentrations (25 μM to 400 μM) was therefore tested to attain maximal staining. The percentage of labeled cells increased in a linear fashion (Fig.1a), reaching a plateau at 200 μM (>99% labeled cells). With increasing CFSE concentrations, an increase in the mean fluorescence intensity of labeled thymocytes was also observed (Fig. 1b).

The concentration of CFSE ultimately used for *in situ* labeling (400 μM), was 80-fold greater than that used *in vitro*. The question therefore arose as to the possible toxicity of this product when injected *in vivo*. We thus assessed total thymocyte counts and viabilities at 2 and 24 hours post-I.T. injection of CFSE or PBS (Table 1), using propidium iodide as a marker of dead cells. The analysis was carried out by flow cytometry on non-gated, total events. Two hours after injection, the total number of thymocytes between groups was not significantly different ($p > 0.05$). At that time, the numbers of viable thymocytes of CFSE- and PBS-injected thymuses were 245.2 and 221.0×10^6 respectively, with no significant difference ($p > 0.05$). Likewise, at 24 hours post-I.T. injection, no significant difference ($p > 0.05$) was observed either for total or for viable cell counts between control and CFSE-injected mice (186.6 ± 9.3 vs $206.0 \pm 15.2 \times 10^6$ and 175.0 ± 5.2 vs $193.1 \pm 14.2 \times 10^6$). Furthermore, morphological integrity of CFSE-labeled

thymocytes was ascertained by comparing the forward light scatter of thymocytes from CFSE- and PBS-injected animals. All peaks were perfectly superimposed (Fig. 2).

Since the number of labeled cells decreased rapidly within the first 24 hrs, from 100% to approximately 15%, it became pertinent to establish the distribution of the labeled thymocytes among subsets detectable by antibodies to CD4 and CD8 (Table 2). The proportion of CD4⁺/CD8⁻, CD4⁺/CD8⁺, CD4⁺/CD8⁻, and CD4⁻/CD8⁺ subsets within CFSE-labeled cells was practically the same as that in the whole thymus, except for a slight decrease in the percentage of double negative CD4⁻/CD8⁻ cells, (1.67 ± 0.79 vs. 3.53 ± 0.35), compensated by a corresponding increase in CD4⁺/CD8⁺ for the total thymic population. Slight differences ($p < 0.05$) were also noted with respect to CD4⁺/CD8⁻ and CD4⁻/CD8⁺ subsets between CFSE- and PBS-injected thymuses (7.83 ± 0.87 vs. 6.17 ± 0.85 and 2.50 ± 0.41 vs. 1.77 ± 0.35), respectively, but overall, CFSE-labeled cells could be considered as a representative sample of their respective subsets.

Kinetics of CD3-labeled thymocytes from CFSE-injected mice

In the light of known population dynamics within the thymus and of the above data, one can predict that the CFSE⁺/CD3⁻ and CFSE⁺/CD3^{lo} cohort, would be the first to disappear either by negative selection, or by differentiation into CFSE⁺/CD3^{hi} cells. For their part, the CFSE⁺/CD3^{hi} (mostly medullary) cells would on the one hand, emigrate to peripheral lymphoid organs, and on the other hand, be replenished by incoming CD3^{lo} cells. Thus CFSE⁺/CD3^{hi} cells would remain at a steady level until the incoming cells from the CFSE⁺/CD3^{lo} compartment

would have been depleted, at which point the emigration of the CFSE⁺/CD3^{hi} thymocytes would become noticeable. In fact, there was an important drop in CFSE-labeled cells CD3⁻ and CD3^{lo} cells, between day 1 and day 5 (Fig. 3). At day 5, CD3⁻ and CD3^{lo} subsets were no longer detectable, while the number of CD3^{hi} cells remained at the same level until day 7. At that time they began to drop sharply, and at day 9, they reached base level, and CFSE⁺ cells were, for all practical purposes, no longer detectable in the thymus.

CFSE-labeled thymic emigrants in the lymph nodes

Kinetics of thymic emigrants were measured in lymph nodes using either CFSE/anti-CD3 staining for total T-cells, or CFSE/anti-CD4 and CFSE/anti-CD8 for particular subsets. In axillary and inguinal lymph nodes, CFSE⁺/CD3⁺ lymphocytes showed a linear increase from day 1 to day 7 (Fig. 4a), when they reached approximately 5% of total CD3⁺ cells. They remained at that level until day 14, and started to decrease, reaching base level, at day 21. Similar kinetics were also observed in the CFSE⁺/CD4⁺ subset (Fig. 4b and Table 3). However, the linear increase of CFSE⁺/CD8⁺ lymphocytes (Fig. 4c), was less marked than that of CFSE⁺/CD4⁺ cells, and the plateau was observed only until day 9, with the base level being reached at day 14 (59 110 cells) staying roughly at that level until day 21 (92 064 cells).

CFSE-labeled thymic emigrants in the spleen

The curves for the CFSE-labeled thymic emigrants to the spleen differ somewhat from those observed in the lymph nodes. Only after a lag period of between 1 and 3 days, did the CFSE⁺/CD3⁺ splenocyte subset show a linear increase, peaking at day 7 (Fig. 5a). A sharp decrease in this subset occurred thereafter, and in contrast to the lymph node T-lymphocytes, CFSE-labeled splenocytes were not detected beyond day 9. Similar kinetics, were seen in the CFSE⁺/CD4⁺ subset (Fig. 5b and Table 3). In the case of the CFSE⁺/CD8⁺ subset, the first cells are noted only at day 3 (120 938 cells); they stay at that level until day 7 (140 019 cells), with the last detectable CFSE⁺/CD8⁺ cells being observed at day 8 (87 840 cells).

Functional integrity of CFSE-labeled peripheral lymphocytes

To ascertain that the CFSE-labeled emigrant cells detected in the peripheral lymphoid organs were, in fact, fully functional and intact cells, their fluorescence intensities, with antibodies to CD3 (Fig. 6a), CD4 (Fig. 6b), and CD8 (Fig. 6c), were compared to that of cells from control groups. As can be seen from their respective histograms, the fluorescence intensity peaks, with each of these antibodies, coincide almost perfectly with that of the respective control. The data for each of the figures presented, is a representative sample of a given experiment performed on the lymph nodes, 7 days post- injection with CFSE.

Immunohistochemical localization of CFSE-labeled cells

Frozen sections of thymus were treated with peroxidase-labeled anti-FITC, 3 and 7 days post CFSE injection. At 3 days (Fig. 7a) labeled cells were in the medulla and in the cortex, with

noticeably fewer cells in the outer cortex. At day 7 post-I.T. injection (Fig. 7b), cortical labeling was virtually absent, but in the medulla, labeling of thymocytes, of endothelial and other stromal cells was very pronounced.

In the lymph nodes, labeled cells were scarce, but those present were confined to T-cell areas (i.e. absent from germinal centers) (Fig. 7c). Labeled cells in the spleen were even more scarce than in the lymph nodes (not shown), but were confined to the T-cell areas as well. These findings thus complement the cell kinetics data obtained by flow cytometry.

T-cell specificity of CFSE-labeling

The considerable quantity of CFSE injected intrathymically staining 100% of the thymocytes after 2 hrs, indicated that cell saturation had been reached and that some CFSE was still presumably available in extracellular spaces. This was indeed confirmed by the heavy staining of thymic endothelial cells evident at day 7 (Fig. 7b). Free CFSE within the thymus, and the possibility of leakage during intrathymic injection, raised the possibility that cells outside the thymus might have been stained, and could have found their way to peripheral lymphoid organs. This was ruled out by demonstrating that all CFSE⁺ cells found in the lymph nodes (Fig. 8a) and in the spleen (Fig. 8b) were, in fact, CD3⁺. The flow cytometry diagrams shown, are representative of CFSE-labeled lymph node and spleen cells, at day 7 post-I.T. injection.

Evaluation of the rate of thymocyte emigration

Day 5 post-I.T. injection is the first time at which all CFSE-labeled thymocytes are exclusively CD3^{hi} (Fig. 3). Taking into consideration this observation and the fact that no significant apoptosis or proliferation occurs within the thymic medulla, we calculated the rate of thymocyte emigration on the basis of the rate of disappearance of CFSE-labeled CD3^{hi} cells. Since the number of CFSE-labeled CD3^{hi} cells observed at day 5, represent 15% of total CD3^{hi} cells (12.5×10^6), and since all CFSE⁺ cells had disappeared by day 9 (i.e. in four days), we conclude that the emigration rate is approximately 3×10^6 cells/day. Calculations based on cells present at day 4 rather than 5, give an emigration rate of 2.5×10^6 /day.

DISCUSSION

In this work, we have shown that *in vivo* labeling of cells with CFSE is feasible with virtually no toxic effect on the labeled or adjacent cells. We have further shown that intracytoplasmic CFSE can be detected not only by fluorescence, but also by immunoperoxidase staining of frozen sections using anti-FITC antibodies which react with a shared epitope.

The technique we have developed, can be used to advantage in relatively long-term migration studies (up to 21 days, in the present case), as demonstrated by the recovery of T cells in the peripheral lymphoid organs.

The specificity of *in vivo* CFSE labeling, resides in the fact that detectable staining can only be achieved above a certain concentration threshold. Thus, while leakage into the blood circulation cannot be ruled out, the dilution factor is such that the cells which may take in the dye, do so at a concentration well below the detection threshold. Indeed, injections of up to 20 μM (four times the concentration used for *in vitro* labeling), gave no detectable labeled cells within the thymus.

One inherent feature of the technique which might have been troublesome, is the fact that the percentage of labeled cells drops from 100% to approximately 15% within 24 hrs, to remain at that level thereafter. This large loss of stain cannot fully be explained by cell loss through apoptosis or by dilution through proliferation, as it was observed in all CD3 and CD4/CD8

subsets. It must be noted however that the same phenomenon was observed when *in vitro*-labeled peripheral lymphocytes were injected to mice [17]. The under-representation we noted at 24 hrs, of the CD4⁺/CD8⁻ subset may easily be explained by the fact that this is the smallest and the least differentiated thymocyte subset, and that labeled cells are replaced by incoming unlabelled precursors, differentiate into CD4⁺/CD8⁺ cells, which in fact display a slight increase of labeled cells. Thus, CFSE-labeled cells constitute a representative sample of the various subsets in which they are found.

It is interesting to note that on day 7, a number of endothelial and other stromal cells in the thymic medulla show strong staining. In view of the centripetal direction of cell traffic (reviewed in [20]) from the cortex to the medulla and into the circulation, a concentration of stain, associated with non-migrating cells in the vicinity of medullary vessels, is not surprising.

One concern with the present method, was the integrity of the labeled cells. We have already shown the negligible toxicity of CFSE. The slight reduction of cell numbers at 24 hours, in both CFSE- and PBS-injected mice, is attributed to the normal post-operative reaction of non-adrenalectomized mice. Four lines of evidence converge to corroborate the notion of cellular integrity after labeling. First, the forward light scatter of CFSE- and PBS-labeled cells coincide perfectly, indicating that no detectable morphological modifications were caused by the label. Second, the labeled cells displayed CD3, CD4 and CD8 markers with the same intensity as unlabelled cells. It was observed by others that the CD4 and CD8 co-receptor molecules are actively synthesized even within the mature, single positive lymphocyte subsets [21], so that, had the CFSE interfered with any intracellular metabolic processes, this would undoubtedly have

been reflected by a change in the expression level of these functional markers. Third, the intrathymic differentiation pathway seems unaffected, as the first subsets to disappear are the CD3^{lo}, followed by the medullary CD3^{hi}, which corresponds with the reported differentiation/exit sequence (reviewed in [20]). Fourth, the localization by immunohistochemistry of labeled cells in peripheral lymphoid organs, and indeed, within the T-dependent areas of these organs, is an indication that emigration from the thymus, and immigration into the spleen and lymph nodes, occurred according to physiological predictions. This cell traffic is regulated by surface receptors, specifically addressins (reviewed in [22]) which from the present data, can be deduced to be intact.

Other *in vivo* labels have been used, most notably FITC [10, 23] and BrdU [24]. Their objectives were different from those of the present work. FITC, which attaches non-specifically to the cell surface [25] , was used to determine the phenotype of early emigrants [26]. FITC however, does not lend itself to long-term studies, and extrapolations in time have to be made, using very small cell numbers (usually in the range of 500-1000 FITC-labeled cells), to evaluate the rate of migration [9]. BrdU, on the other hand, labels only dividing cells. This technique was used to great advantage in studies involving the proliferation of cell cohorts within various thymocyte subsets [27]. *In vivo* CFSE labeling has the advantage that the label stays within the cells for at least three weeks.

By examining the rate of disappearance of CFSE-labeled CD3^{hi} thymocytes, we have been able to determine the approximate number of emigrating thymocytes as being 3×10^6 /day. Scollay and colleagues [9] reported a rate of emigration of 2×10^6 /day. Our estimate, while still

within the same range, is based on the labeled medullary cell number at day 5, when strictly all labeled cells from other subsets have disappeared.

Little work had been done on the rate of seeding of peripheral organs. Our data show that in the spleen, the highest number of labeled cells is reached on day 7, after intrathymic injection of CFSE. This corresponds to the day when the last labeled cells ($CD3^{hi}$) remaining in the thymus, begin their exit. From that day onward, labeled cells start to disappear from the spleen, with practically no detectable cells around day 9. The recirculation of the labeled splenocytes into the lymph nodes is unlikely since, in the lymph nodes, no new immigration was noted at day 7, rather, the plateau was maintained at its original level until day 9. The fact that the spleen is the predominant organ in lymphocyte recirculation, supporting a traffic several times that of all other lymphoid tissues combined, [28, 29], corroborates our observation that the turnover of T cells in the spleen (9 days for $CD4^+$ cells, and 5 days for $CD8^+$ cells), is much more rapid than that of lymph node T cells. The apparent resistance of $CD8^+$ cells to enter and stay in the spleen is noteworthy. It has recently been shown that cellular competition exists among $CD8^+$ T cells, so that peripheral T cells may actually resist replacement by thymic emigrants [30]. Whether this is sufficient to explain our data is unclear. In contrast to the spleen, entry of lymphocytes into the lymph nodes is highly controlled. Lymphocyte homing to lymph nodes depends on specific lectin-mediated interactions with specialized high endothelial cells present in the capillary venules [31, 32]. Indeed, in experiments using *in vivo* anti-selectin antibody administration, and by generating mice lacking L-selectin, the recirculation of lymphocytes within all lymph nodes was reported impaired, resulting in preferential localization of lymphocytes in the spleen [33, 34].

It is possible that the rapid appearance of thymic emigrants in lymph nodes is the result of preferential migration mediated by L-selectin, whereas that into the spleen is uncontrolled.

Using *in vivo* CFSE labeling of thymocytes, followed by simultaneous flow cytometric and immunohistochemical readouts, we have provided a broad picture of T cell kinetics in peripheral lymphoid organs. The simplicity and reliability of this approach makes it suitable to address numerous questions dealing with the migration of even small cell subsets in a variety of experimental conditions.

Work is presently in progress in our laboratory on the possible role of various molecules in lymphocyte migration.

REFERENCES

1. Goldowitz, D., and Mullen, R.J. (1989). Nuclear morphology of ichthyosis mutant mice as a cell marker in chimeric brain. *Develop. Biol.* **89**, 261-267.
2. Le Douarin, N.M. (1973). A feulgen-positive nucleolus. *Exptl. Cell Res.* **77**, 459- 468.
3. Mitchell, G.F., Chan, E.L., Noble, M.S., Weissman, I.L., Mishell, R.I., and Herzenberg, L.A. (1972). Immunological memory in mice. III. Memory to heterologous erythrocytes in both T cell and B cell populations and requirement for T cells in expression of B cell memory. Evidence using immunoglobulin allotype and mouse alloantigen Theta markers with congenic mice. *J. Exp. Med.* **135**, 165-184
4. Khalaf, A-N., Wolff-Vorbek, G., Bross, K., Kerp, L., and Petersen, K-G. (1993). In vivo labelling of the spleen with a red-fluorescent cell dye. *J. Immunol. Methods* **165**, 121-125.
5. Pope, J.H., and Rowe, W.P. (1964). Detection of specific antigen in SV40-transformed cells by immunofluorescence. *J. Exp. Med.* **120**, 121-127.
6. Bryant, B.J. (1972). Renewal and fate in the mammalian thymus: mechanisms and inferences of thymocytokinetics. *Eur. J. Immunol.* **2**, 38-45.
7. Egerton, M., Scollay, R., and Shortman, K. (1990). Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Immunology* **87**, 2579-2582.
8. Cahill, R.N.P., Kimpton, W.G., Washington, E.A., Dudler, L., and Trnka, Z. (1996). Late-term fetal thymectomy does not prevent the development of gut- homing T cells after birth. *Immunology* **88**, 130-133.
9. Scollay, R.G., Butcher, E.C., and Weissman, I.L. (1980). Thymus cell migration: quantitative

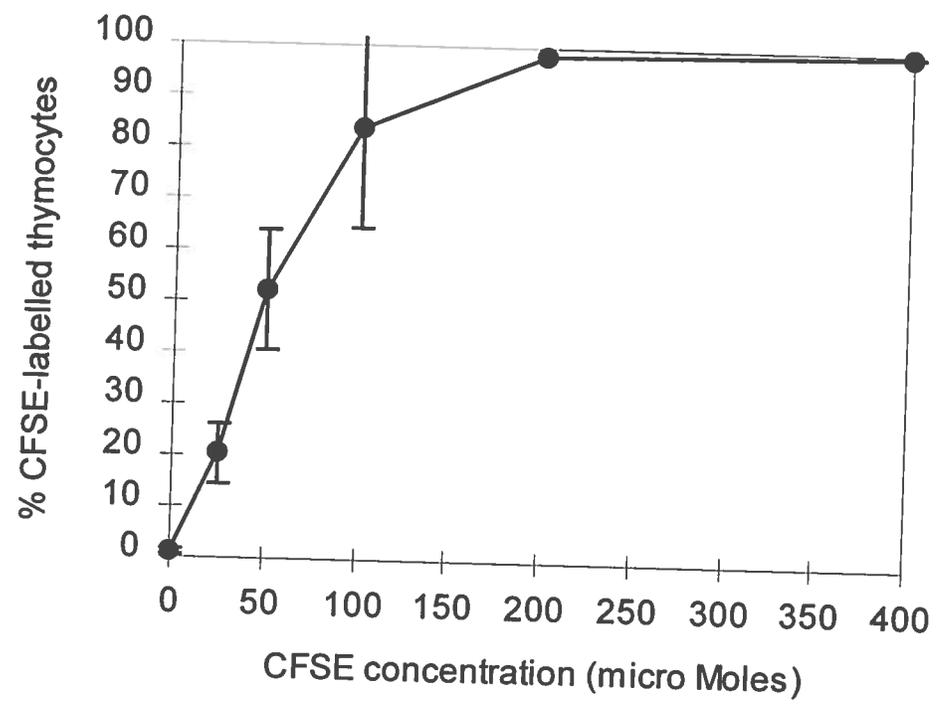
- aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur. J. Immunol.* **10**, 210-218.
10. Hossein Zadeh, H., and Goldschneider, I. (1993). Demonstration of large-scale migration of cortical thymocytes to peripheral lymphoid tissues in cyclosporin A-treated rats. *J. Exp. Med.* **178**, 285-293.
 11. Yagi, H., Matsumoto, M., Nakamura, M., Makino, S., Suzuki, R., Harada, M., and Itoh, T. (1996). Defect of thymocyte emigration in a T cell deficiency strain (CTS) of the mouse. *J. Immunol.* **157**, 3412-3419.
 12. Samlowski, W.E., Robertson, B.A., Draper, B.K., Prystas, E., and McGregor, J.R. (1991). Effects of supravital fluorochromes used to analyze the in vivo homing of murine lymphocytes on cellular function. *J. Immunol. Methods* **144**, 101-115.
 13. Horan, P.K., and Slezak, S.E. (1989). Stable cell membrane labelling. *Nature* **340**, 167-168.
 14. Tanaka, K., Koga, Y., Taniguchi, K., Kamikaseda, K., and Nomoto, K. (1986). T cell recruitment from the thymus to the spleen in tumor-bearing mice: I. analysis of recruited cells by surface markers. *Cancer Immunol. Immunother.* **22**, 37-42.
 15. Maeda, Y., Tanaka, K., Koga, Y., Zhang, X-Y., Sasaki, M., Kimura, G., and Nomoto, K. (1993). A simple quantitative in vitro assay for thymocyte adhesion to thymic epithelial cells using a fluorescein diacetate. *J. Immunol. Methods* **157**, 117-123.
 16. Brenan, M., and Parish, C.R. (1984). Intracellular fluorescent labelling of cells for analysis of lymphocyte migration. *J. Immunol. Methods* **74**, 31-38.
 17. Weston, S.A., and Parish, C.R. (1990). New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies: analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J. Immunol. Methods* **133**, 87-97.

18. Sunder-Plassmann, G., Hofbauer, R., Sengoelge, G., and Hörl, W.H. (1996). Quantification of leukocyte migration: improvement of a method. *Immunol. Invest.* **25**, 49-63.
19. De Clerck, L.S., Bridts, C.H., Mertens, A.M., Moens, M.M., and Stevens, W.J. (1994). Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leukocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. *J. Immunol. Methods* **172**, 115-124.
20. Boyd, R.L., and Hugo, P., (1991). Towards an integrated view of thymopoiesis. *Immunol. Today* **12**, 71-79.
21. Suzuki, H., Punt, J.A., Granger, L.G., and Singer, A., (1995). Asymmetric signaling requirements for thymocyte commitment to the CD4⁺ versus CD8⁺ T cell lineages: A new perspective on thymic commitment and selection. *Immunity* **2**, 413-425.
22. Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314.
23. Huesmann, M., Scott, B., Kisielow, P., and von Boehmer, H. (1991). Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell* **66**, 533-540.
24. Tough, D.F., and Sprent, J. (1995). Thymic emigration- a reply. *Immunol. Today* **16**, 273-274.
25. Butcher, E.C., Scollay, R.G., and Weissman, I.L. (1980). Direct fluorescent labeling of cells with fluorescein or rhodamine isothiocyanate: II. Potential application to studies of lymphocyte migration and maturation. *J. Immunol. Methods* **37**, 109-121.
26. Scollay, R., Wilson, A., and Shortman, K. (1984). Thymus cell migration: analysis of thymus

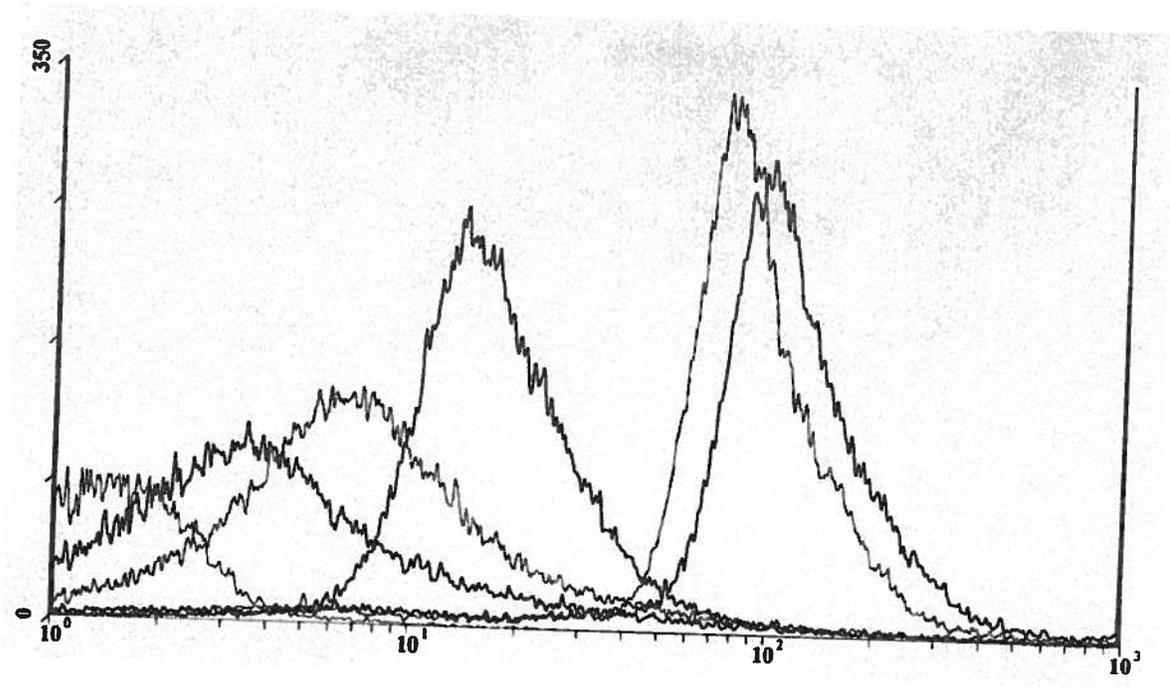
- emigrants with markers that distinguish medullary thymocytes from peripheral T cells. *J. Immunol.* **132**, 1089-1094.
27. Lucas, B., Vasseur, F., and Penit, C. (1994). Production, selection, and maturation of thymocytes with high surface density of TCR. *J. Immunol.* **153**, 53-62.
28. Ford, W.L. (1969). The immunological and migratory properties of the lymphocytes recirculating through the rat spleen. *Br. J. Exp. Pathol.* **50**, 257-269.
29. Pabst, R. (1988). The spleen in lymphocyte migration. *Immunol. Today* **9**, 43-45.
30. Freitas, A.A., Agenes, F., and Coutinho, G.C. (1996). Cellular competition modulates survival and selection of CD8⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2640-2649.
31. Gallatin, W.M., Weissman, I.L., and Butcher, E.C. (1983). A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* **304**, 30-34.
32. Geoffroy, J.S., and Rosen, S.D. (1989). Demonstration that a lectin-like receptor (gp90^{MEL}) directly mediates adhesion of lymphocytes to high endothelial venules of lymph nodes. *J. Cell Biol.* **109**, 2463-2469.
33. Bradley, L.M., Watson, S.R., and Swain, S.L. (1994). Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin. *J. Exp. Med.* **180**, 2401-2406.
34. Arbonès, M.L., Ord, D.C., Ley, K., Ratch, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D.J., and Tedder, T.F. (1994). Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* **1**, 247-260.

ARTICLE I FIGURE 1 : Determination of the optimal concentration of CFSE for *in vivo* labeling. Mice were injected intrathymically with different concentrations of CFSE, and sacrificed 2 h later. (a) Percentage of CFSE-labeled thymocytes. (b) Fluorescence intensity of thymocytes labeled with CFSE at different concentrations. From left to right : 0 (PBS-control), 25, 50, 100, 200, and 400 μM . Histograms are representative of each concentration group.

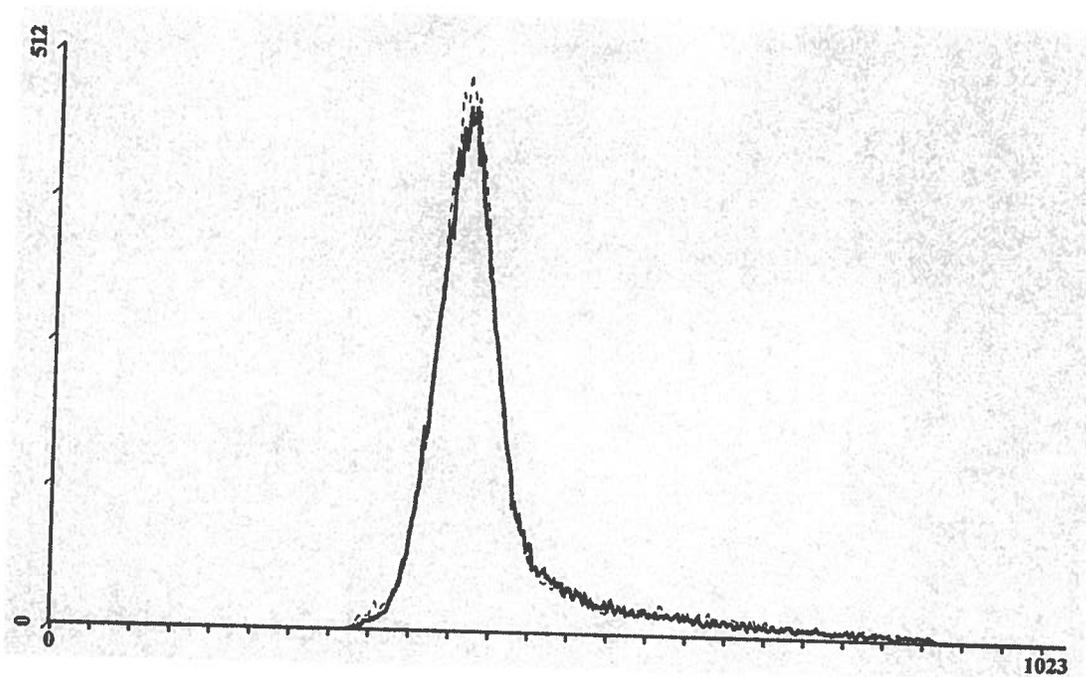
a)



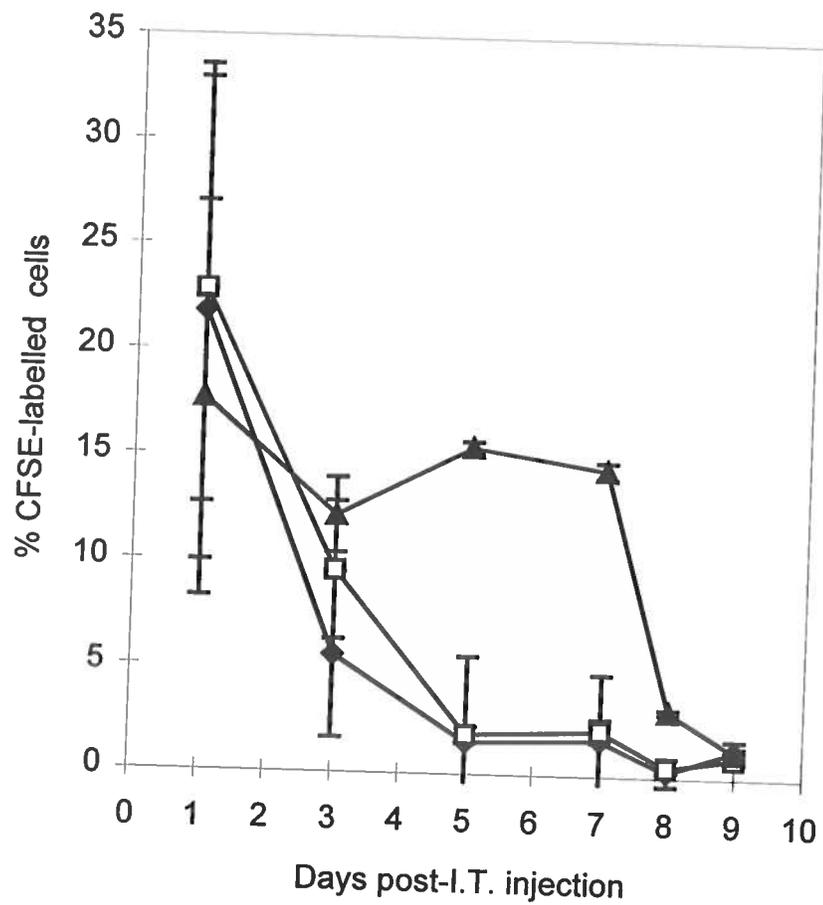
b)



ARTICLE I FIGURE 2: Forward scatter overlay histograms of thymocytes from PBS- and CFSE-injected mice, 2 h post-I.T. injection with 400 μ M CFSE. 1×10^5 events were analyzed. Dead cells were eliminated by propidium iodide exclusion and by applying appropriate gates. The coincidence of histograms is an indication of morphological integrity of CFSE-labeled cells.

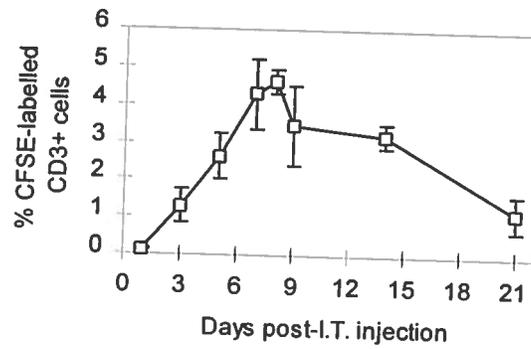


ARTICLE I FIGURE 3 : Evolution with time of the CD3 profile of CFSE-labeled thymocytes, as assessed by flow cytometry. Note that CD3⁻ (◆) and CD3^{lo} (□) cells fall to base level by day 5, while CD3^{hi} (▲) cells remain at a plateau until day 7. Results presented are expressed as the mean percentage of CFSE-labeled thymocytes \pm SD ($n \geq 4$), for each time point.

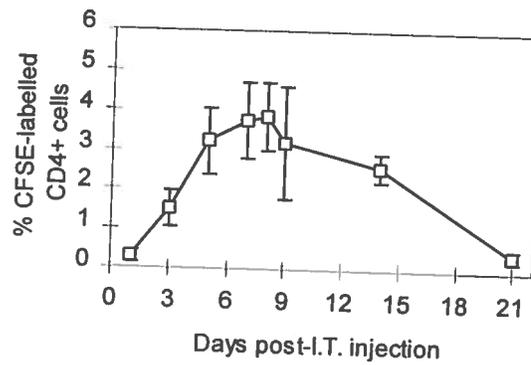


ARTICLE I FIGURE 4: CFSE-labeled cells in lymph nodes, various times after intrathymic injection of the label. (a) Percentage of CFSE-labeled lymphocytes among CD3⁺ cells. (b) Percentage of CFSE-labeled lymphocytes among CD4⁺ cells. (c) Percentage of CFSE-labeled lymphocytes among CD8⁺ cells. Results are expressed as the mean percentage \pm SD (n \geq 4), for each time point. Background, from control animals, has been subtracted.

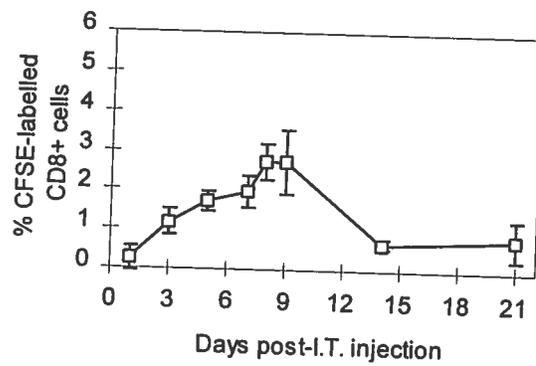
a)



b)

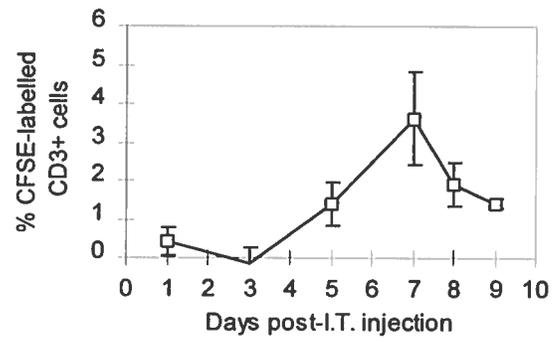


c)

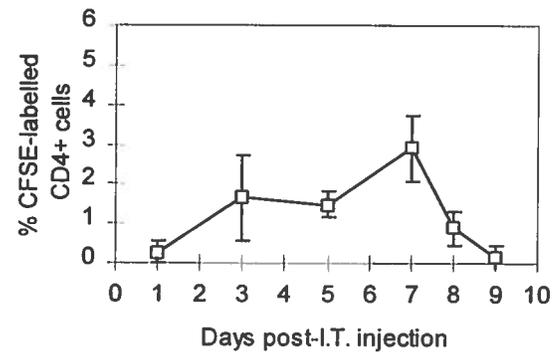


ARTICLE I FIGURE 5: CFSE-labeled cells in the spleen, various times after intrathymic injection of the label. (a) Percentage of CFSE-labeled lymphocytes among CD3⁺ cells. (b) Percentage of CFSE-labeled lymphocytes among CD4⁺ cells. (c) Percentage of CFSE-labeled lymphocytes among CD8⁺ cells. Results are expressed as the mean \pm SD (n \geq 4), for each time point. Background, from control animals, has been subtracted.

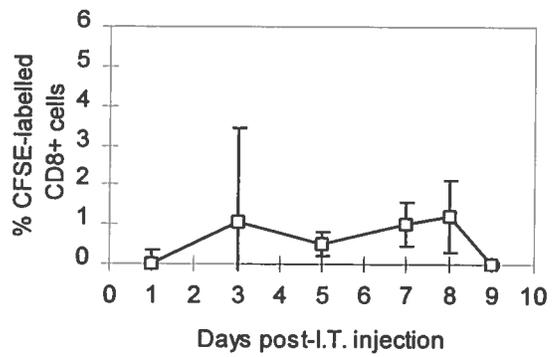
a)



b)

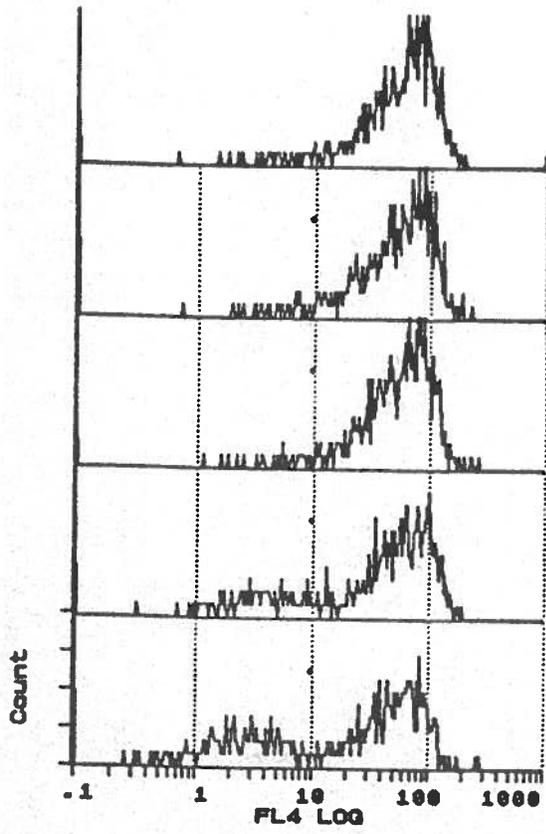


c)

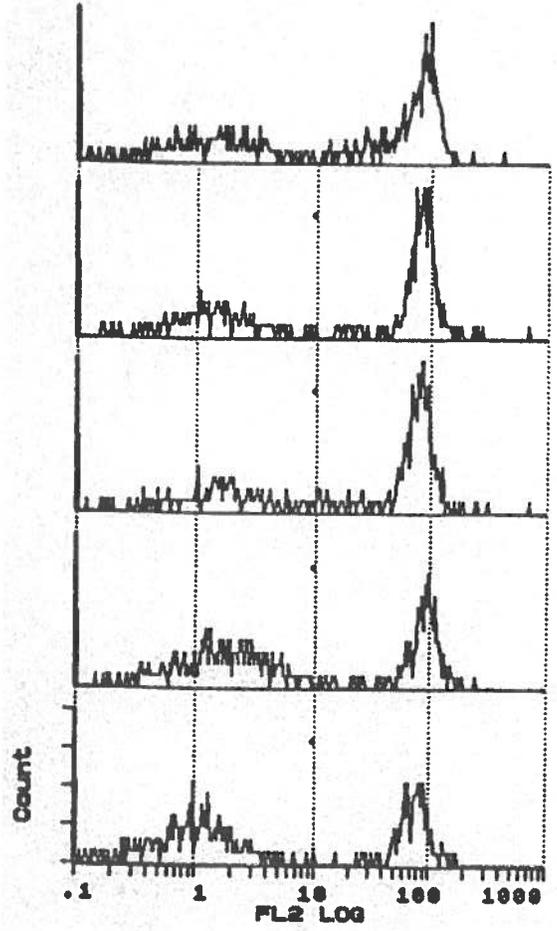


ARTICLE I FIGURE 6 : Non-interference of CFSE with the expression of CD3, CD4 and CD8. Note that the antibody-labeled cells of CFSE- injected or non-injected mice display similar levels of surface antigen. (a) CD3⁺ cells, (b) CD4⁺ cells, and (c) CD8⁺ cells from lymph node lymphocytes. From top to bottom : four CFSE-labeled cell samples and one PBS control.

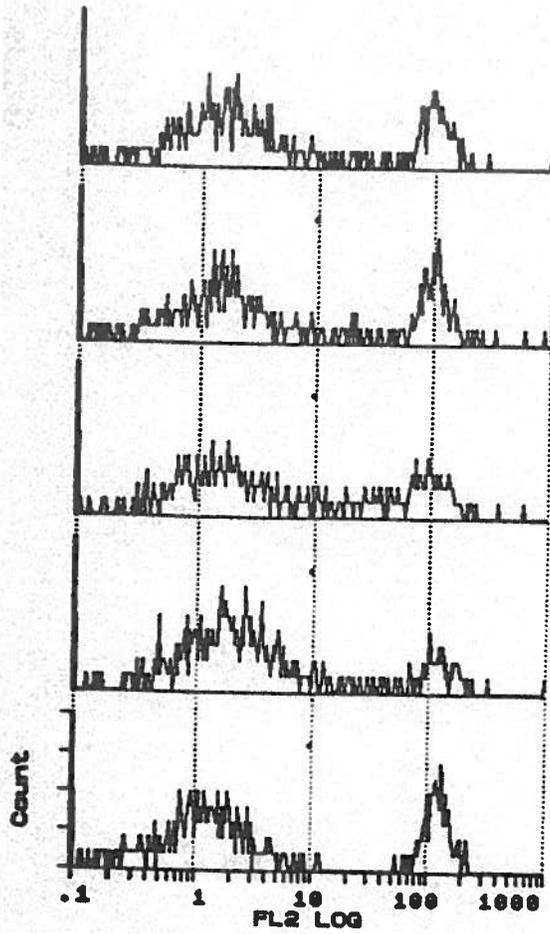
a)



b)

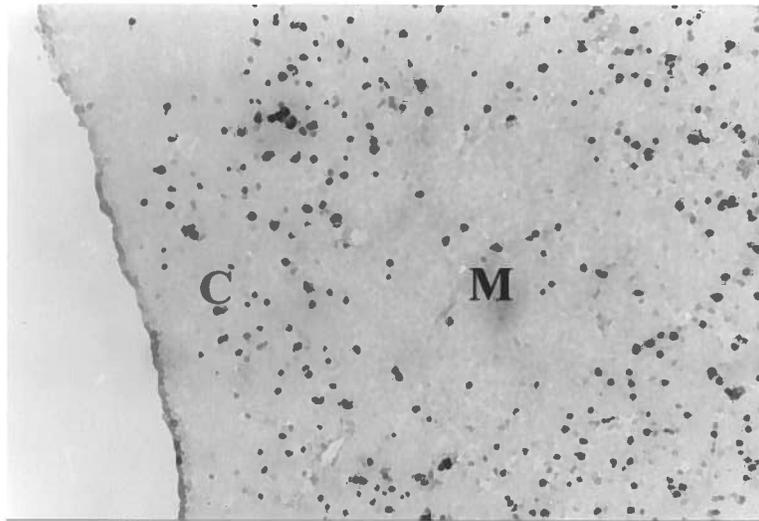


c)

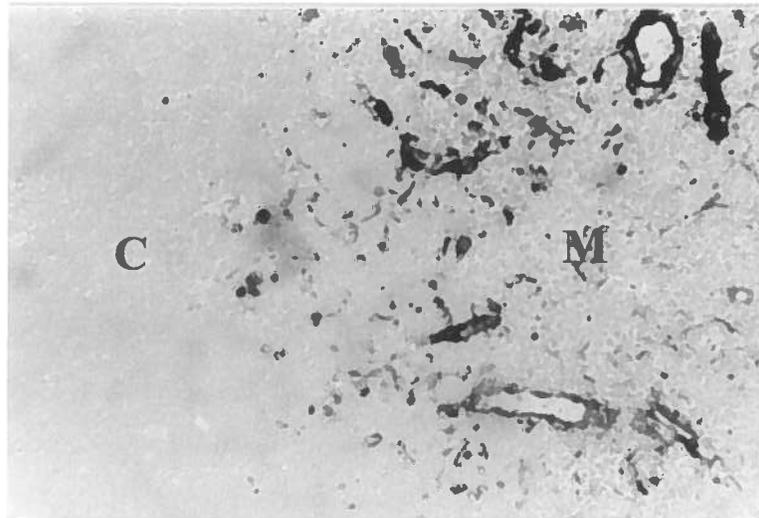


ARTICLE I FIGURE 7: Immunohistochemical detection of CFSE-labeled cells. (a) Thymus section, 3 days post-injection. Most labeled cells are in the inner part of the cortex (C), and in the medulla (M). (b) Thymus section, 7 days post-injection . The cortex contains no labeled cells. The medulla contains some labeled thymocytes, but mostly endothelial and other stromal cells. (c) Lymph node section, 7 days post-injection The few labeled cells are restricted to T cell areas and absent from the germinal center (GC). x 160.

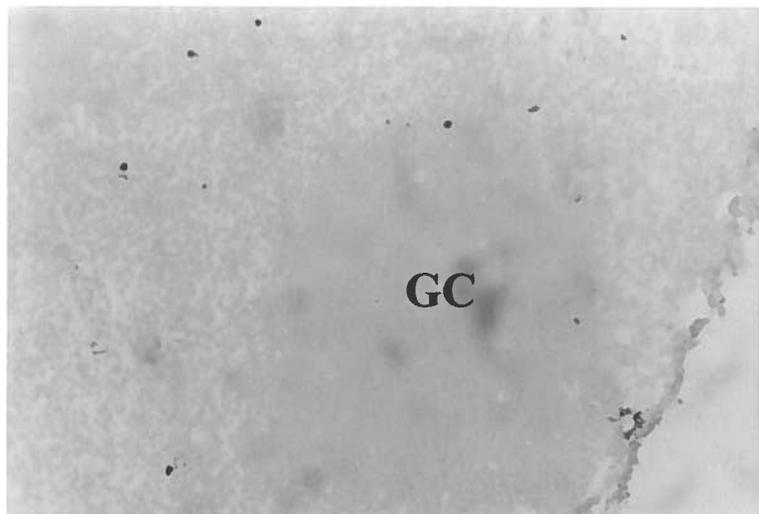
a)



b)

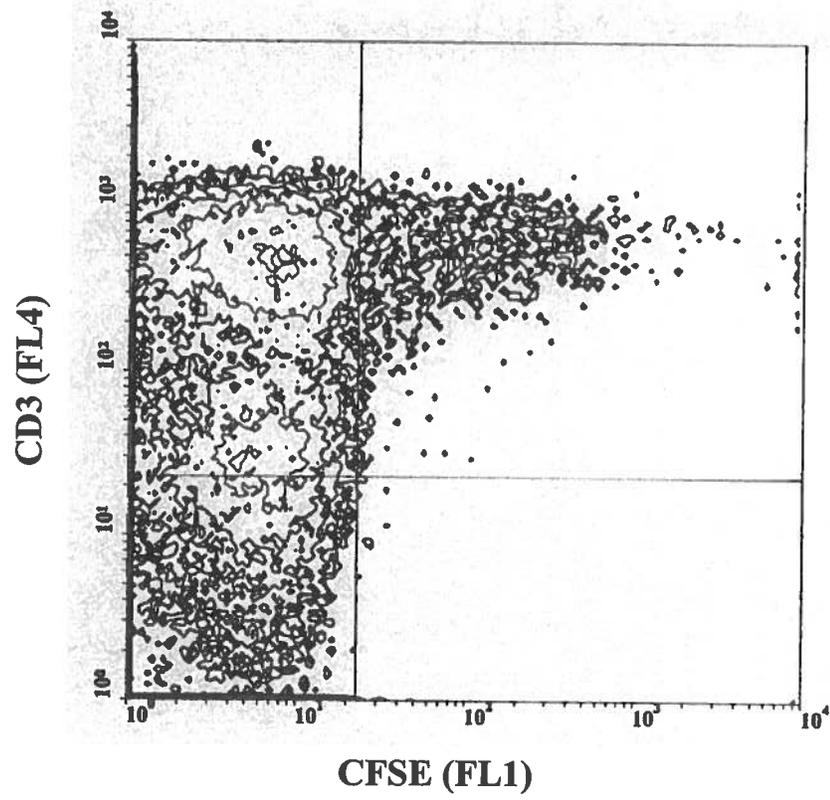


c)

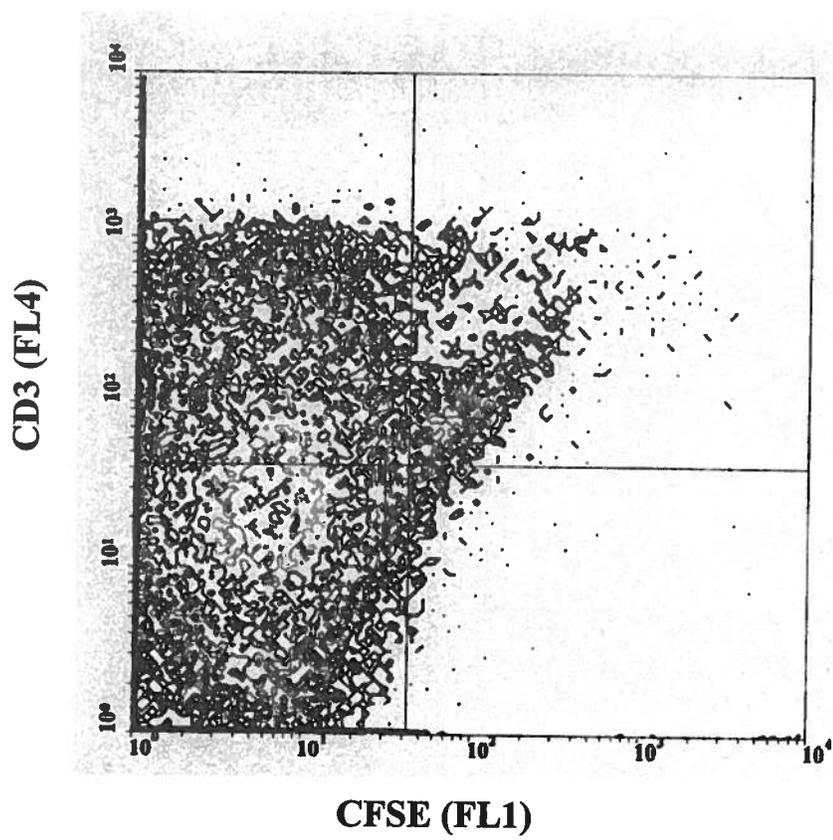


ARTICLE I FIGURE 8 : Restriction of CFSE labeling to thymus-derived cells. (a) CFSE-labeled cells in the lymph nodes. (b) CFSE-labeled cells in the spleen (information generated was based on backgating using CD3⁺ lymphocytes). Note that practically all CFSE-labeled cells are CD3⁺. The flow cytometry diagrams depicted are representative examples of one mouse, from a particular experiment (7 days post-I.T. injection of CFSE).

a)



b)



ARTICLE I TABLE 1:

Thymocyte Counts ($\times 10^6$), at 2 and 24 h Post-Injection with PBS or with
400 μ M CFSE

	2 Hours		24 Hours	
	Total	Viable	Total	Viable
PBS-				
injected	262.2 \pm 5.9	245.2 \pm 7.8	186.6 \pm 9.3	175.0 \pm 5.2
mice				
CFSE-				
injected	236.4 \pm 28.0	221.0 \pm 27.5	206.0 \pm 15.2	193.1 \pm 14.2
mice				

ARTICLE I TABLE 2 :

Distribution of Thymocyte Subsets (%), 24 h after Intra-thymic
Injections

Thymocyte subsets	PBS-injected mice	CFSE-injected mice	
		Gated on all thymocytes	Gated on CFSE- labeled thymocytes
CD4⁻/CD8⁻	3.53 ± 0.35	3.35 ± 0.88	1.67 ± 0.79
CD4⁺/CD8⁺	88.40 ± 1.22	86.30 ± 0.41	89.00 ± 3.68
CD4⁺/CD8⁻	6.17 ± 0.85	7.83 ± 0.87	7.23 ± 2.87
CD4⁻/CD8⁺	1.77 ± 0.35	2.50 ± 0.41	2.10 ± 0.69

ARTICLE I TABLE 3 :

Mean Absolute Numbers of CFSE⁺/CD4⁺ and CFSE⁺/CD8⁺ Thymic
Emigrants in the Lymph Nodes and in the Spleen

	Days post-I.T. Injection with CFSE							
Lymph nodes	1	3	5	7	8	9	14	21
CFSE⁺/CD4⁺ cells	12695	166701	335654	348371	319550	358210	238310	48200
CFSE⁺/CD8⁺ cells	9701	125174	162823	185787	161286	216512	59110	92064
Spleen								
CFSE⁺/CD4⁺ cells	30602	208243	333261	513562	116280	22464	----- ^{a)}	-----
CFSE⁺/CD8⁺ cells	-----	120938	100813	140019	87840	-----	-----	-----

a) CFSE-labeled cells were not detectable

CHAPITRE 3

**LE BLOCAGE DE CEM AVEC LA UEA-I *IN VIVO* ET *IN VITRO* :
LES CEM MODIFIENT LA PROLIFÉRATION DE THYMOCYTES
CORTICAUX MAIS N'INFLUENCENT PAS L'ÉMIGRATION VERS
LA PÉRIPHÉRIE**

RÉSUMÉ ARTICLE II

Le principal type de cellule stromale dans le thymus est la cellule épithéliale médullaire (CEM), bien que son rôle reste peu connu. Certaines CEM expriment des protéines membranaires, possédant des groupements glycosylés par le L-fucose, qui se lient spécifiquement à la lectine UEA-I. Nous avons exploité cette observation dans le but de développer un modèle pour l'étude *in situ* des fonctions reliées aux CEM. Nous avons injecté la UEA-I par voie intrathymique et elle s'est localisée à la région médullaire. Le blocage des CEM UEA-I⁺ n'a pas influencé le taux d'émigration des thymocytes. Par contre, ceci a induit une baisse de la prolifération des thymocytes CD3⁻ et CD3^{lo}. Le scénario qu'on propose est le suivant : L'interférence de contact entre les CEM UEA-I⁺ et les thymocytes médullaires empêche l'activation d'un ou des deux types cellulaires, diminuant la production de facteurs qui sont responsables de la prolifération des thymocytes.

ARTICLE II

Running title: TMECs modify cortical thymocyte proliferation

Full title: **UEA-I⁺ Thymic Medullary Epithelium Blockage Reduces The Rate Of Cortical Thymocyte Proliferation**

Authors' names: Monica Graziano, Yves St-Pierre, and Edouard F. Potworowski

Authors' affiliation: Human Health Research Center, INRS-Institut Armand Frappier

Correspondence: Edouard F. Potworowski
Human Health Research Center, INRS-Institut Armand Frappier
531 boul. des Prairies, Laval, Qc, Canada, H7N-4Z3
e-mail: edouard_potworowski@inrs-iaf.quebec.ca
FAX: (450)-686-5501

(En préparation).

Abstract

Thymic medullary epithelial cells (TMECs) represent a major stromal cell type, whose functions are not yet well established. A major subset of TMECs express L-fucose-glycosylated proteins on their plasma membrane; these can specifically bind the lectin UEA-I. We exploited this fact to develop a model for the *in situ* investigation of TMEC functions. We injected intrathymically UEA-I, which localized to the medulla. This blockage of UEA-I⁺ TMECs did not affect the rate of emigration of thymocytes; however, it reduced the proliferation of CD3⁻ and CD3^{lo} thymocytes. The proposed scenario is that hampered contact between UEA-I⁺ TMECs and medullary thymocytes prevents activation of either or both of these cells, hence reducing the production of soluble factors responsible for cortical thymocyte proliferation.

Key words: Thymus, stromal cells, T lymphocytes, cell-to-cell interactions, UEA-I, trafficking

Introduction

The bulk of cells present in the thymus is found in the cortex. These cells are the immature, DP, CD3^{lo} thymocytes, which have differentiated from a small DN, CD3⁻ population, in response to signals mediated by the pre-TCR complex (1-5). DP cells proliferate vigorously, up-regulate their TcR and start to down-regulate either the CD4 or CD8 co-receptor molecule, as they undergo positive selection. This process is mediated by the recognition, via the TcR, of self MHC-peptide complexes on cortical epithelial cells, and thymocytes which fail positive selection are eliminated by apoptosis (6-8). This large amount of activity occurs in the thymic cortex during a period of 3-4 days (9,10). In contrast, SP thymocytes remain in the medulla for 12-16 days (9). Given this long period of residence in the medulla, and the fact that thymic medullary epithelial cells (TMECs) constitute a major stromal cell type in this compartment, it would be reasonable to anticipate that the ultimate fate of medullary thymocytes would be determined, or at least influenced, by interactions between these two cell types. Among the activities which medullary thymocytes are likely to perform in response to interactions with neighboring epithelial cells, and which deserve some consideration, are: 1) further differentiation, 2) apoptosis, as a result of selection events, 3) proliferation, and 4) controlled export.

Further differentiation of some thymocytes which reside within the medulla, is well documented. Among CD4 and CD8 SP cells, at least two populations can be distinguished on the basis of their expression of the heat stable antigen, HSA (10,11), and of the non-classical MHC class I antigen, Qa-2 (10,12,13). The progression

from HSA⁺Qa-2⁻ to HSA⁻Qa-2⁺, coincides with a functional maturation of thymocytes, with the latter resembling fully mature, immunocompetent peripheral T cells (14). Thus, this progression of medullary thymocytes to a Qa-2⁺ phenotype, which is an event in late thymic maturation, occurring prior to, but not being obligatory for, thymocyte emigration, may require the participation of activation signals from accessory molecules which could conceivably be provided by epithelial cells.

Apoptosis, which is the hallmark of a failed positive selection in the thymic cortex, has also been demonstrated, albeit to a lesser extent, in the thymic medulla, by the TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling) method (7). It has also been suggested to occur as a result of negative selection, which is believed, by most authors, to take place predominantly in the medulla (15-18).

Cell division in mature, medullary thymocytes is low in the adult mouse, in contrast to the extensive proliferation of immature, cortical thymocytes (10,19). Nonetheless, an *in vivo* study by Pénit *et al* (20), describing a "late intrathymic expansion phase", involving phenotypically mature, HSA⁻Qa-2^{hi} cells, double stained with BrdUrd and FITC, showed that such a proliferation was responsible for 10-20% of recent thymic emigrants. Using an anti-mitotic drug which was able to irreversibly arrest cells in metaphase, and consequently kill them, these authors demonstrated that proliferation of mature thymocytes was independent of that of immature thymocytes and that each day, it implicated new cells derived from those in the resting state with the same phenotype. In addition, approximately half of these cycling cells emigrated to the periphery within a

few hours of DNA synthesis. This expansion however, was not an obligatory prerequisite for emigration, since "semi-mature" HSA⁺Qa-2^{lo} thymocytes, also emigrated, without undergoing cell division in the medulla (20). Proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ SP thymocytes was also shown in reaggregate thymic organ cultures, and this post-positive selection expansion was dependent upon MHC class II⁺ thymic epithelial cells (21). Although TMECs, some of which are class II⁺, represent a minority of stromal cells in fetal reaggregate thymic organ cultures, they cannot be dismissed. In this latter study, 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE), an FITC-based dye, had been used to quantitate cellular proliferation *in vitro* (22). Indeed the fluorescence intensity of CFSE-labeled cells is reduced by a half after each cell division (22,23); thus, a small amount of cell proliferation results in an increased number of CFSE-labeled cells (albeit the latter are less strongly labeled), whereas very active proliferation results in dilution of CFSE beyond the limit of detection.

We previously described an improved method for the detection of thymic emigrants, based on the *in situ* labeling of thymocytes with CFSE (24). We showed that CFSE-labeled cells constituted a representative sample of all thymocyte subsets. Using this approach, we found that mature thymocytes migrated at a rate of 2-3 X 10⁶ cells/day to the peripheral lymphoid organs, a figure consistent with previous estimates. Most importantly, CFSE-labeled cells were detected in the periphery for at least 21 days after intrathymic injection of the label.

The aim of the present work was to establish which thymocyte activities resulted from their contact with a major subset of TMECs. The approach we chose was to interfere *in vivo* with these contacts using Ulex Europaeus Agglutinin-I (UEA-I), while still maintaining the thymic architecture intact. UEA-I, is an L-fucose-binding lectin which had been shown to selectively attach to a large population of TMECs. It has previously been used as an immunohistochemical marker of these cells on frozen thymic sections (25). Hence, combining on the one hand, CFSE for its usefulness as an indicator of thymocyte emigration and cell proliferation, with, on the other hand, UEA-I for its ability to selectively bind a TMEC subset, we showed that UEA-I⁺ TMECs are not directly responsible for thymocyte export to the periphery but that they are implicated in the control of cortical thymocyte proliferation.

Materials and Methods

Animals

Five to eight week old C57BL/6 mice were used for all migration experiments. Mice were bred and housed in the Institute's specific pathogen-free animal facility and cared for in compliance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

Blocking agent of thymic medullary epithelial cells:

The lectin *Ulex Europaeus* Agglutinin (UEA-I), which reacts with L-fucose-glycosylated proteins on a subset of thymic medullary epithelial cells was purchased from Sigma (St. Louis, MO), and a stock solution was prepared in PBS, at a concentration of 2.5 mg/ml. UEA-II, a lectin also extracted from *Furze* (also from Sigma), and which reacts with N,N'-Diacetylchitobiose, which served as a second negative control, was prepared as a stock solution in PBS at 2.0 mg/ml.

Tracing agent of thymic emigrants:

5-(-and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), was solubilized, in DMSO at a concentration of 25 mM, and diluted in PBS. The CFSE, purchased from Molecular Probes, Eugene, OR, was used for all migration experiments, and has been shown previously not to be toxic at the concentration used.

In vitro treatment of thymocytes with UEA-I

Freshly isolated thymocytes were incubated in the absence or presence of UEA-I for 0-24 hours. Briefly, 10^6 thymocytes were placed into wells of a 24-flat-bottom well tissue culture plate in either RPMI complete culture medium or in a UEA-I solution at a final concentration of 0.5×10^{-3} mg/ml. Following the specified culture periods, cell viabilities were determined by trypan blue exclusion.

Intrathymic injections

The *in vivo* labeling of thymocytes was performed using a previously described methodology (24). Briefly, mice were anesthetized by an i.p. injection of ketamine/xylazine [(10/1 mg/ml); 0.1 ml/10 g body weight]. The thymus was exposed, following a mediastinal incision, and 10 μ l of the CFSE solution (400 μ M final concentration) were injected into each lobe. In some experiments a solution of UEA-I or UEA-II and CFSE (1 mg/ml and 400 μ M final concentrations, respectively) was injected into each thymic lobe, using a 30-gauge needle. The skin overlying the chest cavity was closed with surgical clips.

Immunohistochemistry

Two days post-intrathymic injection with either PBS, UEA-I or UEA II, mice were sacrificed by CO₂ inhalation and thymuses were snap-frozen in OCT embedding medium (Sakura Finetek, Torrance, CA), and cryostat tissue sections (5µm) were air-dried and fixed in acetone for 20 sec, at room temperature. Endogenous peroxidase was blocked with Peroxo-block (Zymed, San Francisco, CA) for 15 sec and sections were then hydrated in PBS for a further 5 min. The sections were incubated in a humid chamber with a rabbit-anti-UEA-I antibody for 45 min, rinsed and washed in PBS with 0.05% Tween 20, and reincubated with a peroxidase conjugated anti-rabbit mAb (Dakopatts, Denmark) for a subsequent 30 min. Both antibodies were diluted in PBS + 1% condensed milk. The reaction was then revealed by a 20-min incubation with the substrate (AEC; an amino carbazole substrate kit from Zymed). Preparations were then mounted in a buffered glycerol solution for observation.

Preparation of lymphocyte suspensions

At various times post-injection, the thymus, spleen and lymph nodes (axillary and inguinal) were collected and kept on ice in mouse tonicity PBS (MT-PBS), supplemented with 1% FCS. Lymphoid cells were released from the organs by gentle mincing with scalpel blades, and the resulting suspensions were filtered on nylon wool. Spleen cell

suspensions were further subjected to osmotic shocks to eliminate erythrocytes. All cells were then washed twice with cold MT-PBS, and viability was then assessed by trypan blue exclusion.

Flow cytometry

CFSE-labeled lymphocytes from the thymus, the spleen, or lymph nodes were detected using an EPICS XL Flow Cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Forward and side scatter analysis allowed the exclusion of remaining erythrocytes and cell debris. These thymocytes or thymic emigrants were further characterized using a biotin-conjugated anti-CD3 mAb (145-2C11), purchased from Pharmingen. Streptavidin-conjugated RED-670 (GIBCO BRL) was used to reveal the CD3. Based on individual controls, appropriate gates, defining the CFSE-labeled cells, were established either to determine the percentage of CFSE⁺ cells within the thymus or within a phenotypic subset, in the lymph nodes and spleen.

In vitro CFSE retention assay

CFSE solutions, at a final concentration of 12.5 µg/ml, were prepared in either RPMI complete culture medium, or in UEA-I or UEA-II solutions (the latter two at final concentrations of 3.8×10^{-3} mg/ml). These solutions were then filtered on 0.2µm

Sarstedt filters. Duplicates samples of 300 μ l of each solution were placed into wells of a 24-flat-bottom well tissue culture plate. Splenic lymphocytes were then isolated and adjusted to a concentration of 2×10^8 cells/ml in culture medium. Fifty μ l of this cell suspension were added to each well and dispersed. Cells in culture medium alone were used to assess the autofluorescence. Following an initial pre-incubation period of 18 h at 37°C and 7% CO₂, cells were washed twice with PBS, resuspended in complete culture medium, and placed back into culture for an additional 6 or 30 h. Following this culture period, cells were washed and resuspended in MT-PBS (+ 1% FCS) for cytometric analysis to establish stain loss.

Thymocyte proliferation assay

Freshly isolated thymocytes were adjusted to either 5×10^5 , 1×10^6 or 1×10^7 cells/ml in RPMI complete culture medium (RPMI 1640 culture medium, supplemented with 5×10^{-5} M 2-ME, 20 mM Hepes, penicillin/streptomycin, and 10% FCS). All of the above reagents were purchased from GIBCO BRL. Cell suspensions (100 μ l) were added to wells of flat-bottom Linbro/Titertek microtitre plates (Flow Laboratories, VA), along with Con A (Sigma) (10 μ g/ml), or UEA-I or UEA-II (10-100 μ g/ml) in a final volume of 200 μ l. Cells were then incubated at 37° C and 7% CO₂ for 24-72 h, and pulsed with 1 μ Ci/well of ³H Thymidine (71 Ci/mM stock solution; ICN, Costa Mesa, CA), 18 h prior to readout.

Cell cycle analysis of thymocytes

Thymocyte suspensions were stained with an anti-CD3 mAb followed by an FITC-conjugated anti-hamster IgG. Once stained, cells were washed twice with a PBS-glucose (0.1%) solution. Pelleted cells were then fixed and permeabilized with cold 70% ethanol and kept at 4°C overnight. Thymocytes were centrifuged at 2500 RPM for 5 min and resuspended in a propidium iodide solution (PBS-glucose (0.1%), 40 U/ml RNase (USB, Cleveland, OH), 1µg/ml propidium iodide) for at least 30 min before cytometric analysis. Doublets were discriminated and eliminated from analysis.

Statistical analyses

The Student's *t* test was used for statistical significance.

Results

Influence of UEA-I on cell viability

To ascertain that exposure to UEA-I would not alter cell viability, thymocytes were incubated in the absence or presence of UEA-I at a concentration exceeding that to be

used *in vivo*. At all time points (Table 1), no significant differences in cell viabilities were noted in the UEA-I-treated cells compared to their RPMI controls. Likewise, the *in situ* exposure of thymocytes to UEA-I did not alter cell viabilities 1 and 3 days post-UEA-I injection (Table 2).

Intrathymically injected UEA-I localizes to TMECs

The aim of this experiment was to determine whether or not intrathymically injected UEA-I localized exclusively on thymic medullary epithelial cells as did UEA-I applied to frozen sections. Three days after injection, intensely labeled cells, revealed by anti-UEA-I Ab on frozen sections, were in fact found exclusively in the medulla (Fig. 1a); and after ten days, staining, although greatly diminished, could still be detected. The staining pattern of UEA-I injected intrathymically proved, therefore, to be identical to that of UEA-I applied to a section of a non-injected thymus (Fig. 1b). UEA-II used as a control in some of the subsequent experiments, could also be detected by anti-UEA-I Ab in the ELISA test (not shown), but whether injected or applied to frozen sections, it stained only the occasional cells in the thymus (too few to correspond to any identifiable population). On the basis of these data, it was decided that UEA-I could be used reliably to selectively induce steric hindrance on the surface of TMECs and possibly interfere with contact between these cells and adjacent thymocytes.

CFSE⁺ thymic emigrants to the lymph nodes increase in UEA I-treated mice

Emigration of thymocytes is one of the activities which could conceivably be controlled by TMECs, so that hindering access to the latter could modify this activity. We therefore injected intrathymically UEA-I to saturate the plasma membrane of TMECs. Simultaneously, we injected CFSE to stain a random sample of thymocytes. Various times thereafter, axillary and inguinal lymph node lymphocytes were collected and stained with an anti-CD3 mAb. Hence CFSE⁺CD3⁺ double-labeled cells represented thymic emigrants present amongst total T cells. These thymic emigrants within the lymph nodes (Fig. 2a) of UEA-I-treated mice showed a linear increase from day 1 to day 5, whereupon they reached a maximum of approximately 10% of total T cells, that is, almost 5 times the number seen in either control group (2.13% and 2.72% for UEA-II and PBS-treated mice, respectively). A slight decrease was observed at day 7, but emigrants of that cohort remained at a plateau until day 10, representing 6.92% of total T cells, never quite reaching base levels of PBS (4.20%) or UEA-II-injected mice (2.64%). All values were significantly different from those of both the PBS and the UEA-II control groups ($P < 0.05$), except for day 1. Thus, an increase of CFSE⁺ thymocyte emigration to the lymph nodes was seen in UEA-I-treated mice.

CFSE⁺ thymic emigrants in the spleen

The kinetic profile of CFSE⁺ thymic emigrants detected in the spleen of UEA-I-treated mice (Fig. 2b) was generally similar, with few notable variations, to that observed in the

lymph nodes. While thymic emigrants in both control groups lingered at approximately 4% of total T cells, those from UEA-I-treated mice showed a sharp increase from day 1 to day 3, attaining a maximum of 11.47% of total CD3⁺ splenic lymphocytes. This represented a greater than 5-fold increase when compared to the UEA-II-treated mice (2.01%), and approximately a 3-fold increase when compared to PBS-treated mice (4.11%). The percentage of emigrated CFSE-stained cells slowly decreased, thereafter, in all groups until day 10, but at this point CD3⁺ cells from UEA-I-treated mice were still at 8.86%, whereas at 2.44% for the UEA-II group and at 5.82% for the PBS-treated group. Thus, as in the case of lymph nodes, an increased CFSE⁺ thymocyte emigration to the spleen was seen in UEA-I-treated mice.

CFSE⁺ thymocytes are also modified

The increased levels of CFSE⁺ T cells immigrating in the lymph nodes and in the spleen raised the question as to whether or not this would be reflected by a proportional decrease in the number of CFSE⁺ resident thymocytes. We therefore assessed the percentage of CD3⁻, CD3^{lo}, and CD3^{hi} thymocytes which were CFSE⁺. No differences were noted in the percentage of CFSE⁺CD3⁻ cells (Fig. 3a) in experimental and control groups, except on day 1. A greater percentage of CFSE⁺CD3^{lo} cells (Fig. 3b) was noted in the UEA-I treated mice, compared to both PBS- and UEA-II-treated mice, for three days following the intrathymic injections (32.41% vs 10.31% and 18.87%, respectively, on day 1 and 13.79% vs 4.8% and 11.2%, respectively, on day 3). Five days after injection, a decrease

in the percentage of CFSE⁺ resident thymocytes was seen in all three groups, with similar values, these cells becoming virtually undetectable in the thymus by day 7. Thus, despite the apparent increase in emigrating cells to the periphery, in UEA-I-treated mice (Fig. 3c), the percentage of CFSE⁺CD3^{hi} thymocytes remained 2-5 fold greater than that in the PBS-injected mice (32.71% vs 12.62% respectively, at day 1 post-injection, and 10.31% vs 2.62% respectively, at day 7 post-injection). Similar results were observed with respect to the UEA-II control mice. This larger number of CFSE⁺ thymocytes, in the UEA-I-treated mice, especially in the CD3^{hi} subset, could be due to: a) a preferential retention of the CFSE within the thymocytes caused directly by UEA-I, or b) a modified proliferation rate of thymocytes, resulting in higher numbers of CFSE⁺ cells. These possibilities were examined in the subsequent two experiments.

UEA-I does not cause a retention of CFSE within cells

To evaluate whether UEA-I could cause the retention of CFSE within cells, lymphocytes were incubated *in vitro* for 18 h, with either CFSE alone, or with CFSE and UEA-I, or CFSE and UEA-II. Lymphocytes were then washed, to remove excess CFSE, and placed back into culture for a further 6 or 30 h. CFSE⁺ cells were then assessed by flow cytometry. It was clear (Fig. 4), that UEA-I did not bring about a retention of CFSE within cells. The percentage of lymphocytes which were CFSE⁺ was the same within all three groups, and fell at the same rate.

UEA-I does not induce proliferation in vitro

It is well known that some lectins such as ConA, induce proliferation of selected lymphocyte populations. The proliferative effect of UEA-I had not hitherto been documented, and in the light of the results described above, it was felt that this information should be obtained in a controlled environment. The proliferative response of thymocytes to UEA-I was therefore measured *in vitro*. Strong thymocyte proliferation (Fig. 5) was noted with ConA, whereas UEA-I, by itself, did not elicit a proliferative response ($p > 0.05$).

The rate of thymocyte emigration to the periphery is not altered in UEA-I-treated mice

The ratio of $CFSE^+CD3^+$ peripheral lymphocytes at a given observation day/ $CFSE^+CD3^{hi}$ thymocytes at the *previous* observation day was calculated in the three groups, at various times post-injection (Fig 6). The time lag used in the calculation of the ratios between thymocytes and peripheral lymphocytes, was to allow time for the thymocyte emigration and resettlement in target organs. In all three groups, the accumulation with time of $CFSE^+$ emigrant thymocytes occurred at almost identical rates, as illustrated by the nearly overlapping curves. Thus, UEA-I treatment of thymuses did not alter the rate of thymocyte emigration to the periphery.

Decreased proliferation of CD3⁻ and CD3^{lo} thymocytes in UEA-I- treated thymuses

Although we could not detect any mitogenic effect of UEA-I on thymocytes *in vitro*, the question arose as to whether UEA-I could modify the proliferation of thymocytes in their natural environment. Hence, mice were treated with UEA-I intrathymically, and 3 days following the injection, thymocytes were isolated, and their cell cycle was analyzed. The percentages of thymocytes, from PBS- or UEA-I-treated mice, in the G₀G₁ and in the S/G₂M phases of the cell cycle, were determined (Table 3). The percentages of cells in the S/G₂M phases were significantly decreased in the UEA-I treated group, compared to the PBS control group, in both the CD3⁻ and CD3^{lo} thymocyte subsets. No observable difference in CD3^{hi} thymocyte proliferation was noted between UEA-I- and PBS-treated mice. Therefore the proliferation of thymocyte populations which normally divide actively (CD3⁻ and CD3^{lo}, but not that of CD3^{hi}) thymocytes, was inhibited in UEA-I-treated thymuses.

Discussion:

We have shown that a major subset of thymic medullary epithelial cells can modulate the proliferation of CD3⁻ and CD3^{lo} thymocytes in the adult thymus but does not affect the rate of emigration of mature thymocytes to the periphery.

Our initial data indicated that there was an overall increase in the percentage of emigrating CFSE⁺ thymocytes to both the lymph nodes and the spleen in UEA-I treated mice, compared to controls. As a result of this apparent increase in thymocyte export to the periphery, it would have been logical to assume a corresponding decrease of CFSE-labeled cells in the thymus, especially within the CD3^{hi} thymocyte subset. What was in fact observed was that the *in vivo* blockage of TMECs by UEA-I resulted in an accumulation of CFSE⁺ thymocytes in all three subsets, CD3⁻, CD3^{lo} and especially CD3^{hi}. In an attempt to resolve this paradox, the following points were established: 1) UEA-I did not cause a preferential retention of CFSE within cells, 2) thymocytes which had already been exported to the periphery (CFSE⁺), did not recirculate back to the thymus in significant numbers (28), 3) the UEA-I lectin could not act as a mitogen by itself, 4) the blockage of TMECs by UEA-I actually inhibited the proliferation of CD3⁻ and CD3^{lo} thymocytes, but not of CD3^{hi} cells. As explained in the introduction, reduced cell proliferation prevents intracellular CFSE dilution and hence results in a prolonged retention of the marker. This was in fact what we observed in CD3⁻ and CD3^{lo} cells. Since these CD3^{lo} cells, which differentiate into CD3^{hi}, had undergone less proliferation in the UEA-I-treated group, CFSE underwent less dilution, remained longer and as a result, more CD3^{hi}CFSE⁺ cells were found in that group. Thus, the increased number of CFSE⁺ cells in the periphery in the UEA-I group does not reflect an increased number of emigrants but simply more CFSE⁺ cells among the same number of emigrants. Emigration rates were indeed confirmed to be virtually identical in all three groups by the parallel migration curves.

The possibility of toxicity due to UEA-I exposure was categorically ruled out on the basis of the following arguments: 1) no differences in cell viability were observed when thymocytes from young adults were exposed to UEA-I either *in vitro* or *in vivo*. One interpretation of the results thus obtained is that the blockage of TMEC by UEA-I partially inhibits the proliferation of immature thymocytes. Interestingly, the number of mature, SP cells is unchanged. In our *in vivo* experiments, we had noted a transient decrease in the number of CD3⁺ and CD3^{lo} cells; the proportion of these cells was quickly re-established thereafter, no doubt, by new, incoming thymic precursors. It should be noted, that the effects attributed to UEA-I could be, in part, due to the non-specific introduction of a foreign protein, and the associated architectural disruption. The specific effects of UEA-I derives from contact blockage between thymocytes and TMECs. As a specificity control for UEA-I, we chose UEA-II which does not bind TMECs. In fact, in some instances, UEA-II gives results intermediate between the PBS or culture medium control groups and the UEA-I-treated groups. Taken together, these results indicate that TMECs are involved in the control of thymocyte proliferation, which modulate the rate of differentiation from DP to SP thymocytes.

The principal observation made in the present work, is that a subset of medullary epithelial cells participates in modulating the proliferation of sub-capsular DN thymocytes, and of the cortical, DP thymocytes, two subpopulations which are distant from the medulla, and which do not come into contact with TMECs. We propose the following scenario as one possible explanation for these observations: contact between UEA-I⁺ TMECs and medullary thymocytes activates either or both of these cells and leads to the production of soluble factors, probably cytokines, which in turn induce the

cortical thymocytes to proliferate. In the presence of UEA-I, contact between TMECs and adjacent medullary thymocytes was at least hampered, if not totally blocked, so that the ensuing activation events may have been inhibited. In fact, we had previously shown that the *in vitro* adhesion between thymic epithelial cells and thymocytes was reduced by approximately a half in the presence of UEA-I (27). While each discrete step of this scenario has been documented in various studies, the experiments described here provide a possible overall explanation. It is well established that contact between thymic epithelial cells and thymocytes does occur (26, 29-33), *inter alia* via the antigen-independent molecular interactions between CD2/LFA-3 and LFA-1/ICAM-1 ligand pairs (34). Hence, lympho-epithelial contact results in the activation of one or both cell types, as was shown by the upregulation of a specific thymic epithelial glycoprotein (35), by the activation of arachidonic acid metabolism in these same cells (36) known to participate in T cell development (37). Moreover, lympho-epithelial interactions have been shown to induce either cytokine production or cytokine modulation in both epithelial cells and thymocytes. For instance, IL-6 production was increased in epithelial cells (38), as was IL-1 β , while IL-7 was decreased (39). Conversely, an increase in IL-2 and decrease in IL-7 expression was reported in thymocytes in contact with epithelial cells (39). A number of cytokines produced by one or both of these cell types are known to induce cell division. Thus IL-1, IL-3 and GM-CSF produced by thymic epithelial cells stimulate DN thymocyte proliferation (40). Likewise, IL-6 and G-CSF found in supernatants of cultured thymic epithelial cells induce the proliferation of mature T cell clones, accompanied by the endogenous secretion of IL-4 by these same T cells (41).

Hence, cytokine production resulting from such lympho-epithelial interactions can act both on adjacent cells and on distant cells as well.

In an organ with such complex proliferative activities, it is conceivable, indeed probable, that a central traffic control system exists, and it could well be the UEA- I^+ TMECs that play this role.

Acknowledgements

We thank Ms. Claire Beauchemin for technical assistance and Mr. Marcel Desrosiers for flow cytometry assistance.

References

1. Denning, S.M., Kurtzberg, J., Leslie, D.S., and Haynes, B.F., Human postnatal CD4⁺CD8⁻CD3⁻ thymic T cell precursors differentiate *in vitro* into T cell receptor delta-bearing cells. *J. Immunol.* **142**, 2988-2997, 1989.
2. Nikolic-Zugic, J., and Moore, M.W., T cell receptor expression on immature thymocytes with *in vivo* and *in vitro* precursor potential. *Eur. J. Immunol.* **19**, 1957-1960, 1989.
3. Groettrup, M., Ungewiss, K., Azogui, O., Palacios, R., Owen, M.J., Hayday, A.C., and von Boehmer, H., A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor β chain and a 33 kD glycoprotein. *Cell* **75**, 283-294, 1993.
4. Dudley, E.C., Petrie, H.T., Shah, L.M., Owen, M.J., and Hayday, A.C., T-cell receptor β chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* **1**, 83-93, 1994.
5. Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H.J., and von Boehmer, H., Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* **266**, 1208-1212, 1994.

6. Huessman, M., Scott, B., Kisielow, P., and von Boehmer, H., Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T-cell receptor transgenic mice. *Cell* **66**, 533-540, 1991.
7. Surh, C.D., and Sprent, J., T-cell apoptosis detected *in situ* during positive and negative selection in the thymus. *Nature* **372**, 100-103, 1994.
8. Von Boehmer, H., Positive selection of lymphocytes. *Cell* **76**, 219-228, 1994.
9. Egerton, M., Scollay, R., and Shortman, K., Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**, 2579-2582, 1990.
10. Lucas, B., Vasseur, F., and Pénit, C., Production, selection, and maturation of thymocytes with high surface density of TCR. *J. Immunol.* **153**, 53-62, 1994.
11. Lucas, B., Vasseur, F., and Pénit, C., The normal sequence of phenotypic transitions in one cohort of BrdUrd-pulse labeled thymocytes: correlation with T cell receptor expression. *J. Immunol.* **151**, 4574-4582, 1993.
12. Vernachio, J., Li, M., Donnenberg, A.D., and Soloski, M.J., Qa-2 expression in the adult murine thymus. *J. Immunol.* **142**, 48-56, 1989.

13. Wallace, V.A., Fung-Leung, W.P., Tims, E., Gray, D., Kishihara, K., Lo, D.Y., Penninger, J.P., and Mak, T.W. CD45RA and CD45RB^{high} expression induced by thymic selection events. *J. Exp. Med.* **176**, 1657-1663, 1992.
14. Ramsdell, F., Jenkins, M., Dinh, Q., and Fowlkes, B.J. The majority of CD4⁺8⁻ thymocytes are functionally immature. *J. Immunol.* **147**, 1779-1785, 1991.
15. Guidos, C.J., Danska, J.S., Fathman, C.G., and Weissman, I.L., T cell receptor-mediated negative selection of autoreactive T lymphocyte precursors occurs after commitment to the CD4 or CD8 lineages. *J. Exp. Med.* **172**, 835-845, 1990.
16. Hosono, M., Kurozumi, M., Ideyama, S., and Katsura, Y., Neonatal tolerance induction in the thymus to MHC-class-II-associated antigens. V. Thymus medulla and the site for deletional signaling achievement in Mls tolerance. *Thymus* **20**, 31-45, 1992.
17. Kishimoto, H., Cai, Z., Brunmark, A., Jackson, M.R., Peterson, P.A., and Sprent, J., Differing roles for B7 and intercellular adhesion molecule-1 in negative selection of thymocytes. *J. Exp. Med.* **184**, 531-537, 1996.
18. Kishimoto, H., and Sprent, J., Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J. Exp. Med.* **185**, 263-271, 1997.

19. Shortman, K., Vremec, D., and Egerton, M., The kinetic of T cell antigen receptor expression by subgroups of CD4⁺8⁺ thymocytes: delineation of CD4⁺8⁺3⁺ thymocytes as post-selection intermediates leading to mature T cells. *J. Exp. Med.* **173**, 323-332, 1991.
20. Pénit, C., and Vasseur, F., Expansion of mature thymocyte subsets before emigration to the periphery. *J. Immunol.* **159**, 4848-4856, 1997.
21. Hare, K.J, Wilkinson, R.W., Jenkinson, E.J., and Anderson, G., Identification of a developmentally regulated phase of postselection expansion driven by thymic epithelium. *J. Immunol.* **160**, 3666-3672, 1998.
22. Lyons, A.B., and Parish, C.R., Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **171**, 131-137, 1994.
23. Fulcher, D.A., Lyons, A.B., Korn, S.L., Cook, M.C., Koleda, C., Parish, C., Fazekas de St Groth, B., and Basten, A., The fate of self reactive B cells depends primarily on the degree of antigen receptor engagement and availability of the T cell help. *J. Exp. Med.* **183**, 2313-2328, 1996.
24. Graziano, M., St-Pierre, Y., Beauchemin, C., Desrosiers, M., and Potworowski, E.F., The fate of thymocytes labeled *in vivo* with CFSE. *Exp. Cell Res.* **240**, 75-85, 1998.

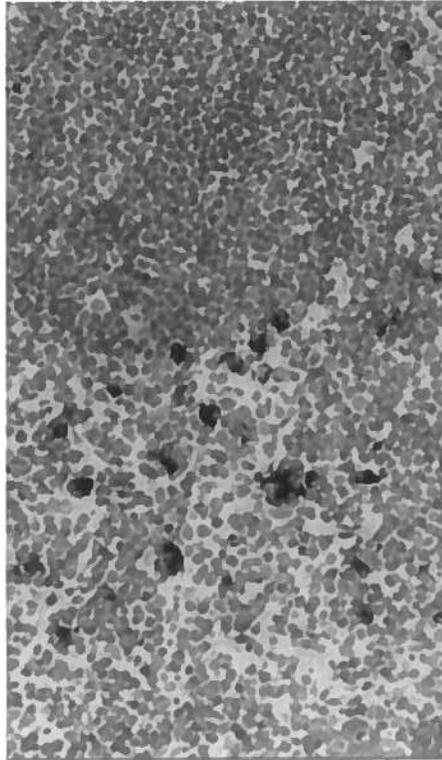
25. Farr, A.G., and Anderson, S.K., Epithelial heterogeneity in the murine thymus: fucose-specific lectins bind medullary epithelial cells. *J. Immunol.* **134**, 2971-2977, 1985.
26. Agus, D.B., Surh, C.D., and Sprent, J., Reentry of T cells to the adult thymus is restricted to activated T cells. *J. Exp. Med.* **173**, 1039-1046, 1991.
27. Graziano, M., St-Pierre, Y., and Potworowski, E.F., UEA-I-binding to thymic medullary epithelial cells selectively reduces numbers of cortical TCR $\alpha\beta$ ⁺ thymocytes in FTOCs. *Immunol. Lett.* **77**, 143-150, 2001.
28. Hugo, P., and Potworowski, E.F., Dynamics of complex formation between thymocytes and thymic medullary epithelial cells. *Scand. J. Immunol.* **29**, 399-408, 1989.
29. Potworowski, E.F., Thibodeau, L., and Zelechowska, M.G., Specific adherence of thymocytes to a thymic medullary epithelial cell line. *Immunol. Lett.* **13**, 89-94, 1986.
30. Couture, C., Patel, P.C., and Potworowski, E.F., A novel thymic epithelial adhesion molecule. *Eur. J. Immunol.* **20**, 2769-2773, 1990.
31. Lepesant, H., Reggio, H., Pierres, M., and Naquet, P., Mouse thymic epithelial cell lines interact with and select a CD3^{low}CD4⁺CD8⁺ thymocyte subset through an LFA-1-dependent adhesion-de-adhesion mechanism. *Int. Immunol.* **2**, 1021-1032, 1990.

32. De Mello-Coelho, V., Villa-Verde, D.M., Dardenne, M., and Savino, W., Pituitary hormones modulate cell-cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. *J. Neuroimmunol.* **76**, 39-49, 1997.
33. Dalmau, S.R., Freitas, C.S., and Savino, W., Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of thymocytes to thymic epithelial cells during the early stages of differentiation: lessons from sublethally irradiated mice. *Blood* **93**, 974-990, 1999.
34. Singer K.H., Denning, S.M., Whichard L.P., and Haynes, B.F., Thymocyte LFA-1 and thymic epithelial cell ICAM-1 molecules mediate binding of activated human thymocytes to thymic epithelial cells. *J. Immunol.* **144**, 2931-2939, 1990.
35. Potworowski, E.F., Chamberland, C., Beauchemin, C., and Marceau, N., Up-regulation of a thymic epithelial ligand after contact with thymocytes. *Cell. Immunol.* **153**, 256-261, 1994.
36. Sun, L., Piltch, A.S., Liu, P.S., Johnson, L.A., and Hayashi, J., Thymocytes stimulate metabolism of arachidonic acid in rat thymic epithelial cells. *Cell. Immunol.* **131**, 86-97, 1990.

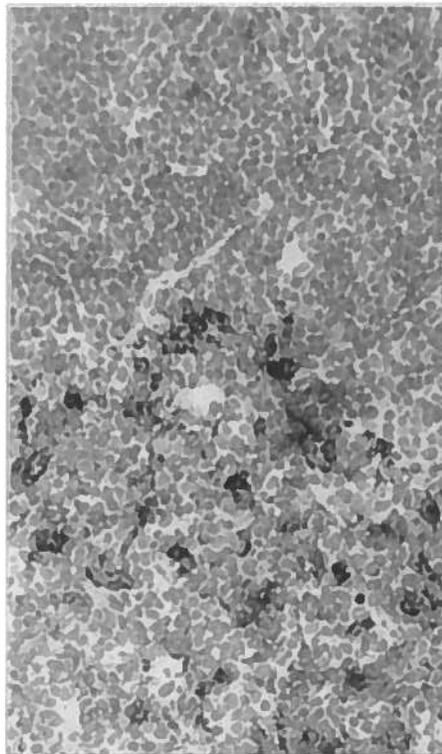
37. Demeure, C.E., Yang, L.P., Desjardins, C., Raynauld, P., and Delespesse, G., Prostaglandin E2 primes naïve T cells for the production of anti-inflammatory cytokines. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3526-3531, 1997.
38. Meilin, A., Shoham, J., Schreiber, L., and Sharabi, Y., The role of thymocytes in regulating thymic epithelial cell growth and function. *Scand. J. Immunol.* **42**, 185-190, 1995.
39. Napolitano, M., Bellavia, D., Maroder, M., Farina, M., Vacca, A., Frati, L., Gulino, A., and Screpanti, I., Modulation of cytokine gene expression by thymic lympho-stromal cell to cell interaction: effect of retinoic acid. *Thymus* **24**, 247-258, 1997.
40. Denning, S.M., Kurtzberg, J., Le, P.T., Tuck, D.T., Singer, K.H., and Haynes, B.F., Human thymic epithelial cells directly induce activation of autologous immature thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 3125-3128, 1988.
41. Meilin, A., Sharabi, Y., and Shoham, J., Analysis of thymic stromal cell subpopulations grown *in vitro* on extracellular matrix in defined medium.--V. Proliferation regulating activities in supernatants of human thymic epithelial cell cultures. *Int. J. Immunopharmacol.* **19**, 39-47, 1997.

ARTICLE II FIGURE 1: Immunohistochemical localization of UEA-I-labeled TMECs. (A) Section of thymus, 3 days post-injection with UEA-I, treated with anti-UEA-I Ab. Note that *in vivo* labeled cells are intensely stained and also exclusively localized to the medulla (bottom), while no staining is visible in the cortex (top). (B) Thymus section treated with UEA-I and with anti-UEA-I Ab. X 160.

A)

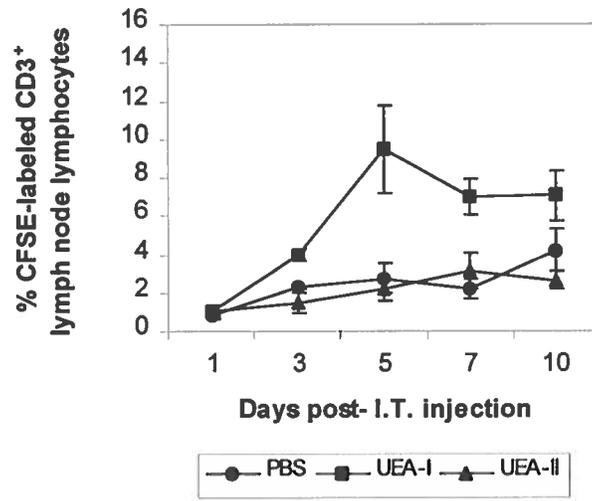


B)

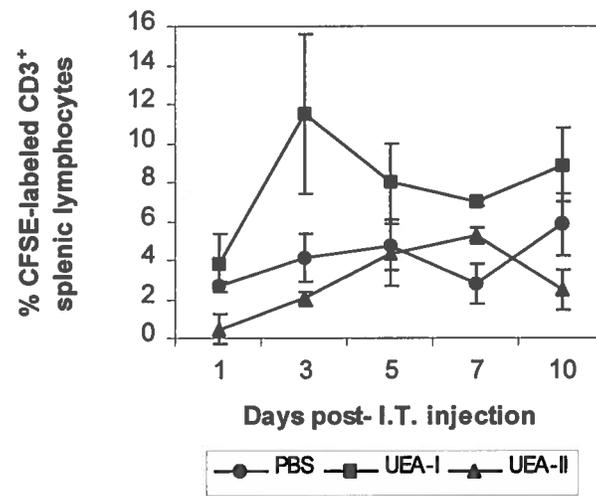


ARTICLE II FIGURE 2: CFSE⁺CD3⁺ lymphocytes, various times after I.T. injection with either PBS , UEA-I or UEA-II. Lymphocytes were stained with biotin-conjugated anti-CD3 mAb and revealed by the streptavidin-conjugated RED-670 tandem. (A) Pooled inguinal and axillary lymph node lymphocytes. (B) Splenic lymphocytes. Results are expressed as the mean % of CFSE⁺CD3⁺ lymphocytes \pm SD for each time point.

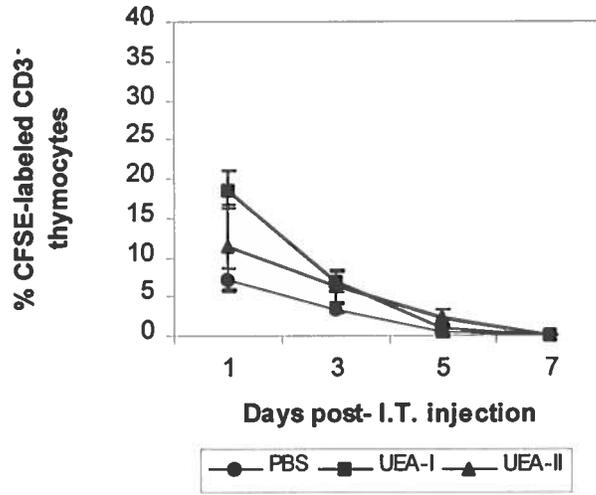
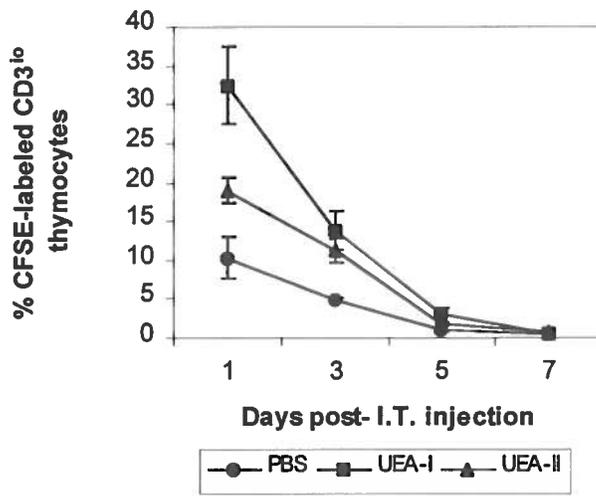
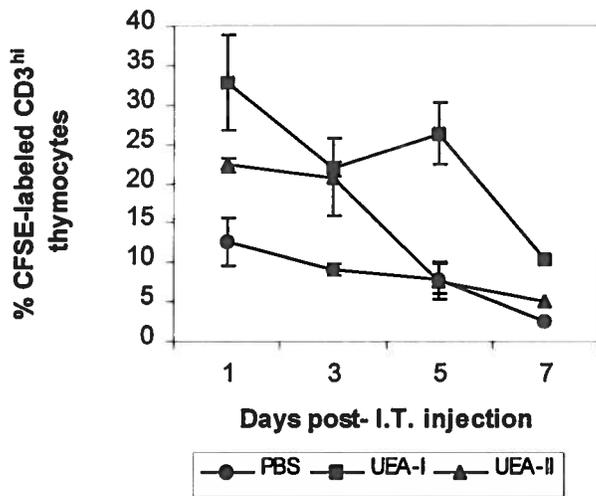
A



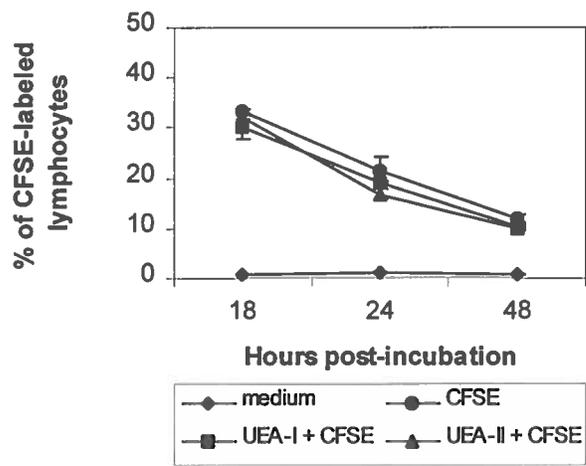
B



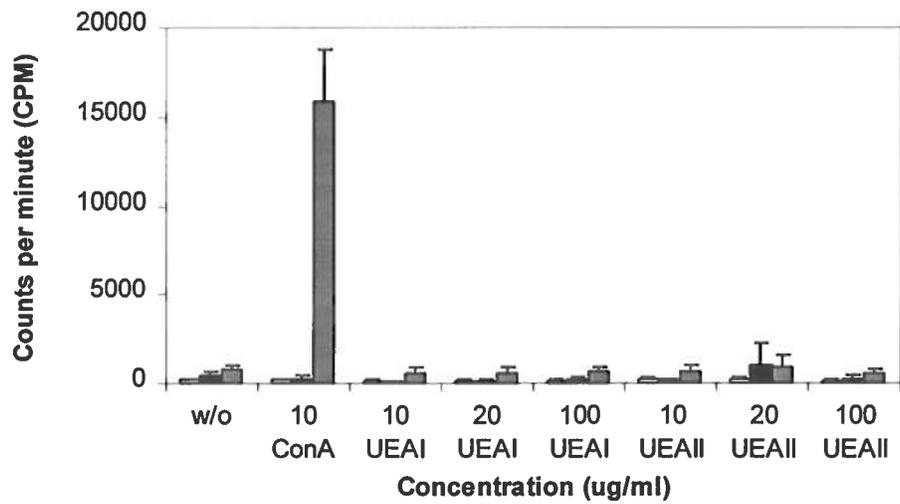
ARTICLE II FIGURE 3: CD3 profile of CFSE⁺ thymocytes, following simultaneous I.T. injections with either PBS and CFSE, UEA-I and CFSE or UEA-II and CFSE. (A) % of CD3⁻ (B) % of CD3^{lo} and (C) % of CD3^{hi} thymocytes labeled with CFSE. Results are expressed as means \pm SD for each time point.

A**B****C**

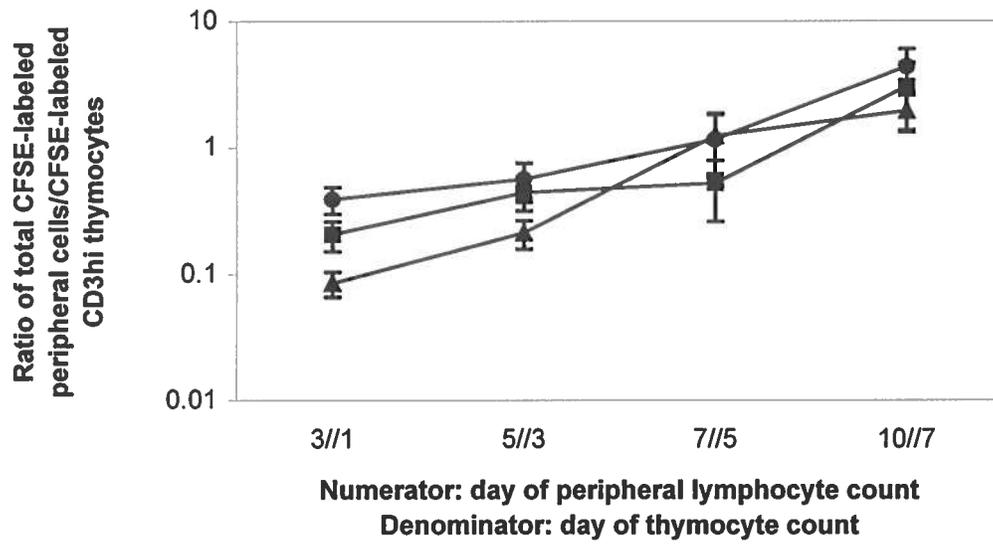
ARTICLE II FIGURE 4: Effects of UEA-I on the retention of CFSE within lymphocytes. % of lymphocytes which have retained the CFSE staining, 6 and 30 hours following an initial incubation period of 18 hours with either CFSE alone, UEA-I and CFSE, or UEA-II and CFSE, as determined by flow cytometry. Culture medium alone was used to determine autofluorescence of cells. Results are expressed as means \pm SD for each time point.



ARTICLE II FIGURE 5: *In vitro* proliferation assay. Thymocytes were cultured for 72 hours with 10-100 $\mu\text{g/ml}$ of either UEA-I or UEA-II. Con A-stimulated cells served as the positive control, whereas unstimulated cells served as the negative control. Proliferation was determined by incorporation of radioactive thymidine and quantified in CPMs using a β -scintillation counter. (empty bars: 0.5×10^5 cells, solid bars: 0.1×10^6 cells, striped bars: 1.0×10^6 cells). Results are presented as means \pm SD of duplicate samples.



ARTICLE II FIGURE 6: Rate of thymic emigration. Ratio of the CFSE⁺CD3⁺ lymphocytes (splenic and lymph nodes) over CFSE⁺CD3^{hi} thymocytes, following simultaneous I.T. injections with either PBS and CFSE, UEA-I and CFSE, or UEA-II and CFSE. Note that a 2-3 day delay was used in ratios between peripheral lymphocytes and thymocytes, to allow for the emigration and for resettlement in target organs. Results are expressed as means \pm SD.



ARTICLE II Table 1: *Viability of thymocytes (%) in vitro.*

Incubation Time	Treatment	
	medium	UEA-I ^a
0 min	97.51 ± 0.84	96.00 ± 2.23
60 min	97.49 ± 1.44	96.79 ± 1.49
110 min	96.17 ± 1.63	96.60 ± 0.82
165 min	95.44 ± 2.06	96.11 ± 1.46
24 h	81.75 ± 5.18	84.95 ± 2.80

^aUEA-I is not significantly different from medium for all time points.

ARTICLE II Table 2: *Viability of thymocytes (%) in situ.*

Material injected	Days post-injection	
	1	3
CFSE	87.08 ± 2.38	95.82 ± 1.75
UEA-I + CFSE	81.55 ± 4.29 ^a	92.21 ± 4.81 ^c
UEA-II + CFSE	84.58 ± 6.29 ^b	87.37 ± 3.20 ^d

^aUEA-I + CFSE is not significantly different from CFSE (p=0.05), nor from UEA-II.

^bUEA-II + CFSE is not significantly different from CFSE.

^cUEA-I + CFSE is not significantly different from CFSE, nor from UEA-II.

^dUEA-II + CFSE is significantly different from CFSE (p<0.05).

ARTICLE II Table 3: Cell cycle analysis of thymocyte subsets , 3 days post-I.T. injection with either PBS or UEA-I.

		G ₀ G ₁ (%)	S and G ₂ M (%)
CD3⁻	PBS	94.00 ± 0.42	5.55 ± 0.64 ^a
	UEA-I	97.40 ± 0.90	1.97 ± 0.75 ^a
CD3^{lo}	PBS	95.95 ± 0.07	3.80 ± 0.40 ^b
	UEA-I	98.33 ± 0.25	1.37 ± 0.25 ^b
CD3^{hi}	PBS	99.15 ± 0.07	0.60 ± 0.14
	UEA-I	99.03 ± 0.11	0.73 ± 0.11

^ap < 0.05.

^bp < 0.005.

RÉSUMÉ ARTICLE III

Les cellules épithéliales médullaires (CEM) représentent le principal type de cellules stromales dans le thymus, quoique leur rôle reste peu connu. Certaines CEM expriment des protéines membranaires, possédants des groupements glycosylés par le L-fucose, qui se lient spécifiquement à la lectine UEA-I. Nous avons exploité cette observation dans le but d'étudier les conséquences d'un blocage *in situ* de CEM, par le UEA-I, utilisant des FTOC comme modèle. Dans les FTOC traités avec UEA-I, nous avons observé une diminution des cellules parmi les $\text{TCR}\alpha\beta^+$ mais pas des cellules $\text{TCR}\gamma\delta^+$. En effet, les cellules corticales $\text{CD}3^-$ et $\text{CD}3^{\text{lo}}$ avaient chuté de façon marquée tandis que les cellules $\text{CD}3^{\text{hi}}$ étaient inaltérées. Puisque les sous-populations de cellules affectées se retrouvent dans un compartiment différent de celui où le UEA-I se lie, il est probable que l'effet soit médié via un facteur soluble. Ainsi deux mécanismes possibles sont proposés : un abaissement de l'activation soit de CEM, soit de thymocytes qui généralement se lient à eux, engendre une diminution de la production de facteurs solubles responsables de la prolifération de thymocytes corticaux. Alternativement, l'attachement de UEA-I aux CEM pourrait activer ces dernières et les inciter à produire des signaux inhibiteurs pour les thymocytes corticaux.

ARTICLE III

Full title: **UEA-I-binding to thymic medullary epithelial cells selectively reduces numbers of cortical TCR $\alpha\beta$ ⁺ thymocytes in FTOCs**

Authors' names: Monica Graziano, Yves St-Pierre, and Edouard F. Potworowski

Authors' affiliation: Human Health Research Center, INRS-Institut Armand Frappier

Correspondence: Edouard F. Potworowski
Human Health Research Center, INRS-Institut Armand Frappier
531 boul. des Prairies, Laval, Qc, Canada, H7N-4Z3
e-mail: edouard_potworowski@inrs-iaf.quebec.ca
Tel: (450)-687-5010 ext: 5370
FAX: (450)-686-5501

Key words: Thymus, stromal cells, T lymphocytes, cell-to-cell interactions, UEA-I

Immunology Letters **77**, 143-150 (2001)

1. Summary

Thymic medullary epithelial cells (TMECs) constitute a major stromal cell type, the function of which is incompletely understood. Some TMECs express L-fucose-glycosylated proteins on their plasma membrane; these have been shown to specifically bind the lectin UEA-I. We exploited this observation to investigate the consequences of *in situ* blockage of TMECs in FTOCs by UEA-I. In UEA-I-treated FTOCs, we noted a decreased cellularity among TCR $\alpha\beta$ ⁺ but not TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells. In fact, CD3⁻ and CD3^{lo} cortical cells were markedly depleted, while CD3^{hi} cells were unaffected. Since the affected cell subsets are in a different compartment from that where UEA-I binding occurs, it is likely that the effect is mediated through a soluble factor. Two possible mechanisms are proposed: a reduced activation of either TMECs or of medullary thymocytes which normally bind to them, results in lowered production of soluble factors responsible for cortical thymocyte proliferation. Alternately, the binding of UEA-I to TMECs could activate the latter to produce signals inhibitory to cortical thymocytes.

2. Introduction

A competent T-cell repertoire is shaped by interactions between immature thymocytes and components of the thymic stroma, consisting mainly of cortical and medullary epithelial cells and fibroblasts, as well as of bone-marrow-derived macrophages and dendritic cells [1,2]. Cortical epithelial cells mainly control the process of positive selection [3,4]. Here, immature DP, CD3^{lo} thymocytes, which have differentiated from a small DN, CD3⁻ population in response to signals mediated by the pre-TCR complex [5-9], proliferate vigorously, up-regulate their TCR and start to down-regulate either the CD4 or CD8 co-receptor molecules. This process is mediated by the recognition, via the TCR, of self MHC-peptide complexes on cortical epithelial cells. Thymocytes that fail positive selection are eliminated by apoptosis [10-12]. Studies regarding the roles of thymic medullary epithelial cells (TMECs) in the selection process on the other hand have been more controversial. Although it has been shown that TMECs do not mediate positive selection [13], several groups have recently suggested that negative selection takes place predominantly in the medulla, and that TMECs play a prominent role [14-17].

The TMEC population is heterogeneous in that at least two subsets have been described, one expressing the conventional MHC molecules (I-A, I-E) [18-20], the other expressing the non-polymorphic I-O molecules [21]. The first subset also co-expresses terminal L-fucosyl residues, which can bind the lectin *Ulex Europaeus* Agglutinin I

(UEA-I) [18]. Hence, immunohistochemistry studies have shown that TMECs expressing I-A (in addition to UEA-I receptors) and I-O molecules were mutually exclusive, except in the fetal thymus, where most TMECs express both [22].

Excised thymic rudiments maintained as fetal thymus organ cultures (FTOCs), provide a unique *in vitro* system which reliably mimics *in vivo* thymocyte development. The flexibility of this system, permitting the addition of various test substances such as cytokines [23,24], antibodies [25,26], and peptides [27,28], while still maintaining an intact thymic architecture, has often been exploited to elucidate the importance of cellular interactions involved in thymocyte development. Thus, FTOCs played an important role in the elucidation of TCR $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell development [29]. These studies indicated that in the fetal thymus, the development of TCR $\gamma\delta$ cells occurs in waves, prior to and during the development of TCR $\alpha\beta$ cells, with the first wave peaking at gestational day 5, and the second at birth. Using FTOCs, Kruisbeek and Fine have shown that blocking either LFA-1, which is normally expressed on most thymocytes, or ICAM-1, expressed on sub-capsular, cortical and medullary stromal cells, impairs the differentiation of DN precursors into DP cells [30].

In the present study, we used FTOCs to investigate the effects of UEA-I binding to TMECs on the development of thymocytes. We showed that the binding of this lectin to a major subset of TMECs selectively reduces the number of TCR $\alpha\beta$ CD3⁺ and CD3^{lo} thymocytes by approximately 36%. Since the affected thymocytes are in a distinct area from that where UEA-I binding occurs, it is postulated that soluble factors are involved.

3. Materials and methods

3.1 Animals

C57BL/6 mice were bred and housed in the Institute's specific pathogen-free animal facility and cared for in compliance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. Fetuses were obtained by overnight matings, with day zero being designated as the day when males were separated from females.

3.2 Blocking agent of thymic medullary epithelial cells

The lectin Ulex Europaeus Agglutinin (UEA-I), which reacts with L-fucose-glycosylated proteins on a subset of thymic medullary epithelial cells, was purchased from Sigma (St. Louis, MO), and a stock solution was prepared in PBS, at a concentration of 2.5 mg/ml.

3.3 Blockage of in vitro adherence of thymocytes to thymic medullary epithelial cells

Thymocyte adherence to E-5 cells thymic epithelial cells [31] was performed essentially as described previously. Blockage was accomplished by the incubation of cells with UEA-I, used at a final concentration of 0.025 mg/ml.

3.4 Viability of thymocytes

Freshly isolated day 15 fetal thymic lobes were placed into wells of a 24-flat-bottom well tissue culture plate in either RPMI complete culture medium alone or with UEA-I at a final concentration of 40 µg/ml. Following a 2 h culture period at 37°C with 7% CO₂, lymphoid cells were released from the lobes, and the resulting suspensions were filtered on nylon wool. Cell viabilities were determined by trypan blue exclusion.

3.5 FTOCs

Fetal thymic organ cultures were performed essentially according to the technique of Robinson and Owen [32]. Briefly, thymic lobes were removed from day 15 fetuses and transferred onto the surface of 0.8 µm Nucleopore filters (Corning Costar U.K., High Wycombe, U.K.) in organ culture. RPMI complete culture medium was used and supplemented, when specified, with UEA-I at a final concentration of 40 µg/ml. Organ cultures were fed every 48 h with 200 µl of culture medium or culture medium supplemented with UEA-I. FTOCs were maintained at 37°C and 7% CO₂ for 12 days. It

must be noted that since even minute variations in culture conditions can markedly affect results, only paired experiments were done in the present work, with both control and experimental lobes coming from the same pool and undergoing identical culture conditions.

3.6 Flow cytometry

Fetal thymocytes were analyzed using an EPICS XL Flow Cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Forward and side scatter analysis allowed the exclusion of cell debris. The following mAb were used to stain cells harvested from FTOCs: biotin-conjugated anti-CD3 mAb (145-2C11, Pharmingen), and anti-HSA mAb (ATCC, M1/69.16.11.HL), which were revealed by the streptavidin-conjugated RED-670 tandem, a PE-conjugated anti- $\gamma\delta$ TCR mAb (GL3, Pharmingen), and an anti-CD25 mAb (ATCC, PC 61 5.3) revealed by a PE-conjugated anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA).

3.7 Immunohistochemistry

Cultured thymic lobes were snap-frozen in OCT embedding medium (Sakura Finetek, Torrance, CA), and cryostat sections (5 μ m) were then incubated in a humid

chamber with either a UEA-I solution (12.5 µg/ml), for a period of 30 min, or directly with a rabbit-anti-UEA-I antibody for 45 min, rinsed and washed in PBS with 0.05% Tween 20, and reincubated with a peroxidase conjugated anti-rabbit mAb (Dakopatts, Denmark) for a subsequent 30 min. UEA-I and both antibodies were diluted in PBS + 1% condensed milk. The reaction was then revealed by a 20-min incubation with the substrate (AEC; an amino carbazole substrate kit from Zymed). Preparations were then mounted in a buffered glycerol solution for observation.

3.8 Statistical analyses

The Student's *t* test was used for statistical significance in the binding assay, and the paired difference test was used for all subsequent FTOC data.

4. Results

To establish the point that UEA-I does in fact hinder contact between thymic medullary epithelial cells and thymocytes, these two cell types were co-cultured with or without UEA-I. We used E-5 cells (a thymic medullary epithelial cell line) which express the L-fucose moiety recognized by UEA-I, (as determined by immunocytochemistry), but to a lesser extent than UEA-I⁺ TMECs *in situ*. Following the co-culture period, the ratio

of adhered thymocytes to medullary epithelial cells was 1.32 ± 0.13 in the cultures with medium alone, and 0.74 ± 0.07 in the cultures with UEA-I. UEA-I therefore reduced adhesion by approximately 50%.

To ascertain that exposure to UEA-I does not alter cell viability, fetal thymocytes were incubated for 2 h in medium alone and with UEA-I at a final concentration of 40 $\mu\text{g/ml}$ (the same concentration used for FTOC cultures). No significant difference in cell viabilities was noted between the two groups ($p = 0.94$). Likewise, the *in vitro* exposure of adult thymocytes to UEA-I for different times, from 0-24 h did not alter cell viabilities (data not shown).

The immunohistochemistry experiment was performed to establish that UEA-I added to the culture medium would localize on thymic medullary epithelial cells *in situ*, as does UEA-I applied to frozen thymic sections. Intensely labeled individual cells and groups of cells in UEA-I-cultures lobes, revealed by anti-UEA-I Ab on frozen sections, were in fact found in the medulla (Fig. 1a). The staining pattern of UEA-I added to culture medium of thymic lobes was therefore identical to that of UEA-I applied to a section of non-treated lobes (Fig. 1b). On the basis of these data and of the contact inhibition data, it was decided that UEA-I could be used reliably to selectively react with the plasma membranes of TMECs and possibly interfere with contact between these cells and adjacent thymocytes *in situ*.

The number of cells/lobe in the UEA-I group was $68.5\% \pm 19.3$ of that in the medium control group ($p < 0.0005$). In addition, a slight decrease in cell viability (5%) was also observed in most UEA-I-treated cultures. In an attempt to define which cell

subsets were affected by UEA-I treatment of fetal thymic cultures, thymocytes from the two groups were stained for CD3. In each experiment, a lesser number of CD3⁺ and CD3^{lo} cells was observed in the UEA-I-treated lobes (Table 1), compared to their untreated counterparts. In fact, by the paired difference test, we noted a significant decrease in the number of CD3⁺ (69%; $p < 0.005$) and CD3^{lo} (60%; $p < 0.0005$) cells in the UEA-I-treated cultures. However, no significant differences in cell numbers were observed between both groups within the CD3^{hi} thymocyte subset, although variability in that subset is very large ($\pm 56.7\%$). This disequilibrium between subsets was shown in the histogram profiles of CD3-stained fetal thymocytes, by an increased proportion of mature CD3^{hi} cells, relative to CD3^{lo} cells (Fig. 2). Two additional markers, which characterize immature thymocytes, were examined (data not shown); the heat-stable antigen (HSA), which is down-regulated on most mature cells [33,34], and the IL-2R, which is typically expressed on immature dividing cells [35]. The absolute number of HSA⁺, and IL-2R⁺ cells in the UEA-I-treated fetal thymic cultures was significantly decreased with respect to untreated cultures, ($p < 0.005$ and $p < 0.001$, respectively). Taken together, the data show that UEA-I treatment of fetal thymic lobes caused a significant decrease in the number of immature thymocytes.

Since significant differences were found in CD3 subsets in UEA-I-treated lobes, it became interesting to determine if both TCR $\alpha\beta$ ⁺ and TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells were equally altered by this same treatment. No significant differences between treated and untreated cultures were observed with respect to the absolute numbers of TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells (Table 2). However,

we noted a 30% reduction in $\text{TCR}\alpha\beta^+$ cell numbers of UEA-I-treated organs. Hence, UEA-I interferes selectively with the $\text{TCR}\alpha\beta$ differentiation pathway.

5. Discussion:

In the present work, we have incubated FTOCs with UEA-I and shown that this lectin binds specifically to medullary epithelial cells. In ancillary experiments, we have also shown that UEA-I decreases the adherence of thymocytes to epithelial cells and that UEA-I does not directly affect thymocyte viability. In FTOCs which had undergone a 12-day culture period with UEA-I, we made four main observations: 1) the total cellularity was decreased, 2) this decrease was due to fewer cortical cells, 3) CD3^{hi} cells were unaffected, and 4) $\text{TCR}\gamma\delta^+$ cells were unaffected. The interpretation of these data is complex because the coating of medullary epithelial cells with UEA-I has an impact not on medullary CD3^{hi} thymocytes, which would be expected to bind the TMECs, but on CD3^- and CD3^{lo} cells which are in a different compartment.

Two possible scenarios can be envisaged to explain this distant effect of UEA-I/TMEC binding. First, TMECs could be physically prevented by UEA-I from binding to medullary thymocytes, so that cell activation (lymphocytic or epithelial) which might have resulted from such interaction does not take place and signals normally transmitted

to the cortex are inhibited, thus preventing some cortical thymocytes from proliferating. In this context, it should be noted that Farr has shown that some thymocytes which are found in contact with UEA-I⁺ TMECs are TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells [36], although it is not clear at present how this ties in with our findings. The second scenario would consist of TMECs being activated by UEA-I, the resulting signal inhibiting cortical cell proliferation (or stimulating the rate of disappearance).

It is well established that contact between thymic epithelial cells and thymocytes [31, 37-41] results in the activation of one or both cell types [42-43]. Moreover, lympho-epithelial interactions have been shown to induce either cytokine production or cytokine modulation in both epithelial cells and thymocytes. For instance, IL-6 production was increased in epithelial cells after coculture with thymocytes [44]. Conversely, an increase in IL-2 and decrease in IL-7 expression was reported in thymocytes after adhesion to epithelial cells [45]. A number of cytokines produced by one or both of these cell types are known to induce cell division. Thus IL-1, IL-3 and GM-CSF produced by thymic epithelial cells stimulate DN thymocyte proliferation [46]. Likewise, IL-6 and G-CSF, found in supernatants of cultured thymic epithelial cells induce the proliferation of mature T cell clones, accompanied by the endogenous secretion of IL-4 by these same T cells [47]. In the case of the present work, it may well be cytokines produced as a result of lympho-epithelial interactions in the medulla that act on cortical thymocytes, and which are inhibited by UEA-I.

It is intriguing to note that the number of CD3^{hi} medullary thymocytes seem unaffected by UEA-I treatment, since these cells are differentiated from the reduced CD3⁻

and CD3^{lo} cortical populations. The regulatory mechanisms controlling the CD3^{lo}-to-CD3^{hi} differentiation rate are unknown, but the relative independence of the size of these subsets has been documented in situations where steroids selectively decrease cortical cells without affecting their medullary progeny [48]. In older thymuses, a similar reversed equilibrium is found, where cortical cells are almost depleted [49]. Thus the size of the medullary compartment seems to be dependent on other factors besides the number of cortical precursors. In addition, the fact that TCR $\gamma\delta$ cells are unaffected indicates that only cortical TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells are depleted by the UEA-I/TMEC modified signal. Most studies regarding inhibitory or enhancing signals resulting from lymphostromal interactions, via soluble mediators or direct cell-to-cell contact, make use of cultured stromal cell lines. In this study, by attaching UEA-I to terminally fucosylated glycoproteins on TMECs *in situ*, we were able to show that medullary lymphoepithelial interactions influence cortical thymocyte proliferation.

Acknowledgements

The authors wish to thank Claire Beauchemin for technical assistance and Marcel Desrosiers for cytometry assistance.

References

1. A.M. Kruisbeek, *Curr. Opin. Immunol.* 5 (1993) 227-234.
2. R.L. Boyd, C.L. Tucek, I.D.I. Godfrey, D.J. Izon, T.J. Wilson, N.J. Davidson, A.G.D. Bean, H.M. Ladyman, M.A. Ritter, P. Hugo, *Immunol. Today* 14 (1993) 445-459.
3. B.B. Ernst, C.D. Surh, J. Sprent, *J. Exp. Med.* 183 (1996) 1235-1240.
4. G. Anderson, J.J. Owen, N.C. Moore, E.J. Jenkinson, *J. Exp. Med.* 179 (1994) 2027-2031.
5. S.M. Denning, J. Kurtzberg, D.S. Leslie, B.F. Haynes, *J. Immunol.* 142 (1989) 2988-2997.
6. J. Nikolic-Zugic, M.W. Moore, *Eur. J. Immunol.* 19 (1989) 1957-1960.
7. M. Groettrup, K. Ungewiss, O. Azogui, R. Palacios, M.J. Owen, A.C. Hayday, H. von Boehmer, *Cell* 75 (1993) 283-294.
8. E.C. Dudley, H.T. Petrie, L.M. Shah, M.J. Owen, A.C. Hayday, *Immunity* 1 (1994) 83-93.

9. C. Saint-Ruf, K. Ungewiss, M. Groettrup, L. Bruno, H.J. Fehling, H. von Boehmer, *Science* 266 (1994) 1208-1212.
10. M. Huessman, B. Scott, P. Kisielow, H. von Boehmer, *Cell* 66 (1991) 533-540.
11. C.D. Surh, J. Sprent, *Nature* 372 (1994) 100-103.
12. H. Von Boehmer, *Cell* 76 (1994) 219-228.
13. J. DeKoning, L. DiMolfetto, C. Reilly, Q. Wei, W.L. Havran, D. Lo, *J. Immunol.* 158 (1997) 2558-2566.
14. C.J. Guidos, J.S. Danska, C.G. Fathman, I.L. Weissman, *J. Exp. Med.* 172 (1990) 835-845.
15. M. Hosono, M. Kurozumi, S. Ideyama, Y. Katsura, *Thymus* 20 (1992) 31-45.
16. H. Kishimoto, Z. Cai, A. Brunmark, M.R. Jackson, P.A. Peterson, J. Sprent, *J. Exp. Med.* 184 (1996) 531-537.
17. H. Kishimoto, J. Sprent, *J. Exp. Med.* 185 (1997) 263-271.

18. A.G. Farr, S.K. Anderson, *J. Immunol.* 134 (1985) 2971-2977.
19. F.P. Guillemont, P.D. Olivier, B.M. Peault, N.M. Le Douarin, *J. Exp. Med.* 160 (1984) 1803-1819.
20. W. van Ewijk, R.V. Rouse, I.L. Weissman, *J. Histochem. Cytochem.* 28 (1980) 1089-1099.
21. L. Karlsson, C.D. Surh, J. Sprent, P.A. Peterson, *Nature* 351 (1991) 485-488.
22. C.D. Surh, E.-K. Gao, H. Kosaka, D. Lo, C. Ahn, D.B. Murphy, L. Karlsson, P. Peterson, J. Sprent, *J. Exp. Med.* 176 (1992) 495-505.
23. A. Varas, A. Vicente, R. Sacedon, A.G. Zapata, *Blood* 92 (1998) 93-100.
24. G. Leclercq, V. Debacker, M. de Smedt, J. Plum, *Exp Med* 184 (1996) 325-336.
25. M. Kaneta, M. Osawa, K. Sudo, H. Nakauchi, A.G. Farr, Y. Takahama, *J. Immunol.* 164 (2000) 256-264.
26. K. Toyooka, X.G. Tai, C.S. Park, Y. Yashiro, T. Hamaoka, H. Fujiwara, *Immunol. Lett.* 63 (1998) 83-89.

27. O. Williams, R. Tarazona, A. Wack, N. Harker, K. Roderickand, D. Kioussis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 (1998) 5706-5711.
28. C. Girao, Q. Hu, J. Sun, P.G. Ashton-Rickardt, J. Immunol. 159 (1997) 4205-4211.
29. Y. Tatsumi, D. Deluca, R.Q. Cron, J.A. Bluestone, Thymus 23 (1994-95) 131-153.
30. J.S. Fine, A.M. Kruisbeek, J. Immunol. 147 (1991) 2852-2859.
31. P. Hugo, E.F. Potworowski, Scand. J. Immunol. 29 (1989) 399-408.
32. J.H. Robinson, J.J.T. Owen, Clin. Exp. Immunol. 27 (1977) 322-327.
33. B. Lucas, F. Vasseur, C. Pénit, J. Immunol. 153 (1994) 53-62.
34. B. Lucas, F. Vasseur, C. Pénit, J. Immunol. 151 (1993) 4574-4582.
35. M. Pearse, L. Wu, M. Egerton, A. Wilson, K. Shortman, R. Scollay, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (1989) 1614-1618.

36. A. Farr, S. Hosier, A. Nelson, S. Itohara, S. Tonegawa, *J. Immunol.* 144 (1990) 492-498.
37. E.F. Potworowski, L. Thibodeau, M.G. Zelechowska, *Immunol. Lett.* 13 (1986) 89-94.
38. C. Couture, P.C. Patel, E.F. Potworowski, *Eur. J. Immunol.* 20 (1990) 2769-2773.
39. H. Lepesant, H. Reggio, M. Pierres, P. Naquet, *Int. Immunol.* 2 (1990) 1021-1032.
40. V. De Mello-Coelho, D.M. Villa-Verde, M. Dardenne, W. Savino, *J. Neuroimmunol.* 76 (1997) 39-49.
41. S.R. Dalmau, C.S. Freitas, W. Savino, *Blood* 93 (1999) 974-990.
42. E.F. Potworowski, C. Chamberland, C. Beauchemin, N. Marceau, *Cell. Immunol.* 153 (1994) 256-261.
43. L. Sun, A.S. Piltch, P.S. Liu, L.A. Johnson, J. Hayashi, *Cell. Immunol.* 131 (1990) 86-97.
44. A. Meilin, J. Shoham, L. Schreiber, Y. Sharabi, *Scand. J. Immunol.* 42 (1995) 185-190.

45. M. Napolitano, D. Bellavia, M. Maroder, M. Farina, A. Vacca, L. Frati, A. Gulino, I. Screpanti, *Thymus* 24 (1997) 247-258.

46. S.M. Denning, J. Kurtzberg, P.T. Le, D.T. Tuck, K.H. Singer, B.F. Haynes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (1988) 3125-3128.

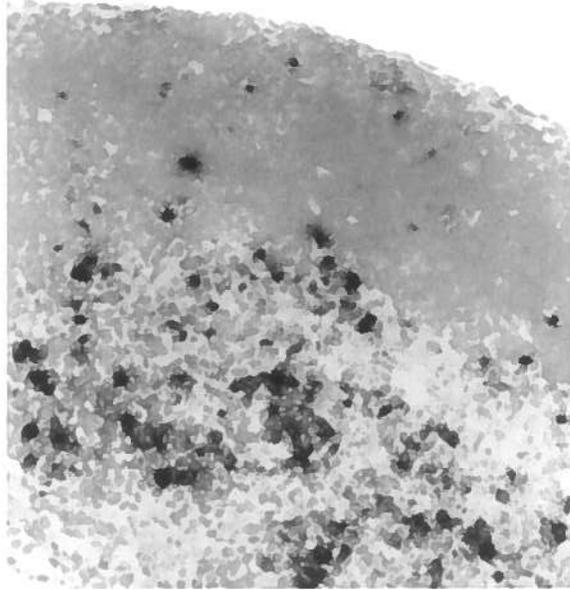
47. A. Meilin, Y. Sharabi, J. Shoham, *Int. J. Immunopharmacol.* 19 (1997) 39-47.

48. T.F. Dougherty, M.L. Berliner, G.L. Schneebeli, D.L. Berliner, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 113 (1964) 825.

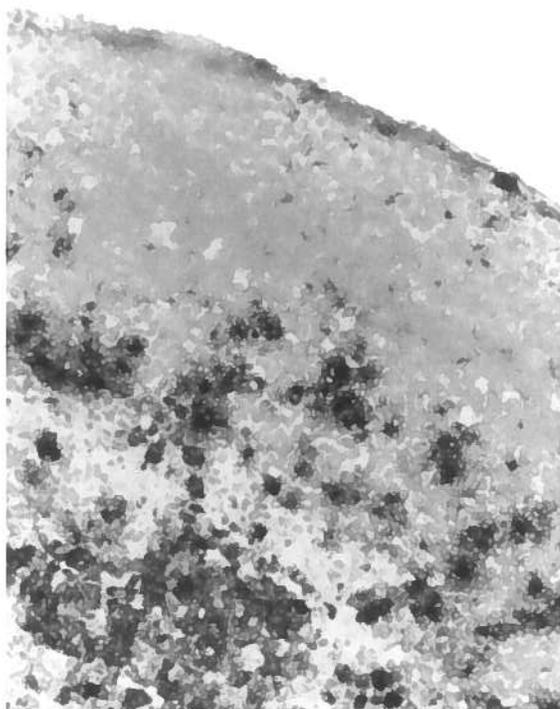
49. K. Hirokawa, T. Makinodar, *J. Immunol.* 114 (1975) 1659-1664.

ARTICLE III FIGURE 1: Immunohistochemical localization of UEA-I labeled cells in FTOCs. (A) Section of fetal thymic lobe following a 7 day incubation with UEA-I. TMEC were revealed with an anti-UEA-I Ab. Note that most labeled cells are found in the medulla (bottom), with very few labeled cells also located in the cortex (top). (B) Fetal thymus section treated with UEA-I and with anti-UEA-I Ab. X 160.

A)



B)



ARTICLE III FIGURE 2: CD3 profiles of fetal thymocytes from FTOCs cultured 12 days in medium alone (A) or in medium with UEA-I (B). Note that in UEA-I treated lobes there is an increase in the percentage of CD3^{hi} cells, and a corresponding decrease in the percentage of CD3^{lo} cells. Histograms are representative of most experiments.

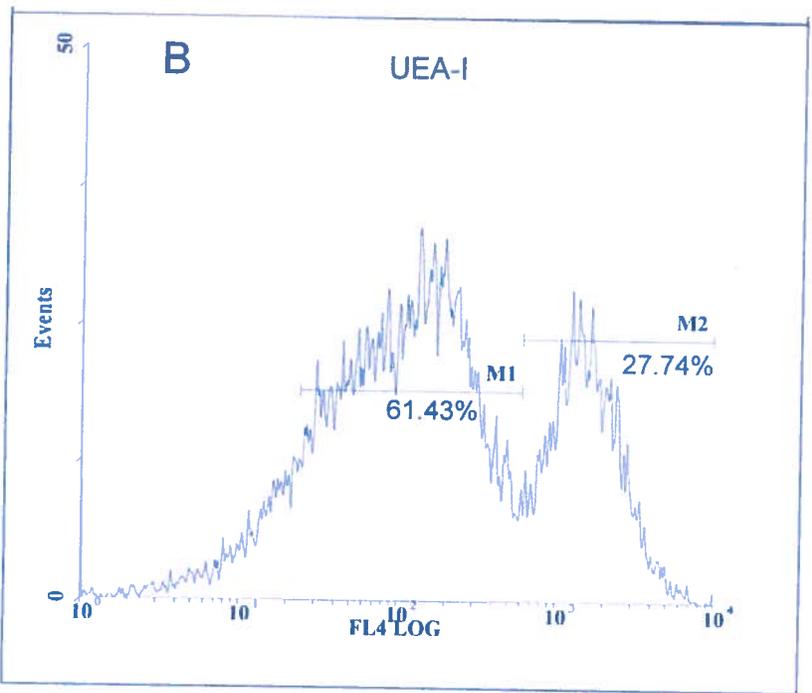
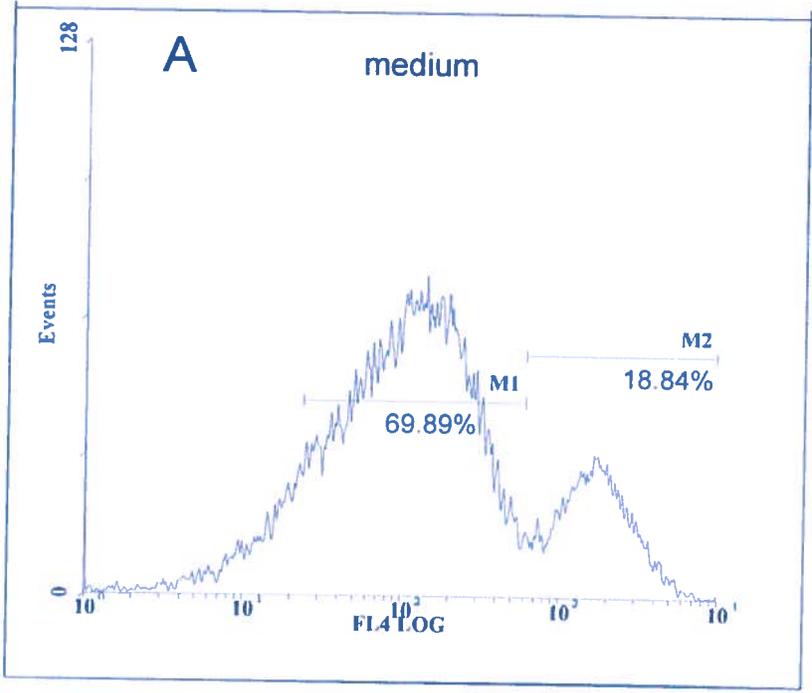


Table 1. Cells/lobe within CD3 subsets, derived from FTOCs cultured 12 days in medium alone or with UEA-I.

Expt.#	CD3 ⁻			CD3 ^{lo}			CD3 ^{hi}		
	medium	UEA-I	% of control ^b	medium	UEA-I	% of control ^d	medium	UEA-I	% of control ^f
	cell number (x 10 ⁵)	cell number (x 10 ⁵) ^a		cell number (x 10 ⁵)	cell number (x 10 ⁵) ^c		cell number (x 10 ⁵)	cell number (x 10 ⁵) ^e	
1	1.28	0.75	58.6	3.53	1.70	48.1	0.82	0.55	67.1
2	1.44	0.81	56.2	3.33	1.68	50.4	0.85	0.81	95.3
3	0.65	0.63	96.9	2.09	1.64	78.5	0.26	0.63	242.3
4	0.39	0.33	84.6	1.78	1.32	74.2	0.53	0.65	122.6
5	0.97	0.39	40.2	3.23	1.32	40.9	0.84	0.83	98.8
6	0.61	0.52	85.2	2.42	1.78	73.6	0.74	0.51	68.9
7	1.13	ND	ND	1.08	ND	ND	1.36	ND	ND
8	0.45	0.28	62.2	2.80	1.38	49.3	0.59	0.31	52.5
9	0.58	ND	ND	2.51	ND	ND	0.44	ND	ND
10	0.54	0.38	70.4	1.52	1.13	74.3	1.21	0.97	80.2
11	0.24	0.13	54.2	1.48	0.65	43.9	0.38	0.22	57.9
12	0.31	0.15	48.4	1.11	0.46	41.4	1.72	1.12	65.1
13	0.43	0.32	74.4	2.21	1.41	63.8	0.57	0.62	108.8
14	0.35	0.34	97.1	1.88	1.58	84.0	0.37	0.68	183.8
15	ND	0.14	ND	ND	0.81	ND	ND	0.35	ND

^aThe UEA-I-treated group is significantly different from the medium-treated group (p<0.005).

^b% of control: mean = 69.0 ± 18.8

^cThe UEA-I-treated group is significantly different from the medium-treated group (p<0.0005).

^d% of control: mean = 60.2 ± 16.1

^eThe UEA-I-treated group is not significantly different from the medium-treated group.

^f% of control: mean = 103.6 ± 56.7

Table 2. TCR $\alpha\beta^+$ and TCR $\gamma\delta^+$ cells/lobe, in FTOCs cultured 12 days in medium alone, or with UEA-I.

Expt. #	TCR $\alpha\beta^+$			TCR $\gamma\delta^+$		
	medium	UEA-I	% of control ^b	medium	UEA-I	% of control ^d
	cell number (x 10 ⁵)	cell number (x 10 ⁵) ^a		cell number (x 10 ⁵)	cell number (x 10 ⁵) ^c	
2	4.00	2.30	57.5	ND	ND	ND
3	2.31	2.11	91.3	ND	ND	ND
4	2.25	1.89	84.0	0.26	0.32	123.1
5	3.93	2.00	50.9	0.48	0.47	97.9
7	ND	ND	ND	0.49	ND	ND
8	ND	ND	ND	0.47	0.36	76.6
9	ND	ND	ND	0.45	0.31	68.9
10	ND	ND	ND	0.45	0.41	91.1
11	ND	ND	ND	0.27	0.21	77.8
12	ND	ND	ND	0.46	0.38	82.6
13	2.75	2.01	73.1	0.34	0.45	132.3
14	ND	ND	ND	0.26	0.36	138.5
15	ND	ND	ND	0.26	0.24	92.3

^aThe UEA-I group has significantly fewer TCR $\alpha\beta^+$ cells than the medium control group ($p < 0.025$).

^b% of control: mean = 71.4 ± 17.1 .

^cThe number of TCR $\gamma\delta^+$ cells in the UEA-I group and in the medium control group are not significantly different ($p > 0.05$).

^d% of control: mean = 98.1 ± 24.7 .

CHAPITRE 4

APPLICATION DE LA TECHNIQUE DE MARQUAGE DE THYMOCYTES *IN VIVO* AVEC DU CFSE CHEZ DES SOURIS ICAM-1 DÉFICIENTES

RÉSUMÉ ARTICLE IV

L'on croit que la molécule ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) participe au développement des lymphocytes T étant donné son importance dans la présentation antigénique, une étape cruciale dans le processus de la différenciation qui mène au développement de lymphocytes T matures dans le thymus. Bien que plusieurs observations dans des systèmes *in vitro* supportent cette hypothèse, elle n'a pas encore pu être prouvée dans un modèle *in vivo*. Nous avons donc évalué l'importance biologique de cette molécule par rapport à l'émigration de thymocytes vers les organes lymphoïdes de la périphérie, utilisant la technique de marquage de thymocytes *in vivo* que nous avons préalablement développée pour la détection à long terme des émigrants thymiques, dans des souris normales et dans deux souches de souris déficientes en ICAM-1 (c'est à dire, ICAM1^{tm1Bay} et ICAM1^{tm1Jcgr}). À partir du patron d'expression de souris normales et de souris ICAM1^{tm1Jcgr}, nous avons aussi utilisé des 'puces à ADN' pour déterminer quels gènes étaient affectés par l'absence des interactions ICAM-1/LFA-1. Nous avons démontré que 1) le taux d'émigration de lymphocytes T du thymus vers la périphérie est diminué dans les souris déficientes en ICAM-1, 2) la transition d'un phénotype CD3^{low} à un phénotype CD3^{high} est ralentie dans les souris ICAM1^{tm1Jcgr}, et 3) la perturbation du gène *icam-1* a affectée l'expression de plusieurs autres gènes importants pour l'activation cellulaire. Nous avons observé surtout la sous-expression du gène *c-src*, un gène qui est associé à l'activation de lymphocytes T via le TCR. Ainsi, pour la première fois *in vivo*, ces résultats démontrent que la molécule ICAM-1 est impliquée dans le développement des lymphocytes T, en contrôlant l'expression de gènes importants dans l'activation cellulaire.

Protracted development and emigration of thymocytes in ICAM-1-deficient mice: cellular evidence and genomic analysis.

Monica Graziano*, Steve Moisan*, Mélanie Demers, Edouard F. Potworowski,
and Yves St-Pierre†.

* Both authors contributed equally to this work.

INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, Laval, Québec, CANADA

†Address correspondence to:

Yves St-Pierre, Professor
INRS-Institut Armand-Frappier
531 Boul. Des Prairies,
Laval, Québec, CANADA H7V 1B7
Fax : 450-686-5501
Phone : 450-686-5354
E-mail : yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca

Running title:

Development and emigration of thymocytes in ICAM-1-deficient mice

Keywords:

T Lymphocytes, Adhesion Molecules, Thymus, Gene regulation, Transgenic/Knockout

Number of Words (including spaces): 41 387.

(manuscrit soumis)

Abstract

The intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) is thought to be involved in T cell maturation because of its importance in antigen presentation, a crucial step in the differentiation process leading to the development of mature T cells in the thymus. Despite several published *in vitro* indications, there is so far no direct *in vivo* evidence for a role of ICAM-1 in T cell development. To clarify this issue, we first evaluated the biological importance of ICAM-1 in the emigration of T cells from the thymus to peripheral organs, using an *in vivo* CFSE-labeling technique in normal and two ICAM-1-deficient mice (i.e. ICAM1^{*tm1Bay*} and ICAM1^{*tm1Jcgr*}). We then used cDNA microarrays to discern, from the expression profiling of normal and ICAM1^{*tm1Jcgr*} mice, which genes were affected by the absence of ICAM-1/LFA-1 interactions. We showed that: 1) the emigration rate of T cells from the thymus to the periphery is reduced in ICAM-1-deficient mice, 2) the transition from a CD3^{low} to a CD3^{high} phenotype was slowed down in ICAM1^{*tm1Jcgr*} deficient mice, and 3) disruption of the *icam-1* gene affected the expression of a battery of genes important for cell activation, most notably the downregulation of *c-src*, a gene previously associated with T cell activation via the T cell receptor. These results provide the first *in vivo* evidence that ICAM-1 is involved in the development of T cells by controlling the expression of genes that play a central role in T cell activation.

Introduction

The intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54), a member of the immunoglobulin superfamily, is expressed constitutively at low levels on endothelial cells, and on most cells of the lymphocytic and monocytic lineages (1-3). This wide expression of repertoire enables ICAM-1 to participate, through interactions with its major ligands, LFA-1 and Mac-1, in a variety of immunological functions, such as cell trafficking and antigen presentation. In the case of T lymphocytes, engagement of LFA-1 at their surface during antigen presentation has been shown to induce phosphorylation of a number of intracellular proteins on serine, threonine, or tyrosine residues (4-7), and to potentiate the T cell receptor-associated signaling pathways (8), which largely involves members of the src and the syk families of tyrosine kinases (9, 10). The generation of activation signals upon binding of ICAM-1 with integrins is, however, bi-directional. Indeed, accumulating evidences show that ICAM-1 can also mediate intracellular signaling via protein kinases in B cells (11, 12), T cells (13), as well as in non-immune cells, such as vascular endothelial cells (14-17) and astrocytes (18).

Because of its importance in antigen presentation, which is a crucial part of the differentiation process leading to the development of mature T cells in the thymus, ICAM-1 has been suspected of participating in T cell development. This possibility is supported by a number of observations: 1) ICAM-1 is expressed constitutively on thymic epithelial cells, thymic macrophages, thymic dendritic cells, and thymic nurse cells (19-24); 2) *in vitro* deletion of immature double-positive thymocytes (CD4+CD8+; DP) from transgenic mice is partially inhibited by anti-ICAM-1 antibodies (25); 3) the presence of anti-ICAM-1 antibodies in fetal thymus organ cultures alters normal T-lymphocyte

development and transiently reduces by approximately 50% the total number of thymocyte (26), and 4) ICAM-1 expression on transfectants provides a selective boost to signaling for differentiation in immature CD4+CD8+ thymocytes (27). However, despite these *in vitro* indications, there is no direct *in vivo* evidence for a role of ICAM-1 in T cell development. Indeed, ICAM-1 knock-outs seem to have an intact T cell compartment judging by the phenotypic analysis of the thymocyte subpopulations and the ability to respond to alloantigens in the mixed lymphocyte reaction (28, 29). This suggests that either ICAM-1 has no role in this process, or that the repertoire of ICAM-1-isoforms expressed in the ICAM-1-deficient mice is sufficient to perform the role of the common form of ICAM-1 in the thymus. Indeed, thorough analysis of the genetically-engineered ICAM-1-deficient mice, generated by targeting exon 4 (29) or 5 (28), showed that residual expression of ICAM-1 was possible because these exons could be skipped by alternative splicing of RNA in mutant, or wild type animals (30).

Faced with this paradox, we first sought to evaluate the biological importance of ICAM-1 in the emigration of T cells from the thymus to the peripheral lymphoid organs. Using an *in vivo* CFSE-labeling technique, we found that T cells traffic was significantly altered in peripheral organs of ICAM-1-deficient mice. This alteration in the distribution of T cells in the periphery was concomitant with an abnormal pattern in the transition of thymocytes from a CD3^{low} to a CD3^{high} phenotype, suggesting that the absence of ICAM-1 affected the normal process of T cell differentiation. We then used a genetic functional approach to discern, from the complex pattern of gene expression in the thymus of normal and ICAM-1-deficient mice, which genes were affected by the absence of ICAM-1/LFA-1 interactions. We found that the transcriptome of the thymus isolated from

ICAM-1-deficient mice differed significantly from that of normal mice. Most notably, we found that the expression of *c-src*, a gene that is normally induced following activation through the TCR, was severely downregulated in absence of ICAM-1.

Materials and Methods

Animals. Seven to eight week-old normal, and ICAM-1-deficient mice (ICAM1^{tm1Jcgr} and ICAM1^{tm1Bay}, carrying a deletional mutation in the fourth and fifth exons respectively on a C57BL/6 background) (29, 28) were bred in our animal facility and maintained under specific pathogen-free conditions and in accordance with institutional guidelines. Breeder pairs for C57BL/6 and ICAM-1-deficient mouse colonies were purchased from Charles River (St-Constant, QC) and Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

Immunohistochemistry. C57BL/6, and ICAM-1-deficient mice were sacrificed by CO₂ inhalation and thymuses were snap-frozen in OCT embedding medium (Sakura Finetek, Torrance, CA). Cryostat tissue sections (5µm) were then air-dried and fixed in acetone for 20 sec, at room temperature, and rehydrated in PBS for a further 5 min. The sections were then incubated in a humid chamber with a rat anti-ICAM-1 mAb (purified by affinity chromatography using protein G Sepharose from the culture supernatant of the hybridoma cell line YN1/1.7.4) for 30 min, rinsed and washed in PBS with 0.05% Tween 20, and re-incubated with a peroxidase-conjugated rabbit anti-rat mAb (Zymed, San Francisco, CA) for another 30 min. Both antibodies were diluted in PBS + 1% condensed milk. The reaction was then revealed by a 20-min incubation with the

substrate (AEC; an amino carbazole substrate kit from Zymed). Buffered glycerol was used as a mounting medium.

Tracing agent of thymic emigrants. The 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), solubilized in DMSO at a concentration of 25 mM, was diluted in PBS to be used at a final concentration of 400 μ M. The CFSE, purchased from Molecular Probes (Eugene, OR) was used for the emigration experiment, and has been previously shown to be non-toxic at the concentration used (31).

Intrathymic injections. Thymocytes were labeled *in situ* using a previously described method (31). Briefly, mice were anesthetized by an i.p. injection of ketamine/xylazine [(10/1 mg/ml); 0.1 ml/10 g body weight]. The thymus was exposed after mediastinal incision, and 10 μ l of the CFSE solution were injected into each lobe using a 30-gauge needle. The skin overlying the chest cavity was then closed with surgical clips.

Preparation of lymphocyte suspensions. At 3 and 5 days post-injection, the thymus, spleen and lymph nodes (axillary and inguinal) were collected and kept on ice in mouse tonic PBS (MT-PBS), supplemented with 1% FCS. Lymphoid cells were released from the organs by gentle mincing with scalpel blades, and the resulting suspensions were filtered on nylon wool. Spleen cell suspensions were further subjected to osmotic shocks to eliminate erythrocytes. Lymphocytes from fetal thymuses were released by homogenization of lobes in a glass potter. All cells were then washed twice with cold MT-PBS, and viability was assessed by trypan blue exclusion.

Flow cytometry. CFSE-labeled lymphocytes from the thymus, spleen, or lymph nodes were detected using an EPICS XL Flow Cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Forward and side scatter analyses allowed the exclusion of remaining erythrocytes and cell debris. These thymocytes or thymic emigrants were further characterized using a biotinylated anti-CD3 mAb (145-2C11), purchased from Pharmingen, and a streptavidin-conjugated RED-670 (GIBCO BRL). Based on individual controls, appropriate gates defining the CFSE-labeled cells were established either to determine the percentage of CFSE⁺ cells within the thymus, or within a phenotypic subset.

Activation of T cells by PMA. The mouse T lymphoma line 267 was derived from a radiation-induced thymic lymphoma in C57BL/Ka mice (32). The cells were maintained in culture using RPMI1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, and 10 mM HEPES buffer (*N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N*-2-ethane sulfonic acid). For treatment with PMA, aliquots of cells (10^7) were grown in one ml of serum-

free medium in the presence of 50 nM PMA for 24 h. The cells were then collected by centrifugation and washed twice with PBS. Pellets were then frozen at -70°C .

RNA preparation. Pellets of T cells or frozen C57BL/6 and ICAM1^{*tm1Jcgr*} thymuses from 12 week-old mice were disrupted using a mortar and pestle and were homogenized using a QIAshredder column (QIAGEN). Total RNA was prepared prior to the enrichment of polyA⁺ RNA using the AtlasTM Pure Total RNA Labeling System (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

AtlasTM mouse 1.2 expression array. All procedures for labeling and purifying the probes were accomplished by following the AtlasTM mouse 1.2 cDNA array manufacturer's instructions (Clontech; Palo Alto, CA, USA). Complex [α -³³P]-dATP-labeled cDNA probes were generated by reverse transcription of mRNA from resting T cells, PMA-treated T cells, C57BL/6 thymus, and ICAM1^{*tm1Jcgr*} thymus. The probes were purified by column chromatography (ChromaSpin) and met the manufacturer's recommendation for specific activity. Hybridization proceeded overnight at 68°C in a roller bottle. Membranes were stringently washed with agitation for 30 min in prewarmed (68°C) solution 1 (2X standard saline citrate (SSC), 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) four times and solution 2 (0.1X SSC, 0.5% SDS) once. Afterwards, membranes were rinsed in 2X SSC at room temperature, exposed to a phosphor screen for three weeks and scanned using a PhosphoImager SI (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA, USA) (pixel size, 200 microns; PMT voltage, 688 V; local average

background correction). Autoradiographic intensity was measured using ImageQuant software (Version 5.0) (Molecular Dynamics). Nine housekeeping genes were used for normalization: ubiquitin, phospholipase A2, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, myosin I, ornithine decarboxylase, β -actin, Ca^{2+} binding protein and ribosomal protein S29.

Analysis of *c-src* transcripts in thymocytes. First-strand cDNA was prepared from 2 μg of total cellular RNA in 20 μl of reaction volume by random priming using OmniscriptTM reverse transcriptase (QIAGEN). After reverse transcription, *c-src* mRNA was amplified by “semi-nested” PCR using two different primers directed against the 5' end of the transcript (TCCAGGCTGAGGAGTGGTACTTTGG and CAAGATCACTAGACGGGAATC) and a unique 3' antisense primer (AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC). Except for the internal primer, the sequence of both oligonucleotides were obtained from Clontech and are the same ones used to amplify the cDNA fragments immobilized on the arrays. For PCR, 25 and 12 cycles of amplification were performed in the first and second rounds respectively in an MJ Research (Watertown, MA) thermal cycler (model PTC-100TM) using the following programmed step cycle: 94°C for 0.5 min, 62°C (for the first round of PCR) or 64°C (for the second round of PCR) for 0.5 min, and 72°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 10 min. Sequences of primers, number of PCR cycles, volumes of cDNA were all adapted to achieve semi-quantitative conditions. Ten μl of the final reaction mixture were size-separated on a 1.2% agarose gel and specifically amplified

products were detected by ethidium bromide staining and UV transillumination. Semi-quantitative analysis was carried out using a computerized densitometric imager.

Statistical analyses. The Student's *t* test was used for statistical analysis.

Results

Expression of ICAM-1 on thymic stroma and thymocytes in ICAM1^{*tmlBay*} and ICAM1^{*tmlJcgr*} mutant mice. Before studying the emigration pattern of mature thymocytes from the thymus to the periphery, we first compared the expression of ICAM-1 in the thymuses of both ICAM-1-deficient strains. Using the ICAM-1-specific YN1/1.7.1 mAb, we confirmed that the ICAM1^{*tmlBay*} mutant mice did indeed express a significant level of ICAM-1 in the thymic medulla, as compared to normal mice (Fig. 1B). Thymuses from ICAM1^{*tmlJcgr*} mutant mice, on the other hand, were completely non-reactive to the anti-ICAM-1 mAb (Fig 1C). It is important to note that tissue sections from ICAM1^{*tmlJcgr*} mice, and to a lesser extent that of ICAM1^{*tmlBay*} did not exhibit detectable ICAM-1 staining of thymocytes.

Decrease in CD3⁺ lymphocytes in the spleens and lymph nodes of ICAM-1-deficient mice. Previous studies have shown that ICAM-1 deficient mice had altered numbers of peripheral blood lymphocytes (PBL) (29). Yet, to date, no direct comparisons have been carried out regarding the ability of T lymphocytes from such mice to migrate from the thymus to peripheral lymphoid organs. To evaluate whether disruption of the ICAM-1 gene could cause changes in the accumulation of T cells in spleen and lymph nodes,

lymphocytes from these organs were counted and the CD3 profiles of these cells were assessed by flow cytometry. Although no differences in total lymphocyte numbers were observed in the spleens of both strains of knock-out mice, we found a significant decrease in the numbers of CD3⁺ cells in both ICAM-1-deficient strains compared to the C57BL/6 control mice (Table I). The decrease in the number of T cells in the mutant mice was compensated by an increase in the percentage of B lymphocytes, as flow cytometric analysis showed that the percentages of B220-positive cells in the spleens of normal, ICAM1^{tm1Bay} and ICAM1^{tm1Jcgr} were 65.7%, 69.3% and 76.9 % respectively. Such a decrease in T cells was also observed in lymph nodes of ICAM-1-deficient mice.

Thymic emigrants in the lymph nodes of ICAM-1-deficient mice. In order to determine whether the reduction in the numbers of T cells in the spleen and lymph nodes of the ICAM-1-deficient mice occurred as a result of impaired thymic emigration, mice from all three strains received an intrathymic injection of CFSE as a means to track the T cells that had emigrated from the thymus to these organs (30). Mice were sacrificed five days later and the number of CFSE-labeled thymic emigrants in spleens and lymph nodes was measured by flow cytometry. We found that while the number of thymic emigrants in the spleen was unaffected by ICAM-1-deficiency, it was significantly reduced in the lymph nodes of these mice (Table I). These results indicated that along the multistep process of differentiation and emigration, the reduced expression of ICAM-1 in the thymus seems to affect to some extent the integrity of the T cell compartment in periphery.

Ratio of CD3^{low}/CD3^{high} CFSE-labeled thymocytes in ICAM-1-deficient mice.

Although thymocyte development appeared phenotypically normal in ICAM-1-deficient mice (22, 23), we decided to closely examine a key step in T cell development, i.e. the transition rate from a CD3^{low} to a CD3^{high} phenotype. For this purpose, two-color flow cytometric analyses were carried out in the thymus five days after *in vivo* labeling of thymocytes with CFSE. When we examined the overall number of CD3^{low} and CD3^{high} cells in the thymus, we found no significant differences between normal and ICAM-1-deficient mice, a result consistent with previous analyses on the thymus of these mice (28, 29). However, when we focused on CFSE-labeled thymocytes, which reflects the transition rate from a CD3^{low} to a CD3^{high} phenotype, we found a statistically significant higher CD3^{low}/CD3^{high} ratio in the ICAM1^{*tm1Jcgr*} strain (1.48 ± 0.55 vs 0.84 ± 0.29 for the wild-type mice). Although the CD3^{low}/CD3^{high} ratio of CFSE-labeled thymocytes in ICAM1^{*tm1Bay*} mice was not statistically significant ($p = 0.0559$), a similar trend was observed (Table II).

Molecular analysis of the transcriptome of thymocytes in ICAM-1-deficient mice.

The above data suggested, for the first time, the existence of a yet unidentified defect in the maturation of thymocytes, in the ICAM1^{*tm1Jcgr*} strain. This possibility has been raised in previous studies showing a partial loss of CD8 T cells in ICAM-1-deficient mice (33). However, the possibility that ICAM-1 plays a role in the development of T cells had been ruled out by other studies showing that thymocyte development appears phenotypically normal in these mice (28, 29). To clarify this question, we investigated at the molecular level whether disruption of the ICAM-1 gene could have an effect on T cell development by comparing the transcriptome of thymocytes isolated from normal and ICAM-1-

deficient mice. Transcription of DNA into mRNA is the first step of a cascade of events responsible for the phenotypic differences that are indicative of cellular responses to microenvironmental perturbations. The expression profile of 1176 known genes was thus determined in the thymus isolated from normal and ICAM1^{tm1Jcgr} mice using cDNA arrays. Our data showed that the transcriptome of the thymus of ICAM1^{tm1Jcgr} mice was significantly altered compared to that of normal mice (Figure 2). Interestingly, the absence of ICAM-1 was associated with the decreased expression of a large panel of genes. The genes whose expression were the most affected by the absence of ICAM-1 are listed in Table IV. The most significant change was the strong decrease of the expression of the *c-src* proto-oncogene (*c-src*), a gene that is regulated at the transcriptional level in T cells upon activation via the TcR (34). Among the other genes, we found that ICAM-1 was indeed downregulated, as one could expect. Not surprisingly, however, this approach revealed several unexpected changes in genes that had not previously been associated with T cell differentiation. To further define, among these multiple putative genes of interest, the molecular pathways that were specifically targeted accessory role of ICAM-1 in antigen presentation, we sought to compare this genomic profiling with that of an activated T cells, assuming that the genes that were downregulated in ICAM-1-deficient mice and which are involved in T cell differentiation are most likely those that are conversely upregulated during T cell activation. For this purpose, we stimulated a thymic T cell line with PMA for 6 h and carried out a cDNA profiling (Figure 3). Interestingly, three of the genes whose levels showed the highest increase in their level of expression in T cells after activation (Table III) were the same that were downregulated in the thymus of ICAM-1-deficient mice; this was the case for *limk-1*, *c-jun* proto-

oncogene, and *c-src*, which again was the gene with the greatest change in its level of expression following T cell activation. The down-regulation of *c-src* in thymocytes isolated from ICAM-1-deficient mice was indeed confirmed by RT-PCR analysis (Figure 4).

Discussion

In the present work, we have shown that: 1) the emigration rate of T cells from the thymus to the periphery is reduced in ICAM-1-deficient mice, 2) the transition from a CD3^{low} to a CD3^{high} phenotype was slowed down in ICAM-1-deficient mice, and 3) disruption of the *icam-1* gene affected the expression of a battery of genes important for cell activation, including *c-src*, a gene previously associated with T cell activation via the T cell receptor. These results provide for the first time *in vivo* evidence that ICAM-1 is involved in the development of T cells by controlling the expression of genes that play a central role in T cell activation.

Two ICAM-1-deficient mouse strains have been generated by homologous recombination, ICAM1^{tm1Jcgr} and ICAM1^{tm1Bay}, with disrupted exons 4 and 5 respectively. It has previously been shown that both of these ICAM-1 mutant mice express a distinct repertoire of isoforms, generated as a result of alternative RNA splicing, distinct from the common ICAM-1 isoform (30). In the present work, we show a significant decrease in T cells in both the spleen and lymph nodes in both these strains of ICAM-1-deficient mice.

When we assessed whether T cell reduction in the peripheral lymphoid organs of ICAM-1-deficient mice was a result of impaired migration, we found that emigration of T

cells from the thymus to the lymph nodes, but not to the spleen, was severely reduced in these mice. These results are in fact consistent with studies showing that entry of naive lymphocytes into lymph nodes occurs via HEVs, where activation of T cells through HEV-specific chemokines and interactions between adhesion molecules and addressins are essential. Our findings in ICAM-1-deficient mice are also consistent with those of Warnock *et al.* (35) who showed that firm adhesion of lymphocytes to PLN-HEVs was completely abrogated upon addition of anti-LFA-1 Abs. This indicates that ICAM-1 is a key ligand for LFA-1 during entry of lymphocytes to lymph nodes, and probably acts interdependently with selectins, since combined loss of L-selectin and ICAM-1 expression dramatically reduced leukocyte recruitment to sites of inflammation (36). Such decrease in the number of CFSE-labeled cells in the spleen was not, however, observed. This is consistent with the idea that entry in this organ is more “passive”, i.e. HEV-independent. Alternatively, it is possible that the spleen still expresses a significant level of functional isoforms of ICAM-1, or that CFSE-labeled emigrants, which would normally have entered the lymph nodes but could not do so in the knock-out mice, were re-directed towards the spleen of ICAM-1 mutant mice. By so doing, an otherwise reduced immigration into the spleen might be masked by the occupancy of available niches by the re-directed cells. It is also conceivable that absence of ICAM-1 does not affect the rate of entry of T cell in the spleen, but accelerates either their exit or their death.

Another, not exclusive, possibility which could explain the reduced rate of emigration of T cells from the thymus to the periphery is that emigration of mature thymocytes from the thymus to the periphery is affected by a defect in T cell

development. Because mature thymocytes are the immediate precursors of thymic emigrants, we sought to investigate whether the altered numbers of thymic emigrants was a result of an impaired thymocyte differentiation process. Indeed, within a given time-frame, we found more CD3^{low} and fewer CD3^{high} thymocytes. These results therefore point out, for the first time, towards the existence of a defect in the differentiation rate of thymocytes in ICAM-1-deficient mice. The implication of ICAM-1 in T cell differentiation is consistent with several existing *in vitro* models, most notably that of Fine et al. (26), who had shown that the addition of anti-ICAM-1 antibodies to fetal thymic organ cultures impaired the generation of DP cells.

To obtain molecular evidence that absence of ICAM-1 impacts on T cell development, we did a genomic analysis to detect perturbations that occur following genetic ablation, and to establish the relationships between specific genes and cellular pathways (37). We found that absence of ICAM-1 severely decreased the expression of a large number of genes in the thymus of ICAM-1-deficient mice, the most significant being the strong downregulation of *c-src*. The *c-src* proto-oncogene is the prototype of the src family of tyrosine kinases, which includes p56^{lck} and p59^{fyn} (38). It is expressed constitutively in most cells, including T cell lines, but it is barely detectable in peripheral resting T cells.

Although the activity of pp60^{c-src} can be regulated at the post-translational level following activation, most notably by phosphorylation of serine residues (39), stimulation of mature CD4⁺ and CD8⁺ T cells with the mitogen PHA, or through the T cell receptor, has been shown to increase the expression of pp60^{c-src} gene (34), suggesting that *de novo* expression of the pp60^{c-src} gene is an important regulatory event in T cell activation.

Since intrathymic T cell development consists of a series of activation processes through various stimuli, including contact via the TcR, and since thymocytes express pp60^{c-src} constitutively (34), it is not surprising that pp60^{c-src} plays a role in T cell development. Although gross examination of src-deficient mice have revealed no obvious abnormalities in the size of lymphoid organs or in the number of peripheral blood leukocytes, it has not been possible to examine a potential role of src in T cell development since mice lacking pp60^{c-src} died shortly after birth (40). However, since mouse strains with null mutations in several regulatory tyrosine kinases, such as p56^{lck} (41), ZAP70, and Syk (42) show defects at the pre-T cell stage of development, and since expression of v-src is responsible for the phosphorylation of critical substrates, including the ζ chain of the TcR, our results raise for the first time the possibility that expression of ICAM-1 in the thymus is essential for maintaining the integrity of the signaling pathways of thymocytes. This possibility is further supported by our findings that many genes, involved in the intracellular signaling pathways, such as *limk-1*, are also downregulated in ICAM-1-deficient mice. LIM-1 kinase contains a putative protein kinase domain, although amino acids previously described to be characteristic of either serine/threonine- or tyrosine-kinases are not present, and yet LIM-1 kinase can autophosphorylate on serine, tyrosine and threonine residues, suggesting that LIM-1 kinase may provide a novel route by which intracellular signaling can be integrated (43). To date, however, there is no published report on a putative role of LIM-1 kinase in T cell development, as this gene is shown to be preferentially expressed in the nervous system, particularly in the spinal cord and the cranial nerve and dorsal root ganglia (44). Close examination of the promoter of this gene, however, reveals the presence of several transcriptional regulators implicated in

control of transcription in many different cell types, including Sp1, Ets, and E2A (45). Indeed, the LIM1 kinase promoter is functional in Jurkat T cells (45).

The fact that *c-src*, and to a lesser extent *limk-1*, are strongly downregulated in ICAM-1-deficient mice, and that the same genes were concomitantly upregulated in T cells following activation with PMA is a strong indication that T cells from ICAM-1-deficient mice may have a yet undetected defect in their signaling pathways. Although previous *in vitro* studies have shown that T cells from these mice respond normally to alloantigen in mixed lymphocyte reaction (28), it is possible that resistance of these mice to SEB-induced septic shock (29), which was originally attributed to the role of ICAM-1 in mediating cell-cell contact, may in fact be indicative of the inability of the T cells to upregulate the expression of key signaling mediators, such as pp60^{c-src}. Such a role would be consistent with the accumulating evidence that ICAM-1 participates in activation of both T and B cells (11-13, 45).

More sensitive approaches will be required to study the impact of these defects in T cell activation, and the possible role of new molecules identified by the cDNA arrays, such as LIM-1 kinase, in T cell activation. Interestingly, both *c-src* and LIMK1 have been shown to be closely associated with the regulation of the general movement of the cytoskeleton (18, 46), a function that has also been previously associated with ICAM-1 and LFA-1 (8). Whether disruption of LFA-1 and ICAM-1 affects temporarily or permanently the integrity of the cytoskeleton of thymocytes and their ability to migrate, and to subsequently carry out their immune functions is currently under investigations.

The present work provides another example that genomic profiling is a powerful approach to rapidly identify molecular pathways affected by a specific mutation. Since

ICAM-1 is expressed on the epithelium of the thymus, and since ICAM-1 is now recognized as a molecule with a strong capacity to transduce intracellular signals, it will be important to determine, using the same approach, whether the transcriptome of the thymic stromal cells is affected by the absence of ICAM-1, or other cell adhesion molecules as well.

Acknowledgments

We would like to thank Ms. D. Legault and C. Beauchemin for their excellent assistance. This work was supported by a grant from the Canadian Institute for Health Research (Y.S.P. and E.F.P.). Y.S.P is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

References

1. Dustin, M. L., R. Rothlein, A. K. Bhan, C. A. Dinarello, and T. A. Springer. 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* 137:245.
2. Arkin, S., B. Naprstek, L. Guarini, S. Ferrone, and J. M. Lipton. 1991. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) on hematopoietic progenitors. *Blood* 77:948.
3. Buckle, A.M., and N. Hogg. 1990. Human memory T cells express intercellular adhesion molecule-1 which can be increased by interleukin 2 and interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.* 20:337.
4. Kanner, S.B., Grosmaire, L.S, Ledbetter, J.A., Damle, N.K. 1993. Beta 2-integrin LFA-1 signaling through phospholipase C-gamma 1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 :7099.

5. Petruzzelli, L., M. Takami, and R. Herrera. 1996. Adhesion through the interaction of lymphocyte function-associated antigen-1 with intracellular adhesion molecule-1 induces tyrosine phosphorylation of p130cas and its association with c-CrkII. *J. Biol. Chem.* 271:7796.
6. Soede, R.D., Wijnands, Y.M., Van Kouteren-Cobzaru, I., Roos, E. 1998. ZAP-70 tyrosine kinase is required for LFA-1-dependent T cell migration. *J. Cell Biol.* 142:1371.
7. Rodriguez-Fernandez, J.L., Gomez, M., Luque, A., Hogg, N., Sanchez-Madrid, F., Cabanas, C. 1999. The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes. *Mol. Biol. Cell* 10:1891.
8. Wulfig, C, Davis, M.M. 1998. A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 282:2266.
9. DeFranco, A.L. 1995. Transmembrane signaling by antigen receptors of B and T lymphocytes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:163.
10. Chu, D.H., Morita, C.T., Weiss, A. 1998. The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol. Rev.* 165:167.
11. Poudrier, J., and T. Owens. 1994. CD54/intercellular adhesion molecule 1 and major histocompatibility complex II signaling induces B cells to express interleukin 2 receptors and complements help provided through CD40 ligation. *J. Exp. Med.* 179:1417.
12. Holland, J., and T. Owens. 1997. Signaling through intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in a B cell lymphoma line. The activation of Lyn tyrosine kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 272:9108.

13. Chirathaworn, C., S. A. Tibbetts, M. A. Chan, and S. H. Benedict. 1995. Cross-linking of ICAM-1 on T cells induces transient tyrosine phosphorylation and inactivation of cdc2 kinase. *J. Immunol.* 155:5479.
14. Sano, H., N. Nakagawa, R. Chiba, K. Kurasawa, Y. Saito, and I. Iwamoto. 1998. Cross-linking of intercellular adhesion molecule-1 induces interleukin-8 and RANTES production through the activation of MAP kinases in human vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250:694.
15. Lawson, C., M. Ainsworth, M. Yacoub, and M. Rose. 1999. Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor-kappaB-independent mechanism. *J. Immunol.* 162:2990.
16. Etienne-Manneville, S., J.B. Manneville, P. Adamson, B. Wilbourn, J. Greenwood, and P. O. Couraud. 2000. ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J. Immunol.* 165:3375.
17. Pluskota, E., and S. E. D'Souza. 2000. Fibrinogen interactions with ICAM-1 (CD54) regulate endothelial cell survival. *Eur. J. Biochem.* 267:4693.
18. Etienne-Manneville, S., N. Chaverot, A. D. Strosberg, and P. O. Couraud. 1999. ICAM-1-coupled signaling pathways in astrocytes converge to cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation and TNF-alpha secretion. *J. Immunol.* 163:668.
19. Nonoyama, S., M. Nakayama, T. Shiohara, and J. Yata. 1989. Only dull CD3+ thymocytes bind to thymic epithelial cells. The binding is elicited by both CD2/LFA-3 and LFA-1/ICAM-1 interactions. *Eur. J. Immunol.* 19:1631.

20. Lepesant, H., H. Reggio, M. Pierres, and P. Naquet. 1990. Mouse thymic epithelial cell lines interact with and select a CD3^{low}CD4⁺CD8⁺ thymocyte subset through an LFA-1-dependent adhesion--de-adhesion mechanism. *Int. Immunol.* 2:1021.
21. Singer, K. H., S. M. Denning, L. P. Whichard, and B. F. Haynes. 1990. Thymocyte LFA-1 and thymic epithelial cell ICAM-1 molecules mediate binding of activated human thymocytes to thymic epithelial cells. *J. Immunol.* 144:2931.
22. Colic, M., and D. Drabek. 1991. Expression and function of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on rat thymic macrophages in culture. *Immunol. Lett.* 28:251.
23. Ardavin, C., and K. Shortman. 1992. Cell surface marker analysis of mouse thymic dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 22:859.
24. Oliveira-dos-Santos, A. J., T. Rieker-Geley, H. Recheis, and G. Wick. 1997. Murine thymic nurse cells and rosettes: analysis of adhesion molecule expression using confocal microscopy and a simplified enrichment method. *J. Histochem. Cytochem.* 45:1293.
25. Carlow, D.A., van Oers, N.S., Teh, S.J., Teh, H.S. 1992. Deletion of antigen-specific immature thymocytes by dendritic cells requires LFA-1/ICAM interactions. *J Immunol.* 148:1595.
26. Fine, J. S., and A. M. Kruisbeek. 1991. The role of LFA-1/ICAM-1 interactions during murine T lymphocyte development. *J. Immunol.* 147:2852.
27. Lucas, B., and R. N. Germain. 2000. Opening a window on thymic positive selection: developmental changes in the influence of cosignaling by integrins and CD28 on selection events induced by TCR engagement. *J. Immunol.* 165:1889.

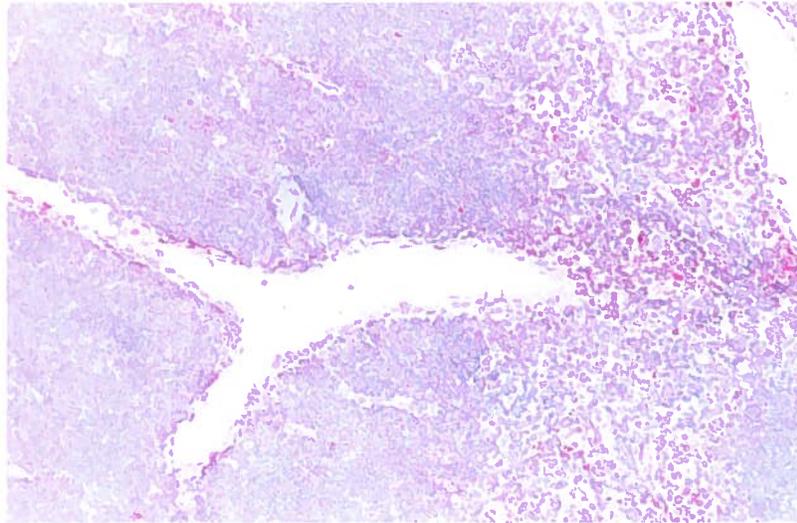
28. Sligh, J. E. Jr., C. M. Ballantyne, S. S. Rich, H. K. Hawkins, C. W. Smith, A. Bradley, and A. L. Beaudet. 1993. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8529.
29. Xu, H., Gonzalo, J. A., St-Pierre, Y., Williams, I. R., Kupper, T. S., Cotran, R. S., Springer, T. A., and Gutierrez-Ramos, J. C. 1994. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180:95.
30. King, P. D., E. T. Sandberg, A. Selvakumar, P. Fang, A. L. Beaudet, and B. Dupont. 1995. Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecule-1 generated by alternative RNA splicing. *J. Immunol.* 154:6080.
31. Graziano, M., Y. St-Pierre, C. Beauchemin, M. Desrosiers, and E. F. Potworowski. 1998. The fate of thymocytes labeled in vivo with CFSE. *Exp. Cell Res.* 240:75.
32. Aoudjit, F., E. F. Potworowski, and Y. St-Pierre. 1998. The metastatic characteristics of murine lymphoma cell lines in vivo are manifested after target organ invasion. *Blood* 91:623.
33. Huleatt, J. W., and L. Lefrancois. 1996. Beta2 integrins and ICAM-1 are involved in establishment of the intestinal mucosal T cell compartment. *Immunity* 5:263.
34. Branch, D. R., and G. B. Mills. 1995. pp60c-src expression is induced by activation of normal human T lymphocytes. *J. Immunol.* 154:3678.
35. Warnock, R. A., S. Askari, E. C. Butcher, and U. H. von Andrian. 1998. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J. Exp. Med.* 187:205.
36. Steeber, D. A., M. L. Tang, N. E. Green, X. Q. Zhang, J. E. Sloane, and T. F. Tedder. 1999. Leukocyte entry into sites of inflammation requires overlapping interactions between the L-selectin and ICAM-1 pathways. *J. Immunol.* 163:2176.

37. Lockhart, D. J., and E. A. Winzeler. 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405:827.
38. Brickell, P. M. 1992. The p60c-src family of protein-tyrosine kinases: structure, regulation, and function. *Crit. Rev. Oncog.* 3:401.
39. Ledbetter, J. A., L. E. Gentry, C. H. June, P. S. Rabinovitch, and A. F. Purchio. 1987. Stimulation of T cells through the CD3/T-cell receptor complex: role of cytoplasmic calcium, protein kinase C translocation, and phosphorylation of pp60c-src in the activation pathway. *Mol. Cell. Biol.* 7:650.
40. Soriano, P., C. Montgomery, R. Geske, and A. Bradley. 1991. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 64:693.
41. Molina, T. J., K. Kishihara, D. P. Siderovski, W. van Ewijk, A. Narendran, E. Timms, A. Wakeham, C. J. Paige, K. U. Hartmann, A. Veillette, et al. 1992. Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature* 357:161.
42. Cheng, A. M., I. Negishi, S. J. Anderson, A. C. Chan, J. Bolen, D. Y. Loh, and T. Pawson. 1997. The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9797.
43. Proschel, C., M. J. Blouin, N. J. Gutowski, R. Ludwig, M. Noble. 1995. Limk1 is predominantly expressed in neural tissues and phosphorylates serine, threonine and tyrosine residues in vitro. *Oncogene* 11:1271.
44. Bernard, O. V., G. C. Burkitt, G. C. Webb, C.D. Bottema, J. Nicholl, G. R. Sutherland, and P. Matthew. 1996. Structure and chromosomal localization of the genomic locus encoding the Kiz1 LIM-kinase gene. *Genomics* 35:593.

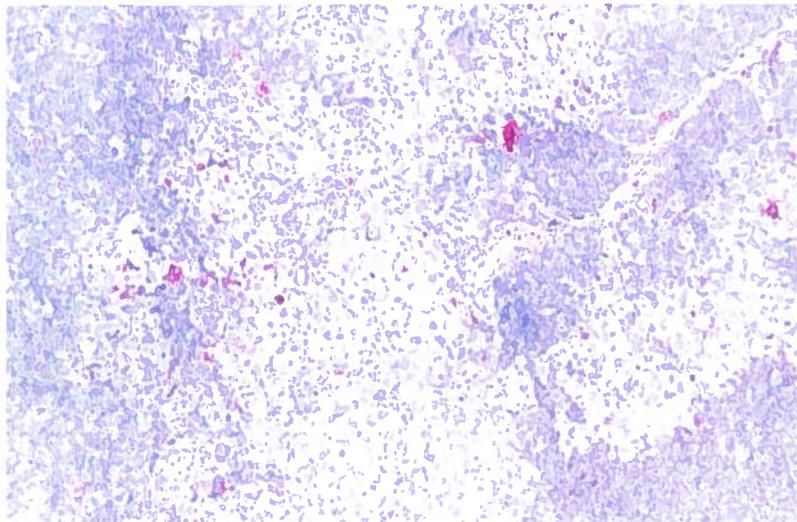
45. Gardiner, E. E., and S. E. D'Souza. 1999. Sequences within fibrinogen and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) modulate signals required for mitogenesis. *J. Biol. Chem.* 274:11930.

ARTICLE IV FIGURE 1: Immunohistochemical detection of ICAM-1⁺ cells in thymus sections from (A) C57Bl/6, (B) ICAM1^{*tm1Bay*} and (C) ICAM1^{*tm1cgr*} mice. Sections were stained with YN-1/1.7.1 anti-ICAM-1 antibody. 160X.

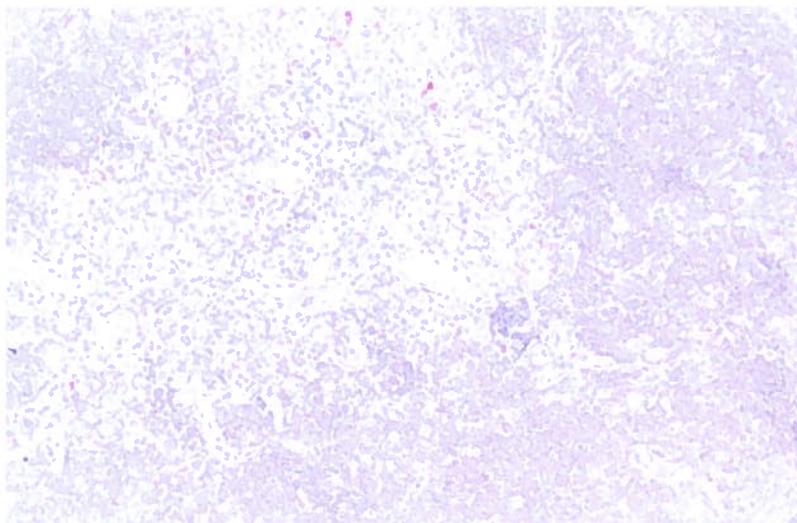
A



B



C

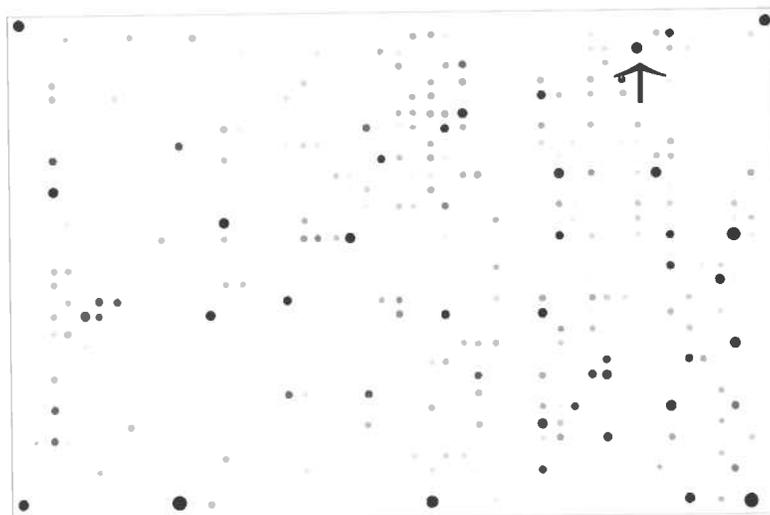
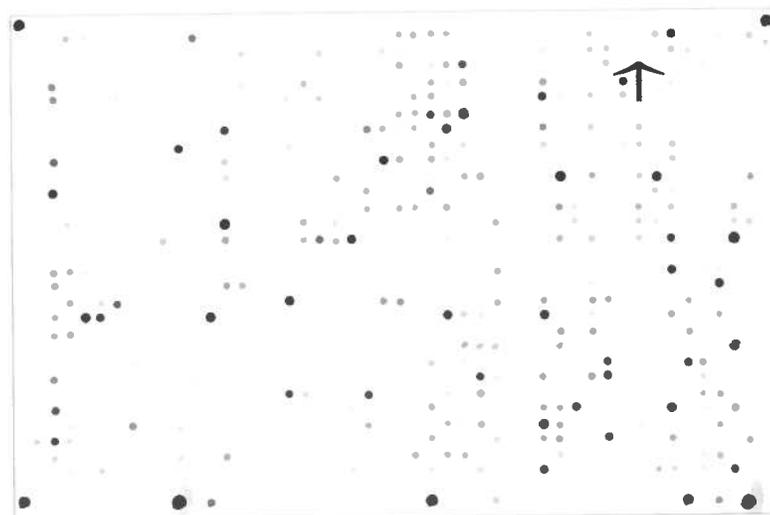
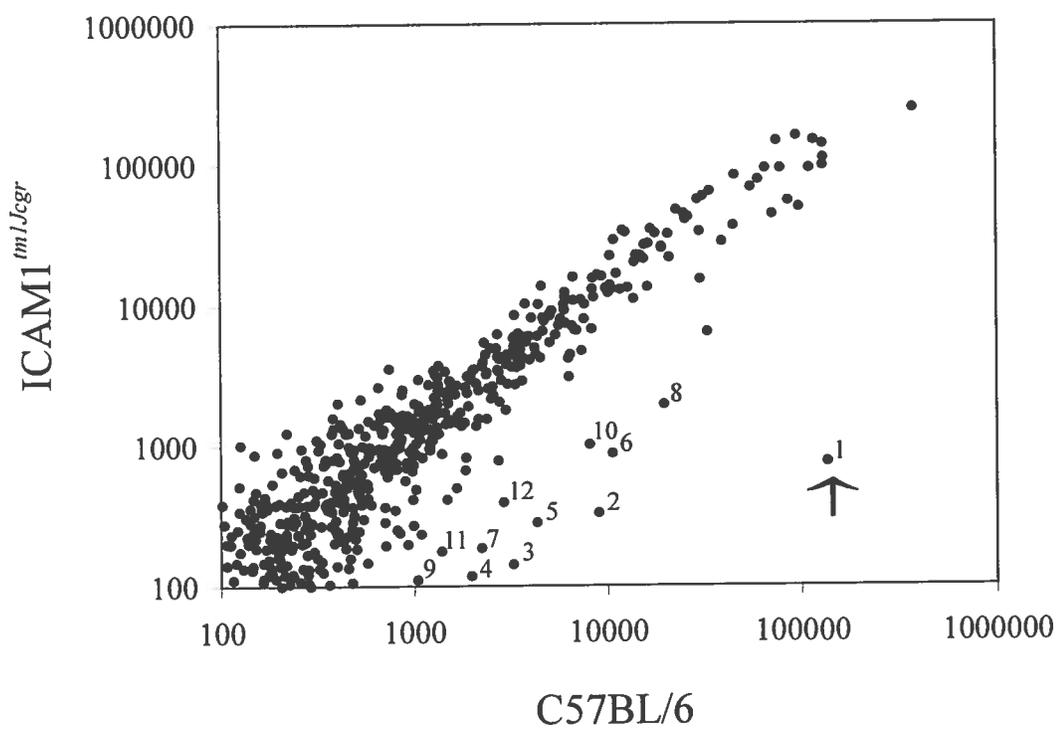


ARTICLE IV FIGURE 2: Identification of differentially expressed genes in the thymus of C57BL/6 and ICAM1^{tmljegr} mice. (A) Gene expression profiles in the thymus of C57BL/6 and ICAM1^{tmljegr} mice. [³³P]-labeled cDNAs were synthesized by RT of total RNAs isolated from the thymus of C57BL/6 (Upper panel) and ICAM1^{tmljegr} mice (Lower panel) and hybridized to the Atlas mouse 1.2 array blots. After stringent washes, the blots were exposed to a phosphor screen for three weeks. (B) Scatter plot matrix of densitometric quantification of expression data. Each point represents one of the 1176 genes on the array and the location of each point on the scatter plot is determined by the gene expression level in C57BL/6, represented on the x-axis and the gene expression level in ICAM1^{tmljegr}, represented in the y-axis. Differently expressed genes (described in Table III) are numbered.

ARTICLE IV FIGURE 3: Identification of differentially expressed genes between resting and PMA-stimulated T lymphoma cells. (A) Gene expression profiles of resting and PMA-stimulated 267 T cells. [³³P]-labeled cDNAs were synthesized by RT of total RNAs isolated from resting (Upper panel) or PMA-stimulated 267 T cells (Lower panel) and hybridized to the Atlas mouse 1.2 array blots. After stringent washes, the blots were exposed to a phosphor screen for three weeks. (B) Scatter plot matrix of densitometric quantification of expression data (as in Fig. 2). Resting T cells and activated T cells are represented on the x- and y-axis, respectively. Differently expressed genes (described in Table IV) are numbered. The location of the c-src proto-oncogene is indicated by an arrow.

A

C57BL/6

ICAM1^{tm1Jcgr}**B**

A

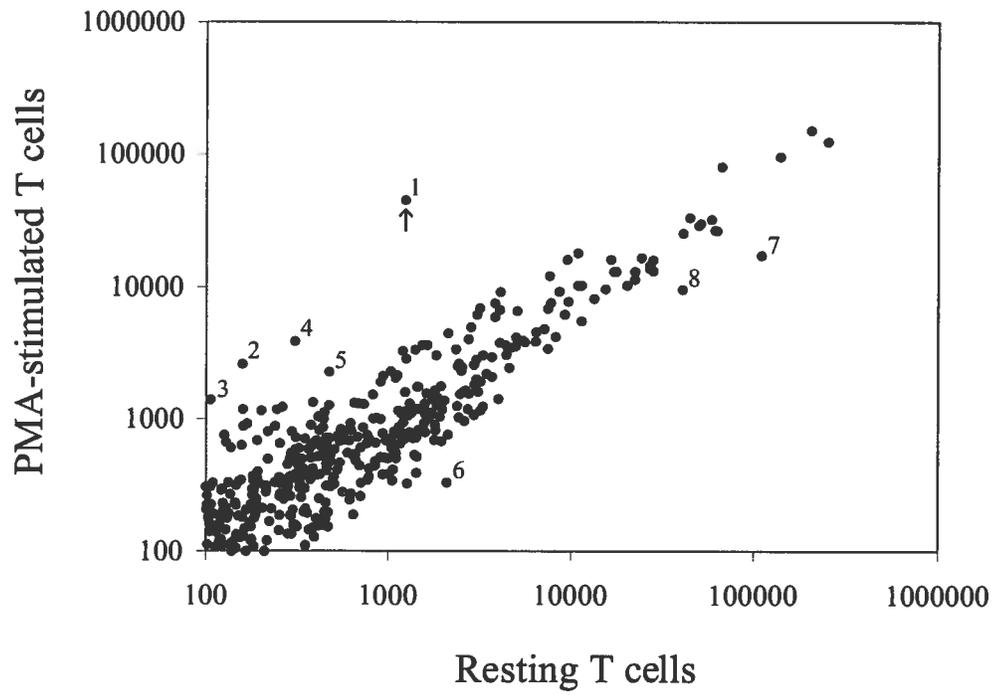
Resting T cells



PMA-stimulated T cells

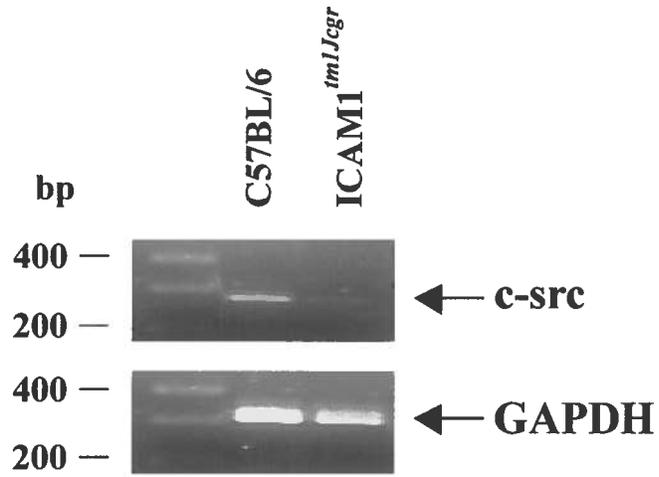


B



ARTICLE IV FIGURE 4: Detection of c-src transcripts in normal and ICAM1^{tm1jegr} mice. Thymocytes were purified from normal and ICAM-1-deficient mice, and detection of transcripts was measured by RT-PCR using specific primers. Results are representative of three independent experiments.

A



B

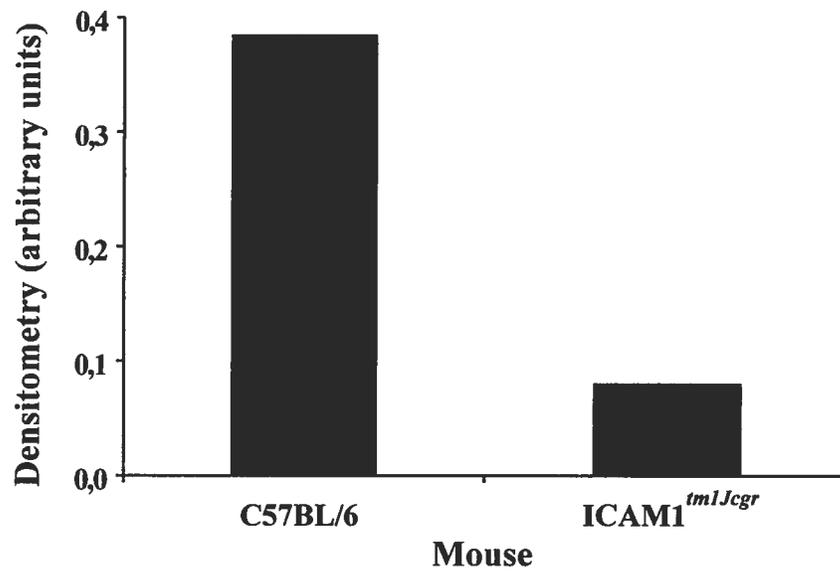


Table I. Lymphocyte counts and CD3 profiles of cells from spleen and lymph nodes

	Spleen				Lymph Nodes			
	Total number of lymphocytes ($\times 10^6$)	% of CD3+ Cells	Absolute Number of CD3+ Cells ($\times 10^6$)	Absolute Number of CFSE+ Cells ($\times 10^6$)	Total number of lymphocytes ($\times 10^6$)	% of CD3+ Cells	Absolute Number of CD3+ Cells ($\times 10^6$)	Absolute Number of CFSE+ Cells ($\times 10^6$)
C57BL/6	67.7 \pm 14.5	24.8 \pm 5.7	18.6 \pm 4.3	0.43 \pm 0.24	23.2 \pm 7.0	70.6 \pm 7.7	16.2 \pm 4.7	0.19 \pm 0.04
ICAMI ^{tm1Bay}	69.9 \pm 21.7	19.4 \pm 2.9 ^a	13.5 \pm 4.2 ^a	0.43 \pm 0.27	9.4 \pm 3.5 ^c	61.3 \pm 4.9 ^a	5.8 \pm 2.4 ^c	0.11 \pm 0.06 ^b
ICAMI ^{tm1Jegr}	65.9 \pm 20.9	16.8 \pm 1.9 ^a	11.0 \pm 3.6 ^b	0.54 \pm 0.11	10.1 \pm 3.6 ^c	67.1 \pm 5.9	6.8 \pm 2.1 ^c	0.12 \pm 0.05 ^a

^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.005$, ^c $p < 0.0005$,

Table II. *Thymocyte counts and CD3^{lo}/CD3^{hi} ratios 3 days post-injection with CFSE*

	Total number of thymocytes (x 10 ⁶)	Ratio of the % of CD3 ^{lo} /CD3 ^{hi} thymocytes	Ratio of the % of CFSE-labeled CD3 ^{lo} /CD3 ^{hi} thymocytes
C57BL/6	71.71 ± 29.76	2.13 ± 0.54	0.84 ± 0.29
ICAM1 ^{tm1Bay}	41.00 ± 8.96 ^a	1.77 ± 0.28	1.26 ± 0.43 ^b
ICAM1 ^{tm1Jcgr}	56.25 ± 25.61	2.28 ± 0.70	1.48 ± 0.55 ^a

^a These groups are significantly different from the C57BL/6 control group (p<0.05)

^b p=0.0559

Table III. Summary of differently expressed genes between C57BL/6 and ICAM1^{tm1Jeg} mouse thymus.

Position on Scatter blot ^a	Position on array ^b	Gene/protein name	GenBank accession number	Fold change ^c
1	C07b	src proto-oncogene	M17031	-176.9
2	C04d	c-jun proto-oncogene	J04115	-27.3
3	B02h	single-minded 2 (SIM2)	U42554	-22.8
4	E02n	fibroblast growth factor 6 (FGF6)	M92415	-16.7
5	C08i	breast cancer type 2 susceptibility protein (BRCA2)	U65594	-15.4
6	E08d	PAR4; thrombin receptor	AF080215	-12.2
7	A07a	T-cell leukemia homeobox 1 (TLX1)	S70632	-11.9
8	D05c	basic fibroblast growth factor receptor-1 (BFGF-R)	M28998	-10.0
9	D06h	CXC chemokine receptor 2	D17630	-9.4
10	B02n	ets-related transcription factor	U19617	-8.0
11	C02i	intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)	X52264	-7.8
12	E11g	LIM domain kinase (LIMK1)	U15159	-7.4

^a Corresponding to numbers on the scatter plot matrix (Figure 2B)

^b Illustrated at figure 3A. A gene list is available at Clontech's Atlas web page (atlasinfo.clontech.com)

^c +/-, increased/decreased (ICAM1^{tm1Jeg} vs C57BL/6 mouse thymuses)

Table IV. *Summary of differently expressed genes between resting and PMA-stimulated T cells*

Position on Scatter blot ^a	Position on array ^b	Gene/protein name	GenBank accession number	Fold change ^c
1	C07b	src proto-oncogene	M17031	+ 36.2
2	C08i	breast cancer type 2 susceptibility protein (BRCA2)	U65594	+ 16.5
3	D11m	nociceptin; orphanin FQ	D82866	+ 13.1
4	E11g	LIM domain kinase 1 (LIMK1)	U15159	+ 12.5
5	C04d	c-jun proto-oncogene	J04115	+ 4.8
6	B11j	GATA-binding protein 3 (GATA3)	X55123	- 6.4
7	D02j	granzyme A (GZMA)	M13226	- 6.3
8	A12m	basic helix-loop-helix leucine zipper protein rox	Y07609	- 4.2

^a Corresponding to numbers on the scatter plot matrix (Figure 3B)

^b Illustrated at figure 3A. A gene list is available at Clontech's Atlas web page (atlasinfo.clontech.com)

^c +/-, increased/decreased (PMA-stimulated vs T cells vs resting)

CHAPITRE 5

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

1.0. LE MARQUAGE *IN VIVO* DE THYMOCYTES AVEC LE CFSE: DÉVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE PERMETTANT L'ÉTUDE DE LA MIGRATION À LONG TERME ET SES APPLICATIONS

Plusieurs types de marqueurs/colorants ont été utilisés pour des études *in vivo*, surtout le FITC et le BrdU, mais les objectifs étaient différents de ceux présentés dans ce travail. Le premier objectif de ce projet de doctorat visait à développer une technique de marquage de thymocytes *in vivo* dans le but de permettre l'étude, à long terme, de l'émigration de ces cellules dans les tissus lymphoïdes de la périphérie.

Le FITC, qui s'attache de façon non-spécifique à la surface des cellules, a été utilisé dans le but de déterminer le phénotype des émigrants thymiques récents (Scollay *et al.*, 1980). Toutefois, le marquage de cellules au FITC n'est pas très stable, et ainsi dans ce contexte, ne se prête pas aux études à longue échéance. Ainsi, l'utilisation d'un petit nombre de cellules nécessite des extrapolations dans le temps pour évaluer le taux de migration. Quant au BrdU, il colore seulement les cellules en division. Cette technique a toutefois été très avantageuse pour les études de prolifération de diverses cohortes cellulaires parmi les différentes sous-populations thymocytaires (McClure *et al.*, 1988, Lucas *et al.*, 1993). Nous avons démontré que *in vivo*, le CFSE présente l'avantage de conserver le marquage de la cellule en G_0/G_1 pendant au moins 3 semaines. Son utilisation pour marquer des thymocytes *in vivo*, suivie d'analyses cytométriques et immunohistochimiques, a donc permis l'élaboration d'un portrait de la cinétique des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes de la périphérie. La simplicité et la fiabilité de cette approche rendent possible l'étude de plusieurs aspects de la migration cellulaire, même pour de très petites sous-populations, et dans des conditions expérimentales variées. Les résultats ainsi obtenus ont été présentés dans l'article I (Chapitre 2).

1.1 ÉTABLISSEMENT DE CONDITIONS OPTIMALES DE MARQUAGE

Le CFSE est un colorant vital estérifié qui se lie de façon covalente à des protéines intracellulaires par l'intermédiaire de résidus de lysine. Comme pour la plupart des marqueurs estérifiés, l'emploi du CSFE était auparavant restreint au marquage de cellules *in vitro*. Cependant, la concentration de CFSE normalement utilisée *in vitro*, soit 5 μM , s'est avérée insuffisante pour la détection de thymocytes colorés lorsqu'il a été injecté par voie intra-thymique. Ainsi, un éventail de concentrations de 25 à 400 μM ont été essayées dans le but d'atteindre un marquage maximal. Nous avons constaté que le pourcentage de cellules colorées augmentait de façon linéaire jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint à 200 μM . À cette concentration, plus que 99% des cellules étaient marquées. Il est à noter aussi que l'accroissement de la concentration de CFSE était accompagné d'une augmentation de l'intensité moyenne de fluorescence des thymocytes.

En fin de compte, la concentration optimale de CFSE utilisée pour le marquage de thymocytes *in situ* était de 400 μM , soit 80 fois supérieure à celle normalement utilisée *in vitro*. Par conséquent, il a fallu évaluer le potentiel toxique de ce produit lorsqu'il était injecté *in vivo*. Deux heures après l'injection, nous n'avons observé aucune différence significative dans le nombre de thymocytes totaux, par rapport au groupe témoin. La légère diminution dans le nombre de cellules après 24 heures, dans les deux groupes de souris traitées, est sans doute attribuable à la réaction post-opératoire normale de souris non-adrénalectomisées. La toxicité attribuable au CFSE est donc négligeable.

L'intégrité morphologique des thymocytes marqués au CFSE a été confirmée en comparant les histogrammes de FSC (forward light scatter) de thymocytes provenant de souris ayant reçu du PBS ou du CFSE. La superposition parfaite des histogrammes est une bonne indication que le CFSE n'a pas causé de modifications morphologiques importantes décelables.

Une des caractéristiques propres au CFSE, qui aurait pu limiter son utilisation dans nos expériences, est le fait que le pourcentage de cellules marquées passe de 100% à environ 15% en 24 heures, pour ensuite se stabiliser. Cependant, il est important de noter que ce même phénomène a été observé lorsque des lymphocytes, préalablement marqués *in vitro*, ont été injectés à des souris (Weston et Parish, 1990). Dans notre cas, cette énorme réduction de fluorescence ne peut être attribuée uniquement à une perte de thymocytes par apoptose ni à une dilution du CFSE causée par une prolifération massive de ces mêmes cellules. Cependant, on pourrait penser que puisque le CFSE s'associe à des groupements amines libres, et qu'il forme des liaisons covalentes avec ceux-ci, il est possible que le 100% observé au temps '0' reflète l'ensemble de toutes les protéines intracellulaires pouvant former cette association, incluant des protéines qui seraient éventuellement sécrétées ou bien celles qui ont une courte demi-vie. Le temps '0' ne serait donc pas représentatif d'un état homéostatique dans le thymus. Ainsi, il a été pertinent d'établir la distribution de thymocytes CFSE⁺, parmi les sous-populations décelables, par des anticorps anti-CD4 et anti-CD8. Les proportions de chaque sous-population, parmi les cellules marquées au CFSE, étaient quasiment identiques à celles dans le thymus entier, à l'exception d'une légère baisse dans le pourcentage de thymocytes DN. Cette baisse était contrebalancée par une augmentation correspondante parmi les thymocytes DP. La sous-représentation de la population DN notée à 24 heures pourrait être expliquée par le fait que celle-ci représente la plus petite et la moins différenciée des sous-populations thymocytaires, et que les cellules marquées auraient rapidement été remplacées par de nouveaux précurseurs non-marqués. De cette façon, cette population de thymocytes DN, marquée au CFSE, se différencierait en DP. Ceci concorde avec la légère augmentation constatée pour ce dernier groupe. Ainsi, les cellules marquées au CFSE constituent un échantillon représentatif des différentes sous-populations thymocytaires.

Deux heures suivant une injection du CFSE par voie intrathymique, 100% des thymocytes étaient marqués, indiquant qu'une saturation avait été atteinte et que, probablement, du CFSE libre était encore disponible dans le milieu extracellulaire. Ainsi,

la présence de CFSE libre dans le thymus, de même que la possibilité de fuite pendant les injections, ont soulevé l'hypothèse que des cellules extrathymiques auraient pu être marquées lors de cette procédure et se retrouver dans les organes lymphoïdes de la périphérie. Ceci a été exclu puisque la localisation immunohistochimique des cellules marquées au CFSE, dans la rate et les ganglions, était restreinte aux zones T-dépendantes.

1.2 LE MARQUAGE DES THYMOCYTES AU CFSE REFLÈTE LA SÉQUENCE DES ÉVÉNEMENTS DE DIFFÉRENCIATION ET D'ÉMIGRATION

Pour nous assurer que la différenciation intrathymique n'avait pas été modifiée par la présence du CFSE, nous avons étudié la cinétique de disparition des thymocytes CFSE⁺ par l'analyse du profil de CD3. Tel que prévu, les premières cohortes à disparaître étaient les cellules CD3^{-lo}, soit par sélection négative, soit par la différenciation de celles-ci en CD3^{hi}. Les résultats que nous avons observés sont en corrélation avec ceux obtenus lors d'études antérieures et correspondent à la séquence des événements qui a lieu durant la différenciation/émigration des thymocytes, telle que rapportée dans la littérature (Boyd et Hugo, 1991). Les observations immunohistochimiques de thymus ont corroboré ceci. Dans le but de localiser les cellules marquées au CFSE, des coupes de thymus congelés ont été traitées avec un anti-FITC conjugué à la peroxydase (tel que décrit par Garton et Schoenwolf, 1996). Trois jours suivant l'injection intrathymique du CFSE, on note que des cellules marquées se retrouvent et dans la médulla et dans le cortex. Par contre, 7 jours après l'injection du CFSE, on retrouve des thymocytes marqués uniquement dans la médulla. De plus, nous avons noté que plusieurs cellules stromales et endothéliales de la médulla thymique étaient également fortement marquées. En effet, si on observe le réseau de vaisseaux sanguins du thymus on voit que des branches de l'artère thoracique entrent via la capsule et elles demeurent intimement associées aux travées conjonctives. Elles pénètrent le parenchyme du thymus à la jonction cortico-médullaire et les capillaires, qui s'étendent dans le cortex, se regroupent ensuite pour se 'transvider' dans des veinules de la

médulla et de la jonction cortico-médullaire (Norment et Bevan, 2000). Ainsi, considérant la direction centripète de la circulation thymique, un marquage accentué des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins médullaires n'est guère surprenant. De plus, il a été démontré que les cellules épithéliales (Nieburgs *et al.*, 1985), les cellules dendritiques (Pelletier *et al.*, 1986), ainsi que les macrophages thymiques (Gallily et Savion, 1983) possèdent des estérases. Pour ce qui est de ces dernières cellules, ce sont surtout les macrophages présents à la jonction cortico-médullaire qui présentent une forte activité d'estérases (Milicevic et Milicevic, 1984).

1.3 ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DES ÉMIGRANTS THYMIQUES DANS LES GANGLIONS ET DANS LA RATE

Peu d'études ont rapporté la rentrée des émigrants thymiques dans les organes périphériques. Dans notre étude, nous avons étudié la cinétique de ces émigrants dans les ganglions et dans la rate en utilisant les marquages CFSE/CD3 pour la totalité des lymphocytes T, ou bien le CFSE/CD4 et le CFSE/CD8 pour les différentes sous-populations. Nos données démontrent que dans la rate, le plus grand nombre de cellules marquées est atteint 7 jours suivant l'injection intrathymique au CFSE. Ceci correspond à la journée où les dernières cellules marquées (CD3^{hi}) dans le thymus commencent leur sortie. Désormais, les cellules marquées commencent à disparaître de la rate. Au jour 9, presque aucune cellule ne peut y être décélée. La recirculation des splénocytes marqués vers les ganglions est peu probable car dans ces derniers, aucune nouvelle immigration n'a été notée au jour 7. En fait, le plateau observé s'est maintenu jusqu'au jour 9. Le remplacement des lymphocytes T est beaucoup plus rapide dans la rate que dans les ganglions. Il est de 9 jours pour les cellules CD4⁺ et 5 jours pour les CD8⁺ dans la rate, comparé à 21 jours pour les deux sous-populations dans les ganglions. Cette observation est en accord avec le fait que la rate constitue l'organe principal de la recirculation des lymphocytes, entretenant un « trafic » supérieur à l'ensemble de tous les autres organes lymphoïdes (Ford, 1969, Pabst, 1988). En outre, on peut éliminer la possibilité que

l'augmentation de cellules CFSE⁺ dans les ganglions soit due à une prolifération cellulaire mais à une accumulation de celles-ci, car sauf dans le cas d'une stimulation antigénique considérable, les émigrants thymiques récents chez une souris normale sont de phénotype naïf (Tough et Sprent, 1994).

En fait, à partir du stade néonatal jusqu'à l'âge adulte, le nombre de lymphocytes périphériques augmente progressivement, accommodant ainsi les émigrants thymiques. Chez les adultes par contre, le nombre total de lymphocytes T reste constant. Il est ainsi logique d'assumer que les cellules qui sont exportées du thymus ou générées par divisions cellulaires dans la périphérie peuvent survivre seulement si les autres populations cellulaires résidentes sont éliminées. Cette 'substitution cellulaire' assurerait un état d'homéostasie du 'pool' de lymphocytes périphériques. Ainsi, en utilisant des souris transgéniques pour un TCR spécifique, Tanchot et Rocha (1997) ont rapporté que le taux de cellules T mémoire dans la périphérie reste constant nonobstant l'arrivée d'émigrants thymiques. Cependant, les cellules T naïves et les cellules auto-réactives sont remplacées par les émigrants thymiques. Les émigrants thymiques pourraient déplacer les lymphocytes naïfs qui possèdent des spécificités redondantes et qui occupent inutilement des niches utilisables par d'autres cellules. Berzins et collaborateurs (1998) suggèrent que pendant une période d'environ 3 semaines, la survie des émigrants thymiques récents soit avantagée par rapport aux lymphocytes résidents. Cette période de temps donnerait l'opportunité aux nouveaux émigrants de rencontrer un antigène et de s'établir parmi les lymphocytes T mémoire déjà présents. Après cette période cruciale, les lymphocytes naïfs qui n'ont pas été activés seraient, à leur tour, substitués par de nouveaux émigrants thymiques. Nos résultats, par contre, semblent suggérer qu'il y aurait une résistance des émigrants thymiques CD8⁺ à entrer et demeurer dans la rate. Freitas et collaborateurs (1996) ont rapporté un phénomène semblable à ce que nous avons observé. Ces chercheurs suggèrent qu'il existe une compétition cellulaire parmi les lymphocytes T CD8⁺ de sorte que certains lymphocytes périphériques résisteraient à un remplacement par des émigrants thymiques nouvellement arrivés. Ce même type de compétition existe aussi parmi les lymphocytes B (Cyster et Goodnow, 1995, Freitas *et al.*, 1995, Agenès et

Freitas, 1999). Les mécanismes moléculaires à la base de cette compétition demeure toutefois mal définis. Bien que dans le cas du lymphocyte B il impliquerait possiblement les signaux intracellulaires via le récepteur antigénique, et donc la présence d'antigène (McLean *et al.*, 1997), il semble que cette compétition au niveau du lymphocyte T ne requiert cependant pas la présence de complexe antigénique peptide/CMH (Dummer *et al.*, 2001), mais pourrait impliquer l'IL-7 (Schluns *et al.*, 2000, Fry *et al.*, 2001).

En comparaison à la rate, l'entrée des lymphocytes T dans les ganglions semble être plus contrôlée. La migration élective des lymphocytes vers les ganglions est dépendant des interactions, *via* des sélectines, avec les cellules endothéliales spécialisées des veinules capillaires (high endothelial venules) (Gallatin *et al.*, 1983, Geoffroy et Rosen, 1989). Effectivement, Bradley et collaborateurs (1994) ont montré que l'administration *in vivo* d'anticorps anti-sélectine conduisait à un affaiblissement de la recirculation des lymphocytes dans les ganglions, menant à leur localisation préférentielle vers la rate. Ce même phénomène s'est produit chez des souris déficientes en L-sélectine (Arbonès *et al.*, 1994). Il est donc possible que l'entrée rapide des émigrants thymiques dans les ganglions soit le résultat d'une migration préférentielle dépendante de la L-sélectine, et que celle dans la rate soit moins contrôlée. En effet, 75% de tous les émigrants thymiques récents qui se localisent dans la rate sont L-sélectine⁻ (Holder *et al.*, 1999). Cependant, il serait risqué d'en déduire que les lymphocytes qui y entrent le font par défaut. Aucun mécanisme n'est clairement défini, mais Weston et Parish (1992) ont montré que le blocage des cellules spléniques sinusoidales avec le sucre mannose a inhibé l'entrée de lymphocytes dans la rate (mais pas dans les ganglions). Toutefois, on ne sait pas si des récepteurs spécifiques pour le mannose sont impliqués dans l'adhésion « lympho-sinusoidale ».

Nous avons aussi déterminé le nombre approximatif de thymocytes émigrants en examinant la vitesse de disparition des cellules CFSE⁺/CD3^{hi}. Ce taux, d'environ 3 x 10⁶ cellules/jour, qui se rapproche de celui rapporté par Scollay et collaborateurs (1980), est basé sur le nombre de thymocytes médullaires marqués au jour 5; à ce jour, toutes les

autres cellules marquées ont disparu. Cependant, nos résultats permettent d'aller plus loin dans les interprétations que la technique utilisée par Scollay. Des extrapolations dans le temps, utilisant un très petit nombre de cellules marquées pour évaluer le taux de migration ne sont pas nécessaires. De plus, notre technique permet de suivre les lymphocytes marqués jusqu'à trois semaines post-émigration, offrant la possibilité d'étudier la localisation de ceux-ci dans différents organes lymphoïdes à différents temps pendant leur circulation.

Pour nous assurer que les émigrants thymiques marqués au CFSE, que nous avons détectés dans les organes lymphoïdes périphériques soient, en effet, fonctionnels et intacts, leurs intensités de fluorescence avec les anticorps anti-CD3, -CD4 et -CD8 ont été comparées à celles provenant de souris témoins. Suzuki et collaborateurs (1995) ont observé que les molécules des deux co-récepteurs CD4 et CD8 sont synthétisées de façon active, même parmi les lymphocytes T matures SP. Ainsi, si le CFSE avait interféré avec des processus métaboliques intracellulaires, ceci aurait, sans doute, été reflété par un changement du niveau de l'expression de ces marqueurs fonctionnels. Effectivement, les cellules marquées au CFSE exhibent ces antigènes avec la même intensité que les cellules non-marquées. Ceci est démontré par les histogrammes où l'on voit une coïncidence des pics d'intensité de fluorescence pour les cellules provenant des deux groupes.

En effet, depuis le développement de la méthode, par Lyons et Parish (1994), pour analyser la division cellulaire utilisant le CFSE, plusieurs observations dans la littérature mènent à la conclusion que ce réactif n'affecte pas les fonctions des différentes cellules étudiées; voici quelques exemples. La prolifération d'un lymphocyte T provoquée par une stimulation antigénique et mesurée avec le CFSE est conforme à celle mesurée par la méthode classique d'incorporation de ^3H -thymidine (Fulcher et Wong, 1999). Lorsqu'on stimule des lymphocytes B au repos, par des anti-immunoglobulines ou par un mélange du ligand pour le CD40 et des cytokines, ceci induit la prolifération de la cellule et provoque un changement d'isotype. Utilisant le CFSE comme marqueur de prolifération, il a été montré que le changement d'isotype était dépendant de la division cellulaire

(Hodgkin *et al.*, 1996, Hodgkin *et al.*, 1997, Hasbold *et al.*, 1998). Ainsi, la différenciation de lymphocytes B n'est pas affectée par l'incorporation du CFSE. Utilisant le CFSE, il a été démontré que le répertoire et la quantité de cytokines produites par un lymphocyte T naïf varient selon le nombre de divisions (déterminé par le signal émis par le CFSE, qui se réduit progressivement d'une moitié avec chaque mitose) que la cellule subit face à une stimulation antigénique (Bird *et al.*, 1998, Gett et Hodgkin, 1998). Très récemment, une nouvelle technique pour mesurer l'activité cytolytique de lymphocytes T CD8⁺ (FATAL : « Fluorometric Assessment of T Lymphocyte Lysis ») a été rapportée, et celle-ci implique la co-culture de cellules effectrices avec des cellules cibles préalablement marquées au CFSE (et au PKH-26) (Sheehy *et al.*, 2001). Lorsque les cellules cibles sont lysées, le CFSE (attaché à des protéines intracellulaires) est libéré (mais il n'est, cependant, pas absorbé ou réutilisé par des cellules adjacentes (Weston et Parish, 1990)), et le pourcentage de lyse spécifique est déterminé. Cet essai s'est avéré très efficace et montre une forte corrélation avec l'essai classique de libération du radio-isotope ⁵¹Cr (Sheehy *et al.*, 2001). Puisque différents processus n'ont pas été affectés chez des lymphocytes marqués au CFSE, on peut conclure que ce réactif ne semble pas nuire de façon significative aux fonctions cellulaires, bien qu'on se doit, comme dans le cas de tous les colorants vitaux, d'utiliser ce type de réactif avec une certaine prudence.

1.4 LES APPLICATIONS POSSIBLES : FAITS ET PERSPECTIVES

La technique de marquage *in vivo* avec le CFSE se prête donc à divers types d'études.

Cette méthode est en effet particulièrement avantageuse pour les études sur le rôle des molécules impliquées dans la migration leucocytaire, comme nous l'avons vu dans nos résultats du Chapitre 4. Combinée aux approches faisant appel au génie génétique, le marquage au CFSE permet ainsi de déceler rapidement, par exemple, l'effet de l'ablation d'un gène (ou via son expression contrôlée dans un modèle transgénique) impliqué dans la migration lymphocytaire, et ceci à plus ou moins long terme.

Exploitant la méthodologie du marquage de thymocytes *in vivo* avec le CFSE, nous avons décidé d'étudier les effets d'une déficience de la molécule ICAM-1 sur l'émigration des thymocytes. Cette question sur le rôle d'ICAM-1 dans la différenciation des thymocytes est controversée à cause des résultats contradictoires obtenus *in vivo* et *in vitro*. Les résultats obtenus représentent les premières observations expérimentales *in vivo* d'un rôle d'ICAM-1 dans la différenciation des lymphocytes T. Chez les souris portant une ablation génétique au niveau du gène de l'ICAM-1, nous avons pu d'abord mettre en évidence une baisse significative de lymphocytes T dans les organes lymphoïdes périphériques engendrée par une réduction de l'émigration des lymphocytes T (CFSE⁺) du thymus vers les ganglions. Cependant nous n'avons pas noté de réduction de cellules CFSE⁺ dans la rate. Cette dernière observation concorde avec l'idée que l'entrée dans cet organe, contrairement aux ganglions, est plus passive, soit HEV-indépendante et possiblement donc ICAM-1-indépendante. D'autre part, il est possible que la rate exprime une quantité importante d'isoformes fonctionnelles d'ICAM-1 permettant, de ce fait, des interactions via cette molécule. Les deux souches de souris ICAM-1-déficientes expriment un répertoire d'isoformes, généré par un épissage alternatif. Ces isoformes sont distinctes de la forme commune d'ICAM-1, mais la plupart d'entre elles gardent, toutefois, la capacité de s'associer au ligand LFA-1 bien qu'à différents degrés (King *et al.*, 1995, van Den Engel, 2000). L'hypothèse a été émise que ces isoformes puissent potentiellement être importantes pour établir des seuils d'activation (Shaw et Dustin, 1997). Ainsi, la variation de l'expression de la molécule ICAM-1, par exemple, pourrait modifier l'avidité de l'interaction avec une autre cellule. Ainsi la sensibilité de l'activation de la cellule pourrait autant être modifiée. D'autres scénarios sont aussi possibles : les émigrants thymiques CFSE⁺, qui seraient normalement entrés dans les ganglions de souris normales, pourraient avoir été redirigés vers la rate dans les souris déficientes en ICAM-1. Ainsi une immigration, par ailleurs diminuée dans la rate, serait masquée par la colonisation des niches disponibles par les cellules redirigées. Il est également concevable que l'absence d'expression de la molécule ICAM-1 puisse soit provoquer, soit accélérer la sortie ou la mort des émigrants thymiques

récents qui entrent dans la rate, causant ainsi la diminution du nombre total de lymphocytes T dans cet organe.

Les données obtenues pour les ganglions par contre, reflètent l'idée qu'ici, l'entrée de lymphocytes T naïfs survient via les HEV, là où l'activation des lymphocytes par des chimiokines HEV-spécifiques et les interactions entre les molécules d'adhésion et leurs ligands sont essentielles (Tangemann *et al.*, 1998). Nos résultats concordent d'ailleurs avec l'étude effectuée par Warnok et collaborateurs (1998) démontrant que l'attachement des lymphocytes aux HEV est complètement aboli lors d'un ajout d'anticorps bloquants anti-LFA-1. Ceci suggère fortement que pour ce qui est de l'entrée des lymphocytes dans les ganglions, le ligand principal de la molécule LFA-1 est l'ICAM-1. Cette dernière agit conjointement avec des sélectines, car chez des souris ICAM-1/L-sélectine déficientes, le recrutement des leucocytes aux sites d'inflammation est énormément restreint (Steeber *et al.*, 1999).

Dernièrement il a été démontré que lorsque les émigrants thymiques récents entrent dans les organes lymphoïdes secondaires, leur expression de la molécule ICAM-1, entre autres, est augmentée. Cependant, cette expression est diminuée lorsqu'ils ré-émigrent dans le sang. En effet, les lymphocytes T qui expriment plus de molécules ICAM-1 sur leurs membranes cytoplasmiques requièrent environ 5 heures de plus pour compléter leur migration à travers les ganglions que ceux qui en expriment moins. Les auteurs suggèrent que cette augmentation de l'expression de l'ICAM-1 pourrait permettre des interactions prolongées avec les CPA des ganglions (Luettig *et al.*, 2001). À la lumière de ces résultats, on pourrait imaginer que ce mécanisme de rétention dans les ganglions ne soit plus, ou pour le moins peu présent chez les souris déficientes en ICAM-1, et de ce fait on voit une baisse dans le nombre d'émigrants thymiques CFSE⁺ dans cet organe. De plus, puisque l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 survient aussi parmi les lymphocytes T naïfs et mémoire dans les ganglions et la rate (Luettig *et al.*, 2001), il n'est pas surprenant de voir une baisse dans le nombre total de cellules CD3⁺ dans ces deux organes chez les souris déficientes en ICAM-1.

Dans le but de déterminer si la baisse du nombre d'émigrants thymiques dérive d'une modification au niveau de la différenciation des lymphocytes, nous avons analysé les proportions de différentes sous-populations thymocytaires marquées au CFSE. Le fait que les pourcentages de cellules CD3^{lo} et CD3^{hi} étaient augmentés et diminués respectivement, suggère une anomalie dans la transition des thymocytes du stade immature au stade mature chez les souris déficientes en ICAM-1. En fait, un rôle possible de l'ICAM-1 sur le développement des lymphocytes T avait été suggéré par Fine et Kruisbeek (1991). Dans cette étude, l'ajout d'anticorps anti-ICAM-1 à des FTOC avait induit une diminution transitoire du nombre de thymocytes DP.

Utilisant l'approche génétique des puces à ADN (Lockhart et Winzeler, 2000), pour discerner le patron d'expression de gènes dans le thymus de souris normales et de souris déficientes en ICAM-1, nous avons trouvé que plusieurs gènes étaient sous-exprimés dans le thymus de ces dernières. Un des effets qui semble particulièrement d'intérêt est la baisse notable de l'expression de *c-src* dans les thymocytes de souris déficientes en ICAM-1. Il a été démontré qu'une stimulation mitogénique des lymphocytes T CD4 et CD8 matures entraîne une augmentation de l'expression de ce gène et que les thymocytes expriment le pp60^{c-src} de façon constitutive (Branch et Mills, 1995), suggérant ainsi que ce gène joue un rôle important dans le développement de lymphocytes T. Un autre gène qui a attiré notre attention dans l'analyse par matrices d'ADNc fut *limk-1*.

Bien que *limk-1* soit surtout reconnu comme étant exprimé surtout dans les tissus d'origine neurale (Proschel *et al.*, 1995), notre laboratoire a confirmé que *limk-1* est également exprimé au niveau des lymphocytes T et que son expression augmente suite à l'activation des lymphocytes T (S. Moisan, manuscrit en préparation). Bien que *limk-1* soit connu pour son rôle dans la régulation (structurelle et fonctionnelle) de synapses matures (Wang *et al.*, 2000), ce même rôle de *Limk-1* serait plausible dans le cas des synapses immunologiques lors de la présentations d'antigènes aux lymphocytes T (Dustin et Cooper, 2000). En effet, il a été démontré que LIMK-1 induit la

phosphorylation de la cofiline, une protéine régulatrice du cytosquelette, qui provoque la dépolymérisation de l'actine. La phosphorylation de la cofiline par LIMK-1 inhibe sa liaison avec l'actine (Arber *et al.*, 1998, Yang *et al.*, 1998). Les actions de polymérisation et de dépolymérisation des filaments de l'actine génèrent la force pour plusieurs types de mouvements cellulaires. Ainsi l'intégrité du cytosquelette est primordiale pour des activités cellulaires tels que la motilité, l'adhésion, la morphogenèse, la croissance, la ségrégation des chromosomes, la projection de lamellipodes lors de la phagocytose, etc. (Moreau et Way, 1999, Leverrier et Ridley, 2001, Ohtsuka *et al.*, 2001). Puisque nous avons démontré que les souris déficientes en ICAM-1 sous-expriment le gène *limk-1*, il serait intéressant de voir si LIMK-1 pourrait être à l'origine des anomalies que nous avons observées, soit : 1) un ralentissement de la vitesse de différenciation des thymocytes, indiqué par le ratio plus élevé de thymocytes CD3^{lo}/CD3^{hi} parmi les thymocytes CFSE⁺, et 2) une diminution dans le nombre d'émigrants thymiques récents vers la périphérie ainsi que du nombre de lymphocytes T totaux dans les ganglions et la rate. Plusieurs approches expérimentales *in vivo* et *in vitro* peuvent être utilisées en sens, notamment par l'utilisation de modèles transgéniques faisant appel à l'ablation génétique de *limk-1*. Puisque la migration intrathymique est accomplie entre autres, par l'entremise de protéines de la matrice extracellulaire et de chimiokines (Villa-Verde *et al.*, 1999, Savino *et al.*, 2000, Savin *et al.*, 2000, Norment et Bevan, 2000), nous pourrions également faire appel à une série d'expériences de tests fonctionnels *in vitro* en utilisant des transfectants stables de lymphocytes T exprimant *limk-1* ou un dominant négatif de cet enzyme afin de déterminer son rôle sur les propriétés migratoires des lymphocytes T. Une approche semblable a été utilisée avec succès pour déterminer l'implication de LIMK-1 dans la régulation du cytosquelette via la cofiline (Arber *et al.*, 2000, Yang *et al.*, 2000). Puisque la capacité des lymphocytes T à entrer dans les ganglions est dépendante, entre autres, de leur migration à travers les HEV, et que ce processus requiert une réorganisation importante du cytosquelette, ces transfectants pourraient être utilisés également pour examiner le rôle de LIMK-1 dans l'extravasation à travers les cellules endothéliales en utilisant un essai de type « Stamper-Woodruff ». Enfin, puisque nous avons démontré que le proto-oncogène *c-src* également est sous-exprimé chez les souris

déficientes en ICAM-1, et qu'il est aussi impliqué dans la régulation du cytosquelette (Landriscina *et al.*, 2000, Weaver *et al.*, 2001), les mêmes expériences pourraient être menées en parallèle avec *c-src* et une forme dominante-négative de cette kinase. *c-src* phosphoryle plusieurs substrats impliqués dans la réorganisation du cytosquelette, notamment FAK, cortactin, talin, vinculin, tensin, etc (Tatosyan et Mizenina, 2000).

En résumé, nos résultats soulèvent la possibilité que l'expression de l'ICAM-1 dans le thymus soit essentielle à l'intégrité de certaines voies de signalisation dans les thymocytes. Les souris déficientes en ICAM-1 pourraient donc présenter des anomalies dans ces voies de signalisation, menant à la perturbation du développement des lymphocytes T. Nos résultats constituent la première démonstration *in vivo* que la molécule ICAM-1 serait impliquée dans le développement des lymphocytes T. Des expériences futures devront être menées afin de déterminer l'impact de ces anomalies au niveau des voies d'activation. L'utilisation de modèles transgéniques au niveau du récepteur à antigènes des cellules T pourraient être utiles en ce sens, notamment dans le but de moduler la l'efficacité de la sélection positive et négative en absence d'ICAM-1 et de voies de signalisations complètement fonctionnelles.

1.5 IMPACT DE LA TECHNIQUE DE MARQUAGE *IN SITU* AVEC LE CFSE

Depuis l'apparition de notre article en 1998, sur la technique de marquage *in situ* avec le CFSE, une dizaine d'études ont été publiés au sujet de l'émigration thymique. Jusqu'à maintenant, la plupart des chercheurs restent fidèles à l'utilisation du FITC pour marquer les thymocytes. Deux nouvelles techniques ont été depuis mises au point pour la détection et l'étude des émigrants thymiques récents (Al-Harhi *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2001). La première, basée sur l'utilisation du PCR, ne permet pas d'étudier les cellules individuellement, ni de phénotypage précis, alors que la deuxième est basée sur un système expérimental *in vitro* faisant appel au FTOC. Cependant, même si notre technique n'a pas encore été adoptée par d'autres équipes, notre étude a été citée plusieurs

fois quant à l'approche expérimentale et aux résultats obtenus au niveau des « niches lymphoïdes ». Parmi ceux-ci, deux manuscrits, parus dans *Immunology and Cell Biology* (Parish, 1999) (d'ailleurs le docteur Christopher E. Parish est le 'père' du CFSE) et *Journal of Immunological Methods* (Sheehy *et al.*, 2001), font référence directement à la technique. Deux autres, dans *Immunology Today* (Anderson *et al.*, 1999) et *Annual Reviews in Immunology* (Freitas et Rocha, 2000) citent des résultats qui ont découlé directement des expériences décrites dans notre étude. De plus, en avril 2001, une nouvelle section (Chapitre 4, Section 4.9) a été introduite dans 'Current Protocols in Immunology' qui s'intitule « Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation »; nous avons également été cités ici.

Les deux prochains paragraphes illustrent des exemples d'applications possibles du marquage *in vivo* utilisant le CFSE. Le vieillissement est associé à l'involution du thymus. Le nombre de précurseurs thymiques qui s'engagent dans la différenciation est réduit (Thoman, 1997), et en effet, la transition des thymocytes du stade DN au stade DP semble être limitée par la capacité de ces premières cellules à proliférer (Thoman, 1995, Thoman, 1997). Ainsi, la contribution du « pool » de lymphocytes T naïfs est amoindrie (Scollay *et al.*, 1980). Quelles seraient donc les répercussions de cette baisse d'émigration? Est-ce que le ratio des différentes sous-populations d'émigrants thymiques est modifié? Le patron de recirculation lymphocytaire est-il modifié? Est-ce que l'espérance de vie de ces cellules T naïves est allongée pour augmenter la possibilité de rencontre avec un antigène? De quelle façon la diversité (maintenue normalement par l'introduction de nouvelles spécificités de TCR) est-elle assurée? De plus, puisque les cellules marquées au CFSE sont viables, on pourrait même songer à les trier et à étudier plusieurs aspects de leur état fonctionnel, telle que leur capacité de proliférer face à des antigènes, à établir leur profil de production de cytokines, ou bien faire des analyses plus globales avec des 'puces à ADN'. Puisque le vieillissement est souvent associé à une plus grande prédisposition à certaines infections et à des cancers, la compréhension de ces différents mécanismes serait essentielle pour concevoir par exemple, une thérapie

possible dirigée vers le rehaussement des fonctions thymiques et ainsi améliorer le système immunitaire chez les personnes âgées.

L'implantation de tumeurs mammaires chez les souris conduit à une involution progressive du thymus qui est en corrélation avec la croissance de la tumeur (Adkins *et al.*, 2000). En effet, cette atrophie est due à un arrêt de la différenciation et à une augmentation de l'apoptose (Adkins *et al.*, 2000, Otsuka *et al.*, 2000). Les mêmes questions que nous nous sommes posées pour le processus du vieillissement et mentionnées ci-haut pourraient être applicables ici. Le concept de la perte d'immunité anti-tumorale pourrait ainsi possiblement être mieux compris.

2.0 L'ATTACHEMENT DE LA UEA-I SUR DES CEM *IN VIVO* SEMBLE INFLUENCER LA PROLIFÉRATION DE THYMOCYTES CD3⁻ ET CD3^{lo}, MAIS N'INFLUENCE PAS LE TAUX D'ÉMIGRATION

Le deuxième objectif de ce projet de doctorat visait à établir quelles activités thymocytaires résultent de leurs interactions avec une sous-population majeure de CEM. La première approche expérimentale utilisée a été d'interférer, *in vivo*, avec ces contacts, en utilisant la UEA-I, tout en conservant intacte l'architecture thymique. La UEA-I est une lectine qui se lie à des résidus de L-fucose (Allen *et al.*, 1977). Dans le thymus, la UEA-I s'attache de façon spécifique à une large population de CEM (Farr et Anderson, 1985). Cette lectine a été utilisée auparavant comme marqueur immunohistochimique de CEM sur des coupes de thymus congelé (Farr et Anderson, 1985). Nous avons ainsi combiné d'une part le CFSE, pour son utilité comme indicateur d'émigration de thymocytes, et d'autre part, la UEA-I pour sa capacité à se lier sélectivement à une sous-population de CEM. Nous avons ainsi démontré que les CEM UEA-I⁺ peuvent modifier la prolifération de thymocytes CD3⁻ et CD3^{lo} dans le thymus adulte, mais qu'elles ne semblent pas influencer le taux d'émigration de thymocytes matures vers la périphérie. Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article II (Chapitre 3).

La deuxième approche expérimentale que nous avons exploitée a été celle d'utiliser les FTOC pour étudier les effets de l'attachement de la UEA-I aux CEM sur le développement des thymocytes, puisqu'ils sont souvent utilisés pour leur capacité de mimer le développement des thymocytes *in vivo*. Les résultats sont présentés dans l'article III (Chapitre 3). La flexibilité de ce modèle *in vitro*, permettant l'ajout de différentes substances telles que des cytokines (Varas *et al.*, 1998, Leclercq *et al.*, 1996), des anticorps (Kaneta *et al.*, 2000, Toyooka *et al.*, 1998) et des peptides (Williams *et al.*, 1998, Girao *et al.*, 1997), a permis d'élucider l'importance des interactions cellulaires impliquées dans le développement des thymocytes. Par exemple, les FTOC ont joué un rôle crucial quant à l'élucidation du développement de cellules TCRαβ et TCRγδ démontrant, entre autres, que dans le thymus fœtal, le développement de cellules TCRγδ

a lieu en cycles, avant et durant le développement de cellules TCR $\alpha\beta$, le premier pic se manifestant au jour 5 de gestation et le deuxième, à la naissance (Tatsumi *et al.*, 1994-95). En ajoutant des anticorps aux FTOC, Kruisbeek et Fine (1991) ont démontré qu'en bloquant soit le LFA-1, qui est normalement exprimé sur la plupart des thymocytes, soit la ICAM-1, exprimée sur des cellules stromales thymiques dans le cortex et dans la médulla, la différenciation des précurseurs DN en cellules DP était diminuée.

2.1 EN PRÉSENCE DE LA UEA-I, LE POURCENTAGE D'ÉMIGRANTS THYMIQUES CFSE⁺ EST AUGMENTÉ, TOUT EN RETROUVANT UNE ACCUMULATION DE THYMOCYTES CFSE⁺ DANS LE THYMUS : LE PARADOXE EST EXPLIQUÉ

Nos données initiales semblaient indiquer qu'il y avait eu une augmentation globale dans le pourcentage d'émigrants thymiques CFSE⁺ dans la rate et dans les ganglions de souris traitées *in vivo* avec la UEA-I. Suite à cette présumée augmentation de la sortie des thymocytes vers la périphérie, il était logique d'anticiper une diminution proportionnelle de cellules marquées au CFSE dans le thymus, surtout parmi la sous-population de thymocytes CD3^{hi}. Nous avons au contraire observé que le blocage *in vivo* des CEM par la UEA-I a plutôt entraîné une accumulation de thymocytes CFSE⁺ dans les trois sous-populations, soit CD3⁻, CD3^{lo} et CD3^{hi}. Pour résoudre ce paradoxe, les faits suivants ont été établis : 1) La présence de UEA-I dans le thymus n'a pas causé de rétention préférentielle de CFSE à l'intérieur des cellules. Ainsi, l'accumulation de thymocytes CFSE⁺ dans le groupe de souris traitées avec la UEA-I n'était pas due à la présence de cette lectine. 2) Les thymocytes qui avaient déjà émigré vers la périphérie n'ont pas recirculé dans le thymus de façon significative. Chez le jeune adulte, la migration de lymphocytes T dans le thymus est restreinte aux cellules T activées. En effet, des lymphocytes T pré-activés par un mitogène et injectés, en large quantité, par voie intraveineuse, représentent moins de 1% de thymocytes matures (Agus *et al.*, 1991). De cette façon, même s'il y avait eu une migration de lymphocytes vers le thymus, le

pourcentage de cellules CFSE⁺ observé est fort supérieur au 1 % cité dans la littérature. 3) La lectine UEA-I n'a pas de pouvoir mitogénique. Nous avons considéré ce point car il est très bien connu que plusieurs lectines, telle que la Con A, induisent la prolifération de certaines populations lymphocytaires. Puisque l'effet prolifératif de UEA-I n'avait jamais été documenté auparavant, nous avons donc jugé essentiel de vérifier ceci, en fonction des résultats obtenus, soit l'accumulation de thymocytes CFSE⁺ dans le thymus. Ainsi, l'effet prolifératif de UEA-I a été vérifié *in vitro* et il a été constaté que cette lectine n'a induit aucune réponse proliférative des thymocytes. 4) Le blocage de CEM par la UEA-I a inhibé la prolifération des thymocytes CD3⁻ et CD3^{lo}, mais pas des CD3^{hi}. Quoique aucun effet mitogénique de la UEA-I seule n'ait été décélé *in vitro*, nous avons voulu vérifier si la UEA-I aurait pu modifier la prolifération des thymocytes dans leur environnement naturel, car on ne pouvait pas exclure la possibilité que la UEA-I ait besoin d'une deuxième molécule pour qu'un effet mitogénique puisse survenir. Ainsi, suivant un traitement *in vivo* avec la UEA-I, nous avons constaté que seules les proportions de thymocytes immatures (CD3⁻, CD3^{lo}) en phase S/G₂M étaient diminuées. Le CFSE a été utilisé auparavant pour quantifier la prolifération de cellules *in vitro*. Il a été démontré que l'intensité de fluorescence des cellules CFSE⁺ est réduite de moitié après chaque division cellulaire (Lyons, 1999). Ainsi, il semblerait logique qu'une légère prolifération conduise à une augmentation du nombre de cellules CFSE⁺, même si leur intensité de fluorescence est moindre. Cependant, une prolifération vigoureuse aboutit à la dilution du CFSE, parmi les cellules descendantes, à la limite du seuil de détection. Dans le contexte de nos résultats, une diminution de la prolifération de cellules CD3⁻ et CD3^{lo} empêche la dilution intracellulaire du CFSE et mène donc à la rétention du marqueur pour une période prolongée. Puisque les cellules CD3^{lo}, qui se différencient en CD3^{hi}, ont eu une prolifération moindre dans le groupe traité avec la UEA-I, comparé au groupe témoin, le CFSE s'est moins dilué, a persisté, et par conséquent, plus de cellules CD3^{hi}CFSE⁺ ont été retrouvées dans ce même groupe. Ainsi, l'augmentation du nombre de cellules CFSE⁺ dans la périphérie chez les souris traitées avec la UEA-I ne reflète pas une augmentation du nombre d'émigrants, mais tout simplement plus de cellules CFSE⁺ parmi le même nombre d'émigrants tel que démontré par les courbes de migration

parallèles. Ainsi, le blocage *in vivo* de CEM par la UEA-I a inhibé la prolifération des thymocytes CD3⁻ et CD3^{lo}, mais pas celle des CD3^{hi}.

L'observation que les CEM semblent influencer les thymocytes DN sous-capsulaires et les DP corticaux est significative et démontre, en effet, que le thymus n'est pas un organe compartimenté de façon rigide. En réalité, la région sous-capsulaire et la jonction cortico-médullaire sont « liées » par des trabécules thymiques. Il serait donc possible que ce lien physique entraîne des interactions entre quelques CEM et des thymocytes DN ; dans notre étude, celles-ci seraient inhibées. Il a été montré auparavant que des thymocytes corticaux DP peuvent former des complexes avec des CEM provenant d'une lignée cellulaire (Couture et al., 1990, Hugo et Potworowski, 1990, Potworowski et al., 1989). Il a été suggéré que toutes les cellules épithéliales du thymus proviennent d'une seule origine (Ritter et Boyd, 1993, Ropke et al., 1995, Penit et al., 1996). Il serait possible donc que les interactions, via des ligands spécifiques, qui s'effectuent normalement entre les cellules épithéliales corticales et les thymocytes corticaux, ces mêmes ligands (ou des isoformes de ceux-là) soient encore présents sur des CEM permettant des interactions avec des thymocytes immatures, surtout ceux à la jonction cortico-médullaire. Toutefois, il n'a pas été démontré si ce genre d'interaction survient réellement *in vivo*.

2.2 L'ATTACHEMENT DE LA UEA-I SUR DES CEM DE THYMUS FOETAUX REDUIT LE NOMBRE DE THYMOCYTES CORTICAUX TCR $\alpha\beta$ ⁺

Parallèlement à l'étude *in vivo*, nous avons exploité le système « clos » des FTOC, c'est-à-dire sans influx de précurseurs ni de sortie significative de cellules matures, pour étudier les effets de la UEA-I sur le développement des thymocytes. Puisque la différenciation des cellules épithéliales et le développement des thymocytes sont interdépendants (Ritter et Boyd, 1993), une absence prolongée de contact entre ces deux

populations cellulaires, due à la présence constante de la UEA-I, pourrait rendre les CEM incapables de supporter la thymopoïèse, et ainsi les effets de blocage par cette lectine seraient amplifiés par rapport à ce que nous avons noté *in vivo*. Nous avons démontré que la UEA-I, qui était présente dans les lobes thymiques à une concentration constante, se lie spécifiquement aux CEM. Dans les expériences préliminaires, nous avons aussi démontré qu'elle diminue l'adhésion des thymocytes aux cellules épithéliales et qu'elle n'influence pas directement la viabilité des thymocytes. À partir de FTOCs incubés pendant une période de 12 jours avec la UEA-I, nous avons fait quatre constatations principales : 1) il y a eu une diminution du nombre total de cellules, 2) celle-ci était attribuable à une chute dans le nombre de cellules corticales, 3) les cellules CD3^{hi} n'ont pas été affectées, et 4) les cellules TCR $\gamma\delta^+$ non plus. L'interprétation de ces données est complexe, car, de même que dans les expériences *in vivo*, le revêtement des CEM avec la UEA-I n'a pas eu d'impact sur les thymocytes CD3^{hi} médullaires, qui eux, devraient se lier aux CEM. Nous avons plutôt noté une influence sur les thymocytes CD3⁻ et CD3^{lo}, soit des cellules qui se retrouvent dans un compartiment différent, le cortex.

Il est intéressant de noter que le nombre de thymocytes médullaires CD3^{hi} ne semble pas avoir été affecté par le traitement avec la UEA-I car ces cellules découlent directement de la différenciation des populations corticales CD3⁻ et CD3^{lo}, qui elles, ont été réduites. Cependant, même si le nombre absolu de cellules CD3^{hi} n'a pas changé, nous avons observé une augmentation dans le pourcentage de ces mêmes cellules dans le groupe traité avec la UEA-I lorsqu'on le compare au groupe témoin. Ainsi, le patron classique de la distribution du CD3 est modifié. Comment expliquer ceci ? Puisque dans le système « clos » des FTOC il n'y a aucun influx de précurseurs, une accélération du taux de la différenciation des thymocytes pourrait expliquer pourquoi nous sommes arrivés au même résultat final dans les deux groupes (aucune différence significative dans le nombre de thymocytes CD3^{hi}). Ainsi, cette augmentation du taux de différenciation mènerait invariablement à la déplétion de précurseurs CD3⁻ et CD3^{lo}. La sélection négative n'a pas été examinée dans cette étude. Mais puisque les CEM jouent un rôle dans ce processus, et que le contact entre celles-ci et les thymocytes est nécessaire, il est

concevable de supposer que l'inhibition partielle de cette sélection, due à l'inhibition de contact par la présence de la UEA-I, puisse permettre la survie de cellules qui normalement seraient éliminées. Ceci augmenterait donc le « pool » de thymocytes CD3^{hi}. Les CEM UEA-I⁺ expriment la molécule B7 (Degermann *et al.*, 1994). En effet il a été montré, par des expériences de transfection de la B7, que l'expression de cette molécule augmente le niveau de sélection négative (Aoki *et al.*, 1998). Ainsi, l'enrobage des CEM par la UEA-I inhibe le contact avec des thymocytes et pourrait donc inhiber, du moins en partie, la sélection négative.

Les mécanismes qui contrôlent le taux de différenciation des cellules CD3^{lo} en CD3^{hi} sont inconnus, mais l'indépendance relative de la taille de ces sous-populations est documentée dans plusieurs études. Par exemple, il a été démontré que les stéroïdes diminuent sélectivement les thymocytes corticaux, sans toutefois affecter leur progéniture médullaire. On observe ce même genre de situation dans des thymus adultes où les thymocytes corticaux sont quasiment épuisés (Hirokawa et Makinodan, 1975). Ainsi, la « taille » du compartiment médullaire ne semble pas dépendre que du nombre de précurseurs corticaux. De plus, le fait que les cellules TCR $\gamma\delta^+$ ne soient pas affectées par le traitement des FTOC avec la UEA-I indique que seules les cellules corticales TCR $\alpha\beta^+$ sont réduites par le signal suite à l'interaction UEA-I/CEM.

2.3 LES SCÉNARIOS POSSIBLES

La constatation principale tirée de ces études est qu'une sous-population de CEM participe à la régulation de la prolifération des cellules DN sous-capsulaires et des DP corticaux, deux sous-populations de thymocytes qui sont éloignées de la médulla et qui n'entrent pas directement en contact avec les CEM. Les scénarios possibles pouvant être envisagés pour expliquer cet effet à distance dû à la liaison UEA-I/CEM sont les suivants : En premier lieu, les CEM pourraient physiquement être empêchées par la UEA-I de se lier aux thymocytes médullaires. En effet nous avons démontré que l'interaction *in*

in vitro entre des CEM thymiques et des thymocytes a été réduite environ de moitié en présence de la UEA-I. Ainsi, dans une situation normale, le contact entre les CEM UEA-I⁺ et les thymocytes médullaires mènerait à une activation d'un ou des deux types cellulaires et entraînerait la production de facteurs solubles, probablement des cytokines, qui, à leur tour, induiraient la prolifération de thymocytes corticaux. Cependant, l'activation cellulaire (lymphoïde ou épithéliale) prévue suite à cette interaction n'aurait pas lieu en présence de la UEA-I, et les signaux normalement transmis au cortex seraient inhibés, empêchant ainsi la prolifération de quelques thymocytes corticaux. Dans ce contexte, il est à noter que Farr (1990) a démontré que certains des thymocytes qui entrent en contact avec des CEM UEA-I⁺ sont des cellules TCR $\gamma\delta$ ⁺. Cependant, le lien entre ces résultats et nos données provenant des FTOC traités n'est pas clair. Le deuxième scénario, quant à lui, impliquerait l'activation directe des CEM par l'attachement de la UEA-I. Le signal qui surviendrait alors inhiberait la prolifération de cellules corticales.

Il a été bien établi que le contact entre des cellules épithéliales thymiques et des thymocytes, entre autres via les interactions moléculaires CD2/LFA-3 et LFA-1/ICAM-1 (Singer *et al.*, 1990), entraîne l'activation de l'un ou des deux types cellulaires, tel que démontré par l'augmentation de l'expression d'une glycoprotéine épithéliale thymique, la gp23 (Potworowski *et al.*, 1994), et par l'activation du métabolisme de l'acide arachidonique dans ces mêmes cellules (Sun *et al.*, 1990). D'ailleurs, il a été démontré que les interactions lympho-épithéliales peuvent induire ou moduler la production de cytokines, tant par les cellules épithéliales que par les thymocytes. Par exemple, la production de l'IL-6 par les cellules épithéliales a été augmentée suivant une co-culture avec des thymocytes (Meilin *et al.*, 1995). On a aussi rapporté une augmentation de l'expression de l'IL-2 et de l'IL-7 par des thymocytes, suite à leur contact avec des cellules épithéliales (Napolitano *et al.*, 1997). Plusieurs cytokines, produites par l'un ou les deux types cellulaires, sont connues pour leur capacité d'induire la division cellulaire. Ainsi, les cytokines IL-1, IL-3 et GM-CSF produites par des cellules épithéliales stimulent la prolifération de thymocytes DN (Denning *et al.*, 1988). Également, l'IL-6 et

le G-CSF, retrouvés dans les surnageants de cultures de cellules épithéliales, induisent la prolifération de clones de lymphocytes T matures, et une sécrétion endogène concomitante de l'IL-4 par ces mêmes cellules T (Meilin *et al.*, 1997). Dans notre étude, il est possible que des cytokines produites lors d'interactions lympho-épithéliales dans la médulla thymique, et agissant sur de thymocytes corticaux, soient inhibées par la UEA-I.

Il est important de noter que les effets qui sont attribués à la UEA-I pourraient être en partie non-spécifiques, tel que nous le suggérons dans le deuxième scénario. En général, chaque molécule de lectine possède deux ou plusieurs sites de liaison (Sharon et Lis, 1990). Ainsi, la multivalence des lectines fait en sorte que quand elles se lient aux sucres qui sont présents à la surface des cellules cibles, il y a un effet de pontage qui peut entraîner, par exemple, l'agglutination des cellules en suspension (Dolgosheina *et al.*, 1992, Smiley *et al.*, 1997). Mais le phénomène du « cross-linking » est surtout associé à l'induction de la transduction de signaux intracellulaires qui mènent à plusieurs sorts : à une activation cellulaire (Geller, 1992, Ohnishi *et al.*, 1995, Hegen *et al.*, 1997), à une inhibition de l'expression d'antigènes de surface (Stoddart *et al.*, 1996), à une inhibition de fonctions cellulaires (Callard *et al.*, 1995), à une prolifération (Osorio *et al.*, 1998, Stuber *et al.*, 1995) ou à une mort cellulaire (Monleon *et al.*, 2000, Desbarats *et al.*, 1996). Par contre, les effets spécifiques de la UEA-I dérivent du blocage de contact entre les thymocytes et les CEM. Pour contrôler la spécificité de la UEA-I, nous avons choisi une deuxième lectine, la UEA-II, qui elle ne s'attache pas aux CEM. En effet, dans quelques cas, les résultats obtenus avec la UEA-II étaient intermédiaires entre ceux provenant de groupes traités avec le PBS et ceux avec la UEA-I. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la simple présence de la UEA-II dans le thymus ait provoqué de l'encombrement stérique inhibant possiblement des interactions cellulaires et causant ainsi des effets non-spécifiques. Il est intéressant de noter que les effets « non-spécifiques » de la UEA-II se sont manifestés, en général, seulement au début du traitement, et ce, aussi bien dans le thymus que dans les organes périphériques. Puisque la UEA-II ne réagit avec aucune entité cellulaire qui soit décelable par immunohistochimie, quelques jours suite à son introduction dans le thymus, elle est probablement éliminée.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus semblent indiquer que les CEM sont impliquées dans le contrôle de la prolifération des thymocytes.

2.4 PERSPECTIVES

La UEA-I reconnaît des résidus de L-fucose associés aux CEM. Les protéines qui interagissent avec des sucres sont des lectines, et dans le thymus on trouve plusieurs exemples d'interactions sucres-lectines. La protéine S-MBP (serum mannan-binding protein), par exemple, est une lectine spécifique, entre autres, pour le mannose, et les thymocytes immatures possèdent les ligands pour celle-ci (Uemura *et al.*, 1996). Elle semble être impliquée dans le développement des thymocytes. La molécule DEC-205, impliquée dans le processus de la présentation d'antigènes, est une protéine exprimée à la surface des cellules épithéliales et dendritiques (Jiang *et al.*, 1995). Toutefois, on ne connaît pas l'identité des « récepteurs » de la UEA-I (ni des ligands qui s'y rattachent) dans le thymus, mais il a été observé que des extraits de cellules stromales thymiques révèlent 8 à 9 bandes qui réagissent avec la UEA-I, et qui présentent des poids moléculaires variables (Farr et Anderson, 1995). Ainsi, plusieurs glycoprotéines pourraient posséder le composant L-fucose. Le type de fucosylation reconnue par la UEA-I est cependant très spécifique. Elle reconnaît les liaisons alpha 1-2, et la biosynthèse des oligosaccharides fucosylés alpha 1-2 est effectuée par l'enzyme alpha 1-2- fucosyltransférase (Gohier *et al.*, 1996).

Selon les résultats présentés dans cette thèse, le blocage des CEM par la UEA-I affecte la prolifération des thymocytes corticaux. Dans le but d'élucider les mécanismes impliqués dans ce processus et possiblement d'autres fonctions des CEM, il serait intéressant de pouvoir produire des souris portant une ablation génétique au niveau du gène de l'alpha- 1-2 fucosyltransférase. Il est fort probable que de telles souris seraient viables, car des souris déficientes pour l'enzyme alpha-1-3-fucosyltransférase ont déjà été produites. Cependant, plusieurs anomalies sont associées à celles-ci, telles qu'une déficience de l'adhésion des leucocytes et un défaut dans l'extravasation leucocytaire (Maly *et al.*, 1996). Puisque des glycoprotéines fucosylées sont impliquées dans de

multiples processus, tels que le recrutement de leucocytes aux sites d'inflammation (Zerfaoui *et al.*, 2000, Britten *et al.*, 1998), la différenciation (Candelier *et al.*, 2000) et la transformation (Sanders *et al.*, 1990, Yamashita *et al.*, 1993), il serait intéressant de pouvoir cibler et inactiver cette enzyme uniquement dans le thymus. En théorie, ceci est possible. Utilisant la logique du « conditional gene targeting » (Kuhn *et al.*, 1995, Rajewsky *et al.*, 1996), sous le contrôle d'un promoteur, par exemple pour la thymopoiétine (exprimée seulement par des cellules épithéliales du thymus (Goldstein, 1975, Viamontes *et al.*, 1986), l'inactivation d'un gène peut être spécifique à un type cellulaire, contrairement à la méthode classique où le gène muté ou inactivé est transmis dans le génome de la souris et est ainsi présent dans l'organisme partout où le gène est normalement exprimé (Thomas et Capecchi, 1987). De plus, l'identification de la(les) molécule(s) reconnue(s) par la UEA-I serait d'autant importante, voire cruciale, pour pouvoir décortiquer les fonctions des interactions lympho-épithéliales médullaires.

Nous avons observé que le blocage d'une sous-population de CEM avec de la UEA-I dans des FTOC a provoqué une diminution du nombre de cellules corticales immatures (Graziano *et al.*, 2001). Il serait donc intéressant de voir à quel stade précis de la différenciation l'effet de ce blocage commence à se manifester. Étant donné que les PLT (qui sont CD3⁺) peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires autres que des lymphocytes T, incluant des cellules NK, des lymphocytes B, et des cellules dendritiques (Ardavin *et al.*, 1993, Antica *et al.*, 1993, Moore et Zlotnik, 1995), il faut entrevoir la possibilité que différents types de cellules pourraient être affectés par l'inhibition de contact. Puisque le prélèvement du thymus fœtal se fait généralement au jour 15 de gestation, et qu'à ce stade, les PLT sont déjà présents, dans le but de déterminer si un blocage des CEM par la UEA-I pourrait affecter les PLT ou leurs descendants immédiats (par exemple, les cellules Pro-T), il faudrait cultiver des lobes fœtaux avec de la désoxyguanosine pour les purger de tout leur contenu lymphoïde. Ceci serait suivi d'un traitement avec de la UEA-I. Ensuite, la co-culture de ces lobes avec des cellules provenant du foie fœtal (qui contient des précurseurs thymiques) induirait la recolonisation des lobes. Enfin, l'immunophénotypage des cellules, utilisant une

combinaison de différents anticorps tels que des anti-CD11, -CD19, -CD25, -CD44, -CD69, -CD117, et -Ly49 fournirait un portrait global de l'état du thymus lors d'un blocage des CEM.

Ce même type d'analyse pourrait être fait *in vivo*. Pour ce faire, l'exposition de souris à une dose létale d'irradiation induirait la déplétion de cellules lymphoïdes du thymus. Les cellules de la moelle osseuse (qui contient des précurseurs thymiques) provenant d'une souris syngénique seraient ensuite transférées chez l'hôte, pour que la reconstitution du thymus puisse se faire. Généralement celle-ci est complète en approximativement deux semaines (Lesley *et al.*, 1990). Aussitôt irradiées, on injecterait de la UEA-I par voie intrathymique aux souris. Puisque nous avons observé que la UEA-I est encore présent dans le thymus 10 jours post-injection, il est fort probable que des effets commenceraient à se manifester même avant que la re-colonisation soit complète. De plus, puisqu'il a été démontré que les CEM semblent nécessaires pour la sélection négative, utilisant des souris qui expriment le I-E, on pourrait vérifier la présence de cellules $V_{\beta}5$, $V_{\beta}11$ ou $V_{\beta}17^+$ (qui sont normalement éliminées par sélection négative chez ces souris) (Okada et Weissman, 1989, Liao *et al.*, 1990, Fink *et al.*, 1992) dans la périphérie. Toutefois, s'il s'avérait que le blocage des CEM *in vivo* par de la UEA-I inhibe la sélection négative, les cellules possédant les chaînes V_{β} spécifiques mentionnées ci-haut seraient décelables, mais quand même peu nombreuses. Ainsi, pour amplifier 'le scénario', il faudrait utiliser des souris qui expriment un transgène pour une de ces V_{β} . Puisque la diversité du répertoire des TCR est limitée chez de telles souris transgéniques, ceci permettrait d'étudier les perturbations d'une population de cellules relativement homogène.

3.0 CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Utilisant le marquage de thymocytes *in vivo* avec le CFSE, conjointement avec des analyses cytométriques et immunohistochimiques, nous avons fourni une vue globale de la cinétique des lymphocytes T dans le thymus et dans les organes lymphoïdes de la périphérie. Tel que nous l'avons démontré avec les souris déficientes en ICAM-1 et par l'étude de l'émigration des thymocytes lors d'un blocage *in vivo* des interactions entre les CEM et les thymocytes avec la UEA-I, la technique que nous avons développée est potentiellement intéressante pour plusieurs types d'expériences, d'autant plus que cette approche est simple et fiable.

La plupart des études concernant les signaux inhibiteurs ou stimulateurs qui surviennent lors d'interactions lymphostromales, via des facteurs solubles ou par contact cellulaire direct, se servent de cultures de lignées cellulaires stromales. Cependant, leur utilité est limitée, car les interactions cruciales pour le développement des lymphocytes qui ont lieu dans l'architecture tri-dimensionnelle du thymus, sont détruites. Dans nos études, l'attachement de la UEA-I à des glycoprotéines fucosylées sur des CEM retrouvées *in situ*, nous avons démontré que les interactions lympho-épithéliales médullaires influencent la prolifération de thymocytes corticaux. Même si nos données n'excluent pas la possibilité que l'attachement de la UEA-I aux CEM ait une influence sur l'activité fonctionnelle de ces cellules, indépendamment des interactions avec les thymocytes, dans un organe avec de semblables activités complexes de prolifération, il est concevable, voire probable, qu'un système central de contrôle existe, et il se pourrait bien que les CEM UEA-I⁺ jouent ce rôle.

BIBLIOGRAPHIE

Acha-Orbea, H., et E. Palmer. 1991. Mls--a retrovirus exploits the immune system. *Immunol. Today* **12**:356-361.

Adachi, M., S. Suematsu, T. Suda, D. Watanabe, H. Fukuyama, J. Ogasawara, T. Tanaka, N. Yoshida, et S. Nagata. 1996. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**:2131-2136.

Adkins, B., V. Charyulu, Q.L. Sun, D. Lobo, et D.M. Lopez. 2000. Early block in maturation is associated with thymic involution in mammary tumor-bearing mice. *J. Immunol.* **164**:5635-5640.

Agenes, F., et A.A. Freitas. 1999. Transfer of small resting B cells into immunodeficient hosts results in the selection of a self-renewing activated B cell population. *J. Exp. Med.* **189**:319-330.

Agus, D.B., C.D. Surh, et J. Sprent. 1991. Reentry of T cells to the adult thymus is restricted to activated T cells. *J. Exp. Med.* **173**:1039-1046.

Aifantis, I., O. Azogui, J. Feinberg, C. Saint-Ruf, J. Buer, et H. von Boehmer. 1998. On the role of the pre-T cell receptor in alphabeta versus gammadelta T lineage commitment. *Immunity* **9**:649-655.

Akashi, K., L.I. Richie, T. Miyamoto, W.H. Carr, et I.L. Weissman. 2000. B lymphopoiesis in the thymus. *J. Immunol.* **164**:5221-5226.

Akashi, K., M. Kondo, U. von Freeden-Jeffry, R. Murray, et I.L. Weissman. 1997. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* **89**:1033-1041.

Alcover, A., et B. Alarcon. 2000. Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit. Rev. Immunol.* **20**:325-346.

Al-Harhi, L., G. Marchetti, C.M. Steffens, J. Poulin, R. Sekaly, et A. Landay. 2000. Detection of T cell receptor circles (TREC) as biomarkers for de novo T cell synthesis using a quantitative polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). *J. Immunol. Methods* **237**:187-197.

Allen, H.J., E.A. Johnson, et K.L. Matta. 1977. A comparison of the binding specificities of lectins from *Ulex europaeus* and *Lotus tetragonolobus*. *Immunol. Commun.* **6**:585-602.

Allison, J.P. 1993. Gamma delta T-cell development. *Curr. Opin. Immunol.* **5**:241-246.

Alves, L.A., R. Coutinho-Silva, et W. Savino. 1999. Extracellular ATP: a further modulator in neuroendocrine control of the thymus. *Neuroimmunomodulation* **6**:81-89.

Aplin, A.E., A. Howe, S.K. Alahari, et R.L. Juliano. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* **50**:197-263.

Altieri, D.C., R. Bader, P.M. Mannucci, et T.S. Edgington. 1988. Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *J. Cell Biol.* **107**:1893-1900.

Amakawa, R., A. Hakem, T.M. Kundig, T. Matsuyama, J.J. Simard, E. Timms, A. Wakeham, H.W. Mittrucker, H. Griesser, H. Takimoto, R. Schmits, A. Shahinian, P. Ohashi, J.M. Penninger, et T.W. Mak. 1996. Impaired negative selection of T cells in Hodgkin's disease antigen CD30-deficient mice. *Cell* **84**:551-562.

Amarante-Mendes, J.G., C. Couture, et E.F. Potworowski. 1993. Identification of a 16-kDa thymocyte membrane glycoprotein involved in the thymocyte/thymic medullary epithelial cell interaction. *Immunol. Lett.* **37**:47-52.

Amsen, D., et A.M. Kruisbeek. 1996. CD28-B7 interactions function to co-stimulate clonal deletion of double-positive thymocytes. *Int. Immunol.* **8**:1927-1936.

Amsen, D., A.M. Kruisbeek. 1998. Thymocyte selection: not by TCR alone. *Immunol. Rev.* **165**:209-229.

^aAnderson, G., J.J. Owen, N.C. Moore, et E.J. Jenkinson. 1994. Characteristics of an in vitro system of thymocyte positive selection. *J. Immunol.* **153**:1915-1920.

^bAnderson, G., J.J. Owen, N.C. Moore, et E.J. Jenkinson. 1994. Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro. *J. Exp. Med.* **179**:2027-2031.

Anderson, G., K.J. Hare, et E.J. Jenkinson. 1999. Positive selection of thymocytes: the long and winding road. *Immunol. Today* **20**:463-468.

Anderson, G., K.J. Hare, N. Platt, et E.J. Jenkinson. 1997. Discrimination between maintenance- and differentiation-inducing signals during initial and intermediate stages of positive selection. *Eur. J. Immunol.* **27**:1838-1842.

Anderson, T.J., D.J. Ferguson, et G.M. Raab. 1982. Cell turnover in the "resting" human breast: influence of parity, contraceptive pill, age and laterality. *Br. J. Cancer* **46**:376-382.

Andreu-Sanchez, J.L., J. Faro, J.M. Alonso, C.J. Paige, C. Martinez, et M.A. Marcos. 1990. Ontogenic characterization of thymic B lymphocytes. Analysis in different mouse strains. *Eur. J. Immunol.* **20**:1767-1773.

Andrews, P., et R.L. Boyd. 1985. The murine thymic nurse cell: an isolated thymic microenvironment. *Eur. J. Immunol.* **15**:36-42.

Annunziato, F., P. Romagnani, L. Cosmi, C. Beltrame, B.H. Steiner, E. Lazzeri, C.J. Raport, G. Galli, R. Manetti, C. Mavilia, V. Vanini, D. Chantry, E. Maggi, et S. Romagnani. 2000. Macrophage-derived chemokine and EBI1-ligand chemokine attract human thymocytes in different stage of development and are produced by distinct subsets of medullary epithelial cells: possible implications for negative selection. *J. Immunol.* **165**:238-246.

Antica, M., L. Wu, K. Shortman, et R. Scollay. 1993. Intrathymic lymphoid precursor cells during fetal thymus development. *J. Immunol.* **151**:5887-5895.

Aoki, N., M. Inobe, M. Murakami, R. Abe, et H. Iizuka. 1998. The functional role of B7 molecules on the induction of thymocyte activation and apoptosis. *Microbiol. Immunol.* **42**:555-565.

Appasamy, P.M., K. Pendino, R.R. Schmidt, K.P. Chepenik, M.B. Prystowsky, et D. Goldowitz. 1991. Expression of prostaglandin G/H synthase (cyclooxygenase) during murine fetal thymic development. *Cell. Immunol.* **137**:341-357.

Arber, S., F.A. Barbayannis, H. Hanser, C. Schneider, C.A. Stanyon, O. Bernard, et P. Caroni. 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* **393**:805-809.

Arbones, M.L., D.C. Ord, K. Ley, H. Ratech, C. Maynard-Curry, G. Otten, D.J. Capon, et T.F. Tedder. 1994. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* **1**:247-260.

Ardavin, C. 1997. Thymic dendritic cells. *Immunol. Today* **18**:350-361.

^aArdavin, C., L. Wu, I. Ferrero, et K. Shortman. 1993. Mouse thymic dendritic cell subpopulations. *Immunol. Lett.* **38**:19-25.

^bArdavin, C., L. Wu, C.L. Li, et K. Shortman. 1993. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* **362**:761-763.

Aruffo, A., et B. Seed. 1987. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**:8573-8577.

Asa, D., L. Raycroft, L. Ma, P.A. Aeed, P.S. Kaytes, A.P. Elhammer, et J.G. Geng. 1995. The P-selectin glycoprotein ligand functions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectins. *J. Biol. Chem.* **270**:11662-11670.

Ashton-Rickardt, P.G., et S. Tonegawa. 1994. A differential-avidity model for T-cell selection. *Immunol. Today* **15**:362-366.

^aAshwell, J.D., F.W. Lu, et M.S. Vacchio. 2000. Glucocorticoids in T cell development and function*. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:309-345.

^bAshwell, J.D., M.S. Vacchio, et J. Galon. 2000. Do glucocorticoids participate in thymocyte development? *Immunol. Today* **21**:644-646.

Bailly, P., P. Hermand, I. Callebaut, H.H. Sonneborn, S. Khamlichi, J.P. Mornon, et J.P. Cartron. 1994. The LW blood group glycoprotein is homologous to intercellular adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**:5306-5310.

Bailly, P., E. Tontti, P. Hermand, J.P. Cartron, et C.G. Gahmberg. 1995. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur. J. Immunol.* **25**:3316-3320.

Barten, R., M. Torkar, A. Haude, J. Trowsdale, et M.J. Wilson. 2001. Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors. *Trends Immunol.* **22**:52-57.

Basson, M.A., et R. Zamoyska. 2000. The CD4/CD8 lineage decision: integration of signalling pathways. *Immunol. Today* **21**:509-514.

Baumhater, S., M.S. Singer, W. Henzel, S. Hemmerich, M. Renz, S.D. Rosen, et L.A. Lasky. 1993. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* **262**:436-438.

Baumhueter, S., N. Dybdal, C. Kyle, et L.A. Lasky. 1994. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* **84**:2554-2565.

Baum, L.G., M. Pang, N.L. Perillo, T. Wu, A. Delegeane, C.H. Uittenbogaart, M. Fukuda, et J.J. Seilhamer. 1995. Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.* **181**:877-887.

Beals, C.R., C.B. Wilson, et R.M. Perlmutter. 1987. A small multigene family encodes Gi signal-transduction proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**:7886-7890.

Bell, E.B., S.M. Sparshott, et A. Ager. 1995. Migration pathways of CD4 T cell subsets in vivo: the CD45RC- subset enters the thymus via alpha 4 integrin-VCAM-1 interaction. *Int. Immunol.* **7**:1861-171.

Belmant, C., E. Espinosa, R. Poupot, M.A. Peyrat, M. Guiraud, Y. Poquet, M. Bonneville, et J.J. Fournie. 1999. 3-Formyl-1-butyl pyrophosphate A novel mycobacterial metabolite-activating human gamma delta T cells. *J. Biol. Chem.* **274**:32079-32084.

Bendelac, A. 1995. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J. Exp. Med.* **182**:2091-2096.

- Bendelac, A., N. Killeen, D.R. Littman, et R.H. Schwartz. 1994. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* **263**:1774-1778.
- Bendelac, A., O. Lantz, M.E. Quimby, J.W. Yewdell, J.R. Bennink, et R.R. Brutkiewicz. 1995. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* **268**:863-865.
- Bendelac, A., M.N. Rivera, S.H. Park, et J.H. Roark 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:535-562.
- Bendriss-Vermare, N., C. Barthelemy, I. Durand, C. Bruand, C. Dezutter-Dambuyant, N. Moulian, S. Berrih-Aknin, C. Caux, G. Trinchieri, et F. Briere. 2001. Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J. Clin. Invest.* **107**:835-844.
- Berg, L.J., B. Fazekas de St Groth, A.M. Pullen, et M.M. Davis. 1989. Phenotypic differences between alpha beta versus beta T-cell receptor transgenic mice undergoing negative selection. *Nature* **340**:559-562.
- Berg, L.J., G.D. Frank, et M.M. Davis. 1990. The effects of MHC gene dosage and allelic variation on T cell receptor selection. *Cell* **60**:1043-1053.
- Berg, L.J., et J. Kang. 2001. Molecular determinants of TCR expression and selection. *Curr. Opin. Immunol.* **13**:232-241.
- Berg, M., et S.P. James. 1990. Human neutrophils release the Leu-8 lymph node homing receptor during cell activation. *Blood* **76**:2381-2388.
- Berlin, C., E.L. Berg, M.J. Briskin, D.P. Andrew, P.J. Kilshaw, B. Holzmann, I.L. Weissman, A. Hamann, et E.C. Butcher. 1993. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* **74**:185-185.
- Berrih, S., W. Savino, et S. Cohen. 1985. Extracellular matrix of the human thymus: immunofluorescence studies on frozen sections and cultured epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* **33**:655-664.
- Berzins, S.P., G.M. Davey, E.S. Randle-Barrett, M.A. Malin, B.J. Classon, S. Fraser, et R.L. Boyd. 1999. Thymic shared antigen-2: a novel cell surface marker associated with T cell differentiation and activation. *J. Immunol.* **162**:5119-5126.
- Berzins, S.P., R.L. Boyd, et J.F. Miller. 1998. The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. *J. Exp. Med.* **187**:1839-1848.
- Bhatt, H., L.J. Brunet, et C.L. Stewart. 1991. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**:11408-11412.

Bilsland, C.A., M.S. Diamond, et T.A. Springer. 1994. The leukocyte integrin p150,95 (CD11c/CD18) as a receptor for iC3b. Activation by a heterologous beta subunit and localization of a ligand recognition site to the I domain. *J. Immunol.* **152**:4582-4589.

Bird, J.J., D.R. Brown, A.C. Mullen, N.H. Moskowitz, M.A. Mahowald, J.R. Sider, T.F. Gajewski, C.R. Wang, et S.L. Reiner. 1998. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* **9**:229-237.

Bisaggio, R.D., O.K. Nihei, P.M. Persechini, W. Savino, et L.A. Alves. 2001. Characterization of P2 receptors in thymic epithelial cells. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **47**:19-31.

Blau, J.N. 1973. Hassall's corpuscles--a site of thymocyte death. *Br. J. Exp. Pathol.* **54**:634-637.

Bodey, B., B. Jr. Bodey, S.E. Siegel, et H.E. Kaiser. 1999. Molecular biological ontogenesis of the thymic reticulo-epithelial cell network during the organization of the cellular microenvironment. *In Vivo* **13**:267-294.

Bodey, B., B. Jr. Bodey, S.E. Siegel, et H.E. Kaiser. 2000. The role of the reticulo-epithelial (RE) cell network in the immuno-neuroendocrine regulation of intrathymic lymphopoiesis. *Anticancer Res.* **20**:1871-1888.

Borgulya, P, H. Kishi, U. Muller, J. Kirberg, et H. von Boehmer. 1991. Development of the CD4 and CD8 lineage of T cells: instruction versus selection. *EMBO J.* **10**:913-918.

Bosma, G.C., R.P. Custer, et M.J. Bosma. 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* **301**:527-530.

Botham, C.A., G.V. Jones, et M.D. Kendall. 2001. Immuno-characterisation of neuroendocrine cells of the rat thymus gland in vitro and in vivo. *Cell Tissue Res.* **303**:381-389.

Bowen, I.D., et G.H. Lewis. 1980. Acid phosphatase activity and cell death in mouse thymus. *Histochemistry* **65**:173-179.

Boyd, R.L., C.L. Tucek, D.I. Godfrey, D.J. Izon, T.J. Wilson, N.J. Davidson, A.G. Bean, H.M. Ladyman, M.A. Ritter, et P. Hugo. 1993. The thymic microenvironment. *Immunol. Today* **14**:445-459.

Boyd, R.L., et Hugo, P. 1991. Towards an integrated view of thymopoiesis. *Immunol. Today* **12**:71-79.

Bradley, L.M., S.R. Watson, et S.L. Swain. 1994. Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin. *J. Exp. Med.* **180**:2401-2406.

- Branch, D.R., et G.B. Mills 1995. pp60c-src expression is induced by activation of normal human T lymphocytes. *J. Immunol.* **154**:3678-3685
- Brandtzaeg, P. 1997. Mucosal immunity in the female genital tract. *J. Reprod. Immunol.* **36**:23-50.
- Brelinska, R., D. Ostalska, et M. Zabel. 2000. Subtypes of thymic epithelial cells defined by neuroendocrine markers. *Histochem. Cell Biol.* **114**:239-244.
- Brenan, M., et C.R. Parish. 1984. Intracellular fluorescent labelling of cells for analysis of lymphocyte migration. *J. Immunol. Methods* **74**:31-38.
- Breuss, J.M., J. Gallo, H.M. DeLisser, I.V. Klimanskaya, H.G. Folkesson, J.F. Pittet, S.L. Nishimura, K. Aldape, D.V. Landers, W. Carpenter. 1995. Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J. Cell Sci.* **108**:2241-2251.
- Briskin, M.J., L.M. McEvoy, E.C. Butcher. 1993. MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. *Nature* **363**:461-464.
- Britten, C.J., D.H. van den Eijnden, W. McDowell, V.A. Kelly, S.J. Witham, M.R. Edbrooke, M.I. Bird, T. de Vries, et N. Smithers. 1998. Acceptor specificity of the human leukocyte alpha3 fucosyltransferase: role of FucT-VII in the generation of selectin ligands. *Glycobiology* **8**:321-327.
- Brocker, T, M. Riedinger, et K. Karjalainen. 1997. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J. Exp. Med.* **185**:541-550.
- Brown, A.R. 1992. Immunological functions of splenic B-lymphocytes. *Crit. Rev. Immunol.* **11**:395-417.
- Bryant, B.J. 1972. Renewal and fate in the mammalian thymus: mechanisms and inferences of thymocyto kinetics. *Eur. J. Immunol.* **2**:38-45.
- Burdin, N., L. Brossay, Y. Koezuka, S.T. Smiley, M.J. Grusby, M. Gui, M. Taniguchi, K. Hayakawa, et M. Kronenberg. 1998. Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14+ NK T lymphocytes. *J. Immunol.* **161**:3271-3281.
- Burkly, L., C. Hession, L. Ogata, C. Reilly, L.A. Marconi, D. Olson, R. Tizard, R. Cate, et D. Lo. 1995. Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* **373**:531-536.

Burkly, L.C., S. Degermann, J. Longley, J. Hagman, R.L. Brinster, D. Lo, et R.A. Flavell. 1993. Clonal deletion of V beta 5+ T cells by transgenic I-E restricted to thymic medullary epithelium. *J. Immunol.* **151**:3954-3960.

Burns, R.P. Jr., A. Nasir, A.R. Haake, R.K. Barth, et A.A. Gaspari. 1999. B7-1 overexpression by thymic epithelial cells results in transient and long-lasting effects on thymocytes and peripheral T helper cells but does not result in immunodeficiency. *Cell. Immunol.* **194**:162-77.

Butcher, E.C., R.G. Scollay, et I.L. Weissman. 1980. Direct fluorescent labeling of cells with fluorescein or rhodamine isothiocyanate. II. Potential application to studies of lymphocyte migration and maturation. *J. Immunol. Methods* **37**:109-121.

Callard, R.E., J. Herbert, S.H. Smith, R.J. Armitage, et K.E. Costelloe. 1995. CD40 cross-linking inhibits specific antibody production by human B cells. *Int. Immunol.* **7**:1809-1815.

Cammarota, G., A. Scheirle, B. Takacs, D.M. Doran, R. Knorr, W. Bannwarth, J. Guardiola, et F. Sinigaglia. 1992. Identification of a CD4 binding site on the beta 2 domain of HLA-DR molecules. *Nature* **356**:799-801

Campbell, J.J., et E.C. Butcher. 2000. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol.* **12**:336-341.

Campbell, J.J., J. Pan, et E.C. Butcher. 1999. Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J. Immunol.* **163**:2353-2357.

Candeias, S., J.J. Peschon, K. Muegge, et S.K. Durum. 1997. Defective T-cell receptor gamma gene rearrangement in interleukin-7 receptor knockout mice. *Immunol. Lett.* **57**:9-14.

Candelier, J.J., R. Mollicone, B. Mennesson, P. Coullin, et R. Oriol. 2000. Expression of fucosyltransferases in skin, conjunctiva, and cornea during human development. *Histochem. Cell. Biol.* **114**:113-124.

Capone, M., P. Romagnoli, F. Beermann, H.R. MacDonald, et J.P. van Meerwijk. 2001. Dissociation of thymic positive and negative selection in transgenic mice expressing major histocompatibility complex class I molecules exclusively on thymic cortical epithelial cells. *Blood* **97**:1336-1342.

Carlos, T.M., et J.M. Harlan. 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**:2068-2101.

Carlow, D.A., N.S. van Oers, S.J. Teh, et H.S. Teh. 1992. Deletion of antigen-specific immature thymocytes by dendritic cells requires LFA-1/ICAM interactions. *J. Immunol.* **148**:1595-1603.

Carlyle, J.R., A.M. Michie, C. Furlonger, T. Nakano, M.J. Lenardo, C.J. Paige, et J.C. Zuniga-Pflucker. 1997. Identification of a novel developmental stage marking lineage commitment of progenitor thymocytes. *J. Exp. Med.* **186**:173-182.

Carlyle, J.R., A.M. Michie, S.K. Cho, et J.C. Zuniga-Pflucker. 1998. Natural killer cell development and function precede alpha beta T cell differentiation in mouse fetal thymic ontogeny. *J. Immunol.* **160**:744-753.

Carlyle, J.R., et J.C. Zuniga-Pflucker. 1998. Lineage commitment and differentiation of T and natural killer lymphocytes in the fetal mouse. *Immunol. Rev.* **165**:63-74.

Ceredig, R. 1990. Intrathymic proliferation of perinatal mouse alpha beta and gamma delta T cell receptor-expressing mature T cells. *Int. Immunol.* **2**:859-867.

Cepek, K.L., S.K. Shaw, C.M. Parker, G.J. Russell, J.S. Morrow, D.L. Rimm, et M.B. Brenner. 1994. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* **372**:190-193.

Chaffin, K.E., et R.M. Perlmutter. 1991. A pertussis toxin-sensitive process controls thymocyte emigration. *Eur. J. Immunol.* **21**:2565-2573.

Chambers, C.A., D. Cado, T. Truong, et J.P. Allison. 1997. Thymocyte development is normal in CTLA-4-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:9296-9301.

Champion, S., B.A. Imhof, P. Savagner, et J.P. Thiery. 1986. The embryonic thymus produces chemotactic peptides involved in the homing of hemopoietic precursors. *Cell* **44**:781-790.

Chantry, D., P. Romagnani, C.J. Raport, C.L. Wood, A. Epp, S. Romagnani, et P.W. Gray. 1999. Macrophage-derived chemokine is localized to thymic medullary epithelial cells and is a chemoattractant for CD3(+), CD4(+), CD8(low) thymocytes. *Blood* **94**:1890-1898.

Cheng, S.H., J.M. Penninger, D.A. Ferrick, T.J. Molina, V.A. Wallace, et T.W. Mak. 1991. Biology of murine gamma delta T cells. *Crit. Rev. Immunol.* **11**:145-166.

Chesnut, R.W., et H.M. Grey. 1985. Antigen presenting cells and mechanisms of antigen presentation. *Crit. Rev. Immunol.* **5**:263-316.

Chiarle, R., A. Podda, G. Prolla, E.R. Podack, G.J. Thorbecke, et G. Inghirami. 1999. CD30 overexpression enhances negative selection in the thymus and mediates programmed cell death via a Bcl-2-sensitive pathway. *J. Immunol.* **163**:194-205.

Chung, J.D., S. Conner, et G. Stephanopoulos. 1995. Flow cytometric study of differentiating cultures of *Bacillus subtilis*. *Cytometry* **20**:324-333.

- Chvatchko, Y., S. Valera, J.P. Aubry, T. Renno, G. Buell, et J.Y. Bonnefoy. 1996. The involvement of an ATP-gated ion channel, P(2X1), in thymocyte apoptosis. *Immunity* **5**:275-283.
- Cilio, C.M., M.R. Daws, A. Malashicheva, C.L. Sentman, et D. Holmberg. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 is induced in the thymus upon in vivo activation and its blockade prevents anti-CD3-mediated depletion of thymocytes. 1998. *J. Exp. Med.* **188**:1239-1246.
- Cohen, J.J., et R.C. Duke. 1984. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.* **132**:38-42
- Cohen, N.R., J.S. Taylor, L.B. Scott, R.W. Guillery, P. Soriano, et A.J. Furley. 1998. Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr. Biol.* **8**:26-33.
- Colic, M., et D. Drabek. 1991. Expression and function of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on rat thymic macrophages in culture. *Immunol. Lett.* **28**:251-257.
- Colonna, M. 1997. Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors. *Immunol. Rev.* **155**:127-133.
- Corbella, P., D. Moskophidis, E. Spanopoulou, C. Mamalaki, M. Tolaini, A. Itano, D. Lans, D. Baltimore, E. Robey, et D. Kioussis. 1994. Functional commitment to helper T cell lineage precedes positive selection and is independent of T cell receptor MHC specificity. *Immunity* **1**:269-276.
- Cordell, J.L., K. Pulford, H. Turley, M. Jones, K. Micklem, I.A. Doussis, X. Tyler, K. Mayne, K.C. Gatter, et D.Y. Mason. 1994. Cellular distribution of human leucocyte adhesion molecule ICAM-3. *J. Clin. Pathol.* **47**:143-147.
- Cordes, U., M. Pedersen, L. Bastholm, M. Nielsen, et O. Werdelin. 1997. Murine thymic nurse cells express ICAM-1 on caveolar and vacuolar membranes. *Scand. J. Immunol.* **46**:344-348.
- Cordier, A.C., et S.M. Haumont. 1980. Development of thymus, parathyroids, and ultimo-branchial bodies in NMRI and nude mice. *Am. J. Anat.* **157**:227-263
- Correa, I., M. Bix, N.S. Liao, M. Zijlstra, R. Jaenisch, et D. Raulet. 1992. Most gamma delta T cells develop normally in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**:653-657.
- Cosgrove, D., D. Gray, A. Dierich, J. Kaufman, M. Lemeur, C. Benoist, et D. Mathis. 1991. Mice lacking MHC class II molecules. *Cell* **66**:1051-1066.

Cosgrove, D., S.H. Chan, C. Waltzinger, C. Benoist, et D. Mathis. 1992. The thymic compartment responsible for positive selection of CD4⁺ T cells. *Int. Immunol.* **4**:707-710.

Couture, C., P.C. Patel, et E.F. Potworowski. 1990. A novel thymic epithelial adhesion molecule. *Eur. J. Immunol.* **20**:2769-2773.

Crowley, M.T., K. Inaba, M.D. Witmer-Pack, S. Gezelter, et R.M. Steinman. 1990. Use of the fluorescence activated cell sorter to enrich dendritic cells from mouse spleen. *J. Immunol. Methods* **133**:55-66.

Cunningham, B.A., J.J. Hemperly, B.A. Murray, E.A. Prediger, R. Brackenbury, et G.M. Edelman. 1987. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* **236**:799-806.

Cyster, J.G. 1999. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* **286**:2098-2102.

Cyster, J.G., et C.C. Goodnow. 1995. Antigen-induced exclusion from follicles and anergy are separate and complementary processes that influence peripheral B cell fate. *Immunity* **3**:691-701.

Dardenne, M. 1999. Role of thymic peptides as transmitters between the neuroendocrine and immune systems. *Ann. Med.* **31** Suppl 2:34-99.

Davey, G.M., S.L. Schober, B.T. Endrizzi, A.K. Dutcher, S.C. Jameson, et K.A. Hogquist. 1998. Preselection thymocytes are more sensitive to T cell receptor stimulation than mature T cells. *J. Exp. Med.* **188**:1867-1874.

Davis, C.B., N. Killeen, M.E. Crooks, D. Raulet, et D.R. Littman. 1993. Evidence for a stochastic mechanism in the differentiation of mature subsets of T lymphocytes. *Cell* **73**:237-247.

de Fougères, A.R., et T.A. Springer. 1992. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J. Exp. Med.* **175**:185-190.

Degermann, S., C.D. Surh, L.H. Glimcher, J. Sprent, et D. Lo. 1994. B7 expression on thymic medullary epithelium correlates with epithelium-mediated deletion of V beta 5⁺ thymocytes. *J. Immunol.* **152**:3254-3263.

DeKoning, J., L. DiMolfetto, C. Reilly, Q. Wei, W.L. Havran, et D. Lo. 1997. Thymic cortical epithelium is sufficient for the development of mature T cells in relB-deficient mice. *J. Immunol.* **158**:2558-2566.

- Denning, S.M., D.T. Tuck, L.W. Vollger, T.A. Springer, K.H. Singer, et B.F. Haynes. 1987. Monoclonal antibodies to CD2 and lymphocyte function-associated antigen 3 inhibit human thymic epithelial cell-dependent mature thymocyte activation. *J. Immunol.* **139**:2573-2578.
- Denning, S.M., J. Kurtzberg, P.T. Le, D.T. Tuck, K.H. Singer, et B.F. Haynes. 1988. Human thymic epithelial cells directly induce activation of autologous immature thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**:3125-3129.
- Desbarats, J., J.H. Freed, P.A. Campbell, et M.K. Newell. 1996. Fas (CD95) expression and death-mediating function are induced by CD4 cross-linking on CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**:11014-11018.
- DeYoung, A.L., O. Duramad, et A. Winoto. 2000. The TNF receptor family member CD30 is not essential for negative selection. *J. Immunol.* **165**:6170-6173.
- Diamond, M.S., D.E. Staunton, S.D. Marlin, et T.A. Springer. 1991. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* **65**:961-971.
- Dimanche-Boitrel, M.T., A. Guyot, G. De Saint-Basile, A. Fischer, C. Griscelli, et B. Lisowska-Groszpiere. 1988. Heterogeneity in the molecular defect leading to the leukocyte adhesion deficiency. *Eur. J. Immunol.* **18**:1575-1579.
- Di Santo, J.P., R. Kuhn, et W. Muller. 1995. Common cytokine receptor gamma chain (gamma c)-dependent cytokines: understanding in vivo functions by gene targeting. *Immunol. Rev.* **148**:19-34.
- Doherty, D.G., et C. O'Farrelly. 2000. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol. Rev.* **174**:5-20.
- Dolgosheina, E.B., A.Y. Karulin, et A.V. Bobylev. 1992. A kinetic model of the agglutination process. *Math. Biosci.* **109**:1-10.
- D'Souza, S.E., V.J. Byers-Ward, E.E. Gardiner, H. Wang, et S.S. Sung. 1996. Identification of an active sequence within the first immunoglobulin domain of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) that interacts with fibrinogen. *J. Biol. Chem.* **271**:24270-24277.
- Dulos, G.J., et W.M. Bagchus. 2001. Androgens indirectly accelerate thymocyte apoptosis. *Int. Immunopharmacol.* **1**:321-328.
- Dummer, W., B. Ernst, E. LeRoy, D. Lee, et C. Surh. 2001. Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment. *J. Immunol.* **166**:2460-2468.

- Dunon, D., et B.A. Imhof. 1993. Mechanisms of thymus homing. *Blood* **81**:1-8.
- Dunon, D., D. Courtois, O. Vainio, A. Six, C.H. Chen, M.D. Cooper, J.P. Dangy, et B.A. Imhof. 1997. Ontogeny of the immune system: gamma/delta and alpha/beta T cells migrate from thymus to the periphery in alternating waves. *J. Exp. Med.* **186**:977-988.
- Durand, R.E., et P.L. Olive. 1982. Cytotoxicity, Mutagenicity and DNA damage by Hoechst 33342. *J. Histochem. Cytochem.* **30**:111-116.
- Dustin, M.L., et J.A. Cooper. 2000. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat. Immunol.* **1**:23-29.
- Dustin, M.L., P. Selvaraj, R.J. Mattaliano, et T.A. Springer. 1987. Anchoring mechanisms for LFA-3 cell adhesion glycoprotein at membrane surface. *Nature* **329**:846-848.
- Dustin, M.L., R. Rothlein, A.K. Bhan, C.A. Dinarello, et T.A. Springer. 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* **137**:245-254.
- Dyall, R., et J. Nikolic-Zugic. 1995. The majority of postselection CD4+ single-positive thymocytes requires the thymus to produce long-lived, functional T cells. *J. Exp. Med.* **181**:235-245.
- Eberl, G., R. Lees, S.T. Smiley, M. Taniguchi, M.J. Grusby, et H.R. MacDonald. 1999. Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J. Immunol.* **162**:6410-6419.
- Egerton, M., R. Scollay, et K. Shortman. 1990. Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**:2579-2582.
- Emoto, M., J. Zerrahn, M. Miyamoto, B. Perarnau, et S.H. Kaufmann. 2000. Phenotypic characterization of CD8(+)/NKT cells. *Eur. J. Immunol.* **30**:2300-2311.
- Epstein, H.D., D.S. Mitchell, J.S. Hunt, et G.W. Wood. 1985. Ia-positive macrophages bind and internalize viable lymphocytes in murine thymus. *Cell. Immunol.* **95**:15-34.
- Erba, E., P. Ubezio, M. Broggin, M. Ponti, et M. D'Incalci. 1988. DNA damage, cytotoxic effect and cell-cycle perturbation of Hoechst 33342 on L1210 cells in vitro. *Cytometry* **9**:1-6.
- Ernst, B.B., C.D. Surh, et J. Sprent. 1996. Bone marrow-derived cells fail to induce positive selection in thymus reaggregation cultures. *J. Exp. Med.* **183**:1235-1240.

Escary, J.L., J. Perreau, D. Dumenil, S. Ezine, et P. Brulet. 1993. Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* **363**:361-364.

Ewing, T., M. Egerton, A. Wilson, R. Scollay, et K. Shortman. 1988. Subpopulations of CD4- CD8- murine thymocytes: differences in proliferation rate in vivo and proliferative responses in vitro. *Eur. J. Immunol.* **18**:261-268.

Fabien, N., C. Auger, et J.C. Monier. 1988. Immunolocalization of thymosin alpha 1, thymopoietin and thymulin in mouse thymic epithelial cells at different stages of culture: a light and electron microscopic study. *Immunology* **63**:721-727.

Farr, A.G., et S.K. Anderson. 1985. Epithelial heterogeneity in the murine thymus: fucose-specific lectins bind medullary epithelial cells. *J. Immunol.* **134**:2971-2977.

Farr, A., S. Hosier, A. Nelson, S. Itohara, et S. Tonegawa. 1990. Distribution of thymocytes expressing gamma delta receptors in the murine thymus during development. *J. Immunol.* **144**:492-498.

Farr, G., et P.K. Nakane. 1983. Cells bearing Ia antigens in the murine thymus. An ultrastructural study. *Am. J. Pathol.* **111**:88-97.

Fehling, H.J., A. Krotkova, C. Saint-Ruf, et H. von Boehmer. 1995. Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature* **375**:795-798. Published erratum appears in *Nature* **378**:419.

Felten, D.L., S.Y. Felten, S.L. Carlson, J.A. Olschowka, et S. Livnat. 1985. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J. Immunol.* **135**:755s-765s.

Feltri, M.L., M. Arona, S.S. Scherer, L. Wrabetz. 1997. Cloning and sequence of the cDNA encoding the beta 4 integrin subunit in rat peripheral nerve. *Gene* **186**:299-304.

Ferens, W.A., W.C. Davis, M.J. Hamilton, Y.H. Park, C.F. Deobald, L. Fox, et G. Bohach. 1998. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infect. Immun.* **66**:573-580.

Ferrero, I., F. Anjuere, P. Martin, G. Martinez del Hoyo, M.L. Fraga, N. Wright, R. Varona, G. Marquez, et C. Ardavin. 1999. Functional and phenotypic analysis of thymic B cells: role in the induction of T cell negative selection. *Eur. J. Immunol.* **29**:1598-1609.

Field, E.O., et E.M. Stanley. 1966. The migration of cells to the thymus. *Acta. Haematol.* **35**:221-231.

Fikri, Y., O. Denis, P. Pastoret, et J. Nyabenda. 2001. Purified bovine WC1+ gamma delta T lymphocytes are activated by staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 superantigens: proliferation response, TCR V gamma profile and cytokines expression. *Immunol. Lett.* **77**:87-95.

Fine, J.S., et A.M. Kruisbeek. 1991. The role of LFA-1/ICAM-1 interactions during murine T lymphocyte development. *J. Immunol.* **147**:2852-2859.

Finkel, T.H., J.C. Cambier, R.T. Kubo, W.K. Born, P. Marrack, et J.W. Kappler. 1989. The thymus has two functionally distinct populations of immature alpha beta + T cells: one population is deleted by ligation of alpha beta TCR. *Cell* **58**:1047-1054.

Fink, P.J., K. Swan, G. Turk, M.W. Moore, et F.R. Carbone. 1992. Both intrathymic and peripheral selection modulate the differential expression of V beta 5 among CD4+ and CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* **176**:1733-1738.

Fontaine-Perus, J.C., F.M. Calman, C. Kaplan, et N.M. Le Douarin. 1981. Seeding of the 10-day mouse embryo thymic rudiment by lymphocyte precursors in vitro. *J. Immunol.* **126**:2310-2316.

Ford, W.L. 1969. The immunological and migratory properties of the lymphocytes recirculating through the rat spleen. *Br. J. Exp. Pathol.* **50**:257-269.

Fort, M.M., et D.M. Pardoll. 1996. Can bone marrow-derived thymic stromal cells mediate the positive selection of class I-restricted T cells? *Cell. Immunol.* **171**:74-79.

Fowlkes, B.J., et E. Schweighoffer. 1995. Positive selection of T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **7**:188-195.

Freedman, A.S., G.J. Freeman, K. Rhyhart, et L.M. Nadler. 1991. Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. *Cell. Immunol.* **137**:429-437.

Freedman, B.D., Q.H. Liu, G. Gaulton, M.I. Kotlikoff, J. Hescheler, et B.K. Fleischmann. 1999. ATP-evoked Ca²⁺ transients and currents in murine thymocytes: possible role for P2X receptors in death by neglect. *Eur. J. Immunol.* **29**:1635-1646.

Freeman, G.J., A.S. Freedman, J.M. Segil, G. Lee, J.F. Whitman, et L.M. Nadler. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. 1989. *J. Immunol.* **143**:2714-2722.

Freeman, G.J., G.S. Gray, C.D. Gimmi, D.B. Lombard, L.J. Zhou, M. White, J.D. Fingerth, J.G. Gribben, et L.M. Nadler. 1991. Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7. *J. Exp. Med.* **174**:625-631.

Freitas, A.A., et B. Rocha. 2000. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:83-111.

Freitas, A.A., F. Agenes, et G.C. Coutinho. 1996. Cellular competition modulates survival and selection of CD8⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* **26**:2640-2649.

Freitas, A.A., M.M. Rosado, A.C. Viale, et A. Grandien. 1995. The role of cellular competition in B cell survival and selection of B cell repertoires. *Eur. J. Immunol.* **25**:1729-1738.

Fry, T.J., E. Connick, J. Falloon, M.M. Lederman, D.J. Liewehr, J. Spritzler, S.M. Steinberg, L.V. Wood, R. Yarchoan, J. Zuckerman, A. Landay, et C.L. Mackall. 2001. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood* **97**:2983-2990.

Fukada, K., S. Korsching, et M.F. Towle. 1997. Tissue-specific and ontogenetic regulation of LIF protein levels determined by quantitative enzyme immunoassay. *Growth Factors* **14**:279-295.

Fulcher, D., et S. Wong. 1999. Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory. *Immunol. Cell Biol.* **77**:559-564.

Funk, J.L., G.V. Jones, C.A. Botham, G. Morgan, P. Wooding, et M.D. Kendall. 1999. Expression of parathyroid hormone-related protein and the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in rat thymic epithelial cells. *J. Anat.* **194**:255-264.

Gabor, M.J., D.I. Godfrey, et R. Scollay. 1997. Recent thymic emigrants are distinct from most medullary thymocytes. *Eur. J. Immunol.* **27**:2010-2015.

Gallatin, W.M., I.L. Weissman, et E.C. Butcher. 1983. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* **304**:30-34.

Gallily, R., et N. Savion. 1983. Cultivation, proliferation and characterization of thymic macrophages. *Immunology* **50**:139-148.

Gallily, R., M. Zeira, et I. Stain. 1985. Thymus-derived macrophages in long-term culture: release of IL-1, stimulation of MLR and expression of tumoricidal activity. *Immunology* **55**:165-172.

Galy, A.H., et H. Spits. 1991. IL-1, IL-4, and IFN-gamma differentially regulate cytokine production and cell surface molecule expression in cultured human thymic epithelial cells. *J. Immunol.* **147**:3823-3830.

Galy, A.H., et H. Spits. 1992. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J. Immunol.* **149**:775-782.

- Garcia, K.C. 1999. Molecular interactions between extracellular components of the T-cell receptor signaling complex. *Immunol. Rev.* **172**:73-85.
- Garni-Wagner, B.A., P.L. Witte, M.M. Tutt, W.A. Kuziel, P.W. Tucker, M. Bennett, et V. Kumar. 1990. Natural killer cells in the thymus. Studies in mice with severe combined immune deficiency. *J. Immunol.* **144**:796-803.
- Garton, H.J., et G.C. Schoenwolf. 1996. Improving the efficacy of fluorescent labeling for histological tracking of cells in early mammalian and avian embryos. *Anat. Rec.* **244**:112-117.
- Ge, Q., et W.F. Chen. 1999. Phenotypic identification of the subgroups of murine T-cell receptor alphabeta+ CD4+ CD8- thymocytes and its implication in the late stage of thymocyte development. *Immunology* **9**:665-671.
- Gelabert, M.J., C. Transy, et C. Penit. 1982. Effect of "facteur thymique serique" (FTS) on TdT expression in murine thymocytes. *Cell. Immunol.* **71**:118-126.
- Geller, R.L. 1992. Role of cross-linking in stepwise activation of T cells. *Scand. J. Immunol.* **35**:327-334.
- Geoffroy, J.S., et S.D. Rosen. 1989. Demonstration that a lectin-like receptor (gp90MEL) directly mediates adhesion of lymphocytes to high endothelial venules of lymph nodes. *J. Cell Biol.* **109**:2463-2469.
- Gett, A.V., et P.D. Hodgkin. 1998. Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:9488-9493.
- Giancotti, F.G. 1996. Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: charting the path between laminin binding and nuclear events. *J. Cell Sci.* **109**:1165-1172.
- Girard, J.P., et T.A. Springer. 1995. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol. Today* **16**:449-457.
- Girao, C., Q. Hu, J. Sun, et P.G. Ashton-Rickardt. 1997. Limits to the differential avidity model of T cell selection in the thymus. *J. Immunol.* **159**:4205-4211.
- Glass, R., A. Townsend-Nicholson, et G. Burnstock. 2000. P2 receptors in the thymus: expression of P2X and P2Y receptors in adult rats, an immunohistochemical and in situ hybridisation study. *Cell Tissue Res.* **300**:295-306.
- Gobin, S.J., et A.J. Paine. 1992. Effects of 2-acetyl-4-tetrahydroxybutyl imidazole (THI) on the thymus of rats. *Thymus* **20**:17-30.

- Godfrey, D.I., J. Kennedy, T. Suda, et A. Zlotnik. 1993. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol.* **150**:4244-4252.
- Godfrey, D.I., J. Kennedy, P. Mombaerts, S. Tonegawa, et A. Zlotnik. 1994. Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8-thymocyte differentiation. *J. Immunol.* **152**:4783-4792.
- Gohier, A., J.F. Espinosa, J. Jimenez-Barbero, P.A. Carrupt, S. Perez, et A. Imberty. 1996. Knowledge-based modeling of a legume lectin and docking of the carbohydrate ligand: the *Ulex europaeus* lectin I and its interaction with fucose. *J. Mol. Graph.* **14**:322-3277, 363-364.
- Goldstein, G. 1975. The isolation of thymopoietin (thymine). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **249**:177-185.
- Golstein, P. 1997. Controlling cell death. *Science* **275**:1081-1082.
- Gonzalez-Amaro, R., et F. Sanchez-Madrid. 1999. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit. Rev. Immunol.* **19**:389-429.
- Graziano, M., Y. St-Pierre, C. Beauchemin, M. Desrosiers, et E.F. Potworowski. 1998. The fate of thymocytes labeled in vivo with CFSE. *Exp. Cell. Res.* **240**:75-85.
- Graziano, M., Y. St-Pierre, et E.F. Potworowski. 2001. UEA-I-binding to thymic medullary epithelial cells selectively reduces numbers of cortical TCRalpha(+) thymocytes in FTOCs. *Immunol. Lett.* **77**:143-150.
- Greenfield, E.A., K.A. Nguyen, et V.K. Kuchroo. 1998. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit. Rev. Immunol.* **18**:389-418.
- Greer, J.M., T.A. Koerner, K. Hayakawa, R.R. Hardy, et J.D. Kemp. 1993. The 3G11+ antigen, a marker for murine CD4+ TH1 lymphocytes, is a ganglioside. *Glycobiology* **3**:391-401.
- Gross, J.A., E. Callas, et J.P. Allison. 1992. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *Immunol.* **149**:380-388.
- Grusby, M.J., H. Jr. Auchincloss, R. Lee, R.S. Johnson, J.P. Spencer, M. Zijlstra, R. Jaenisch, V.E. Papaioannou, et L.H. Glimcher. 1993. Mice lacking major histocompatibility complex class I and class II molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:3913-3917.

Grusby, M.J., R.S. Johnson, V.E. Papaioannou, et L.H. Glimcher. 1991. Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Science* **253**:1417-1420.

Guery, J.C., et L. Adorini. 1995. Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells. *J Immunol* **154**:536-544.

Gugasyan, R., A. Coward, L. O'Connor, K. Shortman, et R. Scollay. 1998. Emigration of mature T cells from the thymus is inhibited by the imidazole-based compound 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole. *Immunology* **93**:398-404.

Gui, M., D.L. Wiest, J. Li, D. Kappes, R.R. Hardy, K. Hayakawa. 1999. Peripheral CD4+ T cell maturation recognized by increased expression of Thy-1/CD90 bearing the 6C10 carbohydrate epitope. *J. Immunol.* **163**:4796-4804.

Hameg, A., I. Apostolou, M. Leite-De-Moraes, J.M. Gombert, C. Garcia, Y. Koezuka, J.F. Bach, et A. Herbelin. 2000. A subset of NKT cells that lacks the NK1.1 marker, expresses CD1d molecules, and autopresents the alpha-galactosylceramide antigen. *J. Immunol.* **165**:4917-4926.

Hamon, Y., C. Broccardo, O. Chambenoit, M.F. Luciani, F. Toti, S. Chaslin, J.M. Freyssinet, P.F. Devaux, J. McNeish, D. Marguet, et G. Chimini. 2000. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat. Cell Biol.* **2**:399-406.

^aHare, K.J., E.J. Jenkinson, et G. Anderson. 1999. CD69 expression discriminates MHC-dependent and -independent stages of thymocyte positive selection. *J. Immunol.* **162**:3978-3983.

^bHare, K.J., E.J. Jenkinson, et G. Anderson. 1999. In vitro models of T cell development. *Semin. Immunol.* **11**:3-12.

Hare, K.J., E.J. Jenkinson, et G. Anderson. 2000. An essential role for the IL-7 receptor during intrathymic expansion of the positively selected neonatal T cell repertoire. *J. Immunol.* **165**:2410-2414.

Hare, K.J., E.J. Jenkinson, et G. Anderson. 2001. Specialisation of thymic epithelial cells for positive selection of CD4+8+ thymocytes. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **47**:119-127.

Hasbold, J., A.B. Lyons, M.R. Kehry, et P.D. Hodgkin. 1998. Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *Eur. J. Immunol.* **28**:1040-1051.

Hathaway, L.J., et J.P. Kraehenbuhl. 2000. The role of M cells in mucosal immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**:323-332.

Hawke, N.A., J.A. Yoder, et G.W. Litman. 1999. Expanding our understanding of immunoglobulin, T-cell antigen receptor, and novel immune-type receptor genes: a subset of the immunoglobulin gene superfamily. *Immunogenetics* **50**:124-133.

Hayakawa, K., et R.R. Hardy. 1991. Murine CD4+ T-cell subsets. *Immunol. Rev.* **123**:145-168.

Hayday, A.C. 2000. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:975-1026.

Hebert, B., J. Bergeron, P. Tijssen, et E.F. Potworowski. 1994. Protein tyrosine kinases transcribed in a murine thymic medullary epithelial cell line. *Gene* **143**:257-260.

Hegen, M., J. Kameoka, R.P. Dong, S.F. Schlossman, et C. Morimoto. 1997. Cross-linking of CD26 by antibody induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase. *Immunology* **90**:257-264.

Hellings, P., M. Jorissen, et J.L. Ceuppens. 2000. The Waldeyer's ring. *Acta Otorhinolaryngol. Belg.* **54**:237-241.

Hemler, M., et W.E. Lands. 1976. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J. Biol. Chem.* **251**:5575-5579.

Henderson, D., et K. Weber. 1981. Immuno-electron microscopical identification of the two types of intermediate filaments in established epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **132**:297-311.

Hernand, P., M. Huet, I. Callebaut, P. Gane, E. Ihanus, C.G. Gahmberg, J.P. Cartron, et P. Bailly. 2000. Binding sites of leukocyte beta 2 integrins (LFA-1, Mac-1) on the human ICAM-4/LW blood group protein. *J. Biol. Chem.* **275**:26002-26010.

Hilton, D.J., et N.M. Gough. 1991. Leukemia inhibitory factor: a biological perspective. *J. Cell. Biochem.* **46**:21-26.

Hirokawa, K., et T. Makinodan. 1975. Thymic involution: effect on T cell differentiation. *J. Immunol.* **114**:1659-1664.

Hockenbery, D., G. Nunez, C. Milliman, R.D. Schreiber, et S.J. Korsmeyer. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**:334-336.

- Hockenbery, D.M., M. Zutter, W. Hickey, M. Nahm, et S.J. Korsmeyer. 1991. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:6961-6965.
- Hodgkin, P.D., J.H. Lee, et A.B. Lyons. 1996. B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. *J. Exp. Med.* **184**:277-281.
- Hodgkin, P.D., S.H. Chin, G. Bartell, A. Mamchak, K. Doherty, A.B. Lyons, et J. Hasbold. 1997. The importance of efficacy and partial agonism in evaluating models of B lymphocyte activation. *Int. Rev. Immunol.* **15**:101-127.
- Hogquist, K.A. 2001. Signal strength in thymic selection and lineage commitment. *Curr. Opin. Immunol.* **13**:225-231.
- Holder, J.E., W.G. Kimpton, E.A. Washington, et R.N. Cahill. 1999. L-selectin expression on thymic emigrants defines two distinct tissue-migration pathways. *Immunology* **98**:422-426.
- Hollander, G.A., B. Wang, A. Nichogiannopoulou, P.P. Platenburg, W. van Ewijk, S.J. Burakoff, J.C. Gutierrez-Ramos, et C. Terhorst. 1995. Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature* **373**:350-353.
- Horan, P.K., et S.E. Slezak. 1989. Stable cell membrane labelling. *Nature* **340**:167-168.
- Hozumi, K., A. Kobori, T. Sato, H. Nozaki, S. Nishikawa, T. Nishimura, et S. Habu. 1994. Pro-T cells in fetal thymus express c-kit and RAG-2 but do not rearrange the gene encoding the T cell receptor beta chain. *Eur. J. Immunol.* **24**:1339-1344.
- Huang, Z., S. Li, et R. Korngold. 1997. Immunoglobulin superfamily proteins: structure, mechanisms, and drug discovery. *Biopolymers* **43**:367-382.
- Hueber, A.O., G. Raposo, et M. Pierres, H.T. He. 1994. Thy-1 triggers mouse thymocyte apoptosis through a bcl-2-resistant mechanism. *J. Exp. Med.* **179**:785-796.
- Huesmann, M., B. Scott, P. Kisielow, et H. von Boehmer. 1991. Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell* **66**:533-540.
- Hugo, P., et E.F. Potworowski. 1990. Selection of CD4+CD8+ thymocytes by complex formation with medulla-derived epithelial cells. *Cell. Immunol.* **126**:143-154.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**:11-25.
- Ilic, V., M. Colic, et D. Kosec. 1994-95. Isolation, cultivation and phenotypic characterization of rat thymic dendritic cells. *Thymus* **24**:9-28.

- Imai, T., D. Chantry, C.J. Raport, C.L. Wood, M. Nishimura, R. Godiska, O. Yoshie, et P.W. Gray. 1998. Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *J. Biol. Chem.* **273**:1764-1768.
- Inaba, M., K. Inaba, M. Hosono, T. Kumamoto, T. Ishida, S. Muramatsu, T. Masuda, et S. Ikehara. 1991. Distinct mechanisms of neonatal tolerance induced by dendritic cells and thymic B cells. *J. Exp. Med.* **173**:549-559.
- Inaba, K., M.D. Witmer-Pack, M. Inaba, S. Muramatsu, R.M. Steinman, C.D. Surh, E.K. Gao, H. Kosaka, D. Lo, C. Ahn, D.B. Murphy, L. Karlsson, P. Peterson, et J. Sprent. 1988. The function of Ia⁺ dendritic cells and Ia⁻ dendritic cell precursors in thymocyte mitogenesis to lectin and lectin plus interleukin 1. *J. Exp. Med.* **167**:149-162.
- Isakov, N., et B. Biesinger. 2000. Lck protein tyrosine kinase is a key regulator of T-cell activation and a target for signal intervention by Herpesvirus saimiri and other viral gene products. *Eur. J. Biochem.* **267**:3413-3421.
- Ishida, I., S. Verbeek, M. Bonneville, S. Itohara, A. Berns, et S. Tonegawa. 1990. T-cell receptor gamma delta and gamma transgenic mice suggest a role of a gamma gene silencer in the generation of alpha beta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**:3067-3071.
- Itano, A., et E. Robey. 2000. Highly efficient selection of CD4 and CD8 lineage thymocytes supports an instructive model of lineage commitment. *Immunity* **12**:383-389.
- Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto, et S. Nagata. 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**:233-243.
- Itoi, M., et T. Amagai. 1998. Inductive role of fibroblastic cell lines in development of the mouse thymus anlage in organ culture. *Cell. Immunol.* **183**:32-41.
- Ivanov, V., et R. Ceredig. 1992. Transcription factors in mouse fetal thymus development. *Int. Immunol.* **4**:729-737.
- Jenkinson, E.J., G. Anderson, et J.J. Owen. 1992. Studies on T cell maturation on defined thymic stromal cell populations in vitro. *J. Exp. Med.* **176**:845-853.
- Jeong, K.I., K. Uetsuka, H. Nakayama, et K. Doi. 1999. Glycoconjugate expression in follicle-associated epithelium (FAE) covering the nasal-associated lymphoid tissue (NALT) in specific pathogen-free and conventional rats. *Exp. Anim.* **48**:23-29.
- Jiang, W., W.J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R.M. Steinman, et M.C. Nussenzweig. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**:151-155.

- Jirgensen, A., M. Nielsen, A. Svejgaard, J.A. Ledbetter, N. Odum, et C. Ropke. 1996. Human thymic epithelial cells present superantigens to T-cell lines and thymocytes. *Exp. Clin. Immunogenet.* **13**:192-203.
- Joel, D.D., M.W. Hess, et H. Cottier. 1972. Magnitude and pattern of thymic lymphocyte migration in neonatal mice. *J. Exp. Med.* **135**:907-923.
- Johnson, R.M., D.W. Lancki, A.I. Sperling, R.F. Dick, P.G. Spear, F.W. Fitch, et J.A. Bluestone. 1992. A murine CD4-, CD8- T cell receptor-gamma delta T lymphocyte clone specific for herpes simplex virus glycoprotein I. *J. Immunol.* **148**:983-988.
- Jotereau, F.V., E. Houssaint, et N.M. Le Douarin. 1980. Lymphoid stem cell homing to the early thymic primordium of the avian embryo. *Eur J Immunol* **10**:620-627.
- Julius, M., C.R. Maroun, et L. Haughn. 1993. Distinct roles for CD4 and CD8 as co-receptors in antigen receptor signalling. *Immunol. Today* **14**:177-183.
- Jung, T.M., et M.O. Dailey. 1990. Rapid modulation of homing receptors (gp90MEL-14) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J. Immunol.* **144**:3130-3136.
- Kamada, N., H. Iijima, K. Kimura, M. Harada, E. Shimizu, S. Motohashi, Si, T. Kawano, H. Shinkai, T. Nakayama, T. Sakai, L. Brossay, M. Kronenberg, et M. Taniguchi. 2001. Crucial amino acid residues of mouse CD1d for glycolipid ligand presentation to V(alpha)14 NKT cells. *Int. Immunol.* **13**:853-861.
- Kamiguchi, H., M.L. Hlavin, et V. Lemmon. 1998. Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol. Cell. Neurosci.* **12**:48-55.
- Kampinga, J., S. Berges, R.L. Boyd, P. Brekelmans, M. Colic, W. van Ewijk, M.D. Kendall, H. Ladyman, P. Nieuwenhuis, M.A. Ritter, et al. 1989. Thymic epithelial antibodies: immunohistological analysis and introduction of nomenclature. *Thymus* **13**:165-173.
- Kaneta, M., M. Osawa, K. Sudo, H. Nakauchi, A.G. Farr, et Y. Takahama. 2000. A role for pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *J. Immunol.* **164**:256-264.
- Kang, J., A. Volkmann, et D.H. Raulet. 2001. Evidence that gammadelta versus alphabeta T cell fate determination is initiated independently of T cell receptor signaling. *J. Exp. Med.* **193**:689-698.
- Kang, J., J. Baker, et D.H. Raulet. 1995. Evidence that productive rearrangements of TCR gamma genes influence the commitment of progenitor cells to differentiate into alpha beta or gamma delta T cells. *Eur. J. Immunol.* **25**:2706-2709.

- Kang, J., M. Coles, et D.H. Raulet. 1999. Defective development of gamma/delta T cells in interleukin 7 receptor-deficient mice is due to impaired expression of T cell receptor gamma genes. *J. Exp. Med.* **190**:973-982.
- Kappes, D.J., B. Alarcon, et J.R. Regueiro. 1995. T lymphocyte receptor deficiencies. *Curr. Opin. Immunol.* **7**:441-447.
- Kappler, J.W., N. Roehm, et P. Marrack. 1987. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* **49**:273-280.
- Kappler, J.W., T. Wade, J. White, E. Kushnir, M. Blackman, J. Bill, N. Roehm, et P. Marrack. 1987. A T cell receptor V beta segment that imparts reactivity to a class II major histocompatibility complex product. *Cell* **49**:263-271.
- Karlsson, L., C.D. Surh, J. Sprent, et P.A. Peterson. 1991. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* **351**:485-488.
- Kasai, M., K. Hirokawa, K. Kajino, K. Ogasawara, M. Tatsumi, E. Hermel, J.J. Monaco, et T. Mizuochi. 1996. Difference in antigen presentation pathways between cortical and medullary thymic epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* **26**:2101-2107.
- Kawakami, N., F. Nishizawa, N. Sakane, M. Iwao, K. Tsujikawa, M. Ikawa, M. Okabe, et H. Yamamoto. 1999. Roles of integrins and CD44 on the adhesion and migration of fetal liver cells to the fetal thymus. *J. Immunol.* **163**:3211-3216.
- Kawamoto, H., T. Ikawa, K. Ohmura, S. Fujimoto, et Y. Katsura. 2000. T cell progenitors emerge earlier than B cell progenitors in the murine fetal liver. *Immunity* **12**:441-450.
- Kaye, J., N.J. Vasquez, et S.M. Hedrick. 1992. Involvement of the same region of the T cell antigen receptor in thymic selection and foreign peptide recognition. *J. Immunol.* **148**:3342-3353.
- Kelly, K.A., et R. Scollay. 1990. Analysis of recent thymic emigrants with subset- and maturity-related markers. *Int. Immunol.* **2**:419-425.
- Kendall, M.D. 1989. The morphology of perivascular spaces in the thymus. *Thymus* **13**:157-164.
- Kennedy, M.K., M. Glaccum, S.N. Brown, E.A. Butz, J.L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C.R. Willis, K. Brasel, P.J. Morrissey, K. Stocking, J.C. Schuh, S. Joyce, et J.J. Peschon. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.* **191**:771-780.

- Kerr, J.F., B. Harmon, et J. Searle. 1974. An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. *Cell. Sci.* **14**:571-585.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, et A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**:239-257.
- Kersh, G.J., F.F. Hooshmand, et S.M. Hedrick. 1995. Efficient maturation of alpha beta lineage thymocytes to the CD4+CD8+ stage in the absence of TCR-beta rearrangement. *J. Immunol.* **154**:5706-5714.
- Kersh, G.J., et S.M. Hedrick. 1995. Role of TCR specificity in CD4 versus CD8 lineage commitment. *J. Immunol.* **154**:1057-1068.
- Kikuta, A., et S.D. Rosen. 1994. Localization of ligands for L-selectin in mouse peripheral lymph node high endothelial cells by colloidal gold conjugates. *Blood* **84**:3766-3775.
- Kilgannon, P., T. Turner, J. Meyer, W. Wisdom, et W.M. Gallatin. 1998. Mapping of the ICAM-5 (telencephalin) gene, a neuronal member of the ICAM family, to a location between ICAM-1 and ICAM-3 on human chromosome 19p13.2. *Genomics* **54**:328-330.
- Kim, K., C.K. Lee, T.J. Sayers, K. Muegge, et S.K. Durum. 1998. The trophic action of IL-7 on pro-T cells: inhibition of apoptosis of pro-T1, -T2, and -T3 cells correlates with Bcl-2 and Bax levels and is independent of Fas and p53 pathways. *J. Immunol.* **160**:5735-5741.
- Kim, M.G., G. Lee, S.K. Lee, M. Lolkema, J. Yim, S.H. Hong, R.H. Schwartz. 2000. Epithelial cell-specific laminin 5 is required for survival of early thymocytes. *J. Immunol.* **165**:192-201.
- Kim, S.Y., S.L. Ang, D.B. Bloch, K.D. Bloch, Y. Kawahara, C. Tolman, R. Lee, J.G. Seidman, et E.J. Neer. 1988. Identification of cDNA encoding an additional alpha subunit of a human GTP-binding protein: expression of three alpha i subtypes in human tissues and cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**:4153-4157.
- Kincade, P.W., L. Flaherty, G. Lee, T. Watanabe, et J. Michaelson. 1980. Qa antigen expression on functional lymphoid, myeloid, and stem cells in adult mice. *J. Immunol.* **124**:2879-2885.
- King, P.D., E.T. Sandberg, A. Selvakumar, P. Fang, A.L. Beudet, et B. Dupont. 1995. Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecule-1 generated by alternative RNA splicing. *J. Immunol.* **154**:6080-6093.
- Kishimoto, H., C.D. Surh, et J. Sprent. 1998. A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo. *J. Exp. Med.* **187**:1427-1438.

- Kishimoto, H., et J. Sprent. 2000. The thymus and negative selection. *Immunol. Res.* **21**:315-323.
- Kishimoto, H., Z. Cai, A. Brunmark, M.R. Jackson, P.A. Peterson, et J. Sprent. 1996. Differing roles for B7 and intercellular adhesion molecule-1 in negative selection of thymocytes. *J. Exp. Med.* **184**:531-537.
- Kishimoto, T.K., N. Hollander, T.M. Roberts, D.C. Anderson, et T.A. Springer. 1987. Heterogeneous mutations in the beta subunit common to the LFA-1, Mac-1, and p150,95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency. *Cell* **50**:193-202.
- Kleindienst, P., I. Chretien, T. Winkler, et T. Brocker. 2000. Functional comparison of thymic B cells and dendritic cells in vivo. *Blood* **95**:2610-2616.
- Koller, B.H., P. Marrack, J.W. Kappler, et O. Smithies. 1990. Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science* **248**:1227-1230.
- Koshiba, M., S. Apasov, V. Sverdlov, P. Chen, L. Erb, J.T. Turner, G.A. Weisman, et M.V. Sitkovsky. 1997. Transient up-regulation of P2Y2 nucleotide receptor mRNA expression is an immediate early gene response in activated thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:831-836.
- Knolle, P.A., et G. Gerken. 2000. Local control of the immune response in the liver. *Immunol. Rev.* **174**:21-34.
- Knop, N., et E. Knop. 2000. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**:1270-1279.
- Komori, T., A. Okada, V. Stewart, et F.W. Alt. 1993. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* **261**:1171-1175. Published erratum appears in *Science* 1993 Dec 24;**262**(5142):1957
- Kruisbeek, A.M., J.J. Mond, B.J. Fowlkes, J.A. Carmen, S. Bridges, et D.L. Longo. 1985. Absence of the Lyt-2-,L3T4+ lineage of T cells in mice treated neonatally with anti-I-A correlates with absence of intrathymic I-A-bearing antigen-presenting cell function. *J. Exp. Med.* **161**:1029-1047.
- Kruisbeek, A.M., M.J. Fultz, S.O. Sharrow, A. Singer, et J.J. Mond. 1983. Early development of the T cell repertoire. In vivo treatment of neonatal mice with anti-Ia antibodies interferes with differentiation of I-restricted T cells but not K/D-restricted T cells. *J. Exp. Med.* **157**:1932-1946.
- Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet, et K. Rajewsky. 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**:1427-1429.

- Kuper, C.F., P.J. Koornstra, D.M. Hameleers, J. Biewenga, B.J. Spit, A.M. Duijvestijn, P.J. van Breda Vriesman, et T. Sminia. 1992. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today* **13**:219-224.
- Kurasawa, K., Y. Hashimoto, et I. Iwamoto. 1999. Fas modulates both positive and negative selection of thymocytes. *Cell. Immunol.* **194**:127-135.
- Kurz, B., B. von Gaudecker, B. Krisch, et R. Mentlein. 1996. Rat thymic epithelial cells in vitro and in situ: characterization by immunocytochemistry and morphology. *Cell Tissue Res.* **283**:221-229.
- Kurzinger, K., T. Reynolds, R.N. Germain, D. Davignon, E. Martz, et T.A. Springer. 1981. A novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): cellular distribution, quantitative expression, and structure. *J. Immunol.* **127**:596-602.
- Kyewski, B.A., R.V. Rouse, et H.S. Kaplan. 1982. Thymocyte rosettes: multicellular complexes of lymphocytes and bone marrow-derived stromal cells in the mouse thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**:5646-5650.
- Laky, K., L. Lefrancois, U. von Freeden-Jeffry, R. Murray, et L. Puddington. 1998. The role of IL-7 in thymic and extrathymic development of TCR gamma delta cells. *J. Immunol.* **161**:707-713.
- Lee, C.K., J.K. Kim, Y. Kim, M.K. Lee, K. Kim, J.K. Kang, R. Hofmeister, S.K. Durum, et S.S. Han. 2001. Generation of macrophages from early t progenitors in vitro. *J. Immunol.* **166**:5964-5969.
- Landriscina, M., I. Prudovsky, C.M. Carreira, R. Soldi, F. Tarantini, et T. Maciag. 2000. Amlexanox reversibly inhibits cell migration and proliferation and induces the Src-dependent disassembly of actin stress fibers in vitro. *J. Biol. Chem.* **275**:32753-32762.
- Languino, L.R., A. Duperray, K.J. Joganic, M. Fornaro, G.B. Thornton, et D.C. Altieri. 1995. Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **92**:1505-1509.
- Lanier, L.L. 1998. NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **16**:359-393.
- Lannes-Vieira, J., M. Dardenne, et W. Savino. 1991. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment: ontogenetic studies and modulation by glucocorticoid hormones. *J. Histochem. Cytochem.* **39**:1539-1546.
- Lantz, O., et A. Bendelac. 1994. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4- T cells in mice and humans. *J. Exp. Med.* **180**:1097-1106.

- Larocca, L.M., M. Piantelli, S. Valitutti, F. Castellino, N. Maggiano, et P. Musiani. 1988. Alterations in thymocyte subpopulations in Down's syndrome (trisomy 21). *Clin. Immunol. Immunopathol.* **49**:175-186.
- Larsen, C.P., S.C. Ritchie, T.C. Pearson, P.S. Linsley, et R.P. Lowry. 1992. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *J. Exp. Med.* **176**:1215-1220.
- Laufer, T.M., J. DeKoning, J.S. Markowitz, D. Lo, et L.H. Glimcher. 1996. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* **383**:81-85.
- Laufer, T.M., L. Fan, et L.H. Glimcher. 1999. Self-reactive T cells selected on thymic cortical epithelium are polyclonal and are pathogenic in vivo. *J. Immunol.* **162**:5078-5084.
- Lechner, O., G.J. Wieggers, A.J. Oliveira-Dos-Santos, H. Dietrich, H. Recheis, M. Waterman, R. Boyd, et G. Wick. 2000. Glucocorticoid production in the murine thymus. *Eur. J. Immunol.* **30**:337-346.
- Leclercq, G., V. Debacker, M. de Smedt, et J. Plum. 1996. Differential effects of interleukin-15 and interleukin-2 on differentiation of bipotential T/natural killer progenitor cells. *J. Exp. Med.* **184**:325-336.
- Leduc, I., W.M. Hempel, N. Mathieu, C. Verthuy, G. Bouvier, F. Watrin, P. Ferrier. 2000. T cell development in TCR beta enhancer-deleted mice: implications for alpha beta T cell lineage commitment and differentiation. *J. Immunol.* **165**:1364-1373.
- Lee, C.K., J.K. Kim, Y. Kim, M.K. Lee, K. Kim, J.K. Kang, R. Hofmeister, S.K. Durum, et S.S. Han. 2001. Generation of macrophages from early t progenitors in vitro. *J. Immunol.* **166**:5964-5969.
- Lee, C.K., K. Kim, L.A. Welniak, W.J. Murphy, K. Muegge, et S.K. Durum. 2001. Thymic emigrants isolated by a new method possess unique phenotypic and functional properties. *Blood* **97**:1360-1369.
- Lemmon, V., K.L. Farr, et C. Lagenaur. 1989. L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* **2**:1597-1603.
- Lepault, F., M.C. Gagnerault, C. Faveeuw, et C. Boitard. 1994. Recirculation, phenotype and functions of lymphocytes in mice treated with monoclonal antibody MEL-14. *Eur. J. Immunol.* **24**:3106-3112.

- Leposavic, G., M. Micic, N. Ugresic, M. Bogojevic, et K. Isakovic. 1992. Components of sympathetic innervation of the rat thymus during late fetal and postnatal development: histofluorescence and biochemical study. *Sympathetic innervation of the rat thymus. Thymus* **19**:77-87.
- Le, P.T., S. Lazorick, L.P. Whichard, Y.C. Yang, S.C. Clark, B.F. Haynes, et K.H. Singer. 1990. Human thymic epithelial cells produce IL-6, granulocyte-monocyte-CSF, and leukemia inhibitory factor. *J. Immunol.* **145**:3310-3315.
- Le, P.T., L.W. Vollger, B.F. et Haynes, K.H. Singer. 1990. Ligand binding to the LFA-3 cell adhesion molecule induces IL-1 production by human thymic epithelial cells. *J. Immunol.* **144**:4541-4547.
- Lesley, J., J. Trotter, R. Schulte, et R. Hyman. 1990. Phenotypic analysis of the early events during repopulation of the thymus by the bone marrow prothymocyte. *Cell. Immunol.* **128**:63-78.
- Lesley, J., R. Hyman, et P.W. Kincade. 1993. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv. Immunol.* **54**:271-335.
- Leverrier, Y., et A.J. Ridley. 2001. Requirement for Rho GTPases and PI 3-kinases during apoptotic cell phagocytosis by macrophages. *Curr. Biol.* **11**:195-199.
- Liao, N.S., J. Maltzman, et D.H. Raulet. 1990. Expression of the V beta 5.1 gene by murine peripheral T cells is controlled by MHC genes and skewed to the CD8+ subset. *J. Immunol.* **144**:844-848.
- Linch, D.C., D.L. Wallace, et K. O'Flynn. 1987. Signal transduction in human T lymphocytes. *Immunol. Rev.* **95**:137-159.
- Linsley, P.S., W. Brady, M. Urnes, L.S. Grosmaire, N.K. Damle, et J.A. Ledbetter. 1991. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* **174**:561-569.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, et X. Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**:479-489.
- Liu, C.C., B. Perussia, et J.D. Young. 2000. The emerging role of IL-15 in NK-cell development. *Immunol. Today* **21**:113-116.
- Liu, C.P., F. Crawford, P. Marrack, et J. Kappler. 1998. T cell positive selection by a high density, low affinity ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:4522-4526.
- Li, Y., M. Pezzano, D. Philp, V. Reid, et J. Guyden. 1992. Thymic nurse cells exclusively bind and internalize CD4+CD8+ thymocytes. *Cell. Immunol.* **140**:495-506.

- Lockhart, D.J., et E.A. Winzeler. 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**:827-836.
- Lodolce, J.P., D.L. Boone, S. Chai, R.E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin, et A. Ma. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* **9**:669-676.
- Lopez-Botet, M., M. Llano, F. Navarro, et T. Bellon. 2000. NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Semin. Immunol.* **12**:109-119.
- Low, T.L., G.B. Thurman, C. Chincarini, J.E. McClure, G.D. Marshall, S.K. Hu, et A.L. Goldstein. 1979. Current status of thymosin research: evidence for the existence of a family of thymic factors that control T-cell maturation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **332**:33-48.
- Lucas, B., et R.N. Germain. 2000. Opening a window on thymic positive selection: developmental changes in the influence of cosignaling by integrins and CD28 on selection events induced by TCR engagement. *J. Immunol.* **165**:1889-1895.
- Lucas, B., F. Vasseur, et C. Penit. 1993. Normal sequence of phenotypic transitions in one cohort of 5-bromo-2'-deoxyuridine-pulse-labeled thymocytes. Correlation with T cell receptor expression. *J. Immunol.* **151**:4574-4582.
- Lucas, B., F. Vasseur, et C. Penit. 1994. Production, selection, and maturation of thymocytes with high surface density of TCR. *J. Immunol.* **153**:53-62.
- Luettig, B., A. Sponholz, C. Heerwagen, U. Bode, et J. Westermann. 2001. Recent Thymic Emigrants (CD4+) Continuously Migrate Through Lymphoid Organs: within the Tissue They Alter Surface Molecule Expression. *Scand. J. Immunol.* **53**:563-571.
- Lundberg, K., W. Heath, F. Kontgen, F.R. Carbone, et K. Shortman. 1995. Intermediate steps in positive selection: differentiation of CD4+8int TCRint thymocytes into CD4-8+TCRhi thymocytes. *J. Exp. Med.* **181**:1643-1651.
- Lyons, A.B. 1999. Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol. Cell. Biol.* **77**:509-515.
- Lyons, A.B., et C.R. Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **17**:131-137.
- MacDonald, H.R., et A. Wilson. 1998. The role of the T-cell receptor (TCR) in alpha beta/gamma delta lineage commitment: clues from intracellular TCR staining. *Immunol. Rev.* **165**:87-94.

- Majima, T., Y. Ohashi, R. Nagatomi, A. Iizuka, et T. Konno. 1993. Defective mononuclear cell antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in patients with leukocyte adhesion deficiency emphasizing on different CD11/CD18 requirement of Fc gamma RI versus Fc gamma RII in ADCC. *Cell. Immunol.* **148**:385-396.
- Maki, K., S. Sunaga, Y. Komagata, Y. Kodaira, A. Mabuchi, H. Karasuyama, K. Yokomuro, J.I. Miyazaki, et K. Ikuta. 1996. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**:7172-7177.
- Maly, P., A. Thall, B. Petryniak, C.E. Rogers, P.L. Smith, R.M. Marks, R.J. Kelly, K.M. Gersten, G. Cheng, T.L. Saunders, S.A. Camper, R.T. Camphausen, F.X. Sullivan, Y. Isogai, O. Hindsgaul, U.H. von Andrian, et J.B. Lowe. 1996. The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* **86**:643-653.
- Mandel, T.E., et M.M. Kennedy. 1978. The differentiation of murine thymocytes in vivo and in vitro. *Immunology* **35**:317-331.
- Marlin, S.D., et T.A. Springer. 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* **51**:813-819.
- Martinon-Ego, C., R. Berthier, F. Cretin, V. Collin, A.M. Laharie, et P.N. Marche. 2001. Murine dendritic cells derived from myeloid progenitors of the thymus are unable to produce bioactive IL-12p70. *J. Immunol.* **166**:5008-5017.
- Matsumoto, I., et T. Osawa. 1969. Purification and characterization of an anti-H(O) phytohemagglutinin of *Ulex europaeus*. *Biochim. Biophys. Acta* **194**:180-189.
- Matsumoto, K., Y. Yoshikai, T. Asano, K. Himeno, A. Iwasaki, et K. Nomoto. 1991. Defect in negative selection in lpr donor-derived T cells differentiating in non-lpr host thymus. *J. Exp. Med.* **173**:127-136.
- McClelland, A., J. deBear, S.C. Yost, A.M. Meyer, C.W. Marlor, et J.M. Greve. 1991. Identification of monoclonal antibody epitopes and critical residues for rhinovirus binding in domain 1 of intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**:7993-7997.
- McClure, S., L. Dudler, D. Thorpe, et W.R. Hein. 1988. Analysis of cell division among subpopulations of lymphoid cells in sheep. I. Thymocytes. *Immunology* **65**:393-399.
- McCormack, J.E., J. Kappler, P. Murrack, et J.Y. Westcott. 1991. Production of prostaglandin E2 and prostacyclin by thymic nurse cells in culture. *J. Immunol.* **146**:239-243.
- McEver, R.P. 1994. Selectins. *Curr. Opin. Immunol.* **6**:75-84.

- McLean, A.R., M.M. Rosado, F. Agenes, R. Vasconcellos, et A.A. Freitas. 1997. Resource competition as a mechanism for B cell homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:5792-5797.
- Meco, D., S. Scarpa, M. Napolitano, M. Maroder, D. Bellavia, R. De Maria, M. Ragano-Caracciolo, L. Frati, A. Modesti, et A. Gulino. 1994. Modulation of fibronectin and thymic stromal cell-dependent thymocyte maturation by retinoic acid. *J. Immunol.* **153**:73-83.
- Meilin, A., J. Shoham, L. Schreiber, et Y. Sharabi. 1995. The role of thymocytes in regulating thymic epithelial cell growth and function. *Scand. J. Immunol.* **42**:185-190.
- Meilin, A., Y. Sharabi, et J. Shoham. 1997. Analysis of thymic stromal cell subpopulations grown in vitro on extracellular matrix in defined medium--V. Proliferation regulating activities in supernatants of human thymic epithelial cell cultures. *Int. J. Immunopharmacol.* **19**:39-47.
- Michie, A.M., J.R. Carlyle, T.M. Schmitt, B. Ljutic, S.K. Cho, .Q Fong, et J.C. Zuniga-Pflucker. 2000. Clonal characterization of a bipotent T cell and NK cell progenitor in the mouse fetal thymus. *J. Immunol.* **164**:1730-1733.
- Michie, S.A., E.A. Kirkpatrick, et R.V. Rouse. 1988. Rare peripheral T cells migrate to and persist in normal mouse thymus. *J. Exp. Med.* **168**:1929-1934.
- Michie, S.A., et R.V. Rouse. 1989. Traffic of mature lymphocytes into the mouse thymus. *Thymus* **13**:141-148.
- Micic, M., G. Leposavic, N. Ugresic, M. Bogojevic, et K. Isakovic. 1992. Parasympathetic innervation of the rat thymus during first life period: histochemical and biochemical study. *Thymus* **19**:173-182.
- Milicevic, N.M., et Z.J. Milicevic. 1984. Enzyme-histochemical characterization of macrophages in the rat thymus, with special reference to metallophilic cells of the corticomedullary zone. *J. Leukoc. Biol.* **36**:761-769.
- Miyama-Inaba, M., S. Kuma, K. Inaba, H. Ogata, H. Iwai, R. Yasumizu, S. Muramatsu, R.M. Steinman, et S. Ikehara. 1988. Unusual phenotype of B cells in the thymus of normal mice. *J. Exp. Med.* **168**:811-816.
- Mizuno, T., Y. Yoshihara, J. Inazawa, H. Kagamiyama, et K. Mori. 1997. cDNA cloning and chromosomal localization of the human telencephalin and its distinctive interaction with lymphocyte function-associated antigen-1. *J. Biol. Chem.* **272**:1156-1163.
- Moll, R., W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger, et R. Krepler. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**:11-24.

- Mombaerts, P., A.R. Clarke, M.A. Rudnicki, J. Iacomini, S. Itohara, J.J. Lafaille, L. Wang, Y. Ichikawa, R. Jaenisch, et M.L. Hooper. 1992. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* **360**:225-231. Published erratum appears in *Nature* 1992 **360**:491.
- Mombaerts, P., J. Iacomini, R.S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, et V.E. Papaioannou. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**:869-877.
- Monleon, I., M.J. Martinez-Lorenzo, A. Anel, P. Lasierra, L. Larrad, A. Pineiro, J. Naval, et M.A. Alava. 2000. CD59 cross-linking induces secretion of APO2 ligand in overactivated human T cells. *Eur. J. Immunol.* **30**:1078-1087.
- Moore, M.A., et J.J. Owen . 1967. Experimental studies on the development of the thymus. *J. Exp. Med.* **126**:715-726.
- Moore, N.C., G. Anderson, C.A. Smith, J.J. Owen, et E.J. Jenkinson. 1993. Analysis of cytokine gene expression in subpopulations of freshly isolated thymocytes and thymic stromal cells using semiquantitative polymerase chain reaction. *Eur. J. Immunol.* **23**:922-927.
- Moore, T.A., et A. Zlotnik. 1995. T-cell lineage commitment and cytokine responses of thymic progenitors. *Blood* **86**:1850-1860.
- Moore, T.A., U. von Freeden-Jeffry, R. Murray, et A. Zlotnik. 1996. Inhibition of gamma delta T cell development and early thymocyte maturation in IL-7 $-/-$ mice. *J. Immunol.* **157**:2366-7233.
- Moreau, V., et M. Way. 1999. In vitro approaches to study actin and microtubule dependent cell processes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:152-158.
- Moretta, A., R. Biassoni, C. Bottino, et L. Moretta. 2000. Surface receptors delivering opposite signals regulate the function of human NK cells. *Semin. Immunol.* **12**:129-138.
- ^aMorita, C.T., H.K. Lee, H. Wang, H. Li, R.A. Mariuzza, et Y. Tanaka. 2001. Structural features of nonpeptide prenyl pyrophosphates that determine their antigenicity for human gammadelta T cells. *J. Immunol.* **167**:36-41.
- ^bMorita, C.T., H. Li, J.G. Lamphear, R.R. Rich, J.D. Fraser, R.A. Mariuzza, et H.K. Lee. 2001. Superantigen recognition by gammadelta T cells: SEA recognition site for human Vgamma2 T cell receptors. *Immunity* **14**:331-344.
- Moulian, N., C. Renvoize, C. Desodt, A. Serraf, et S. Berrih-Aknin. 1999. Functional Fas expression in human thymic epithelial cells. *Blood* **93**:2660-2670.

- Mrozek, E., P. Anderson, et M.A. Caligiuri. 1996. Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* **87**:2632-2640.
- Mueller, C., M.W. Hess, et H. Cottier. 1987. Macrophages containing amylase-resistant, PAS-positive material in the thymic cortex of conventional and germ-free mice. *Thymus* **9**:253-256.
- Mueller, D.L. 2000. T cells: A proliferation of costimulatory molecules. *Curr. Biol.* **10**:R227-230.
- Muller, E. 1977. Localization of eosinophils in the thymus by the peroxidase reaction. *Histochemistry* **52**:273-279.
- Muller, K.P., et B.A. Kyewski. 1995. Intrathymic T cell receptor (TcR) targeting in mice lacking CD4 or major histocompatibility complex (MHC) class II: rescue of CD4 T cell lineage without co-engagement of TcR/CD4 by MHC class II. *Eur. J. Immunol.* **25**:896-902.
- Murphy, K.M., A.B. Heimberger, et D.Y. Loh. 1990. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science* **250**:1720-1723.
- Murphy, M., D.S. Friend, L. Pike-Nobile, et L.B. Epstein. 1992. Tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma expression in human thymus. Localization and overexpression in Down syndrome (trisomy 21). *J. Immunol.* **149**:2506-2512.
- Murphy, M., et L.B. Epstein. 1990. Down syndrome (trisomy 21) thymuses have a decreased proportion of cells expressing high levels of TCR alpha, beta and CD3. A possible mechanism for diminished T cell function in Down syndrome. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **55**:453-467.
- Murphy, M., et L.B. Epstein. 1992. Down syndrome (DS) peripheral blood contains phenotypically mature CD3+TCR alpha, beta+ cells but abnormal proportions of TCR alpha, beta+, TCR gamma, delta+, and CD4+ CD45RA+ cells: evidence for an inefficient release of mature T cells by the DS thymus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **62**:245-251.
- Murphy, M., R.M. Insoft, L. Pike-Nobile, K.S. Derbin, et L.B. Epstein. 1993. Overexpression of LFA-1 and ICAM-1 in Down syndrome thymus. Implications for abnormal thymocyte maturation. *J. Immunol.* **150**:5696-5703.
- Nabarra, B., et I. Andrianarison. 1987. Ultrastructural studies of thymic reticulum: I. Epithelial [corrected] component. *Thymus* **9**:95-121. Published erratum appears in *Thymus* **1988**;11(3):following 205.
- Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**:355-365.

- Napolitano, M., D. Bellavia, M. Maroder, M. Farina, A. Vacca, L. Frati, A. Gulino, et I. Screpanti. 1997. Modulation of cytokine gene expression by thymic lympho-stromal cell to cell interaction: effect of retinoic acid. *Thymus* **24**:247-258.
- Naquet, P., M. Naspetti, et R. Boyd. 1999. Development, organization and function of the thymic medulla in normal, immunodeficient or autoimmune mice. *Semin. Immunol.* **11**:47-55.
- Naspetti, M., M. Aurrand-Lions, J. DeKoning, M. Malissen, F. Galland, D. Lo, et P. Naquet. 1997. Thymocytes and RelB-dependent medullary epithelial cells provide growth-promoting and organization signals, respectively, to thymic medullary stromal cells. *Eur. J. Immunol.* **27**:1392-1397.
- Nelson, A.J., S. Hosier, W. Brady, P.S. Linsley, et A.G. Farr. 1993. Medullary thymic epithelium expresses a ligand for CTLA4 in situ and in vitro. *J. Immunol.* **151**:2453-2461.
- Newman, P.J., M.C. Berndt, J. Gorski, G.C. White, S. Lyman, C. Paddock, et W.A. Muller. 1990. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* **247**:1219-1222.
- Nicolas, L., G. Monneret, A.L. Debard, A. Blesius, M.C. Gutowski, G. Salles, J. Biennu. 2001. Human gammadelta T cells express a higher TCR/CD3 complex density than alphabeta T cells. *Clin. Immunol.* **98**:358-363.
- Nieburgs, A.C., P.T. Picciano, J.H. Korn, T. McCalister, C. Allred, et S. Cohen. 1985. In vitro growth and maintenance of two morphologically distinct populations of thymic epithelial cells. *Cell. Immunol.* **90**:439-450.
- Niedergang, F., et J.P. Kraehenbuhl. 2000. Much ado about M cells. *Trends Cell Biol.* **10**:137-141.
- Nonoyama, S., M. Nakayama, T. Shiohara, et J. Yata. 1989. Only dull CD3+ thymocytes bind to thymic epithelial cells. The binding is elicited by both CD2/LFA-3 and LFA-1/ICAM-1 interactions. *Eur. J. Immunol.* **19**:1631-1635.
- Norment, A.M., et M.J. Bevan. 2000. Role of chemokines in thymocyte development. *Semin. Immunol.* **12**:445-455.
- Norment, A.M., L.Y. Bogatzki, B.N. Gantner, et M.J. Bevan. 2000. Murine CCR9, a chemokine receptor for thymus-expressed chemokine that is up-regulated following pre-TCR signaling. *J. Immunol.* **164**:639-648.
- Ober, B.T., Q. Hu, J.T. Opferman, S. Hagevik, N. Chiu, C.R. Wang, et P.G. Ashton-Rickardt. 2000. Affinity of thymic self-peptides for the TCR determines the selection of CD8(+) T lymphocytes in the thymus. *Int. Immunol.* **12**:1353-1363.

- O'Brien, R.L., Y.X. Fu, R. Cranfill, A. Dallas, C. Ellis, C. Reardon, J. Lang, S.R. Carding, R. Kubo, et W. Born. 1992. Heat shock protein Hsp60-reactive gamma delta cells: a large, diversified T-lymphocyte subset with highly focused specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**:4348-4352.
- Ohnishi, H., J.A. Ledbetter, S.B. Kanner, P.S. Linsley, T. Tanaka, A.M. Geller, et M. Kotb. 1995. CD28 cross-linking augments TCR-mediated signals and costimulates superantigen responses. *J. Immunol.* **154**:3180-3193.
- Ohteki T., C. Maki, S. Koyasu, T.W. Mak, et P.S. Ohashi. 1999. Cutting edge: LFA-1 is required for liver NK1.1+TCR alpha beta+ cell development: evidence that liver NK1.1+TCR alpha beta+ cells originate from multiple pathways. *J. Immunol.* **162**:3753-3756.
- Ohtsuka, Y., Y. Okamura, et T. Obinata. 2001. Changes in gelsolin expression during ascidian metamorphosis. *Dev. Genes Evol.* **21**:252-256.
- Okada, C.Y., et I.L. Weissman. 1989. Relative V beta transcript levels in thymus and peripheral lymphoid tissues from various mouse strains. Inverse correlation of I-E and Mls expression with relative abundance of several V beta transcripts in peripheral lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* **169**:1703-1719.
- Oliveira-dos-Santos, A.J., J.M. Penninger, T. Rieker-Geley, G. Matsumoto, T.M. Mak, et G. Wick. 1998. Thymic heterotypic cellular complexes in gene-targeted mice with defined blocks in T cell development and adhesion molecule expression. *Eur. J. Immunol.* **28**:2882-2892.
- Oliveira-dos-Santos, A.J., T. Rieker-Geley, H. Recheis, et G. Wick. 1997. Murine thymic nurse cells and rosettes: analysis of adhesion molecule expression using confocal microscopy and a simplified enrichment method. *J. Histochem. Cytochem.* **45**:1293-1297.
- Olsen, N.J., G. Olson, S.M. Viselli, X. Gu, et W.J. Kovacs. 2001. Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development. *Endocrinology* **142**:1278-1283.
- Olsen, N.J., S.M. Viselli, J. Fan, et W.J. Kovacs. 1998. Androgens accelerate thymocyte apoptosis. *Endocrinology* **139**:748-752.
- Olsen, N.J., et W.J. Kovacs. 1989. Increased thymic size and thymocyte interleukin 2 production in androgen-resistant mice. *Scand. J. Immunol.* **29**:733-738.
- Oosterwegel, M.A., R.J. Greenwald, D.A. Mandelbrot, R.B. Lorsbach, et A.H. Sharpe. 1999. CTLA-4 and T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* **11**:294-300.

- Osborn, L., C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso, et R. Lobb. 1989. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* **59**:1203-1211.
- Osorio, L.M., M. Rottenberg, M. Jondal, et S.C. Chow. 1998. Simultaneous cross-linking of CD6 and CD28 induces cell proliferation in resting T cells. *Immunology* **93**:358-365.
- Otsuka, S., H. Iwagaki, T. Yoshino, Y. Nitta, Y. Takeuchi, M. Uomoto, A. Gouchi, M. Nishibori, et N. Tanaka. 2000. Extensive cell death in thymocytes in colon 26-induced cachectic mice. *J. Int. Med. Res.* **28**:36-45.
- Owen, J.J., et M.A. Ritter. 1969. Tissue interaction in the development of thymus lymphocytes. *J. Exp. Med.* **129**:431-442.
- Pabst, R. 1988. The spleen in lymphocyte migration. *Immunol. Today* **9**:43-45.
- Pabst, R., et T. Tschernig. 1995. Lymphocytes in the lung: an often neglected cell. Numbers, characterization and compartmentalization. *Anat. Embryol. (Berl)* **192**:293-299.
- Pachmann, K., et D. Killander. 1976. Simultaneous quantitation of two antigens in mixture in individual cells by microimmunofluorimetry. *J. Immunol. Methods* **12**:67-79.
- Page, D.M., Y. Tokugawa, J. Silver, et C.L. Stewart. 1997. Role of Thy-1 in T cell development. *J. Immunol.* **159**:5285-5292.
- Panaccio, M., M.T. Gillespie, I.D. Walker, L. Kirszbaum, J.A. Sharpe, G.H. Tobias, I.F. McKenzie, et N.J. Deacon. 1987. Molecular characterization of the murine cytotoxic T-cell membrane glycoprotein Ly-3 (CD8). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**:6874-6878.
- Pardoll, D.M., B.J. Fowlkes, J.A. Bluestone, A. Kruisbeek, W.L. Maloy, J.E. Coligan, et R.H. Schwartz. 1987. Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. *Nature* **326**:79-81.
- Parish, C.R. 1999. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Biol.* **77**:499-508.
- Parnes, J.R., et T. Hunkapiller. 1987. L3T4 and the immunoglobulin gene superfamily: new relationships between the immune system and the nervous system. *Immunol. Rev.* **100**:109-127.
- Pasqualini, R., J. Bodorova, S. Ye, et M.E. Hemler. 1993. A study of the structure, function and distribution of beta 5 integrins using novel anti-beta 5 monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* **105**:101-111.

- Pautou, M.P. 1975. [Morphogenesis of the chick embryo foot].[Article in French]. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **34**:511-529.
- Pazmino, N.H., J.N. Ihle, et A.L. Goldstein. 1978. Induction in vivo and in vitro of terminal deoxynucleotidyl transferase by thymosin in bone marrow cells from athymic mice. *J. Exp. Med.* **147**:708-718.
- Peach, R.J., J. Bajorath, W. Brady, G. Leytze, J. Greene, J. Naemura, et P.S. Linsley. 1994. Complementarity determining region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. *J. Exp. Med.* **180**:2049-2058.
- Pelletier, M., C. Tautu, D. Landry, S. Montplaisir, C. Chartrand, et C. Perreault. 1986. Characterization of human thymic dendritic cells in culture. *Immunology* **58**:263-270.
- Pendino, K.J., K.P. Chepenik, et R.R. Schmidt. 1992. Differential eicosanoid synthesis by murine fetal thymic non-lymphoid cells. *Immunol. Cell. Biol.* **70**:237-252.
- Penit, C., B. Lucas, et F. Vasseur. 1995. Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J. Immunol.* **154**:5103-5113.
- Penit, C., et F. Vasseur. 1988. Sequential events in thymocyte differentiation and thymus regeneration revealed by a combination of bromodeoxyuridine DNA labeling and antimitotic drug treatment. *J. Immunol.* **140**:3315-3323.
- Penit, C., et F. Vasseur. 1997. Expansion of mature thymocyte subsets before emigration to the periphery. *J. Immunol.* **159**:4848-4856.
- Penit, C., B. Lucas, F. Vasseur, T. Rieker, et R.L. Boyd. 1996. Thymic medulla epithelial cells acquire specific markers by post-mitotic maturation. *Dev. Immunol.* **5**:25-36.
- Penninger, J., et G. Wick. 1992. Thymic nurse cell lymphocytes react against self major histocompatibility complex. *Eur. J. Immunol.* **22**:79-83.
- Perillo, N.L., C.H. Uittenbogaart, J.T. Nguyen, et L.G. Baum. 1997. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J. Exp. Med.* **185**:1851-1858.
- Pezzano, M., K.D. King, D.D. Philp, A. Adeyemi, B. Gardiner, J. Yang, M. Samms, W. Boto, J.C. Guyden. 1998. A thymic nurse cell-specific monoclonal antibody. *Cell. Immunol.* **185**:123-133.
- Philpott, K.L., J.L. Viney, G. Kay, S. Rastan, E.M. Gardiner, S. Chae, A.C. Hayday, et M.J. Owen. 1992. Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor alpha beta-expressing cells. *Science* **256**:1448-1452.

- Potworowski, E.F., C. Chamberland, C. Beauchemin, et N. Marceau. 1994. Up-regulation of a thymic epithelial ligand after contact with thymocytes. *Cell. Immunol.* **153**:256-261.
- Potworowski, E.F., et K.W. Pyke. 1985. Thymic microenvironmental factor: a possible chemoattractant for hemopoietic stem cells. *Thymus* **7**:345-356.
- Potworowski, E.F., F. Gagnon, C. Beauchemin, Y. St Pierre. 1996. Dendritic cells prevent radiation-induced thymic lymphoma. *Leukemia* **10**:1639-1647.
- Potworowski, E.F., et K.W. Pyke. 1985. Thymic microenvironmental factor: a possible chemoattractant for hemopoietic stem cells. *Thymus* **7**:345-356.
- Potworowski, E.F., F. Turcotte, C. Beauchemin, P. Hugo, et M.G. Zelechowska. 1986. Establishment and characterization of a thymic medullary epithelial cell clone. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **22**:557-560.
- Potworowski, E.F., L. Thibodeau, et M.G. Zelechowska. 1986. Specific adherence of thymocytes to a thymic medullary epithelial cell line. *Immunol. Lett.* **13**:89-94.
- Potworowski, E.F., P. Hugo, et C. Couture. 1989. Binding of cortical thymocytes to a medullary epithelial cell line: a brief review. *Thymus* **13**:237-243.
- Proschel, C., M.J. Blouin, N.J. Gutowski, R. Ludwig, et M. Noble. 1995. Limk1 is predominantly expressed in neural tissues and phosphorylates serine, threonine and tyrosine residues in vitro. *Oncogene* **11**:1271-1281.
- Quddus, J., A. Kaplan, et B.C. Richardson. 1994. Anti-CD11a prevents deletion of self-reactive T cells in neonatal C57BR mice. *Immunology* **82**:301-305.
- Rajewsky, K., H. Gu, R. Kuhn, U.A. Betz, W. Muller, J. Roes, et F. Schwenk. 1996. Conditional gene targeting. *J. Clin. Invest.* **98**:600-603.
- Ramsdell, F., M. Jenkins, Q. Dinh, et B.J. Fowlkes. 1991. The majority of CD4+8-thymocytes are functionally immature. *J. Immunol.* **147**:1779-1785.
- Raulet, D.H. 1999. Development and tolerance of natural killer cells. *Curr. Opin. Immunol.* **11**:129-134.
- Reiser, H., et E.E. Schneeberger. 1994. The costimulatory molecule B7 is expressed in the medullary region of the murine thymus. *Immunology* **81**:532-537.
- Revilla, C., A.L. Gonzalez, C. Conde, M. Lopez-Hoyos, et J. Merino. 1997. Treatment with anti-LFA-1 alpha monoclonal antibody selectively interferes with the maturation of CD4- 8+ thymocytes. *Immunology* **90**:550-556.

- Rocca, B., L.M. Spain, G. Ciabattoni, C. Patrono, et G.A. FitzGerald. 1999. Differential expression and regulation of cyclooxygenase isozymes in thymic stromal cells. *J. Immunol.* **162**:4589-4597.
- Ritter, M.A., et R.L. Boyd. 1993. Development in the thymus: it takes two to tango. *Immunol. Today* **14**:462-469.
- Romagnani, P., F. Annunziato, R. Manetti, C. Mavilia, L. Lasagni, C. Manuelli, G.B. Vannelli, V. Vanini, E. Maggi, C. Pupilli, et S. Romagnani. 1998. High CD30 ligand expression by epithelial cells and Hassal's corpuscles in the medulla of human thymus. *Blood* **91**:3323-3332.
- Ropke, C., P. Van Soest, P.P. Platenburg, et W. Van Ewijk. 1995. A common stem cell for murine cortical and medullary thymic epithelial cells? *Dev. Immunol.* **4**:149-156.
- Rosenstein, Y., J.K. Park, W.C. Hahn, F.S. Rosen, B.E. Bierer, et S.J. Burakoff. 1991. CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* **354**:233-235.
- Rosmaraki, E.E., I. Douagi, C. Roth, F. Colucci, A. Cumano, et J.P. Di Santo. 2001. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur. J. Immunol.* **31**:1900-1909.
- Roth, C., J.R. Carlyle, H. Takizawa, et D.H. Raulet. 2000. Clonal acquisition of inhibitory Ly49 receptors on developing NK cells is successively restricted and regulated by stromal class I MHC. *Immunity* **13**:143-153.
- Rouse, R.V., W. van Ewijk, P.P. Jones, et I.L. Weissman. 1979. Expression of MHC antigens by mouse thymic dendritic cells. *J. Immunol.* **122**:2508-2515.
- Ruppert, M., S. Aigner, M. Hubbe, H. Yagita, et P. Altevogt. 1995. The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. *J. Cell Biol.* **131**:1881-1891.
- Ryseck, R.P., P. Bull, M. Takamiya, V. Bours, U. Siebenlist, P. Dobrzanski, et R. Bravo. 1992. RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* **12**:674-684.
- Sainte-Marie, G., F.S. Peng, et D. Marcoux. 1986. The stroma of the thymus of the rat: morphology and antigen diffusion, a reconsideration. *Am. J. Anat.* **177**:333-352.
- Saint-Ruf, C., K. Ungewiss, M. Groettrup, L. Bruno, H.J. Fehling, et H. von Boehmer. 1994. Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* **266**:1208-1212.

- Sakata, T., S. Iwagami, Y. Tsuruta, M. Yamaguchi, M. Michishita, K. Nagata, Y. Takai, M. Ogata, H. Teraoka, et H. Fujiwara. 1992. Constitutive expression of leukemia inhibitory factor (LIF) mRNA and production of LIF by a cloned murine thymic stromal cell line. *Thymus* **19**:89-95
- Salter, R.D., R.J. Benjamin, P.K. Wesley, S.E. Buxton, T.P. Garrett, C. Clayberger, A.M. Krensky, A.M. Norment, D.R. Littman, et P. Parham. 1990. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature* **345**:41-46.
- Salomon, D.R., C.F. Mojcik, A.C. Chang, S. Wadsworth, D.H. Adams, J.E. Coligan, et E.M. Shevach. 1994. Constitutive activation of integrin alpha 4 beta 1 defines a unique stage of human thymocyte development. *J. Exp. Med.* **179**:1573-1584.
- Salomon, D.R., L. Crisa, C.F. Mojcik, J.K. Ishii, G. Klier, et E.M. Shevach. 1997. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development. **89**:2461-2471.
- Samlowski, W.E., B.A. Robertson, B.K. Draper, E. Prystas, J.R. et McGregor. 1991. Effects of supravital fluorochromes used to analyze the in vivo homing of murine lymphocytes on cellular function. *J. Immunol. Methods* **144**:101-115.
- Samms, M., D. Philp, F. Emanus, O. Osuji, M. Pezzano, et J.C. Guyden. 1999. Lysosomal-mediated degradation of apoptotic thymocytes within thymic nurse cells. *Cell. Immunol.* **197**:108-115.
- Sanders, D.S., D.M. Milne, et M.A. Kerr. 1990. The expression of Lewis(a) and Lewis(b) antigens reflects changes in fucosylation between normal and neoplastic cervical squamous epithelium. *J. Pathol.* **162**:23-28.
- Savill, J., V. Fadok, P. Henson, et C. Haslett. 1993. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today* **14**:131-136.
- Savino, W., D.M. Villa-Verde, et J. Lannes-Vieira. 1993. Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration and differentiation? *Immunol. Today* **14**:158-161.
- Savino, W., D.M. Villa-Verde, L.A. Alves, et M. Dardenne. 1998. Neuroendocrine control of the thymus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **840**:470-479.
- Savino, W., et M. Dardenne. 2000. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr. Rev.* **21**:412-443.
- Savino, W., P.C. Huang, A. Corrigan, S. Berrih, et M. Dardenne. 1984. Thymic hormone-containing cells. V. Immunohistological detection of metallothionein within the cells bearing thymulin (a zinc-containing hormone) in human and mouse thymuses. *J. Histochem. Cytochem.* **32**:942-946.

- Savino, W., S. Smaniotto, V. De Mello-Coelho, et M. Dardenne. 2000. Is there a role for growth hormone upon intrathymic T-cell migration? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **917**:748-754.
- Savin, W., S.R. Dalmau, et V.C. Dealmeida. 2000. Role of extracellular matrix-mediated interactions in thymocyte migration. *Dev. Immunol.* **7**:279-291.
- Sawada, M., J. Nagamine, K. Takeda, K. Utsumi, A. Kosugi, Y. Tatsumi, T. Hamaoka, K. Miyake, K. Nakajima, T. Watanabe, et al. 1992. Expression of VLA-4 on thymocytes. Maturation stage-associated transition and its correlation with their capacity to adhere to thymicstromal cells. *J. Immunol.* **149**:3517-3524.
- Schlegel, R.A., S. Kraehling, M.K. Callahan, et P. Williamson. 1999. CD14 is a component of multiple recognition systems used by macrophages to phagocytose apoptotic lymphocytes. *Cell Death Differ.* **6**:583-592.
- Schlegel, R.A., M.K. Callahan, et P. Williamson. 2000. The central role of phosphatidylserine in the phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **926**:217-225.
- Schleussner, C., et R. Ceredig. 1993. Analysis of intraepithelial lymphocytes from major histocompatibility complex (MHC)-deficient mice: no evidence for a role of MHC class II antigens in the positive selection of V delta 4+ gamma delta T cells. *Eur. J. Immunol.* **23**:1615-1622.
- Schluns, K.S., W.C. Kieper, S.C. Jameson, et L. Lefrancois. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat. Immunol.* **1**:426-432.
- Schreiber, L., Y. Sharabi, D. Schwartz, N. Goldfinger, C. Brodie, V. Rotter, et J. Shoham. 1996. Induction of apoptosis and p53 expression in immature thymocytes by direct interaction with thymic epithelial cells. *Scand. J. Immunol.* **44**:314-322.
- Schuler, W., I.J. Weiler, A. Schuler, R.A. Phillips, N. Rosenberg, T.W. Mak, J.F. Kearney, R.P. Perry, et M.J. Bosma. 1986. Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency. *Cell* **46**:963-972.
- Scollay, R., A. Wilson, et K. Shortman. 1984. Thymus cell migration: analysis of thymus emigrants with markers that distinguish medullary thymocytes from peripheral T cells. *J. Immunol.* **132**:1089-1094.
- Scollay, R., et D.I. Godfrey. 1995. Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips? *Immunol. Today* **16**:268-273; discussion 273-274.
- Scollay, R.G., E.C. Butcher, et I.L. Weissman. 1980. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur. J. Immunol.* **10**:210-218.

- Scollay, R. 1982. Thymus cell migration: cells migrating from thymus to peripheral lymphoid organs have a "mature" phenotype. *J. Immunol.* **128**:1566-1570.
- Scollay, R., W.F. Chen, et K. Shortman. 1984. The functional capabilities of cells leaving the thymus. *J. Immunol.* **132**:25-30.
- Sebzda, E., V.A. Wallace, J. Mayer, R.S. Yeung, T.W. Mak, et P.S. Ohashi. 1994. Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science* **263**:1615-1618.
- Seed, B., et A. Aruffo. 1987. Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**:3365-3369.
- Seki, S., Y. Habu, T. Kawamura, K. Takeda, H. Dobashi, T. Ohkawa, et H. Hiraide. 2000. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol. Rev.* **174**:35-46.
- Sellins, K.S., et J.J. Cohen. 1987. Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J. Immunol.* **139**:3199-3206.
- Sempowski, G.D., L.P. Hale, J.S. Sundy, J.M. Massey, R.A. Koup, D.C. Douek, D.D. Patel, et B.F. Haynes. 2000. Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. *J. Immunol.* **164**:2180-2187.
- Sentman, C.L., J.R. Shutter, D. Hockenbery, O. Kanagawa, et S.J. Korsmeyer. 1991. bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* **67**:879-888.
- Seong, R.H., J.W. Chamberlain, et J.R. Parnes. 1992. Signal for T-cell differentiation to a CD4 cell lineage is delivered by CD4 transmembrane region and/or cytoplasmic tail. *Nature* **356**:718-720.
- Sethi, S.K., A. Bianco, J.T. Allen, R.A. Knight, et M.A. Spiteri. 1997. Interferon-gamma (IFN-gamma) down-regulates the rhinovirus-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human airway epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* **110**:362-369.
- Sewell, W.A., M.H. Brown, J. Dunne, M.J. Owen, et M.J. Crumpton. 1986. Molecular cloning of the human T-lymphocyte surface CD2 (T11) antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**:8718-2872. Published erratum appears in *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987 Oct;**84**(20):7256.

- Sharon, N., et H. Lis. 1990. Legume lectins--a large family of homologous proteins. *FASEB J.* 4:3198-3208.
- Shaw, A.S., et M.L. Dustin. 1997. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 6:361-369.
- Sheehy, M.E., A.B. McDermott, S.N. Furlan, P. Klenerman, et D.F. Nixon. 2001. A novel technique for the fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis. *J. Immunol. Methods* 249:99-110.
- Shen, M.M., et P. Leder. 1992. Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:8240-8244.
- Shen, M.M., R.C. Skoda, R.D. Cardiff, J. Campos-Torres, P. Leder, et D.M. Ornitz. 1994. Expression of LIF in transgenic mice results in altered thymic epithelium and apparent interconversion of thymic and lymph node morphologies. *EMBO J.* 13:1375-1385.
- Shields, J.W. 2000. The functional evolution of GALT: a review. *Lymphology* 33:47-57.
- Shier, P., G. Otulakowski, K. Ngo, J. Panakos, E. Chourmouzis, L. Christjansen, C.Y. Lau, et W.P. Fung-Leung. 1996. Impaired immune responses toward alloantigens and tumor cells but normal thymic selection in mice deficient in the beta2 integrin leukocyte function-associated antigen-1. *J. Immunol.* 157:5375-5386.
- Shimamura, M., T. Ohteki, P. Launois, A.M. Garcia, et H.R. MacDonald. 1997. Thymus-independent generation of NK1+ T cells in vitro from fetal liver precursors. *J. Immunol.* 158:3682-3689.
- Shimizu, Y., G.A. Van Severter, K.J. Horgan, et S. Shaw. 1990. Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature* 345:250-253.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, K.P. Lam, E.M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, et A.M. Stall. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855-867.
- Shi, Y.F., R.P. Bissonnette, N. Parfrey, M. Szalay, R.T. Kubo, et D.R. Green. 1991. In vivo administration of monoclonal antibodies to the CD3 T cell receptor complex induces cell death (apoptosis) in immature thymocytes. *J. Immunol.* 146:3340-3346.
- Shi, Y.F., M.G. Szalay, L. Paskar, B.M. Sahai, M. Boyer, B. Singh, et D.R. Green. 1990. Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. Morphologic aspects and DNA fragmentation. *J. Immunol.* 144:3326-3333.

- Shores, E.W., W. Van Ewijk, et A. Singer. 1991. Disorganization and restoration of thymic medullary epithelial cells in T cell receptor-negative scid mice: evidence that receptor-bearing lymphocytes influence maturation of the thymic microenvironment. *Eur. J. Immunol.* **21**:1657-1661.
- Shortman, K., D. Vremec, A. D'Amico, F. Battye, et R. Boyd. 1989. Nature of the thymocytes associated with dendritic cells and macrophages in thymic rosettes. *Cell. Immunol.* **119**:85-100.
- Shortman, K., et L. Wu. 1996. Early T lymphocyte progenitors. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:29-47.
- Shortman, K., M. Egerton, G.J. Spangrude, et R. Scollay. 1990. The generation and fate of thymocytes. *Semin. Immunol.* **2**:3-12.
- Sikorski, E.E., R. Hallmann, E.L. Berg, et E.C. Butcher. 1993. The Peyer's patch high endothelial receptor for lymphocytes, the mucosal vascular addressin, is induced on a murine endothelial cell line by tumor necrosis factor-alpha and IL-1. *J. Immunol.* **151**:5239-5250.
- Singer, G.G., et A.K. Abbas. 1994. The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* **1**:365-371.
- Singer, K.H. 1990. Interactions between epithelial cells and T lymphocytes: role of adhesion molecules. *J. Leukoc. Biol.* **48**:367-374.
- Singer, K.H., L.S. Wolf, D.F. Lobach, S.M. Denning, D.T. Tuck, A.L. Robertson, et B.F. Haynes. 1986. Human thymocytes bind to autologous and allogeneic thymic epithelial cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**:6588-6592.
- Singer, K.H., S.M. Denning, L.P. Whichard, et B.F. Haynes. 1990. Thymocyte LFA-1 and thymic epithelial cell ICAM-1 molecules mediate binding of activated human thymocytes to thymic epithelial cells. *J. Immunol.* **144**:2931-2939.
- Sireci, G., E. Espinosa, C. Di Sano, F. Dieli, J.J. Fournie, et A. Salerno. 2001. Differential activation of human gammadelta cells by nonpeptide phosphoantigens. *Eur. J. Immunol.* **31**:1628-1635.
- Sligh, J.E., C.M. Ballantyne, S.S. Rich, H.K. Hawkins, C.W. Smith, A. Bradley, et A.L. Beaudet. 1993. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:8529-8533.
- Smiley, S.T., T.N. Stitt, et M.J. Grusby. 1997. Cross-linking of protein S bound to lymphocytes promotes aggregation and inhibits proliferation. *Cell. Immunol.* **181**:120-126.

- Smith, C.A., G.T. Williams, R. Kingston, E.J. Jenkinson, et J.J. Owen. 1989. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* **337**:181-184.
- ^aSmith, C.A., T. Davis, D. Anderson, L. Solam, M.P. Beckmann, R. Jerzy, S.K. Dower, D. Cosman, et R.G. Goodwin. 1990. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* **248**:1019-1023.
- ^bSmith, J.W., D.J. Vestal, S.V. Irwin, T.A. Burke, et D. Chersesh. 1990. Purification and functional characterization of integrin alpha v beta 5. An adhesion receptor for vitronectin. *J. Biol. Chem.* **265**:11008-11013.
- Smith, W.L., et D.L. Dewitt. 1996. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv. Immunol.* **62**:167-215.
- Soga, H., M. Nakamura, H. Yagi, S. Kayaba, T. Ishii, T. Gotoh, et T. Itoh. 1997. Heterogeneity of mouse thymic macrophages: I. Immunohistochemical analysis. *Arch. Histol. Cytol.* **60**:53-63.
- Soloski, M.J. 2001. Recognition of tumor cells by the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* **13**:154-162.
- Sonnenberg, A., C.J. Linders, J.H. Daams, et S.J. Kennel. 1990. The alpha 6 beta 1 (VLA-6) and alpha 6 beta 4 protein complexes: tissue distribution and biochemical properties. *J. Cell Sci.* **96**:207-217.
- Spangelo, B.L., D.D. Farrimond, M. Thapa, C.M. Bulathsinghala, K.L. Bowman, A. Sareh, F.M. Jr. Hughes, A.L. Goldstein, et M. Badamchian. 1998. Thymosin fraction 5 inhibits the proliferation of the rat neuroendocrine MMQ pituitary adenoma and C6 glioma cell lines in vitro. *Endocrinology* **139**:2155-2162.
- Spangrude, G.J., S. Heimfeld, et I.L. Weissman. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**:58-62. Published erratum appears in *Science* **244**:1030.
- Spits, H., B. Blom, A.C. Jaleco, K. Weijer, M.C. Verschuren, J.J. van Dongen, M.H. Heemskerk, et P.C. Res. 1998. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. *Immunol. Rev.* **165**:75-86.
- Sprent, J., D. Lo, E.K. Gao, et Y. Ron. 1988. T cell selection in the thymus. *Immunol. Rev.* **101**:173-190.
- Sprent, J., et S.R. Webb. 1995. Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **7**:196-205.

- Spring, F.A., S.F. Parsons, S. Ortlepp, M.L. Olsson, R. Sessions, R.L. Brady, et D.J. Anstee. 2001. Intercellular adhesion molecule-4 binds alpha(4)beta(1) and alpha(V)-family integrins through novel integrin-binding mechanisms. *Blood* **98**:458-466.
- Springer, T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**:301-314.
- Springer, T.A. 1995. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* **57**:827-872
- Stanley, J.B., R.M. Gorczynski, T.L. Delovitch, et G.B. Mills. 1989. IL-2 secretion is pertussis toxin sensitive in a T lymphocyte hybridoma. *J. Immunol.* **142**:3546-3552.
- Staunton, D.E., M.L. Dustin, et T.A. Springer. 1989. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* **339**:61-64.
- Staunton, D.E., M.L. Dustin, H.P. Erickson, et T.A. Springer. 1990. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* **61**:243-254. Published errata appear in *Cell* 1990 Jun 15;**61**(2):1157 and 1991 Sep 20;**66**(6):following 1311.
- Staunton, D.E., S.D. Marlin, C. Stratowa, M.L. Dustin, et T.A. Springer. 1988. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* **52**:925-933.
- Steeber, D.A., M.L. Tang, N.E. Green, X.Q. Zhang, J.E. Sloane, et T.F. Tedder. 1999. Leukocyte entry into sites of inflammation requires overlapping interactions between the L-selectin and ICAM-1 pathways. *J. Immunol.* **163**:2176-2186.
- Steggmaier, M., A. Levinovitz, S. Isenmann, E. Borges, M. Lenter, H.P. Kocher, B. Kleuser, et D. Vestweber. 1995. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* **373**:615-620.
- Steinmann G.G., B. Klaus, et H.K. Muller-Hermelink. 1985. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand. J. Immunol.* **22**:563-575.
- Stockinger, B., et B. Hausmann. 1994. Functional recognition of in vivo processed self antigen. *Int. Immunol.* **6**:247-254.
- Stoddart, J.H., R.R. Jasuja, M.A. Sikorski, U.H. von Andrian, et J.W. Mier. 1996. Protease-resistant L-selectin mutants. Down-modulation by cross-linking but not cellular activation. *J. Immunol.* **157**:5653-5659.
- St-Pierre, Y., P. Hugo, D. Legault, P. Tremblay, et E.F. Potworowski. 1996. Modulation of integrin-mediated intercellular adhesion during the interaction of thymocytes with stromal cells expressing VLA-4 and LFA-1 ligands. *Eur. J. Immunol.* **26**:2050-2055.

- Streilein, J.W. 1983. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J. Invest. Dermatol.* **80** Suppl:12s-16s.
- Stuber, E., M. Neurath, D. Calderhead, H.P. Fell, et W. Strober. 1995. Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells. *Immunity* **2**:507-521.
- Suda, T., R. Murray, C. Guidos, et A. Zlotnik. 1990. Growth-promoting activity of IL-1 alpha, IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in combination with IL-2, IL-4, or IL-7 on murine thymocytes. Differential effects on CD4/CD8 subsets and on CD3+/CD3-double-negative thymocytes. *J. Immunol.* **144**:3039-3045.
- Sugihara, A., M. Inaba, S.I. Mori, S. Taketani, Y. Adachi, H. Hisha, K. Inaba, J. Toki, T. Horio, M.E. Gershwin, et S. Ikehara. 2000. Differentiation from thymic B cell progenitors to mature B cells in vitro. *Immunobiology* **201**:515-526.
- Sun, L., A.S. Piltch, P.S. Liu, L.A. Johnson, et . Hayashi. 1990. Thymocytes stimulate metabolism of arachidonic acid in rat thymic epithelial cells. *Cell. Immunol.* **131**:86-97.
- ^aSurh, C.D., B. Ernst, et J. Sprent. 1992. Growth of epithelial cells in the thymic medulla is under the control of mature T cells. *J. Exp. Med.* **176**:611-616.
- Surh, C.D., et J. Sprent. 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* **372**:100-103.
- ^bSurh, C.D., E.K. Gao, H. Kosaka, D. Lo, C. Ahn, D.B. Murphy, L. Karlsson, P. Peterson, et J. Sprent. 1992. Two subsets of epithelial cells in the thymic medulla. *J. Exp. Med.* **176**:495-505.
- Surh, C.D., J. Sprent, et S.R. Webb. 1993. Exclusion of circulating T cells from the thymus does not apply in the neonatal period. *J. Exp. Med.* **177**:379-385.
- Suzuki, H., J.A. Punt, L.G. Granger, et A. Singer. 1995. Asymmetric signaling requirements for thymocyte commitment to the CD4+ versus CD8+ T cell lineages: a new perspective on thymic commitment and selection. *Immunity* **2**:413-425.
- Suzuki, H., T.I. Guintier, S. Koyasu, et A. Singer. 1998. Positive selection of CD4+ T cells by TCR-specific antibodies requires low valency TCR cross-linking: implications for repertoire selection in the thymus. *Eur. J. Immunol.* **28**:3252-3258.
- Swain, S.L., C.D. Surh, J. Sprent, et S.R. Webb. 1983. T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol. Rev.* **74**:129-142.

- Swiggard, W.J., A. Mirza, M.C. Nussenzweig, et R.M. Steinman. 1995. DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Cell. Immunol.* **165**:302-311.
- Takahashi, T., M. Tanaka, C.I. Brannan, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, T. Suda, et S. Nagata. 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**:969-976.
- Takata, S., O. Ohtani, et Y. Watanabe. 2000. Lectin binding patterns in rat nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and the influence of various types of lectin on particle uptake in NALT. *Arch. Histol. Cytol.* **63**:305-312.
- Tamatani, T., M. Kotani, et M. Miyasaka. 1991. Characterization of the rat leukocyte integrin, CD11/CD18, by the use of LFA-1 subunit-specific monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* **21**:627-633.
- Tanaka, Y., M.B. Brenner, B.R. Bloom, et C.T. Morita. 1996. Recognition of nonpeptide antigens by T cells. *J. Mol. Med.* **74**:223-231.
- Tangemann, K., M.D. Gunn, P. Gibling, et S.D. Rosen. 1998. A high endothelial cell-derived chemokine induces rapid, efficient, and subset-selective arrest of rolling T lymphocytes on a reconstituted endothelial substrate. *J. Immunol.* **161**:6330-6337.
- Tang, M.L., L.P. Hale, D.A. Steeber, et T.F. Tedder. 1997. L-selectin is involved in lymphocyte migration to sites of inflammation in the skin: delayed rejection of allografts in L-selectin-deficient mice. *J. Immunol.* **158**:5191-5199.
- Tatosyan, A.G., et O.A. Mizenina. 2000. Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc)* **65**:49-58.
- Tatsumi, Y., D. Deluca, R.Q. Cron, et J.A. Bluestone. 1994-95. Differential effects of T cell receptor ligation of TCR gamma delta thymocyte development in fetal thymic organ culture. *Thymus* **23**:131-153.
- Teh, H.S., B. Motyka, et S.J. The. 1997. Influence of the affinity of selecting ligands on T cell positive and negative selection and the functional maturity of the positively selected T cells. *Crit. Rev. Immunol.* **17**:399-410.
- Teh, S.J., N. Killeen, A. Tarakhovsky, D.R. Littman, et H.S. Teh. 1997. CD2 regulates the positive selection and function of antigen-specific CD4- CD8+ T cells. *Blood* **89**:1308-1318.

- Terrence, K., C.P. Pavlovich, E.O. Matechak, et B.J. Fowlkes. 2000. Premature expression of T cell receptor (TCR)alpha beta suppresses TCRgamma delta gene rearrangement but permits development of gamma delta lineage T cells. *J. Exp. Med.* **192**:537-548.
- Teyton, L., V. Apostolopoulos, C. Cantu 3rd, H. Celia, V. Mallet-Designe, R. Stefanko, T. Stramann, et M. Wallace. 2000. Function and dysfunction of T cell receptor: structural studies. *Immunol. Res.* **21**:325-330.
- Thoman, M.L. 1995. The pattern of T lymphocyte differentiation is altered during thymic involution. *Mech. Ageing. Dev.* **82**:155-170.
- Thoman, M.L. 1997. Early steps in T cell development are affected by aging. *Cell. Immunol.* **178**:117-123.
- Thomas, K.R., et M.R. Capecchi. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**:503-512.
- Throsby, M., A. Herbelin, J.M. Pleau, et M. Dardenne. 2000. CD11c⁺ eosinophils in the murine thymus: developmental regulation and recruitment upon MHC class I-restricted thymocyte deletion. *J. Immunol.* **165**:1965-1975.
- ^aTian, L., H. Nyman, P. Kilgannon, Y. Yoshihara, K. Mori, L.C. Andersson, S. Kaukinen, H. Rauvala, W.M. Gallatin, et C.G. Gahmberg. 2000. Intercellular adhesion molecule-5 induces dendritic outgrowth by homophilic adhesion. *J. Cell. Biol.* **150**:243-252.
- ^bTian, L., P. Kilgannon, Y. Yoshihara, K. Mori, W.M. Gallatin, O. Carpen, et C.G. Gahmberg. 2000. Binding of T lymphocytes to hippocampal neurons through ICAM-5 (telencephalin) and characterization of its interaction with the leukocyte integrin CD11a/CD18. *Eur. J. Immunol.* **30**:810-818.
- Tian, L., Y. Yoshihara, T. Mizuno, K. Mori, et C.G. Gahmberg. 1997. The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. *J. Immunol.* **158**:928-936.
- Tian, T., J. Zhang, L. Gao, X.P. Qian, et W.F. Chen. 2001. Heterogeneity within medullary-type TCRalpha beta(+)CD3(+)CD4(-)CD8(+) thymocytes in normal mouse thymus. *Int. Immunol.* **13**:313-320.
- Tijerina, M., W.C. Gorospe, K.L. Bowman, M. Badamchian, A.L. Goldstein, et B.L. Spangelo. 1997. A novel thymosin peptide stimulates interleukin-6 release from rat C6 glioma cells in vitro. *Neuroimmunomodulation* **4**:163-170.

- Tomonari, K., S. Fairchild, O.A. Rosenwasser, P.J. Robinson, A.M. Knight, et P.J. Dyson. 1992. Endogenous ligands selecting T cells expressing particular V beta elements. *Int. Rev. Immunol.* **8**:289-309.
- Tough, D.F., et J. Sprent. 1994. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J. Exp. Med.* **179**:1127-1135.
- Touma, M., K.J. Mori, et M. Hosono. 2000. Failure to remove autoreactive Vbeta6+ T cells in Mls-1 newborn mice attributed to the delayed development of B cells in the thymus. *Immunology* **100**:424-431.
- Toyooka, K., X.G. Tai, C.S. Park, Y. Yashiro, T. Hamaoka, et H. Fujiwara. 1998. A caspase inhibitor protects thymocytes from diverse signal-mediated apoptosis but not from clonal deletion in fetal thymus organ culture. *Immunol. Lett.* **63**:83-89.
- Tschernig, T., et R. Pabst. 2000. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is not present in the normal adult lung but in different diseases. *Pathobiology* **68**:1-8.
- Tucek, C.L., D.I. Godfrey, et R.L. Boyd. 1992. Five novel antigens illustrate shared phenotype between mouse thymic stromal cells, thymocytes, and peripheral lymphocytes. *Int. Immunol.* **4**:1021-1030.
- Uemura, K., Y. Yokota, Y. Kozutsumi, et T. Kawasaki. 1996. A unique CD45 glycoform recognized by the serum mannan-binding protein in immature thymocytes. *J. Biol. Chem.* **271**:4581-4584.
- Ushikubi, F., Y. Aiba, K. Nakamura, T. Namba, M. Hirata, O. Mazda, Y. Katsura, et S. Narumiya. 1993. Thromboxane A2 receptor is highly expressed in mouse immature thymocytes and mediates DNA fragmentation and apoptosis. *J. Exp. Med.* **178**:1825-1830.
- Utsumi, K., M. Sawada, S. Narumiya, J. Nagamine, T. Sakata, S. Iwagami, Y. Kita, H. Teraoka, H. Hirano, et M. Ogata. 1991. Adhesion of immature thymocytes to thymic stromal cells through fibronectin molecules and its significance for the induction of thymocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**:5685-5689.
- Vacchio, M.S., et J.D. Ashwell. 2000. Glucocorticoids and thymocyte development. *Semin. Immunol.* **12**:475-485.
- Vacchio, M.S., J.D. Ashwell, et L.B. King. 1998. A positive role for thymus-derived steroids in formation of the T-cell repertoire. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **840**:317-327.
- van Den Engel, N.K., E. Heidenthal, A. Vinke, H. Kolb, et S. Martin. 2000. Circulating forms of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in mice lacking membranous ICAM-1. *Blood* **95**:1350-1355.

- Van der Vieren, M., H. Le Trong, C.L. Wood, P.F. Moore, T. St John, D.E. Staunton, et W.M. Gallatin. 1995. A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity* 3:683-690.
- van Ewijk, W., G. Hollander, C. Terhorst, et B.Wang. 2000. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development* 127:1583-1591.
- van Meerwijk, J.P., et R.N. Germain. 1993. Development of mature CD8+ thymocytes: selection rather than instruction? *Science* 261:911-915.
- Van Vliet, E., M. Melis, et W. Van Ewijk. 1984. Monoclonal antibodies to stromal cell types of the mouse thymus. *Eur. J. Immunol.* 14:524-529.
- Varas, A., A. Vicente, R. Sacedon, et A.G. Zapata. 1998. Interleukin-7 influences the development of thymic dendritic cells. *Blood* 92:93-100.
- Vaux, D.L. 1993. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:786-789.
- Veis, D.J., C.M. Sorenson, J.R. Shutter, et S.J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75:229-240.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, et C. Reutelingsperger. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184:39-51.
- Vernachio, J., M. Li, A.D. Donnenberg, et M.J. Soloski. 1989. Qa-2 expression in the adult murine thymus. A unique marker for a mature thymic subset. *J. Immunol.* 142:48-56.
- Vespa, G.N., L.A. Lewis, K.R. Kozak, M. Moran, J.T. Nguyen, L.G. Baum, et M.C. Miceli. 1999. Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.* 162:799-806.
- Viamontes, G.I., T. Audhya, et G. Goldstein. 1986. Immunohistochemical localization of thymopoietin with an antiserum to synthetic Cys-thymopoietin28-39. *Cell. Immunol.* 100:305-313.
- Vicari, A.P., D.J. Figueroa, J.A. Hedrick, J.S. Foster, K.P. Singh, S. Menon, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, K.B. Bacon, et A. Zlotnik. 1997. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 7:291-301.

- Vicente, A., A. Varas, L. Alonso, M. Gomez de Moral, et A.G. Zapata. 1994. Ontogeny of rat thymic dendritic cells. *Immunology* **82**:75-81.
- Villa-Verde, D.M., J.M. Lagrota-Candido, M.A. Vannier-Santos, R. Chammas, R.R. Brentani, et W. Savino. 1994. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment. IV. Modulation of thymic nurse cells by extracellular matrix ligands and receptors. *Eur. J. Immunol.* **24**:659-664.
- Villa-Verde, D.M., T.C. Calado, J.S. Ocampo, E. Silva-Monteiro, et W. Savino. 1999. The conveyor belt hypothesis for thymocyte migration: participation of adhesion and de-adhesion molecules. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**:569-572.
- Virtanen, I. J. Lohi, T. Tani, H. Sariola, R.E. Burgeson, et V.P. Lehto. 1996. Laminin chains in the basement membranes of human thymus. *Histochem. J.* **28**:643-650.
- Viselli, S.M., N.J. Olsen, K. Shults, G. Steizer, et W.J. Kovacs. 1995. Immunochemical and flow cytometric analysis of androgen receptor expression in thymocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **109**:19-26.
- Vivinus-Nebot, M., M. Ticchioni, F. Mary, P. Hofman, V. Quaranta, P. Rousselle, et A. Bernard. 1999. Laminin 5 in the human thymus: control of T cell proliferation via alpha6beta4 integrins. *J. Cell Biol.* **144**:563-574.
- Volkman, A., T. Zal, B. et Stockinger. 1997. Antigen-presenting cells in the thymus that can negatively select MHC class II-restricted T cells recognizing a circulating self antigen. *J. Immunol.* **158**:693-706.
- Vollger, L.W., D.T. Tuck, T.A. Springer, B.F. Haynes, et K.H. Singer. 1987. Thymocyte binding to human thymic epithelial cells is inhibited by monoclonal antibodies to CD-2 and LFA-3 antigens. *J. Immunol.* **138**:358-363.
- von Boehmer, H., et K. Schubiger. 1984. Thymocytes appear to ignore class I major histocompatibility complex antigens expressed on thymus epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* **14**:1048-1052.
- von Boehmer, H., et P. Kisielow. 1993. Lymphocyte lineage commitment: instruction versus selection. *Cell* **73**:207-208.
- von Freeden-Jeffry, U., P. Vieira, L.A. Lucian, T. McNeil, S.E. Burdach, et R. Murray. 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* **181**:1519-15126.
- von Freeden-Jeffry, U., N. Solvason, M. Howard, et R. Murray. 1997. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* **7**:147-154.

- Von Gaudecker, B., M.D. Kendall, et M.A. Ritter. 1997. Immuno-electron microscopy of the thymic epithelial microenvironment. *Microsc. Res. Tech.* **38**:237-249.
- Vremec, D., et K. Shortman. 1997. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J. Immunol.* **159**:565-573.
- Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D.J. Saunders, C.F. Ardavin, L. Wu, et K. Shortman. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **176**:47-58.
- Wada, K., T. Kina, H. Kawamoto, M. Kondo, et Y. Katsura. 1996. Requirement of cell interactions through adhesion molecules in the early phase of T cell development. *Cell. Immunol.* **170**:11-19.
- Wadsworth, S., M.J. Halvorson, et J.E. Coligan. 1992. Developmentally regulated expression of the beta 4 integrin on immature mouse thymocytes. *J. Immunol.* **149**:421-428.
- Wang, B., C. Biron, J. She, K. Higgins, M.J. Sunshine, E. Lacy, N. Lonberg, et C. Terhorst. 1994. A block in both early T lymphocyte and natural killer cell development in transgenic mice with high-copy numbers of the human CD3E gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**:9402-9406.
- Wang, J., et T.A. Springer. 1998. Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol. Rev.* **163**:197-215.
- Wang, J.Y., D.J. Wigston, H.D. Rees, A.I. Levey, et D.L. Falls. 2000. LIM kinase 1 accumulates in presynaptic terminals during synapse maturation. *J. Comp. Neurol.* **416**:319-334.
- Wardlaw, A.J., M.L. Hibbs, S.A. Stacker, et T.A. Springer. 1990. Distinct mutations in two patients with leukocyte adhesion deficiency and their functional correlates. *J. Exp. Med.* **172**:335-345.
- Warnock, R.A., S. Askari, E.C. Butcher, et U.H. von Andrian. 1998. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J. Exp. Med.* **187**:205-216.
- Watanabe-Fukunaga, R., C.I. Brannan, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, et S. Nagata. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**:314-317.

- Watanabe-Fukunaga, R., C.I. Brannan, N. Itoh, S. Yonehara, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, et S. Nagata. 1992. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J. Immunol.* **148**:1274-1279.
- Watanabe, Y., J. Gytoku, et Y. Katsura. 1989. Analysis of the development of T cells by transferring precursors into cultured fetal thymus with a microinjector. *Thymus* **13**:57-71.
- Waterhouse, P., L.E. Marengere, H.W. Mittrucker, et T.W. Mak. 1996. CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunol. Rev.* **153**:183-207.
- Waterhouse, P., M.F. Bachmann, J.M. Penninger, P.S. Ohashi, et T.W. Mak. 1997. Normal thymic selection, normal viability and decreased lymphoproliferation in T cell receptor-transgenic CTLA-4-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* **27**:1887-1892.
- Weaver, A.M., A.V. Karginov, A.W. Kinley, S.A. Weed, Y. Li, J.T. Parsons, et J.A. Cooper. 2001. Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr. Biol.* **11**:370-374.
- Weil, R., et A. Veillette. 1996. Signal transduction by the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **205**:63-87.
- Weissman, I.L. 1967. Thymus cell migration. *J. Exp. Med.* **126**:291-304.
- Wekerle, H., U.P. Ketelsen, et M. Ernst. 1980. Thymic nurse cells. Lymphoepithelial cell complexes in murine thymuses: morphological and serological characterization. *J. Exp. Med.* **151**:925-944.
- Weston, S.A., et C.R. Parish. 1990. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J. Immunol. Methods* **133**:87-97.
- Weston, S.A., et C.R. Parish. 1992. Evidence that mannose recognition by splenic sinusoidal cells plays a role in the splenic entry of lymphocytes. *Eur J Immunol* **22**:1975-1981.
- Wildin, R.S., A.M. Garvin, S. Pawar, D.B. Lewis, K.M. Abraham, K.A. Forbush, S.F. Ziegler, J.M. Allen, et R.M. Perlmutter. 1991. Developmental regulation of lck gene expression in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **173**:383-393.
- Wilkinson, B., J.J. Owen, et E.J. Jenkinson. 1999. Factors regulating stem cell recruitment to the fetal thymus. *J. Immunol.* **162**:3873-3881.
- Williams, N.S., A. Kubota, M. Bennett, V. Kumar, et F. Takei. 2000. Clonal analysis of NK cell development from bone marrow progenitors in vitro: orderly acquisition of receptor gene expression. *Eur. J. Immunol.* **30**:2074-2082.

- ^aWilliams, N.S., J. Klem, I.J. Puzanov, P.V. Sivakumar, J.D. Schatzle, M. Bennett, et V. Kumar. 1998. Natural killer cell differentiation: insights from knockout and transgenic mouse models and in vitro systems. *Immunol. Rev.* **165**:47-61.
- ^bWilliams, O., R. Tarazona, A. Wack, N. Harker, K. Roderick, et D. Kioussis. 1998. Interactions with multiple peptide ligands determine the fate of developing thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:5706-5711.
- Wilson, A., M. Capone, et H.R. MacDonald. 1999. Unexpectedly late expression of intracellular CD3epsilon and TCR gamma delta proteins during adult thymus development. *Int. Immunol.* **11**:1641-1650.
- Winkel, K., F. Sotzik, D. Vremec, P.U. Cameron, et K. Shortman. 1994. CD4 and CD8 expression by human and mouse thymic dendritic cells. *Immunol. Lett.* **40**:93-99.
- Witmer-Pack, M.D., W.J. Swiggard, A. Mirza, K. Inaba, et R.M. Steinman. 1995. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Cell. Immunol.* **163**:157-162.
- Wu, L., et A. D'Amico. 1994. Functional analysis of Mel-14+ and Mel-14- early precursor cells in the adult mouse thymus. *Immunol. Lett.* **40**:89-92.
- Wu, L., D. Vremec, C. Ardavin, K. Winkel, G. Suss, H. Georgiou, E. Maraskovsky, W. Cook, et K. Shortman. 1995. Mouse thymus dendritic cells: kinetics of development and changes in surface markers during maturation. *Eur. J. Immunol.* **25**:418-425.
- Xu, H., J.A. Gonzalo, Y. St Pierre, I.R. Williams, T.S. Kupper, R.S. Cotran, T.A. Springer, et J.C. Gutierrez-Ramos. 1994. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J. Exp. Med.* **180**:95-109.
- Yagi, H., M. Matsumoto, M. Nakamura, S. Makino, R. Suzuki, M. Harada, et T. Itoh. 1996. Defect of thymocyte emigration in a T cell deficiency strain (CTS) of the mouse. *J. Immunol.* **157**:3412-3419.
- Yagi, H., R. Kamba, K. Chiba, H. Soga, K. Yaguchi, M. Nakamura, et T. Itoh. 2000. Immunosuppressant FTY720 inhibits thymocyte emigration. *Eur. J. Immunol.* **30**:1435-1444.
- Yamashita, I., T. Nagata, T. Tada, et T. Nakayama. 1993. CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection. *Int. Immunol.* **5**:1139-1150.

- Yamashita, K., K. Taketa, S. Nishi, K. Fukushima, et T. Ohkura. 1993. Sugar chains of human cord serum alpha-fetoprotein: characteristics of N-linked sugar chains of glycoproteins produced in human liver and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* **53**:2970-2975.
- Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C.N. Kim, A.M. Ibrado, J. Cai, T.I. Peng, D.P. Jones, et X. Wang. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**:1129-1132.
- Yang, N., O. Higuchi, K. Ohashi, K. Nagata, A. Wada, K. Kangawa, E. Nishida, K. Mizuno. 1998. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**:809-812.
- Yap, A.S., W.M. Briehner, M. Pruschy, et B.M. Gumbiner. 1997. Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr. Biol.* **7**:308-315.
- Yasutomo, K., B. Lucas, et R.N. Germain. 2000. TCR signaling for initiation and completion of thymocyte positive selection has distinct requirements for ligand quality and presenting cell type. *J. Immunol.* **165**:3015-3022.
- Yoshino, T., M. Okano, H.L. Chen, J. Tsuchiyama, E. Kondo, R. Nishiuchi, N. Teramoto, K. Nishizaki, et T. Akagi. 1999. Cutaneous lymphocyte antigen is expressed on memory/effector B cells in the peripheral blood and monocytoid B cells in the lymphoid tissues. *Cell. Immunol.* **197**:39-45.
- Young, H.A., D.M. Klinman, D.A. Reynolds, K.J. Grzegorzewski, A. Nii, J.M. Ward, R.T. Winkler-Pickett, J.R. Ortaldo, J.J. Kenny, et K.L. Komschlies. 1997. Bone marrow and thymus expression of interferon-gamma results in severe B-cell lineage reduction, T-cell lineage alterations, and hematopoietic progenitor deficiencies. *Blood* **89**:583-595.
- Yu, X., S. Fournier, J.P. Allison, A.H. Sharpe, et R.J. Hodes. 2000. The role of B7 costimulation in CD4/CD8 T cell homeostasis. *J. Immunol.* **164**:3543-3553.
- Zerfaoui, M., M. Fukuda, V. Sbarra, D. Lombardo, et A. El-Battari. 2000. alpha(1,2)-fucosylation prevents sialyl Lewis x expression and E-selectin-mediated adhesion of fucosyltransferase VII-transfected cells. *Eur. J. Biochem.* **267**:53-61.
- Zhang, W., et L.E. Samelson. 2000. The role of membrane-associated adaptors in T cell receptor signalling. *Semin. Immunol.* **12**:35-41.
- Zhao, T., C. He, M. Su, C.A. West, S.J. Swanson, A.J. Young, et S.J. Mentzer. 2001. Cell adhesion molecule expression in the sheep thymus. *Dev. Comp. Immunol.* **25**:519-530.
- Zheng, L.M., A. Zychlinsky, C.C. Liu, D.M. Ojcius, et J.D. Young. 1991. Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J. Cell. Biol.* **112**:279-288.

- Zhou, T., H. Bluethmann, J. Eldridge, M. Brockhaus, K. Berry, et J.D. Mountz. 1991. Abnormal thymocyte development and production of autoreactive T cells in T cell receptor transgenic autoimmune mice. *J. Immunol.* **147**:466-474.
- Zijlstra, M., M. Bix, N.E. Simister, J.M. Loring, D.H. Raulet, et R. Jaenisch. 1990. Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8⁺ cytolytic T cells. *Nature* **344**:742-746.
- Zlotnik, A., et T.A. Moore. 1995. Cytokine production and requirements during T-cell development. *Curr. Opin. Immunol.* **7**:206-213.
- Zlotnik, A., J. Morales, et J.A. Hedrick. 1999. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit. Rev. Immunol.* **19**:1-47.
- Zuniga-Pflucker, J.C., et M.J. Lenardo. 1996. Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Curr. Opin. Immunol.* **8**:215-224.
- Zuniga-Pflucker, J.C., H.L. Schwartz, et M.J. Lenardo. 1993. Gene transcription in differentiating immature T cell receptor(neg) thymocytes resembles antigen-activated mature T cells. *J. Exp. Med.* **178**:1139-1149.

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de recherche, le docteur Edouard F. Potworowski d'avoir accepté la direction de mes études doctorales. L'expérience a été enrichissante.

Je tiens aussi à remercier le docteur Yves St-Pierre, mon co-directeur, pour les diverses discussions, pour son encouragement, et surtout pour son esprit très humain.

J'aimerais remercier mon amie et la technicienne du laboratoire, Claire Beauchemin, de m'avoir initiée à plusieurs techniques qui ont été critiques pour le cheminement de mon doctorat. Je lui suis surtout reconnaissante pour son encouragement lors de moments difficiles et pour son sourire journalier.

J'aimerais également remercier Marcel Desrosiers pour ses conseils par rapport à la cytométrie de flux, les membres du laboratoire du docteur Yves St-Pierre pour leur amitié, notamment le docteur Pierre Tremblay, Anna-Karine Bélizaire, Doris Legault, Benoît Ochietti, Benoît Champagne, Pierre-Olivier Estève, Manon Girard, et Eric Chicoine. J'aimerais aussi remercier Frédéric Chano et le docteur Mikhail Popkov pour leur amitié et pour les discussions fort intéressantes. De plus, j'aimerais souligner ma gratitude envers Anick Chalifour, avec qui j'ai partagé les hauts et les bas de mon doctorat. Ton amitié a été précieuse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers les docteurs Suzanne Duquette et Michel Fournier pour avoir lu la thèse.

Je remercie de tout cœur mes parents, Emilia et Mario pour leur support constant et inconditionnel et pour leur énorme patience. Sans vous je n'aurais jamais pu me rendre à ce point. Je remercie également mon frère Gabriele et ma belle-soeur Christina, ainsi que mon époux, Pino, pour la confiance qu'ils ont toujours eue envers moi.

Enfin, je remercie la Fondation Armand-Frappier pour le soutien financier, qui m'a permis de poursuivre ces études.

ANNEXE I

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

1. **Graziano, M., St-Pierre, Y., and Potworowski, E.F.** 2001. UEA-I-binding to thymic medullary epithelial cells selectively reduces numbers of cortical TCR $\alpha\beta$ ⁺ thymocytes in FTOCs. *Immunology Letters*. 77 :143-150.
2. **Graziano, M., St-Pierre, Y., Beauchemin, C., Desrosiers, M., and Potworowski, E.F.** 1998. The Fate of Thymocytes Labeled *in Vivo* with CFSE. *Experimental Cell research*. 240:75-85.
3. **Graziano, M., Moisan, S., Demers, M., Potworowski, E.F., et St-Pierre, Y.** Protracted development and emigration of thymocytes in ICAM-1-deficient mice: cellular evidence and genomic analysis. (soumis).
4. **Graziano, M., St-Pierre, Y., and Potworowski, E.F.** UEA-I+ Thymic Medullary Epithelium Blockage Reduces the Rate of Cortical Thymocyte Proliferation. (en préparation).

COMMUNICATION

Graziano, M., St-Pierre, Y., Beauchemin, C., Desrosiers, M., and Potworowski, E.F. 1998. In situ labelling of thymocytes with CFSE for long-term migration analyses. Canadian Society for Immunology. Sainte-Adèle, Quebec.

ANNEXE II
TIRÉS À PART DES ARTICLES