



HAL
open science

Sélection centrale, survie et sélection périphérique des lymphocytes T ab CD8+

Nicolas Legrand

► **To cite this version:**

Nicolas Legrand. Sélection centrale, survie et sélection périphérique des lymphocytes T ab CD8+. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2002. Français. NNT : . tel-00001512

HAL Id: tel-00001512

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00001512>

Submitted on 3 Sep 2002

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat de l'Université Pierre & Marie Curie – Paris VI
Spécialité : Immunologie

Présentée par :

Nicolas LEGRAND

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris VI

Sujet de la thèse :

Sélection centrale, survie et sélection périphérique des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺

Soutenue le 16 septembre 2002 devant un jury composé de :

Monsieur Pierre-André CAZENAVE

Président

Madame Anne-Marie SCHMITT-VERHULST

Rapporteur

Monsieur Philippe NAQUET

Rapporteur

Monsieur Rhodri CEREDIG

Examineur

Monsieur Antonio FREITAS

Directeur de thèse

La thèse est un exercice long et délicat, en venir à bout seul semble impossible ! Je voudrais donc sur quelques lignes remercier tous ceux qui m'ont accompagné durant ces 4 dernières années.

Je tiens en premier lieu à exprimer mes plus sincères remerciements aux membres du jury pour avoir accepté d'y participer, parfois au péril d'un agenda extrêmement chargé. Je remercie P-A. Cazenave de présider le jury lors de ma soutenance de thèse, ainsi que A-M. Schmitt-Verhulst et P. Naquet pour avoir accepté d'analyser mon travail en tant que rapporteurs. Enfin, je remercie R. Ceredig pour sa participation au jury en tant qu'examineur.

Merci Antonio, tout d'abord pour l'encadrement de ma thèse, mais aussi pour l'ensemble des qualités humaines qui ont fait de l'UBPL l'endroit le plus agréable pour travailler.

Mes remerciements vont bien entendu aux membres et stagiaires de l'unité, pour l'excellente ambiance générale : Angela, Fabien, Manuela, Marie-Pierre, Maud, Patricia, Camille, mon cousin Pol, José, Emmanuelle, Sylvie, Vanessa, Ninog, Jaime, et l'équipe de Paolo Truffa-Bacchi. J'adresse une mention spéciale à Alix, pour la relecture du manuscrit et ses impertinentes corrections. Pensée spéciale aussi pour Laurent, qui aura défriché le chemin avant moi malgré tous ses efforts pour y échapper ! Many thanks to you, Afonso, for your daily assistance in the lab, but also for all the things outside the lab ! (sorry, I switched again, as usual) Merci tout particulièrement à Marie-Christine, pour son efficacité redoutable au quotidien. J'adresse également mes remerciements à mon tuteur de thèse, Yves Rivière. Enfin, je tiens à remercier l'ensemble du personnel des salles de préparation qui facilitent le travail de paillasse, de manière discrète mais néanmoins indispensable.

J'ai évidemment beaucoup de remerciements à adresser à tous ceux qui ont un jour ou l'autre croisé mon chemin, que ce soit sur le campus de l'Institut ou non. J'adresse enfin un clin d'oeil complice à mes petits camarades des associations de doctorants parisiennes et nationales, dont les activités débordantes auront été plus qu'enrichissantes.

Je n'aurais pas pu mener cette thèse jusqu'au bout sans le soutien de ceux qui me sont les plus proches. J'adresse donc mes derniers (et forcément les meilleurs) remerciements à mes parents, à mon frère Olivier et à Mireille.

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	3
RÉSUMÉ	7
LISTE DES FIGURES ET TABLES	8
LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
INTRODUCTION	11
I. LE DÉVELOPPEMENT PRÉCOCE DES CELLULES T	13
A. A l'origine : de la cellule souche au précurseur des cellules T	13
1) La cellule souche hématopoïétique	13
a) Caractéristiques principales	13
b) L'apparition des premières CSH dans l'embryon	13
2) Vers le progéniteur des cellules T	14
a) Le progéniteur commun de la lignée lymphoïde	15
b) L'entrée dans le thymus force l'engagement dans la lignée T	16
c) ... mais l'engagement dans la lignée T peut avoir lieu avant l'entrée dans le thymus	16
d) Événements de signalisation décisifs pour l'engagement dans la lignée T	17
i- Facteurs de transcription	17
ii- Le cas de Notch-1	18
iii- La signalisation par les récepteurs IL-7R α/γ_c et c-kit	19
3) Colonisation du thymus	21
a) Colonisations successives du thymus au cours du développement	21
b) Molécules impliquées dans la colonisation	21
i- Les intégrines	22
ii- La molécule CD44	23
iii- Les chémokines et leurs récepteurs	23
B. Le thymus	24
1) Organisation du thymus	25
a) Généralités	25
b) Quelques mots sur les cellules épithéliales thymiques	25
2) Vue « géographique » du développement des thymocytes	26
a) Migration des thymocytes dans le thymus	26
b) Molécules impliquées dans les mouvements intrathymiques	27
i- Les chémokines et leurs récepteurs	27
ii- Les intégrines	28
3) Concept de niche	28
II. LA SÉLECTION THYMIQUE DES LYMPHOCYTES T $\alpha\beta$	30
A. Étapes du développement	30
1) La population triple-négative	30

a)	Analyse des marqueurs CD44 et CD25	31
b)	Quelques mécanismes impliqués dans le développement des thymocytes TN	32
i-	Les récepteurs IL-7R α/γ_c et c-kit	32
ii-	La chaîne pT α et la β -sélection	33
iii-	La famille bHLH	34
2)	La population double-positive	35
a)	Généralités	35
b)	Quelques molécules impliquées dans la différenciation vers le stade DP	36
3)	Les populations simple-positives	37
B.	Le récepteur des cellules T (TCR).....	38
1)	La construction du TCR $\alpha\beta$	38
a)	L'organisation des gènes du TCR $\alpha\beta$	38
i-	Locus TCR α/δ	39
ii-	Locus TCR β	39
b)	La machinerie de réarrangement des gènes du TCR $\alpha\beta$	40
i-	Le mécanisme du réarrangement V(D)J.....	40
ii-	Excision ou inversion d'ADN	41
iii-	Expression des enzymes RAG et réarrangements secondaires.....	41
iv-	Génération de diversité supplémentaire	43
2)	L'exclusion allélique.....	44
a)	Exclusion allélique de la chaîne TCR β	44
b)	Inclusion allélique de la chaîne TCR α	45
c)	Cas des souris transgéniques pour les chaînes α et/ou β du TCR	46
3)	Le complexe TCR-CD3 et son ligand	46
a)	Les molécules CD3	46
b)	Les co-récepteurs CD4 et CD8	47
c)	Le ligand du TCR $\alpha\beta$: le complexe pAg-CMH	48
i-	Les molécules du CMH	48
ii-	La présentation des peptides sur les molécules du CMH	49
iii-	La restriction des cellules T aux molécules du CMH	50
C.	La sélection thymique.....	51
1)	Sélection positive et sélection négative	51
a)	Mise en évidence des deux types de sélection	51
b)	Sélection et peptides du complexe pAg-CMH	52
c)	Induction de tolérance par délétion et par anergie	53
2)	Modèle qualitatif et modèle quantitatif.....	54
a)	Modèle qualitatif du peptide.....	54
b)	Modèle quantitatif de l'avidité	55
c)	Sélection des thymocytes : « not by TCR alone »	56
3)	Epithélium thymique et cellules dérivées de la moelle osseuse.....	56
a)	Rôles respectifs durant la sélection positive.....	57
b)	Rôles respectifs durant la sélection négative	58
4)	Modèle stochastique ou instructioniste ?.....	59
a)	Modèle instructioniste	59

b)	Choix stochastique/sélectif.....	60
c)	Modèle instructionniste/par défaut.....	60
III.	SURVIE & SÉLECTION PÉRIPHÉRIQUE DES CELLULES T CD8⁺ $\alpha\beta$	62
A.	<i>Lymphocytes T CD8⁺ naïfs et mémoires</i>	62
1)	Caractérisation des cellules T CD8 ⁺ naïves et mémoires/activées.....	62
a)	Phénotypes et caractéristiques.....	62
b)	Export thymique, migration et dynamique des populations.....	64
2)	Sélection périphérique des cellules T CD8 ⁺	65
a)	Fonction des cellules T CD8 ⁺ à la périphérie.....	65
b)	Activation des cellules T.....	66
c)	Devenir de la réponse immunitaire : rôle de la coopération cellulaire.....	67
B.	<i>Homéostasie des populations lymphocytaires T CD8⁺</i>	69
1)	Homéostasie de « l'écosystème » immunitaire.....	69
a)	Généralités.....	69
b)	Observations expérimentales.....	70
c)	Homéostasie des sous-populations lymphocytaires.....	71
d)	Perturbation et homéostasie.....	71
2)	Compétition lymphocytaire.....	72
3)	Prolifération homéostatique.....	74
a)	Quelques résultats anciens.....	74
b)	... et les données récentes.....	74
c)	Implication physiologique de la prolifération homéostatique.....	76
4)	Survie des cellules T CD8 ⁺	77
a)	Quelques estimations sur la durée de vie.....	77
b)	Facteurs de survie.....	78
i-	L'interaction TCR/CMH.....	78
ii-	Peptide du soi et antigène.....	79
iii-	Les interleukines.....	80
	RÉSULTATS	82
I.	TRAVAIL DE THÈSE.....	83
II.	SÉLECTION THYMIQUE DANS DES SOURIS DOUBLE-TRANSGÉNIQUES POUR LE TCR.....	86
III.	SÉLECTION PÉRIPHÉRIQUE DANS DES SOURIS DOUBLE-TRANSGÉNIQUES POUR LE TCR.....	97
IV.	ADAPTATION DES CELLULES T SPÉCIFIQUES LORS DE L'ÉTABLISSEMENT D'UNE INFECTION VIRALE CHRONIQUE.....	107
V.	INFLUENCE DES MOLÉCULES DE CLASSE I DU CMH SUR LA SURVIE ET L'EXPANSION DES CELLULES T CD8 ⁺ (RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES).....	146
A.	<i>Modèles expérimentaux</i>	146
B.	<i>Résultats des transferts</i>	147
C.	<i>Résultats des transferts dans les receveurs déplétés en cellules NK</i>	148
	DISCUSSION	150
A.	<i>Cellules T exprimant deux TCR $\alpha\beta$ et implication dans l'autoimmunité</i>	151

<i>B. Développement des cellules T dans les souris DTg et exclusion allélique.....</i>	<i>153</i>
<i>C. Cellules DTE : répertoire T disponible et activité régulatrice.....</i>	<i>155</i>
<i>D. Adaptation des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ à leurs conditions environnementales</i>	<i>157</i>
<i>E. Molécules de classe I du CMH et survie des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺.....</i>	<i>160</i>
<i>F. Perspectives</i>	<i>163</i>
BIBLIOGRAPHIE	166
ANNEXES	197

Résumé

La composition des compartiments lymphocytaires T est soumise à de constantes modifications, sous l'effet conjugué de la production de nouvelles spécificités, de la sélection lors d'une rencontre avec un antigène et de la mort cellulaire. Face à ces flux de cellules entre les différents compartiments centraux et périphériques, les mécanismes de la régulation homéostatique assurent le fait que le système immunitaire se maintienne à l'équilibre. A l'image d'un écosystème, on peut alors observer que les lymphocytes T entrent en compétition les uns avec les autres pour des niches de sélection et des ressources en quantité limitée. Durant ce travail de thèse, réalisé chez la souris, nous avons analysé le comportement des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ face à un bouleversement de leur environnement, et nous avons travaillé sur les molécules de classe I du CMH comme modèle de ressource nécessaire à la survie des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺.

Dans un premier temps, nous avons étudié la sélection centrale et périphérique de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ exprimant deux transgènes codant respectivement pour le TCR aHY, spécifique de l'antigène mâle H-Y, et le TCR P14, spécifique du peptide gp33-41 issu du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV). Ce modèle reproduit un phénomène courant dans le système immunitaire, puisqu'on trouve chez l'homme et la souris jusqu'à 30% de cellules exprimant deux TCR différents à leur surface. Nos résultats montrent que l'expression de deux TCR par les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ leur permet d'échapper partiellement à la sélection négative dans le thymus, et de résister à la délétion clonale à la périphérie. Dans un second temps, nous avons étudié l'établissement d'une infection chronique par le LCMV dans des souris n'ayant pour lymphocytes que des cellules T exprimant le TCR P14 (souris MoP14). Nous avons pu observer que cette infection passe par la sélection de variants viraux spécifiquement mutés au niveau de l'épitope gp33-41, mais également par la modification du comportement des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ des animaux. L'ensemble de ces données plaide pour un modèle d'adaptation des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ à leurs conditions environnementales.

Enfin, nous avons étendu ce travail à l'étude de l'influence des molécules de classe I du CMH sur la survie et la prolifération homéostatique des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺, en utilisant une gamme de souris transgéniques pour le TCR. Nos résultats montrent une variété de comportements en relation avec la réactivité croisée supposée des différents TCR utilisés.

Liste des figures et tables

- FIGURE 1 *Lignées générées à partir de la cellule souche hématopoïétique*
- FIGURE 2 *Modèle de différenciation cellulaire durant l'hématopoïèse*
- FIGURE 3 *Vagues de précurseurs colonisant le thymus au cours de la vie*
- FIGURE 4 *Organisation et architecture du thymus*
- FIGURE 5 *Schéma des mouvements intrathymiques des thymocytes*
- FIGURE 6 *Étapes du développement des thymocytes*
- FIGURE 7 *Développement des thymocytes TN dans des souris déficientes pour la voie de signalisation de l'IL-7*
- FIGURE 8 *Organisation des gènes codant pour les chaînes α et β du TCR*
- FIGURE 9 *Réarrangements : conséquences et possibilités ultérieures*
- FIGURE 10 *Modèles pour la nature du signal impliqué lors des sélections positive et négative des thymocytes*
- FIGURE 11 *Cinétique après transfert de cellules $T \alpha\beta CD8^+$ restreintes par H-2D^b*
- FIGURE 12 *Cinétique de division de cellules $T \alpha\beta CD8^+ P14^+$*
- FIGURE 13 *Cinétique après transfert de cellules $T \alpha\beta CD8^+$ restreintes par H-2K^b*
- FIGURE 14 *Cinétique de division de cellules $T \alpha\beta CD8^+ OT-1^+$*
- FIGURE 15 *Cinétique après transfert de cellules $T \alpha\beta CD8^+$ polyclonales*
- FIGURE 16 *Cinétique après transfert de cellules $T \alpha\beta CD8^+$ en l'absence de cellules NK*
- FIGURE 17 *La dynamique des populations lymphocytaires $T \alpha\beta CD8^+$*
- FIGURE 18 *Seuil de perception réduit pour les cellules $T \alpha\beta CD8^+$ mémoires*
- TABLE 1 *Résumé du développement lymphoïde T dans les lignées de souris mutantes pour des cytokines et récepteurs de cytokines*

Liste des abréviations

<i>Ag</i>	<i>antigène</i>
<i>aHY</i>	<i>anti-HY (complexe mineur d'histocompatibilité mâle)</i>
$\beta 2m$	$\beta 2$ -microglobuline
<i>bHLH</i>	« <i>basic helix-loop-helix</i> »
<i>bp</i>	<i>paire de base</i>
<i>BrdU</i>	<i>bromodeoxyuridine</i>
<i>CLIP</i>	« <i>class-II associated invariant chain peptide</i> »
<i>CMH</i>	<i>complexe majeur d'histocompatibilité</i>
<i>CPA</i>	<i>cellule présentatrice de l'antigène</i>
<i>CSH</i>	<i>cellule souche hématopoïétique</i>
<i>DN</i>	<i>double négatif (CD4⁻ CD8⁻)</i>
<i>DP</i>	<i>double positif (CD4⁺ CD8⁺)</i>
<i>DTE</i>	« <i>dual TCR expressor</i> »
<i>DTg</i>	<i>double-transgénique</i>
<i>FTOC</i>	« <i>foetal thymic organ culture</i> »
<i>Ig</i>	<i>immunoglobuline</i>
<i>IL</i>	<i>interleukine</i>
<i>ISP</i>	<i>immature simple-positif</i>
<i>kb</i>	<i>kilobase (1000 nucléotides)</i>
<i>LCMV</i>	<i>virus de la chorioméningite lymphocytaire</i>
<i>LFA</i>	« <i>lymphocyte function antigen</i> »
<i>Mb</i>	<i>mégabase</i>
<i>NK</i>	« <i>naturel killer</i> »
<i>pAg</i>	<i>peptide antigénique</i>
<i>PLC</i>	<i>progéniteur lymphoïde commun</i>
<i>RAG</i>	« <i>recombination activating gene</i> »
<i>RSS</i>	« <i>recombination signal sequence</i> »
<i>SCF</i>	« <i>stem cell factor</i> »
<i>SP</i>	<i>simple positif (soit CD4⁺ CD8⁻, soit CD4⁻ CD8⁺)</i>
<i>Sp/AGM</i>	<i>splanchnopleure / aorte, gonades, mesonephros</i>

<i>TAP</i>	<i>« transporter associated with antigen processing »</i>
<i>TCM</i>	<i>« T central memory »</i>
<i>TCR</i>	<i>récepteur des cellules T</i>
<i>TEM</i>	<i>« T effector memory »</i>
<i>Tg</i>	<i>transgénique</i>
<i>TN</i>	<i>triple négatif (TCR-CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻)</i>
<i>VIH</i>	<i>virus de l'immunodéficience humaine</i>

Introduction

Mon travail de thèse a été réalisé chez la souris, et s'est intéressé aux cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ depuis leur développement précoce dans le thymus jusqu'à leur différenciation après une réponse immunitaire. C'est pourquoi l'introduction de cette thèse se propose de donner une vue d'ensemble du développement des lymphocytes T chez la souris, même si certains exemples trouvés chez l'homme seront également cités. La première partie de l'introduction s'intéressera à la cellule souche hématopoïétique et à l'émergence du précurseur lymphoïde commun, jusqu'à son entrée dans le thymus. La seconde partie de l'introduction se focalisera sur les mécanismes de sélection des thymocytes et le processus de maturation amenant à la production de lymphocytes T matures. Enfin, la troisième partie de l'introduction abordera les compartiments périphériques des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺. Nous essayerons alors de préciser la dynamique des populations lymphocytaires, phénomène essentiel dans la régulation homéostatique du système immunitaire.

I. LE DÉVELOPPEMENT PRÉCOCE DES CELLULES T

A. A l'origine : de la cellule souche au précurseur des cellules T

1) La cellule souche hématopoïétique

a) Caractéristiques principales

Il y a maintenant plus de cinquante ans que l'existence de la cellule souche hématopoïétique (CSH) a été prouvée (Lorenz et al., 1951). Dans ces expériences, des souris et des cochons d'Inde ont été létalement irradiés, c'est-à-dire avec une dose qui empêche toute régénération des cellules sanguines. Ces animaux ont pu être sauvés de la mort par anémie après injection de moelle osseuse d'un donneur syngénique. Ainsi, il existe dans la moelle osseuse d'une souris adulte un précurseur des cellules sanguines.

Suite à cette découverte, la CSH a été caractérisée et une propriété remarquable a été mise en évidence : la CSH est pluripotente. Suite à une succession d'étapes de différenciation, elle est en effet capable de générer l'ensemble des lignées des cellules sanguines, c'est-à-dire les lignées lymphoïde, myéloïde, mégacaryocytaire et érythroïde (**Figure 1**). De plus, afin d'assurer le constant renouvellement des cellules sanguines, la CSH bénéficie d'une capacité à s'auto-renouveler. Cette capacité est liée au maintien de l'expression de la télomérase dans ces cellules (Morrison et al., 1996). Ces deux caractéristiques principales assurent une génération des cellules sanguines durant toute la vie : les CSH s'auto-renouvellent et peuvent se différencier au sein des organes hématopoïétiques (foie fœtal, moelle osseuse, thymus, rate), qui disposent des conditions environnementales adéquates.

b) L'apparition des premières CSH dans l'embryon

De nombreux travaux en embryologie ont été menés pour déterminer la limite maximale à partir de laquelle les CSH peuvent être détectées, et pour préciser le territoire exact à l'origine de l'émergence des CSH (revue par (Cumano and Godin, 2001)).

Il a ainsi été montré que l'origine des CSH est clairement étrangère aux organes hématopoïétiques. C'est en effet le sac vitellin, composé de mésoderme et d'endoderme primitif, qui a été identifié chez la souris comme étant le premier lieu d'apparition des CSH, environ au jour 7,5 de vie embryonnaire (E7,5). La majeure partie de ces premières CSH se différencient en cellules de la lignée érythroïde qui possèdent la propriété d'être nucléées, contrairement aux érythrocytes classiques. Les CSH ne sont pas produites uniquement dans le

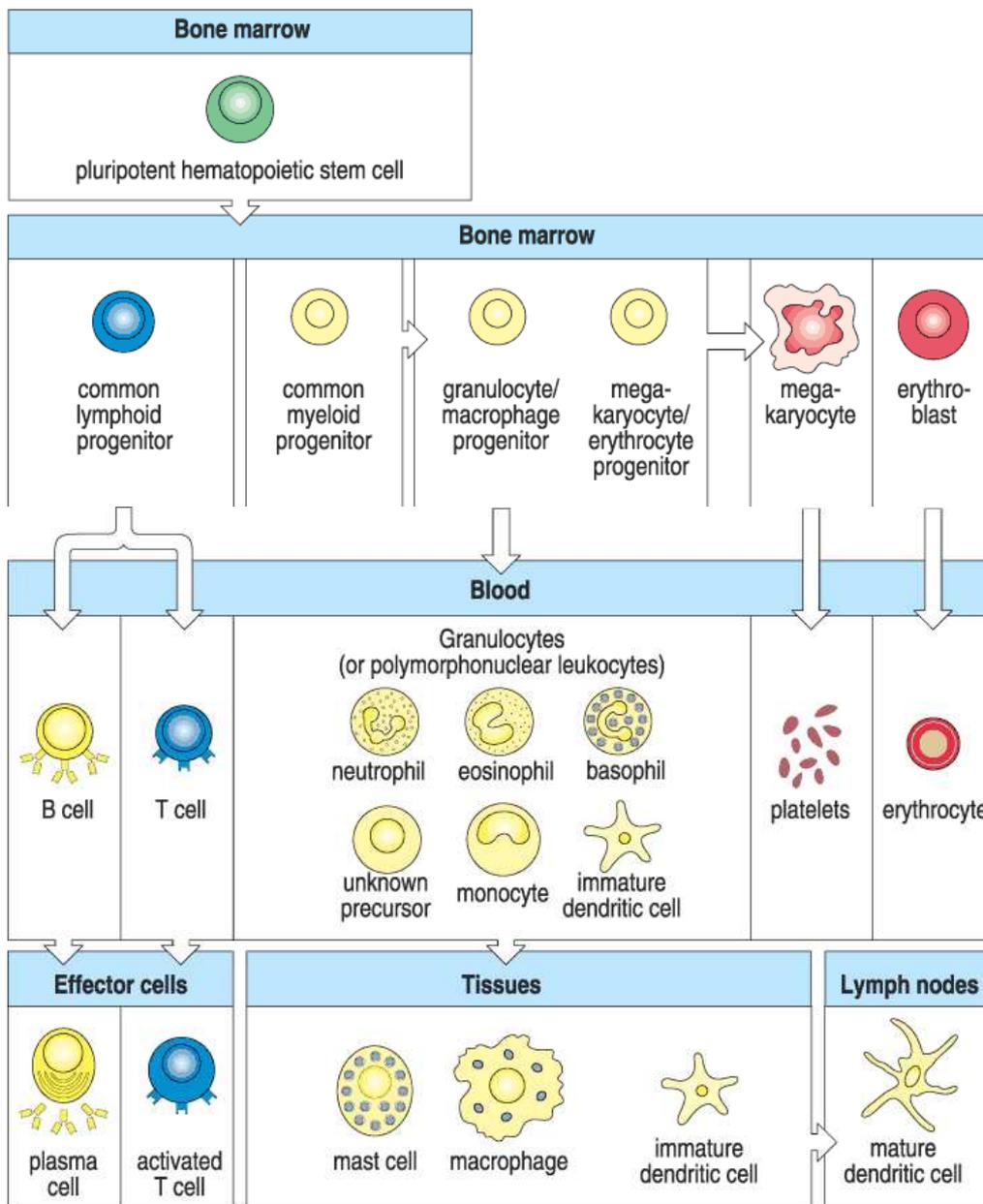


Figure 1: Lignées générées à partir de la cellule souche hématopoïétique

Chez l'adulte, la cellule souche est principalement concentrée au niveau de la moelle osseuse. Après différenciation, elle génère l'ensemble des cellules sanguines, à savoir les érythrocytes (globules rouges), les mégacaryocytes (producteurs des plaquettes), les lymphocytes et les cellules myéloïdes. Le progéniteur lymphoïde commun est également capable de générer des cellules dendritiques thymiques et des cellules NK, qui n'apparaissent pas sur ce schéma.

(Janeway, C.A. & al., « Immunobiology - The immune system in health and disease », 5th edition, Garland Publishing)

sac vitellin, comme l'ont montré par la suite des expériences utilisant des chimères associant un sac vitellin de poulet et un embryon de caille (Dieterlen-Lievre, 1975). En effet, dans ces expériences, les progéniteurs du sac vitellin ne contribuent pas durablement à l'érythropoïèse, alors que les cellules intra-embryonnaires de la région Sp/AGM (splanchnopleure, et ses dérivés aorte, gonades, mesonephros) fournissent des précurseurs hématopoïétiques à long terme. Ainsi, deux vagues de CSH sont générées de manière indépendante dans le sac vitellin, puis dans la région Sp/AGM.

Chez la souris, c'est entre les jours E9 et E12,5 que la région embryonnaire Sp/AGM montre une production de CSH et de précurseurs lymphoïdes, qui sont capables de reconstituer durablement le système hématopoïétique d'une souris létalement irradiée (Medvinsky and Dzierzak, 1996; Muller et al., 1994). On peut également trouver des CSH pluripotentes dans le sac vitellin au jour E11 (Muller et al., 1994). En fait, ces CSH dérivent de la région Sp/AGM et passent dans le sac vitellin lorsque la circulation sanguine se met en place dans l'embryon, entre les jours E8 et E10,5. Ces CSH peuvent servir à reconstituer un adulte, mais c'est avec les populations directement isolées de la région Sp/AGM que les taux de reconstitution sont les meilleurs, ce qui renforce l'idée selon laquelle les CHS adultes sont bien originaires de la région Sp/AGM, pénètrent dans la circulation et colonisent le foie fœtal, puis la moelle osseuse peu avant la naissance.

Ainsi, la première vague de précurseurs issus du sac vitellin est orientée vers une production rapide d'érythrocytes pour pallier le déficit de circulation passive d'oxygène d'origine maternelle, avant la production d'érythrocytes par le foie fœtal qui démarre vers le jour E11. Dans un second temps, les précurseurs issus de la région Sp/AGM génèrent des CSH pluripotentes qui pourront coloniser le foie fœtal et permettre enfin l'hématopoïèse durant la vie adulte à partir de la moelle osseuse. On peut préciser que des sites intra-embryonnaires similaires ont été identifiés chez l'amphibien (Turpen et al., 1997), les oiseaux (Dieterlen-Lievre, 1975), la souris (Godin et al., 1993; Medvinsky et al., 1993) et l'humain (Tavian et al., 1996).

2) *Vers le progéniteur des cellules T*

Le thymus est colonisé durant toute la vie par des progéniteurs dérivant des CSH. Toutefois, les cellules qui colonisent le thymus peuvent être plus ou moins engagées dans la lignée lymphoïde. Selon l'hypothèse dominante, la différenciation vers la lignée lymphoïde passe tout d'abord par le progéniteur lymphoïde commun (PLC), capable à son tour de dériver vers les lignées T, B et NK (revue par (Shortman and Wu, 1996)). Dans ce schéma

développemental, la CSH s'engage lors de sa première étape de différenciation soit vers la lignée myéloïde, pour générer les polynucléaires (basophiles, éosinophiles, neutrophiles), les macrophages, et les mastocytes, soit vers la lignée lymphoïde, ou encore vers les lignées mégacaryocytaire et érythroïde. Cependant, d'autres modèles envisagent que la CSH puisse se différencier en progéniteurs bipotents (lymphocytes T et cellules myéloïdes ; lymphocytes B et cellules myéloïdes), ou encore directement en progéniteurs mono-compétents.

Comment conférer cette plasticité au système, qui permet à des progéniteurs multipotents de s'orienter dans une voie de différenciation en fonction de l'environnement et des signaux reçus ? Cette flexibilité semble permise par la « promiscuité entre lignées » : initialement, un certain nombre de gènes lignée-spécifiques importants sont exprimés à faible niveau par les progéniteurs multipotents et, suivant les événements, l'expression de certains de ces gènes est sélectivement perdue pendant que les cellules progressent dans leur différenciation (Greaves et al., 1986). Nous allons maintenant préciser la nature du progéniteur des lymphocytes T, puis nous aborderons les événements principaux qui débouchent sur l'émergence de cette cellule.

a) Le progéniteur commun de la lignée lymphoïde

Considérant la difficulté des expériences à mener, il n'est pas certain qu'une réponse définitive puisse être apportée quant à la nature exacte du PLC. Un certain nombre d'expériences récentes vont dans le sens de son existence et précisent son phénotype, notamment grâce à l'étude de l'inactivation fonctionnelle de gènes impliqués dans des voies de signalisation intracellulaire, ou bien codant pour des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation lymphoïde. Les résultats obtenus jusqu'ici ont permis d'isoler un progéniteur commun capable de générer des lymphocytes B, des lymphocytes T, et des cellules NK (Matsuzaki et al., 1993; Wu et al., 1991a). De plus, ce PLC peut donner des cellules dendritiques thymiques (Ardavin et al., 1993), mais ce dernier cas reste discuté (Di Santo et al., 2000). Les travaux menés pour identifier le PLC lui confèrent le phénotype $\text{Lin}^- \text{IL-7R}\alpha^+ \text{Sca-1}^{\text{low}} \text{c-kit}^{+\text{low}}$, en comparaison avec la CSH dont le phénotype est $\text{Lin}^- \text{IL-7R}\alpha^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$ (revue par (Akashi et al., 1998; Shortman and Wu, 1996)). En se basant sur ce phénotype, le PLC a pu être mis en évidence dans la moelle osseuse de souris ; son caractère pluripotent restreint aux lymphocytes T, B et NK a été démontré dans des expériences de reconstitution *in vivo* (Kondo et al., 1997b).

b) L'entrée dans le thymus force l'engagement dans la lignée T...

L'existence d'un PLC semble avérée, mais il reste à savoir si l'engagement dans la lignée lymphoïde T est directement dû à l'entrée dans le thymus ou non. Certaines expériences prouvent un effet indéniable de l'environnement cellulaire sur le choix de différenciation. Ainsi, l'équipe de K. Shortman a étudié le précurseur T le plus précoce dans le thymus, qui exprime de faibles niveaux de surface du co-récepteur CD4 (Wu et al., 1991b), et a pu montrer que cette population thymique se différencie en cellules T lorsqu'elle est injectée dans le thymus d'un receveur irradié, mais également en cellules B si elle est injectée par voie intraveineuse (Wu et al., 1991a). Ces résultats ont été confirmés en comparant le potentiel de reconstitution respectif des cellules $c\text{-kit}^+ \text{Lin}^- \text{Thy-1}^{\text{low}}$ issues du thymus ou bien de la moelle osseuse (Matsuzaki et al., 1993). De plus, cette étude renforce l'idée selon laquelle les précurseurs trouvés dans le thymus sont engagés plus en avant dans la voie de différenciation vers la lignée lymphoïde. En effet, la différenciation en cellules T après transfert direct dans le thymus d'un receveur irradié est plus rapide avec les cellules thymiques $c\text{-kit}^+ \text{Lin}^- \text{Thy-1}^{\text{low}}$ qu'avec les cellules triées à partir de la moelle osseuse.

c) ... mais l'engagement dans la lignée T peut avoir lieu avant l'entrée dans le thymus

L'influence de l'environnement cellulaire est évidente : l'environnement thymique pousse les précurseurs qui y pénètrent à s'engager vers la lignée lymphoïde T. Toutefois, il pourrait être possible que les précurseurs hématopoïétiques soient déjà, au moins en partie, pré-engagés dans la lignée lymphoïde T avant l'entrée dans le thymus.

En effet, il a été montré que des précurseurs engagés dans la lignée T, dits « pro-thymocytes », peuvent être isolés à partir du sang fœtal de souris (Rodewald et al., 1994). Il est à noter que ces cellules, de phénotype $\text{Thy-1}^+ c\text{-kit}^{\text{low}}$, portent des réarrangements des gènes de la chaîne β du récepteur des cellules T (TCR), et ce avant la colonisation du thymus fœtal. Dans le même ordre d'idée, un précurseur $\text{NK1.1}^+ c\text{-kit}^{\text{low}}$ des cellules T et NK a été identifié chez la souris fœtale, dans le sang et la rate (Carlyle and Zuniga-Pflucker, 1998). Si ces cellules partagent certaines caractéristiques avec les pro-thymocytes décrits par Rodewald et collègues, il est intéressant de noter que ces précurseurs $\text{NK1.1}^+ c\text{-kit}^{\text{low}}$ conservent les locus β du TCR en configuration germinale, ce qui sous-entend que le plein engagement de ce précurseur dans la lignée lymphoïde T nécessite l'entrée dans le thymus. Des résultats similaires ont été récemment obtenus à partir d'une population $\text{B220}^{\text{low}} c\text{-kit}^+ \text{CD19}^-$ du foie fœtal de souris (Douagi et al., 2002). Toutes ces données suggèrent qu'un ensemble de

précurseurs différents, plus ou moins engagés dans la lignée lymphoïde (PLC versus précurseur T/NK), participe à la colonisation du thymus.

d) Événements de signalisation décisifs pour l'engagement dans la lignée T

Beaucoup de travaux ont été effectués afin de caractériser un peu mieux les événements moléculaires impliqués dans la différenciation vers la lignée T. Cela passe notamment par l'identification des voies de signalisation et des facteurs de transcription contrôlant ce processus de manière globale. Cette approche a permis de révéler la complexité du processus, comme le montrent quelques unes des revues récentes (Akashi et al., 2000; Clevers and Ferrier, 1998; Di Santo et al., 2000; Kuo and Leiden, 1999).

i- Facteurs de transcription

Au moins trois familles de facteurs de transcription ont été identifiés comme exerçant un rôle majeur dans l'engagement définitif vers la lignée T, à savoir les familles des protéines Ikaros, Ets, et GATA (**Figure 2**).

Le gène *Ikaros* génère par épissage alternatif une famille de facteurs de transcription possédant des domaines de liaison à l'ADN de type « doigt de zinc ». Diverses lignées de souris mutantes pour le gène *Ikaros* ont été créées, afin d'étudier l'effet de l'absence d'un des domaines sur l'action des protéines Ikaros. Chez une de ces lignées mutantes, les précurseurs sont incapables de conduire à l'établissement correct de la lignée myéloïde, et le nombre absolu de CSH est réduit (Nichogiannopoulou et al., 1999). Ces résultats suggèrent que la famille Ikaros exerce un rôle dans la génération, l'auto-renouvellement et/ou la différenciation des CSH. Globalement, les souris invalidées pour le gène *Ikaros* montrent une immunodéficiences sévère des lignées T, B et NK (Georgopoulos et al., 1994). Il s'avère que Ikaros peut interagir avec un certain nombre de protéines partenaires, ce qui en fait un point clef du développement des lymphocytes. Ainsi, il a été montré que Aiolos, un homologue de Ikaros exprimé uniquement dans la lignée lymphoïde, peut interagir avec Ikaros pour réguler le développement des lymphocytes T (Morgan et al., 1997).

La famille Ets est composée de facteurs de transcription qui partagent un domaine de fixation à l'ADN de type « winged helix-loop-helix », et qui régulent l'expression d'une grande variété de gènes. Ils influent notamment sur les mécanismes de différenciation cellulaire, et ce de la mouche jusqu'aux mammifères les plus complexes. La protéine PU.1, appartenant à la famille Ets, exerce un rôle dans l'engagement vers les lignées lymphoïde et myéloïde, comme l'a montré un mutant de PU.1 létal aux stades embryonnaires tardifs et présentant un défaut

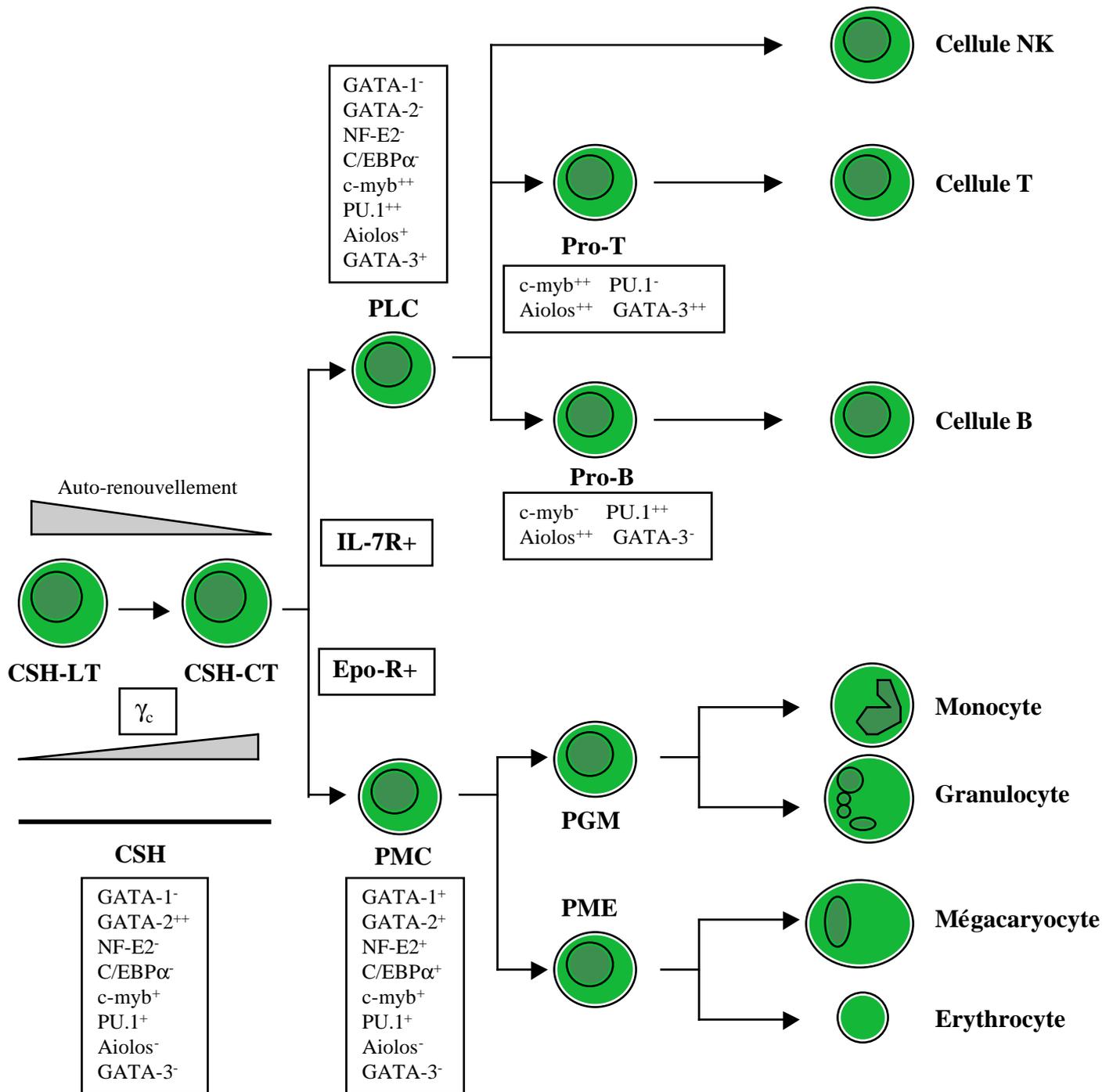


Figure 2: Modèle de différenciation cellulaire durant l'hématopoïèse

Un certain nombre de facteurs lignée-spécifiques influent sur la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH). On distingue deux populations de CSH possédant une capacité d'auto-renouvellement à long terme (CSH-LT) ou bien à court terme (CSH-CT). Le modèle proposé ici est a minima, car il n'est pas exclu que certaines cellules puissent être générées sans passer par les progéniteurs communs, ou encore qu'il existe certains progéniteurs bipotents (notamment cellules B/myéloïdes). PLC: progéniteur lymphoïde commun; PMC: progéniteur myéloïde commun; PGM: progéniteur des granulocytes et macrophages; PME: progéniteur des mégacaryocytes et érythrocytes.

(d'après Akashi & al., Curr. Opin. Immunol., 2000, 12:144)

des deux types de progéniteurs (Scott et al., 1997). Toutefois, il faut rester prudent quant au rôle effectif de PU.1 dans l'engagement dans la lignée T : en effet, une autre équipe a analysé un second mutant de PU.1, létal après la naissance si et seulement si les souriceaux ne sont pas traités avec des antibiotiques pour éviter une septicémie sévère. Chez les animaux traités, des cellules T apparaissent après quelques jours, ce qui indique que PU.1 n'est essentiel que pour le développement des macrophages et des cellules B (McKercher et al., 1996). Autrement dit, l'absence d'expression de PU.1 après la naissance n'empêche pas l'émergence de populations de lymphocytes T.

Enfin, les facteurs de transcription GATA – au moins six sont identifiés – possèdent comme Ikaros un domaine de fixation à l'ADN de type « doigt de zinc ». Le rôle de GATA-3 dans l'engagement dans la lignée T a été démontré dans un système de souris chimériques, l'inactivation du gène codant pour GATA-3 étant létale suite notamment à des anomalies cérébrales, un syndrome d'anémie et des hémorragies abdominales (Pandolfi et al., 1995). Dans ces chimères, les précurseurs GATA-3^{-/-} ne donnent pas de cellules de la lignée T, même aux stades les plus précoces, alors que leur contribution aux lignées B, myéloïde et érythroïde est normale (Ting et al., 1996).

ii- Le cas de Notch-1

Récemment, plusieurs études ont tenté de démontrer le rôle de Notch dans le choix de différenciation des progéniteurs T (Deftos and Bevan, 2000). En effet, cette famille de protéines, dont 4 membres ont été identifiés chez les mammifères, est connue pour son rôle primordial dans le choix de différenciation cellulaire au cours du développement. La redondance possible entre les 4 récepteurs identifiés et leurs multiples ligands rend difficile l'étude du rôle de Notch dans le développement vers la lignée T, cependant il semble que Notch-1 possède une influence majeure dans ce processus. L'inactivation du gène codant pour Notch-1 est létale à un stade embryonnaire précoce, ce qui est compatible avec son influence lors du développement embryonnaire (Conlon et al., 1995). On peut citer deux systèmes qui ont été utilisés pour contourner ce problème (Pui et al., 1999; Radtke et al., 1999).

Dans le premier cas, des CSH isolées à partir de moelle osseuse de souris ont été infectées avec un rétrovirus codant pour une forme constitutivement active de Notch-1 (Notch-IC). Après reconstitution de souris irradiées avec ces CSH modifiées, l'émergence rapide d'une population de cellules T immatures double-positives CD4⁺ CD8⁺ est observée dans la moelle osseuse. On peut penser qu'il s'agit d'un engagement anarchique *in situ* de progéniteurs vers

la lignée T, car cela a lieu indépendamment de l'existence d'un thymus fonctionnel ou non. Par contre, le développement des cellules B est bloqué dans ce système, et la différenciation de la lignée myéloïde n'est pas affectée (Pui et al., 1999). Ce travail a été répété en induisant l'expression ectopique de Notch-1 dans des CSH RAG-2^{-/-}, incapables de réarranger les gènes codant pour les récepteurs des lymphocytes T et B (Allman et al., 2001). De manière intéressante, il a été observé que les précurseurs s'engagent alors dans la lignée T, à nouveau dans la moelle osseuse, mais sont bloqués à un stade très précoce (CD4⁻ CD8⁻ CD44⁻ CD25⁺), ce qui indique que le signal délivré par Notch-1 ne peut pas se substituer au signal induit après l'expression de la chaîne β du TCR.

Alternativement, un second groupe a choisi de créer un *knock-out* inductible de *Notch-1* en utilisant le système de délétion Cre-LoxP (Radtke et al., 1999). L'invalidation du gène chez des nouveaux-nés induit une diminution drastique du développement des cellules T et une accumulation de cellules B immatures dans le thymus. De même, l'induction de la délétion de *Notch-1* sur des cellules de moelle osseuse de souris utilisées pour une reconstitution confirme ce blocage du développement T en absence d'une expression normale de Notch-1. Toutes les autres lignées (myéloïde, érythrocytaire, cellules NK) ne semblent pas affectées dans ce système.

L'ensemble de ces résultats fait de Notch-1 un candidat potentiel pour le choix d'engagement de différenciation entre les lignées T et B à partir du PLC, dans le sens où Notch-1 est nécessaire, voire suffisant, pour l'apparition de cellules T immatures.

iii- La signalisation par les récepteurs IL-7R α / γ_c et c-kit

La cytokine « clef » du développement des lymphocytes T et B est l'IL-7, qui est exprimée notamment par les cellules stromales de la moelle osseuse et du thymus (revue par (Akashi et al., 1998; Di Santo et al., 2000)). Les immigrants thymiques les plus précoces expriment la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (CD127) et la chaîne γ_c commune aux récepteurs des interleukines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 et IL-15. Le récepteur IL-7R α / γ_c utilise pour sa signalisation les Janus kinases JAK-1 et JAK-3, ainsi que les molécules STAT-1 (Signal Transducer and Activator of Transcription), STAT-3 et STAT-5. Il est à noter que l'invalidation des gènes codant pour l'IL-7 ou la chaîne IL-7R α provoque un blocage incomplet du développement des lymphocytes B et T, voire complet dans le cas des cellules T $\gamma\delta$ (Peschon et al., 1994; von Freeden-Jeffry et al., 1995). Le blocage touche d'autres populations cellulaires dans le cas de l'invalidation de la chaîne γ_c car les cellules NK sont également absentes (DiSanto et al., 1995). Globalement, la comparaison du phénotype de ces

trois lignées de souris mutantes montre une grande similarité, avec des défauts de maturation des cellules T $\alpha\beta$ et une forte diminution du nombre de thymocytes, mais quelques différences peuvent être relevées. Ainsi, le phénotype des souris IL-7R $\alpha^{-/-}$ semble un peu plus sévère au niveau des cellules T $\alpha\beta$, ce qui a amené à s'interroger sur le rôle de la molécule TSLP (Thymic Stromal cell-derived Lymphopoietin) (revue par (Di Santo and Rodewald, 1998)). Cette molécule est un ligand potentiel de la chaîne IL-7R α seule, c'est-à-dire sans association avec la chaîne γ_c . L'interaction TSLP/ IL-7R α pourrait donc partiellement rattraper le phénotype délétère des souris IL-7 $^{-/-}$ ou $\gamma_c^{-/-}$, même si l'influence de cette voie de signalisation apparaît au final comme relativement mineure.

La seconde voie de signalisation particulièrement importante pour le développement précoce de la lignée lymphoïde implique le récepteur c-kit (CD117) et son ligand principal SCF (Stem Cell Factor). Le récepteur c-kit, de type tyrosine kinase, est exprimé très tôt par les précurseurs hématopoïétiques, y compris par les CSH. Il est trouvé à la surface des « pro-thymocytes » (Rodewald et al., 1994) et de plusieurs précurseurs intrathymiques des cellules T. Son ligand SCF existe, du fait de la possibilité d'un épissage alternatif, sous les deux formes soluble et membranaire, et il est produit notamment par les cellules stromales du thymus. Similairement aux résultats observés avec la voie de signalisation à l'IL-7, les déficiences observées en l'absence du récepteur c-kit ou de son ligand sont sévères mais pas totales (Di Santo and Rodewald, 1998). Ainsi, les souris c-kit^{null} montrent une réduction de 40 fois du nombre de précurseurs T les plus précoces, définis comme Thy-1^{int} CD2^{-low}, et un phénotype similaire est obtenu avec des thymus SCF $^{-/-}$ greffés à des souris normales (Rodewald et al., 1995). Cependant, cette observation pourrait également être liée à un défaut de colonisation du thymus par les progéniteurs, le rôle de c-kit dans la migration d'autres lignées cellulaires étant avéré (Takeda et al., 1997).

Ainsi, la survie et la prolifération des précurseurs lymphoïdes précoces est particulièrement dépendante des signaux délivrés par CD117/c-kit et par le récepteur à l'IL-7, IL-7R α/γ_c . La relative permissivité du développement des lymphocytes en l'absence d'une des deux voies de signalisation suggère qu'ils sont potentiellement interdépendants. Cela a été clairement confirmé avec des animaux déficients à la fois pour l'expression de c-kit et de la chaîne commune γ_c , chez lesquels le développement T est totalement abrogé (Rodewald et al., 1997).

3) Colonisation du thymus

Le thymus est la principale source de lymphocytes T durant l'existence. Entre l'apparition des CSH dans l'embryon et la production effective de cellules T matures, il est nécessaire que les CSH se différencient vers la lignée lymphoïde T et que le thymus soit colonisé. Il faut de plus garder à l'esprit que ce processus met en jeu des dynamiques complexes du fait de la production de progéniteurs dans le foie fœtal ou la moelle osseuse, de la migration de ces progéniteurs et de leur différenciation avancée sous l'effet du micro environnement thymique.

a) Colonisations successives du thymus au cours du développement

Nous avons vu qu'il existe deux vagues de CSH lors de la vie embryonnaire, et que les CSH du sac vitellin génèrent principalement des cellules de la lignée érythroïde. En revanche, les CSH issues de la région Sp/AGM vers le jour E10,5 colonisent le foie fœtal et les ébauches du thymus fœtal, donnant alors lieu à une première vague de précurseurs des cellules T (**Figure 3**). Une part des CSH présentes dans le foie fœtal prolifère et progresse plus en avant dans la différenciation en progéniteurs de la lignée lymphoïde, qui colonisent à leur tour le thymus fœtal, massivement vers le jour E13 (Ema et al., 1998). Une seconde part de ces CSH colonise la moelle osseuse, qui devient alors le siège principal de la production de progéniteurs de la lignée lymphoïde durant la vie adulte, comme cela a été notamment montré à l'aide de souris en parabiose, c'est-à-dire avec une circulation croisée (Donskoy and Goldschneider, 1992).

Ainsi, le thymus embryonnaire est colonisé par plusieurs vagues successives de précurseurs, mais ils ne semblent pas tous posséder la même capacité à générer des lymphocytes T. En effet, il a été proposé que les premiers immigrants thymiques (jour E11 environ) sont moins efficaces pour donner des thymocytes, comparativement à la deuxième vague de colonisation. Cette deuxième vague, en provenance du foie fœtal (à partir du jour E13), semble en effet plus avancée dans la voie de différenciation T (Douagi et al., 2000). Chez l'adulte, la colonisation du thymus par les précurseurs T est par contre censée être continue à partir de la moelle osseuse. Une étude complexe indique toutefois que les précurseurs pourraient en fait toujours coloniser le thymus adulte par vagues, chacune séparée de la suivante par un délai d'environ 4 semaines (Foss et al., 2001).

b) Molécules impliquées dans la colonisation

Un certain nombre de molécules influent sur la migration des cellules hématopoïétiques, notamment via l'adhésion à l'endothélium. En général, on considère schématiquement que l'extravasation des leucocytes vers les zones d'inflammation tissulaire fait intervenir plusieurs

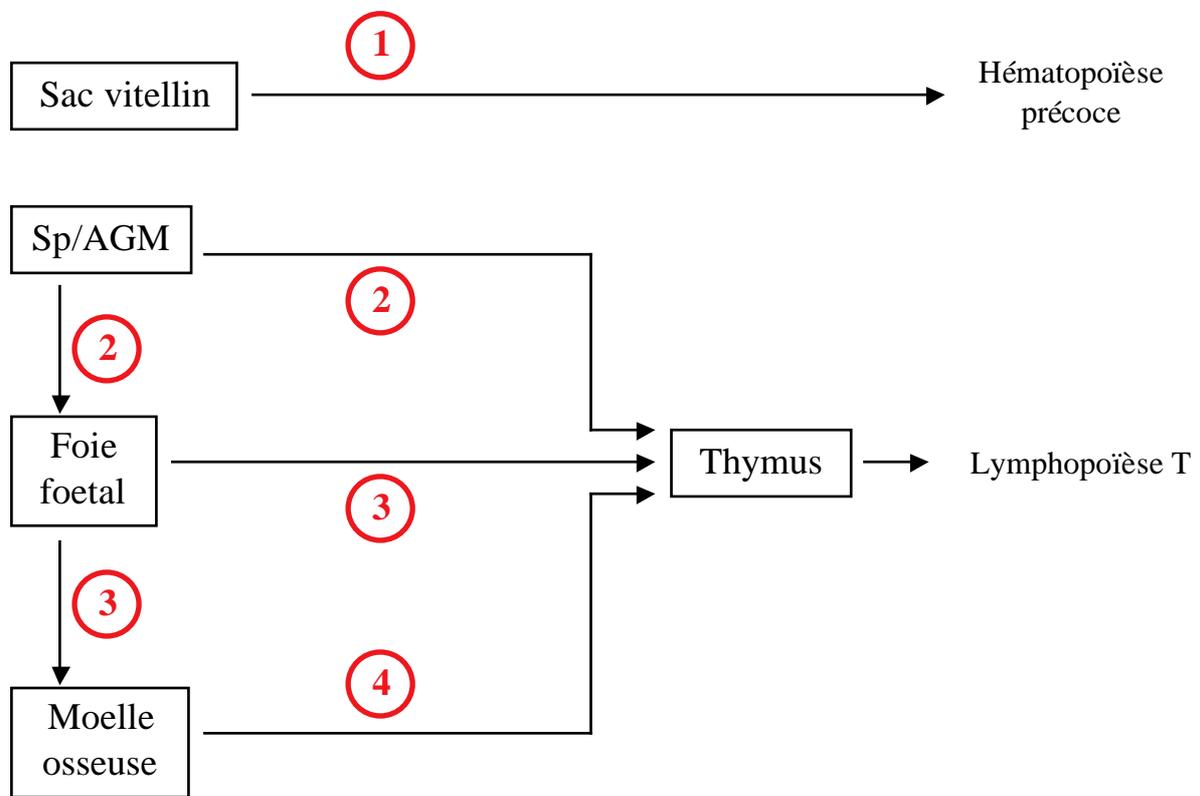


Figure 3: Vagues de précurseurs colonisant le thymus au cours de la vie

La première vague de CSH (1) ne génère pas de précurseurs colonisant le thymus. Par contre, les vagues suivantes donnent naissance à des progéniteurs capables de coloniser le thymus. La première vague de progéniteurs (2) est issue de la région Sp/AGM vers le jour E11, puis une seconde vague (3) en provenance du foie fœtal est observée autour du jour E13. Enfin, la moelle osseuse prend rapidement le relais (4) et reste la source de progéniteur pour le reste de l'existence.

procédés : les premiers types d'adhésions sont plutôt transitoires, permettant au lymphocyte de littéralement rouler sur la paroi des vaisseaux (« rolling »), et font intervenir les sélectines ; les seconds types d'adhésions cellulaires, plus fermes, sont médiés par les intégrines. Les chémokines sont également connues pour être des médiateurs du recrutement cellulaire et de l'activation des lymphocytes. Certaines de ces familles de molécules sont impliquées à divers degrés dans la colonisation du thymus, essayons à présent d'en dégager les principales.

i- Les intégrines

Les intégrines forment une large famille de récepteurs impliqués dans l'adhésion cellulaire (Hynes, 1992). Elles sont toutes constituées en hétérodimères de deux sous-unités α et β , sachant qu'il existe au moins 14 sous-unités α et 8 sous-unités β , et qu'un degré de complexité supplémentaire est introduit par des possibilités d'épissage alternatif. Toutes les combinaisons ne sont pas forcément trouvées *in vivo*, mais les intégrines existantes possèdent en général plusieurs ligands et vice-versa. Ces quelques éléments suffisent à imaginer la complexité et les redondances possibles du système.

Les exemples les mieux documentés au niveau des leucocytes sont les intégrines β_2 , comme l'intégrine $\alpha_L\beta_2$ /LFA-1 (Lymphocyte Function Antigen-1) (Hynes, 1992; van Kooyk et al., 1989), et les intégrines β_1 (Potocnik, 2000). Ces dernières ont été identifiées comme jouant un rôle majeur dans la colonisation des sites de l'hématopoïèse dès le stade fœtal, y compris le thymus. En effet, les CSH $\beta_1^{-/-}$ sont pluripotentes *in vitro* et sont massivement présentes dans le sang fœtal mais montrent un défaut de migration vers les organes de l'hématopoïèse (Hirsch et al., 1996). Ces résultats sont controversés, car l'analyse de chimères de moelle osseuse utilisant des précurseurs avec une délétion inductible du gène β_1 ne révèle aucun défaut compétitif sur la rétention des CSH dans la moelle osseuse, l'hématopoïèse en général ou la migration lymphocytaire (Brakebusch et al., 2002). Toutefois, la reconstitution de thymus avec des précurseurs de moelle osseuse β_1^{-} montre un défaut transitoire en comparaison avec les précurseurs β_1^{+} . Ce défaut est transitoire, car il est clairement détecté 5 semaines après reconstitution, mais plus à 8 semaines, et aucune sous-population thymique ne semble particulièrement affectée (Brakebusch et al., 2002). Ces apparentes contradictions pourraient être dues à une redondance entre intégrines ou bien à d'autres mécanismes compensatoires.

Les intégrines α_4 ont été impliquées dans un grand nombre de phénomènes durant l'hématopoïèse, plus particulièrement durant l'érythropoïèse. Les souris déficientes pour α_4

possèdent un blocage précoce dans le développement B, les précurseurs T s'y montrent incapables de quitter la moelle osseuse, et il est enfin suggéré que le rôle de α_4 s'accroît après la naissance, la colonisation du thymus par des précurseurs $\alpha_4^{-/-}$ étant observée durant la vie prénatale dans des souris chimériques (Arroyo et al., 1996; Arroyo et al., 1999). En outre, des expériences conduites *in vitro* laissent apparaître un rôle possible des intégrines α_4 dans l'adhésion des progéniteurs aux lobules thymiques (Kawakami et al., 1999).

ii- La molécule CD44

L'interaction de CD44 avec son ligand principal, l'acide hyaluronique, a été impliquée dans l'adhésion des lymphocytes aux cellules endothéliales (DeGrendele et al., 1996). Ce mécanisme contribue à l'extravasation des leucocytes, par exemple en réponse à une inflammation. Or, les progéniteurs qui colonisent le thymus expriment ce récepteur CD44, qui est d'ailleurs utilisé comme marqueur pour définir certaines étapes discrètes du développement précoce des thymocytes. En conséquence, Kawakami et collègues ont également cherché à préciser le rôle de CD44 lors de la colonisation du thymus (Kawakami et al., 1999). Les expériences indiquent que ce récepteur cellulaire n'est pas impliqué dans l'adhésion au niveau des lobules thymiques. En revanche, CD44 joue un rôle dans la migration des progéniteurs vers l'intérieur du thymus et dans les mouvements intrathymique des précurseurs T.

iii- Les chémokines et leurs récepteurs

Les chémokines sont de petites protéines, en général sécrétées, et elles sont connues pour leur rôle dans la migration cellulaire, la transcription de certaines cytokines ou encore l'induction des intégrines. Elles sont classées dans quatre familles (C, CC, CXC et CX3C) en fonction du nombre de cystéines situées sur la partie amino-terminale et suivant le nombre de résidus séparant ces cystéines (revue par (Zlotnik and Yoshie, 2000)). Concernant le rôle des chémokines dans la colonisation du thymus, il faut bien avouer que le terrain n'est pas encore entièrement défriché. Ainsi, le profil d'expression des multiples ligands dans les différentes régions de l'organisme n'est pas connu de manière fine. L'interaction entre le récepteur CXCR4, fortement exprimé par les précurseurs lymphoïdes pénétrant dans le thymus, et son ligand SDF-1/CXCL12 (Stromal Derived Factor-1), fortement exprimé par le thymus fœtal et la région externe du cortex thymique chez l'adulte, constitue un des modèles les mieux étudiés pour confirmer le rôle des chémokines dans la colonisation du thymus (revue par (Norment and Bevan, 2000)). Il faut toutefois modérer ces observations, l'analyse des souris

CXCR4^{-/-} par l'équipe de D. Littman ayant montré un développement thymique normal (Zou et al., 1998). Les redondances possibles entre les différents récepteurs aux chémokines et leurs ligands pourraient expliquer ces contradictions.

La cellule souche hématopoïétique est à l'origine d'une grande variété de lignées cellulaires, allant des érythrocytes aux macrophages, en passant par les lymphocytes. Il est maintenant admis que les lymphocytes T sont issus d'un progéniteur commun à l'ensemble de la lignée lymphoïde. L'engagement de ce progéniteur vers la lignée T peut être antérieur à son entrée dans le thymus. Cependant, dans des conditions physiologiques normales, le progéniteur des lymphocytes T a besoin de l'environnement thymique pour se différencier correctement en thymocyte. Les processus en jeu impliquent un ensemble complexe de mécanismes de signalisation sous contrôle d'une balance sensible, notamment entre différents facteurs de transcription.

B. Le thymus

Le thymus est le lieu majeur de la production des lymphocytes T durant l'existence. En effet, le thymus est continuellement colonisé par les précurseurs des lymphocytes T, et ce dès la période embryonnaire, et ces précurseurs s'y différencient pour donner des cellules T matures. Le développement des lymphocytes T est permis par le micro-environnement cellulaire spécialisé, qui fournit aux thymocytes les facteurs nécessaires et les conditions adéquates. Historiquement, le rôle du thymus dans la lymphopoïèse a été démontré par des expériences de thymectomie néo-natale chez la souris (Miller, 1961). Dans ces expériences, Miller a pu observer que la thymectomie induit une diminution du nombre de lymphocytes, une susceptibilité accrue des souris aux infections et l'absence de rejet immédiat d'une greffe allogénique.

1) Organisation du thymus

a) Généralités

On peut schématiquement considérer que les deux lobes thymiques sont constitués d'une multitude de lobules, formés eux-mêmes d'une région externe, le cortex, et d'une région interne, la medulla (**Figure 4**). L'origine de ces deux régions est semble-t-il différente, même si cela reste controversé : ainsi, la région corticale pourrait être d'origine ectodermique et la région médullaire d'origine endodermique. Le thymus apparaît suite à de multiples invaginations de ces régions, qui viennent à se refermer sur elles-mêmes, aux environs du 11^{ème} jour embryonnaire chez la souris.

Le micro-environnement thymique possède une importance cruciale dans le développement des cellules T. Ainsi, les souris *nude (nu/nu)* présentent un défaut dans la formation du thymus qui empêche l'apparition de cellules T $\alpha\beta$ fonctionnelles (Jenkinson et al., 1981; Van Vliet et al., 1985). La base architecturale du thymus, appelée stroma thymique, est constituée par les cellules épithéliales du cortex et de la medulla, qui sont d'origine thymique, et par des cellules d'origine hématopoïétique. Ces cellules dérivées de la moelle osseuse – cellules dendritiques et macrophages – ne sont pas distribuées équitablement entre le cortex et la medulla. En effet, les cellules dendritiques et la plupart des macrophages sont concentrées au niveau de la medulla. La distribution de ces cellules met donc en évidence des compartiments jouant des rôles distincts dans la maturation des thymocytes (revue par (Anderson and Jenkinson, 2001; Picker and Siegelman, 1999; van Ewijk, 1991)).

Chez la souris adulte, le nombre total de thymocytes est d'environ 100 à 200 millions. De manière remarquable, le thymus est le siège d'une mort cellulaire massive touchant les thymocytes, du fait des processus de sélection thymique.

b) Quelques mots sur les cellules épithéliales thymiques

La controverse sur l'origine embryonnaire respective des cellules épithéliales du cortex et de la medulla est liée à des observations menées par N. Le Douarin & al. en utilisant le système de chimères embryonnaires entre la caille et le poulet (Le Douarin and Jotereau, 1975). Avec ce système expérimental, il a été observé que des rudiments thymiques possédant une architecture normale pouvaient se mettre en place sans contribution de l'ectoderme. Il n'est donc pas clairement défini si les cellules épithéliales du cortex et de la medulla dérivent de deux populations distinctes de précurseurs, ou bien d'un précurseur commun. Quelques études favorisent cette dernière hypothèse, grâce à l'identification de populations rares de

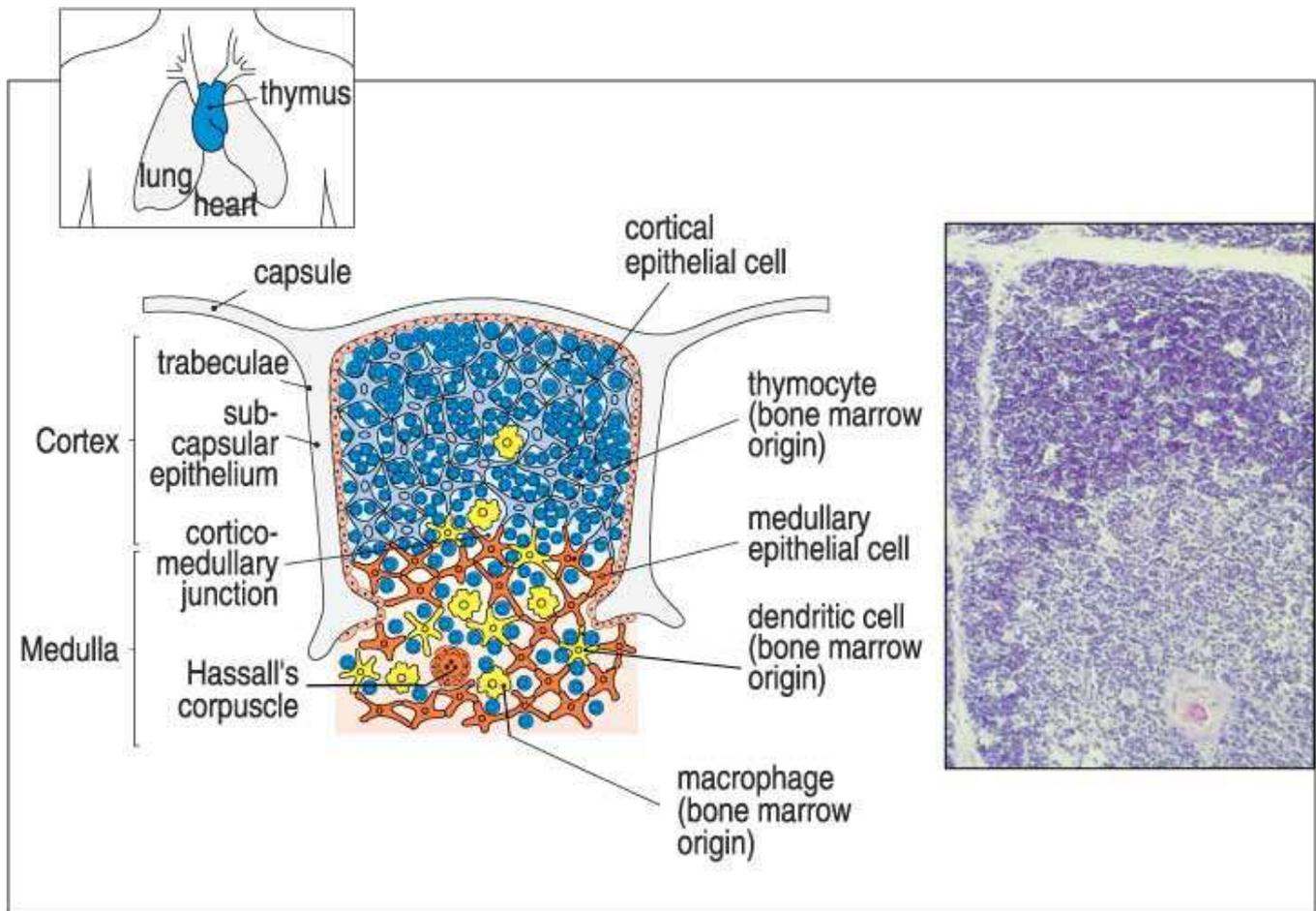


Figure 4: Organisation et architecture du thymus

Le thymus est formé par un ensemble de petits lobules délimités par une capsule. L'encart en haut à gauche montre la position du thymus chez l'homme, au dessus du cœur. Chaque lobule thymique est constitué de deux régions distinctes, le cortex externe et la medulla centrale, qui sont en contact au niveau de la jonction corticomédullaire. Le cortex contient les thymocytes immatures (bleu foncé), des cellules épithéliales corticales (bleu pâle) et quelques macrophages (jaune). A l'inverse, la medulla contient des thymocytes matures (bleu foncé), des cellules épithéliales médullaires (orange), des cellules dendritiques et des macrophages (jaune). Les corpuscules de Hassal que l'on trouve dans le thymus humain sont interprétés comme étant des sites de destruction cellulaire. L'encart de droite montre une section de thymus humain, coloré à l'hématoxyline-éosine.

(Janeway, C.A. & al., « Immunobiology - The immune system in health and disease », 5th edition, Garland Publishing)

cellules épithéliales exprimant les deux marqueurs TR4 et TR5 (Ropke et al., 1995), ou encore les kératines K5 et K8 (Klug et al., 1998), alors que l'expression de ces molécules est généralement restreinte soit aux cellules épithéliales du cortex (TR4⁺ K8⁺), soit de la medulla (TR5⁺ K5⁺). Ces populations rares pourraient donc représenter un intermédiaire immature des cellules épithéliales thymiques, mais cela reste à préciser. En bref, les mécanismes qui contrôlent le développement des cellules épithéliales du thymus sont mal connus, et cela est clairement souligné par le nombre restreint de molécules qui y ont été impliqués (revue par (Anderson and Jenkinson, 2001)).

2) Vue « géographique » du développement des thymocytes

a) Migration des thymocytes dans le thymus

La quasi totalité de la maturation des thymocytes se déroule au niveau du cortex, ce qui explique que les thymocytes immatures y soient concentrés. Toutefois, ce processus de maturation n'est pas statique, les thymocytes sont amenés à se déplacer entre les différentes régions du thymus durant leur différenciation. Pour commencer, les précurseurs les plus précoces des cellules T sont principalement trouvés dans le thymus au niveau de la région sous-capsulaire, autrement dit la région la plus externe du cortex. C'est dans cette région qu'on peut d'ailleurs mettre en évidence les thymocytes CD4⁻CD8⁻ en prolifération. Nous verrons plus tard que cette observation ne veut pas forcément dire que les progéniteurs les plus précoces pénètrent dans le thymus par cette zone. Au cours de leur différenciation, les thymocytes s'enfoncent plus profondément dans le cortex vers la medulla, et atteignent en général le stade de développement caractérisé par l'expression simultanée des deux molécules CD4 et CD8 à leur surface.

La jonction cortico-médullaire est propice aux étapes de sélection des lymphocytes T, dont nous analyserons les mécanismes dans un chapitre ultérieur. En effet, on trouve dans le stroma du cortex des cellules épithéliales, dont les caractéristiques leur permettent de jouer un rôle primordial dans la sélection des thymocytes. La medulla, notamment à proximité du cortex, contient de nombreux macrophages et cellules dendritiques, qui sont également des acteurs de cette sélection. En progressant dans leurs étapes de différenciation, les thymocytes traversent la jonction cortico-médullaire et passent dans la medulla.

L'entrée des précurseurs précoces dans le thymus et la sortie des thymocytes matures pourraient potentiellement avoir lieu au niveau de la jonction cortico-médullaire (Ceredig and Schreyer, 1984), mais cela reste discuté du fait de l'utilisation d'animaux irradiés lors de cette

ancienne observation. Pour aller dans le sens de cette hypothèse, on peut toutefois remarquer que cette zone est riche en vaisseaux. Il est donc envisagé que l'entrée des précurseurs et la sortie des cellules T matures utilise des vénules ou des vaisseaux lymphatiques se trouvant au niveau de la jonction cortico-médullaire (revue par (Prockop and Petrie, 2000)). Entre ces deux événements, les thymocytes se différencieraient tout en faisant un « aller-retour » entre la jonction cortico-médullaire et le cortex (**Figure 5**).

b) Molécules impliquées dans les mouvements intrathymiques

i- Les chémokines et leurs récepteurs

Les chémokines semblent jouer un rôle important dans la migration et/ou la rétention des thymocytes au sein de chacun des compartiments thymiques. D'un côté, les chémokines pourraient faciliter les interactions des thymocytes avec les cellules épithéliales ; d'un autre côté, les récepteurs des chémokines pourraient produire des signaux menant à l'activation des intégrines à la surface des thymocytes. Plusieurs mécanismes impliquant les chémokines et leurs récepteurs ont ainsi été mis en évidence lors de la migration des thymocytes dans le cortex, vers la jonction cortico-médullaire, puis dans la medulla (revue par (Ansel and Cyster, 2001; Norment and Bevan, 2000)).

A titre d'exemple, l'expression du récepteur CCR9 est fortement accrue chez la souris lors de la transition des thymocytes $CD4^-CD8^-$ au stade $CD4^+CD8^+$ (revue par (Norment et al., 2000)), et les mouvements des cellules $CD4^+CD8^+$ à travers le cortex sont significativement régulés par ce récepteur CCR9 et son ligand CCL25/TECK (Thymus-Expressed ChemoKine) (Youn et al., 1999). Initialement, TECK a été détecté au niveau des cellules dendritiques de la medulla (Vicari et al., 1997), mais il est maintenant démontré que cette molécule est également exprimée par les cellules épithéliales du cortex thymique (Wurbel et al., 2000). En parallèle à ce mécanisme, on note que l'expression de CXCR4, que nous avons précédemment impliqué dans la colonisation du thymus, commence à diminuer lors de la transition des thymocytes vers le stade $CD4^+CD8^+$. Inversement, l'expression de CCR5, dont les ligands CCL4/MIP-1 β et CCL5/RANTES sont exprimés dans le thymus, augmente à la surface des thymocytes (revue par (Norment and Bevan, 2000)).

On peut ainsi établir une liste de chémokines potentiellement impliquées dans la migration des thymocytes à la jonction cortico-médullaire (à titre d'exemple : le récepteur CCR4 et ses ligands CCL22/MDC, CCR4 et CCL17/TARC, CCR3 et CCL11/éotaxine, etc.), puis enfin au sein de la medulla (CCR7 et CCL21/SLC, CCR7 et CCL19/ELC, CCR9 et CCL25/TECK

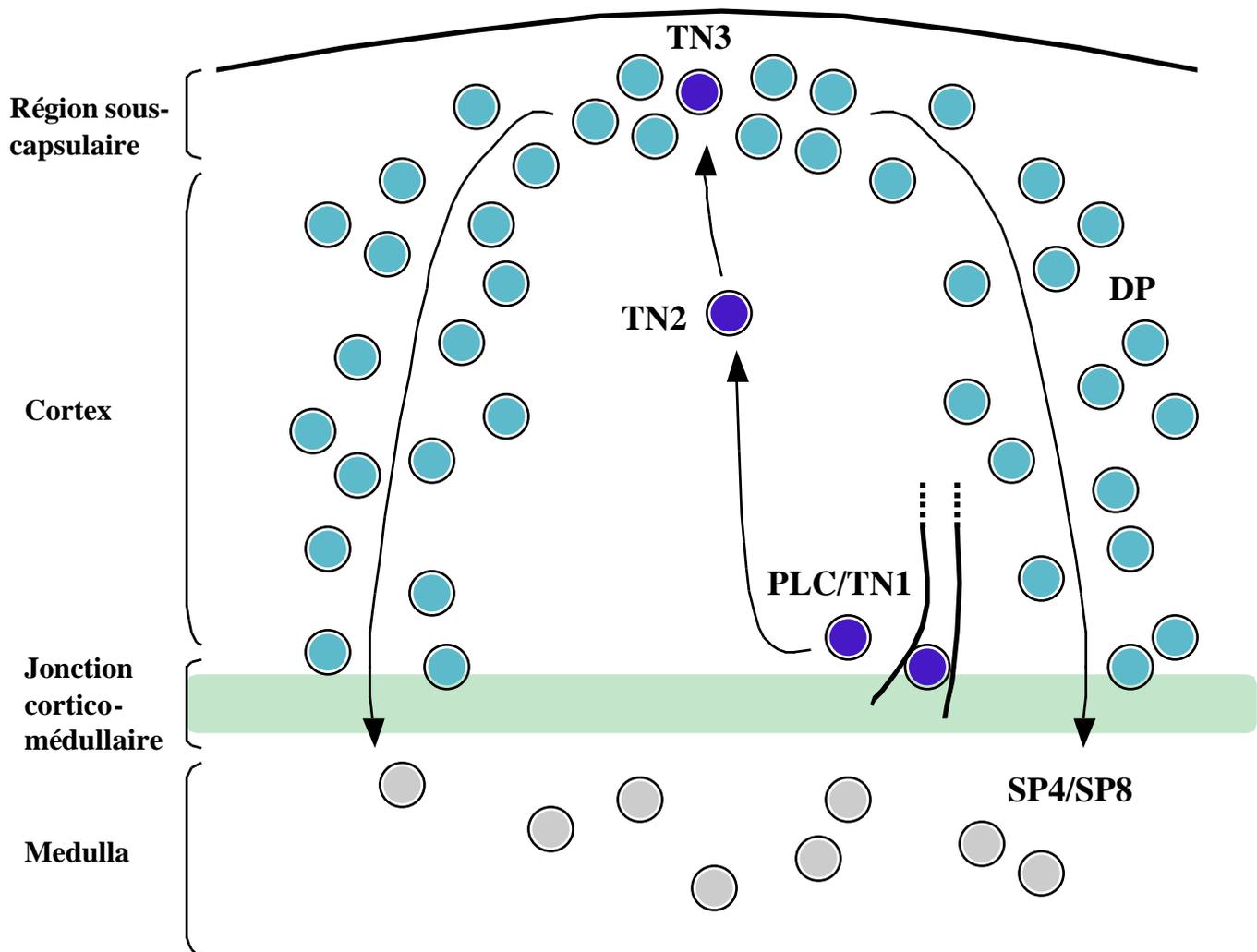


Figure 5: Schéma des mouvements intrathymiques des thymocytes

Les précurseurs (PLC/TN1) des thymocytes pénètrent dans le thymus par des vaisseaux au niveau de la jonction cortico-médullaire. Ils migrent rapidement vers la région sous-capsulaire, où sont concentrés la plupart des thymocytes TN. Au cours de la maturation au stade DP, les thymocytes engagent le chemin inverse vers la jonction cortico-médullaire. Les thymocytes SP sont majoritairement trouvés au niveau de la médulla.

(d'après Prockop & Petrie, *Semin. Immunol.*, 2000, 12: 435)

pour les lymphocytes T CD8⁺, CCR4 et CCL22/MDC pour les lymphocytes T CD4⁺, etc.) (revue par (Ansel and Cyster, 2001; Norment and Bevan, 2000)). On notera que les observations menées au niveau de la medulla font de CCR7 un bon candidat pour le mécanisme d'émigration des cellules T matures vers les organes lymphoïdes secondaires (Ueno et al., 2002). Du fait de la multiplicité des ligands et des zones d'ombre encore existantes (revue par (Zlotnik and Yoshie, 2000)), il semble probable que cette liste de couples « chémokines/récepteurs aux chémokines » impliqués dans la migration intrathymique des thymocytes soit appelée à grandir dans les années à venir.

ii- Les intégrines

D'autres molécules sont impliquées dans les processus de migration, notamment les intégrines. Ainsi, il a été montré chez l'homme que la migration des thymocytes matures vers la medulla nécessite une interaction entre les intégrines VLA-4 (Very Late Antigen) et VLA-5, exprimées par les thymocytes, et la fibronectine, exprimée par le stroma thymique. A l'inverse, l'interaction entre VLA-4 et la fibronectine chez les thymocytes immatures CD4⁺CD8⁺ induit plutôt une forte adhésion locale (Crisa et al., 1996). Ainsi, le rôle de VLA-4 évolue en fonction du stade de maturation des thymocytes. Pour donner un autre exemple d'intégrine, on peut citer $\alpha_1\beta_2$ /LFA-1 (intégrine également répertoriée sous le nom CD11 α -CD18) et un de ses ligands ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1, ou CD54), dont l'interaction a été impliquée dans la différenciation des thymocytes (Fine and Kruisbeek, 1991).

3) Concept de niche

Nous avons déjà pu nous rendre compte de la complexité des régulations qui permettent aux précurseurs des cellules T de prendre forme, et cette complexité se retrouve dans les mécanismes qui poussent les thymocytes à se différencier jusqu'à l'état de cellule T mature. L'image globale suggère qu'il existe une régulation fine de l'ensemble des processus, aidée par un certain niveau de redondance entre certains des mécanismes impliqués.

Mais, *in fine*, il faut bien admettre que pour atteindre la conclusion de la différenciation, à savoir une cellule T mature fonctionnelle, tous les intermédiaires doivent se trouver au bon endroit au bon moment afin de recevoir les signaux corrects de différenciation, de survie ou de prolifération. Ainsi, pour une cellule T donnée, qui exprime un lot unique de récepteurs variés (TCR spécifique de l'antigène, mais aussi récepteurs des chémokines, d'adhésion, de cytokines, etc.), il est nécessaire d'avoir accès à une « niche de sélection » qui procure les

ligands de ces récepteurs de façon à assurer son bon développement (Merkenschlager et al., 1994). Cette idée de niche de sélection est un premier pas vers une présentation du système immunitaire à l'image d'un écosystème complexe, composé d'une multitude de populations diverses (revue par (Freitas and Rocha, 2000)).

Le concept de niche de sélection est particulièrement important lors des étapes de sélection thymique des lymphocytes T, mais on gardera à l'esprit pour la suite qu'il s'applique également aux cellules T périphériques, qui doivent également recevoir les signaux adéquats pour mener à bien leur fonction.

Le thymus est le siège primordial de la production des lymphocytes T durant toute l'existence. L'architecture du thymus, du fait des populations cellulaires qui le compose, offre le micro-environnement capable de soutenir efficacement la différenciation et la sélection des thymocytes. Toutes ces étapes sont conditionnées par le déplacement des thymocytes au travers des différentes régions du thymus, qui fournissent les niches nécessaires à la maturation des thymocytes immatures en cellules T matures.

II. LA SÉLECTION THYMIQUE DES LYMPHOCYTES T $\alpha\beta$

La maturation des thymocytes est régulée par des programmes de différenciation intrinsèques aux cellules, par des interactions cellule-cellule, et par des facteurs solubles. Ce processus a été décortiqué avec soin depuis de nombreuses années, notamment au travers de l'expression ordonnée de multiples marqueurs cellulaires de surface (complexe TCR-CD3 ; co-récepteurs CD4 et CD8 ; molécules CD44, CD25, CD2, c-kit, etc.) et d'événements moléculaires précis (réarrangement des gènes codant pour les gènes du TCR). Nous allons nous focaliser sur la population lymphocytaire T principale, à savoir celle qui exprime un TCR composé par l'association des chaînes α et β , en mettant volontairement de côté le cas des cellules T $\gamma\delta$. Ce chapitre va successivement aborder le développement des cellules T $\alpha\beta$ de manière globale, puis les mécanismes qui amènent à l'expression du TCR, et enfin le processus de sélection des cellules T. C'est donc délibérément que nous n'aborderons pas ici quelques cas particuliers de sélection T, comme la sélection extra-thymique des cellules T $\alpha\beta$ ou la sélection des cellules NKT (se reporter aux revues récentes par (Guy-Grand and Vassalli, 2002; MacDonald, 2002)).

A. *Étapes du développement*

On peut regarder le précurseur précoce des cellules T comme n'exprimant pas de complexe moléculaire TCR-CD3, ni un des deux co-récepteurs définissant la lignée T CD4⁺ dite « auxiliaire » ou la lignée T CD8⁺ dite « cytotoxique ». Ces cellules triple-négatives (TN) (TCR-CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻) conduisent à la formation de thymocytes matures simple-positifs (SP) soit CD4⁺ (SP4), soit CD8⁺ (SP8), suivant la séquence que nous allons maintenant décrire. La masse d'information disponible sur ce sujet rend difficile la mise en place d'une synthèse exhaustive (revue par (Benoist and Mathis, 1999; Berg and Kang, 2001; Di Santo and Rodewald, 1998; Fehling and von Boehmer, 1997; Kuo and Leiden, 1999)), cette section s'attachera donc à ne faire ressortir que les étapes principales du processus, en développant plus particulièrement les étapes les plus précoces (**Figure 6**).

1) La population triple-négative

Le progéniteur thymique le plus précoce, dans l'état triple-négatif comme défini précédemment, commence par subir une succession d'étapes (TN1/2/3/4) qui l'amèneront au stade double-positif (DP), c'est-à-dire exprimant les deux co-récepteurs CD4 et CD8. L'ensemble des cellules TN forme une population hétérogène et les cellules aux stades les

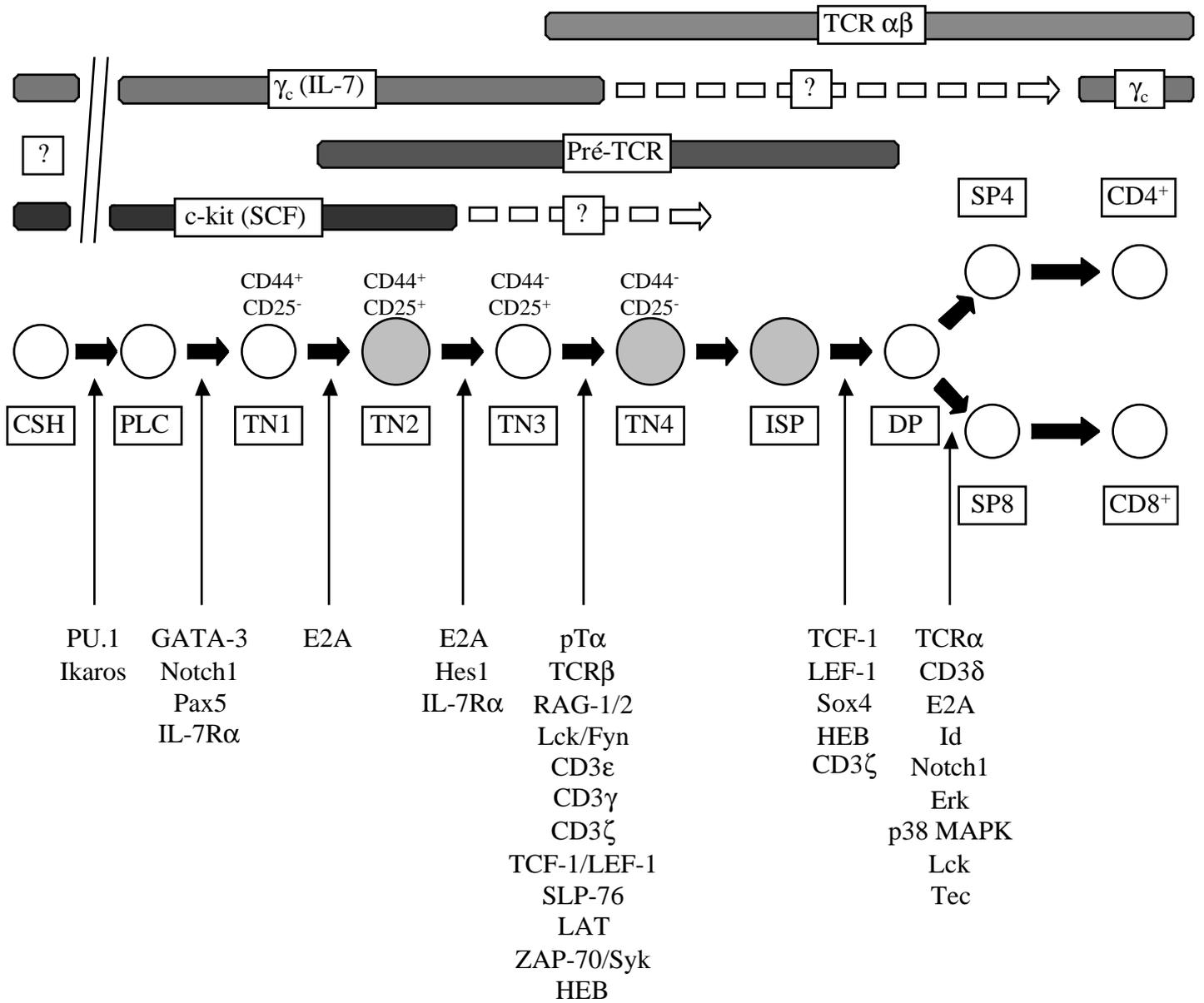


Figure 6: Etapes du développement des thymocytes

Cette figure schématise l'influence des facteurs de croissance, cytokines, éléments du TCR et facteurs intracellulaires sur le développement des thymocytes. Ces signaux sont nécessaires lors de la colonisation du thymus, la survie, l'expansion et la différenciation des thymocytes. Les cellules hachurées indiquent les stades de forte prolifération.

(d'après Di Santo & Rodewald, *Curr. Opin. Immunol.*, 1998, 10: 196 et Berg & Kang, *Curr. Opin. Immunol.*, 13: 232)

plus précoces ne sont pas encore irréversiblement engagées dans la lignée T $\alpha\beta$. La population TN représente environ 5% des thymocytes d'une souris adulte, et la durée de la maturation au stade TN est estimée à environ 2 semaines (revue par (Shortman et al., 1990)). On pourrait presque considérer que le fait de parler de cellules TN est un abus de langage puisque le précurseur le plus précoce exprime de faibles niveaux de CD4 (Wu et al., 1991b). Les thymocytes TN sont également définis comme cellules double-négatives (DN, CD4⁻ CD8⁻) mais cette dénomination peut également se référer à des populations particulières de cellules T $\alpha\beta$ TCR-CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻.

a) Analyse des marqueurs CD44 et CD25

L'analyse de la population des thymocytes TN a été affinée par l'intermédiaire de deux récepteurs cellulaires de surface, CD44 et CD25/IL-2R α (revue par (Godfrey and Zlotnik, 1993)). Comme nous l'avons déjà remarqué, le récepteur CD44 possède un rôle dans la colonisation du thymus, il est logiquement trouvé à la surface des précurseurs les plus précoces parmi les thymocytes, de phénotype TN c-kit⁺ CD44⁺ CD25⁻ (stade TN1). Nous avons déjà observé que ces cellules ne sont pas encore totalement engagées dans la lignée lymphoïde T, puisqu'elles sont capables de générer des cellules NK, des lymphocytes B et des cellules dendritiques si les conditions environnementales requises sont présentes (Ardavin et al., 1993; Matsuzaki et al., 1993; Wu et al., 1991a). On peut souligner au passage l'importance de l'utilisation de c-kit comme marqueur de la population TN1, après la mise en évidence d'une population « contaminante » de phénotype CD4⁻ CD8⁻ c-kit⁻ CD44⁺ CD25⁻ qui s'est avérée être TCR $\alpha\beta$ -CD3⁺ (Godfrey et al., 1994).

L'étape suivante est marquée par l'expression de surface du récepteur CD25 (TN c-kit⁺ CD44⁺ CD25⁺, stade TN2) et représente une population de précurseurs possédant toujours les gènes codant pour le TCR en configuration germinale (Godfrey et al., 1994). Il n'est donc pas totalement surprenant que la population TN2 conserve un potentiel de différenciation en cellules dendritiques thymiques (Wu et al., 1996). La transition entre les stades TN1 et TN2 s'accompagne d'une augmentation nette (5 fois plus) du nombre de cellules en cycle, comme le montrent des expériences d'incorporation de BrdU (Penit et al., 1995). Ce phénomène serait conduit par l'action du ligand principal de c-kit, SCF, ou encore de l'IL-7 (Rodewald et al., 1997).

Ensuite, les cellules perdent l'expression des récepteurs c-kit et, en partie, CD44 (c-kit^{-low} CD44^{low} CD25⁺, stade TN3), et acquièrent une expression forte du marqueur CD2, signe que l'engagement dans la lignée T est désormais définitif. C'est lors du passage vers ce stade TN3

que le processus génétique de mise en place du TCR se met en route, en commençant par le réarrangement des gènes codant pour les chaînes β , γ et δ du TCR. Si un réarrangement productif donne une chaîne β , un TCR temporaire (pré-TCR) est exprimé à la surface des thymocytes TN3, associant la chaîne β , spécifique du thymocyte concerné, et la chaîne pT α commune à toutes les cellules TN3. L'étape TN3, via ce processus dit de « β -sélection », représente donc un point de contrôle important pour les thymocytes, et cela est confirmé par le blocage de la différenciation constaté chez des animaux manipulés génétiquement pour empêcher l'expression des chaînes du TCR (Godfrey et al., 1994). Si aucun des deux allèles du locus β du TCR ne donne de réarrangement productif, et si le thymocyte ne peut s'engager dans la voie de différenciation des cellules T $\gamma\delta$ (revue par (Robey and Fowlkes, 1998)), la cellule est promise à une mort cellulaire. Au contraire, si le thymocyte traverse avec succès l'étape de β -sélection, et exprime à sa surface le pré-TCR, il acquiert des caractéristiques cellulaires et moléculaires de cellules en division rapide (Hoffman et al., 1996) et passe à l'étape suivante (c-kit⁻ CD44^{-low} CD25⁻, stade TN4). Cette étape de prolifération aide également les cellules à effectuer l'exclusion allélique de la chaîne β (Uematsu et al., 1988), autrement dit à empêcher que le thymocyte ne possède plusieurs réarrangements productifs des gènes codant pour la chaîne β du TCR.

b) Quelques mécanismes impliqués dans le développement des thymocytes TN

Globalement, on peut résumer les étapes du développement précoce en deux phénomènes : un processus de prolifération/survie non spécifique, et le processus de β -sélection, plus drastique puisqu'il nécessite que le thymocyte ait réarrangé les gènes de la chaîne β avec une phase ouverte de lecture productive et exprime alors un pré-TCR. Nous allons effectuer un rapide survol des principales molécules responsables du bon avancement de la différenciation des thymocytes TN, en gardant à l'esprit que la liste est loin d'être si restreinte (revue par (Berg and Kang, 2001; Kuo and Leiden, 1999)).

i- *Les récepteurs IL-7R α/γ_c et c-kit*

Il s'avère que certains des mécanismes que nous avons déjà abordés jusqu'ici pour le développement des progéniteurs précoces agissent également durant le développement des thymocytes. Ainsi, c'est le cas des voies de signalisation utilisant les récepteurs IL-7R α/γ_c et c-kit. L'IL-7 et SCF, ligand de c-kit, sont des inducteurs de prolifération chez les thymocytes immatures *in vivo* (Murray et al., 1989 ; Rodewald et al., 1995). De plus, l'IL-7 soutient la survie des thymocytes immatures en maintenant l'expression du facteur anti-apoptotique

Bcl-2 (von Freeden-Jeffry et al., 1997), si bien que le développement normal des cellules T $\alpha\beta$ peut être partiellement restauré dans les souris IL-7R $\alpha^{-/-}$ et $\gamma_c^{-/-}$ suite à l'introduction d'un transgène codant pour Bcl-2 (Akashi et al., 1997; Kondo et al., 1997a; Maraskovsky et al., 1997). Toutefois, les résultats chez ces animaux $\gamma_c^{-/-}$ Bcl2-Tg⁺ sont contestés d'une part parce qu'ils n'ont pas toujours donné ce résultat positif (Di Santo and Rodewald, 1998), et d'autre part du fait d'une totale absence d'effet bénéfique sur le développement des cellules B, T $\gamma\delta$ et NK (Kondo et al., 1997a). En conséquence, soit les cytokines γ_c -dépendantes jouent pour ces lignées lymphocytaires un rôle supplémentaire à celui du maintien de la survie cellulaire, soit le transgène codant pour Bcl-2 ne remplace pas totalement le vrai signal de survie induit par l'IL-7. Enfin, on peut signaler que le rôle de l'IL-7 dans le réarrangement des gènes α et β du TCR n'est pas clairement prouvé, mais il est difficile de bien séparer ces trois phénomènes de survie, prolifération et réarrangement des gènes du TCR, qui sont interdépendants. En bref, un scénario satisfaisant envisage que l'IL-7 agit sur les thymocytes comme agent prolifératif avant et après les réarrangements, et comme agent de survie pendant les réarrangements (revue par (Di Santo and Rodewald, 1998)).

ii- *La chaîne pT α et la β -sélection*

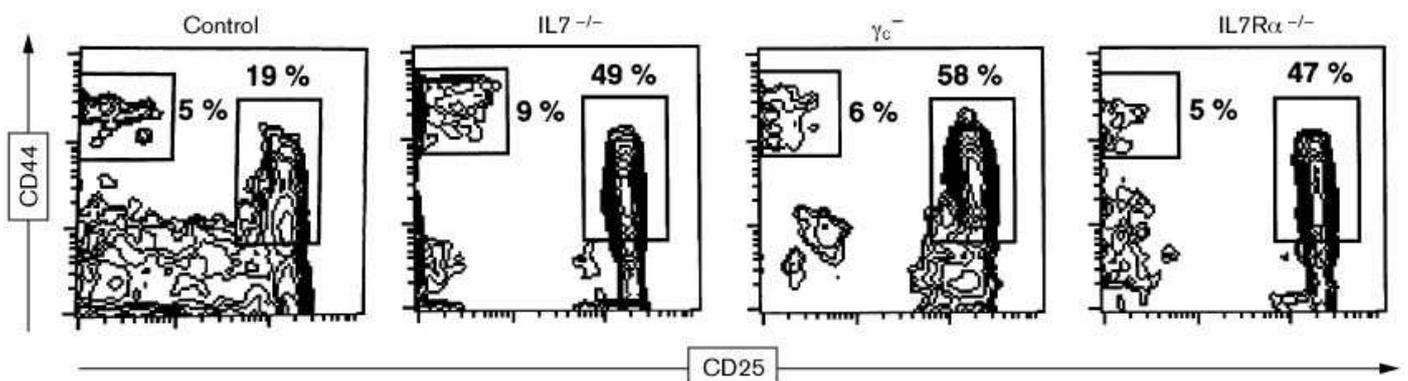
Le processus de β -sélection intervient au stade TN3 et représente un point de contrôle majeur des thymocytes immatures (revue par (von Boehmer et al., 1998)). Ce phénomène passe par l'expression de surface d'un pré-TCR, constitué par l'association entre une chaîne β du TCR fonctionnelle et la pseudo-chaîne pT α , qui transduit des signaux de manière constitutive (Saint-Ruf et al., 2000). Le gène pT α est surtout exprimé par les thymocytes aux stades TN2 et TN3 (Saint-Ruf et al., 1994), c'est-à-dire pendant les réarrangement massifs des gènes codant pour la chaîne β du TCR. Il est suggéré que la régulation de l'expression de pT α se fait de manière extrêmement fine, ce qui expliquerait les faibles quantités trouvées à la surface des thymocytes immatures et le caractère sensible de la signalisation par le pré-TCR. Ainsi, les mécanismes de contrôle de l'expression de surface du pré-TCR passeraient par sa rétention dans le réticulum endoplasmique et l'expression d'un variant de pT α sans domaine extracellulaire, ce qui empêche son adressage à la surface cellulaire (revue par (Borowski et al., 2002)).

De manière similaire à ce qui est observé chez les souris déficientes pour l'IL-7 ou les chaînes IL-7R α et γ_c (**Figure 7 ; Table 1**), la déficience pour la chaîne pT α est relativement permissive, dans le sens où le blocage du développement thymique existe mais est incomplet

Table 1 : Résumé du développement lymphoïde T dans des lignées de souris mutantes pour des cytokines et récepteurs de cytokines
(adapté de Di Santo & Rodewald, *Curr. Opin. Immunol.*, 1998, 10: 196)

Mutation	THYMUS	PERIPHERIE	Références
	T $\alpha\beta$	T $\alpha\beta$	
c-kit ^{-/-} (W/W)	\$ (40x)	\$	(Rodewald et al., 1995)
SCF ^{-/-} (SI/SI)	\$	\$	(Rodewald et al., 1995)
pT α ^{-/-}	\$ (20x à 70x)	\$	(Fehling et al., 1995) (Di Santo et al., 1999)
IL-7 ^{-/-}	\$ (20x)	\$ (10x)	(von Freeden-Jeffry et al., 1995)
IL-7R α ^{-/-}	\$* (10x à 10 000x)	\$ (10x à 15x)	(Peschon et al., 1994)
γ_c ^{-/-}	\$ (20x)	\$ (3x à 4x)	(DiSanto et al., 1995)
c-kit ^{-/-} x γ_c ^{-/-}	-	-	(Rodewald et al., 1997)
pT α ^{-/-} x γ_c ^{-/-}	-	-	(Di Santo et al., 1999)

\$ réduction (taux de réduction chez l'adulte par rapport aux animaux non mutés) ; - absents ;
* différents phénotypes ont pu être observés : les expériences de Peschon et collègues (Peschon et al., 1994) indiquent que 65% des animaux présentent un blocage complet au stade CD4⁺ CD8⁻, et que 35% des animaux sont permissifs, alors que tous les animaux sont permissifs dans d'autres études (revue par (Di Santo and Rodewald, 1998)).



Current Opinion in Immunology

Figure 7: Développement des thymocytes TN dans des souris déficientes pour la voie de signalisation de l'IL-7

Analyse de la distribution de l'expression des marqueurs CD44 et CD25 dans la population thymique CD4⁺ CD8⁻ des souris mutantes pour l'IL-7, ou les chaînes IL-7R α et γ_c . Un blocage similaire est noté chez les trois mutants lors de la transition entre les stades TN2 et TN3. Le nombre absolu des précurseurs thymiques précoces sont réduits d'environ 25x dans les mutants par rapport aux animaux contrôles.

(profils de cytométrie issus de Di Santo & Rodewald, *Curr. Opin. Immunol.*, 1998, 10: 196)

(Fehling et al., 1995). Des expériences montrent que les cytokines γ_c -dépendantes sont impliquées dans la transition des thymocytes TN $pT\alpha^+$ vers le stade DP. Ainsi, les souris γ_c^- $pT\alpha^-$ montrent un blocage du développement intrathymique au stade TN2 $CD44^+ CD25^+$ (Di Santo et al., 1999). Le cas des souris γ_c^- $c-kit^-$ est encore plus drastique car le développement des thymocytes y est totalement bloqué (Di Santo et al., 1999). L'ensemble des phénotypes observés chez ces animaux indiquent donc que des facteurs de croissance, comme le ligand de $c-kit$ SCF, permettent la différenciation des progéniteurs T jusqu'au stade TN2, et que le pré-TCR peut ensuite apporter des signaux de substitution capables de faire progresser la différenciation au delà du stade TN2, par exemple chez les animaux γ_c^- .

L'analyse des souris $pT\alpha^-$ révèle d'autres éléments sur le phénomène de β -sélection. Ainsi, chez une souris normale, les réarrangements TCR β analysés dans les cellules DP sont à 75% en phase ouverte de lecture (Mallick et al., 1993) et quasiment toutes les cellules DP expriment une chaîne β dans le cytoplasme et à la surface (Levelt et al., 1993). Chez les souris $pT\alpha^-$, le nombre de cellules DP est réduit à 10% de la valeur normale (Fehling et al., 1995), et un marquage intra-cytoplasmique révèle que seules 40% d'entre elles expriment une chaîne β (Buer et al., 1997). La chaîne $pT\alpha$ intervient donc dans un processus actif de sélection des thymocytes immatures qui possèdent un réarrangement TCR β en phase ouverte de lecture.

iii- La famille bHLH

Les facteurs de transcription de la famille bHLH (pour « basic helix-loop-helix ») possèdent un rôle majeur dans le développement neuronal, musculaire et hématopoïétique. Il existe dans cette famille des facteurs activateurs, qui poussent les cellules à se différencier, et des facteurs répresseurs, qui ont plutôt tendance à maintenir la cellule dans un état de prolifération. L'inactivation du gène codant pour le facteur Hes-1 a prouvé son importance pour le développement précoce des lymphocytes T, mais pas pour l'engagement vers la lignée T. Cette mutation étant létale, des expériences ont été menées avec des chimères de moelle osseuse, obtenues en utilisant des cellules Hes-1 $^-$ de foie fœtal comme source de CSH. Ainsi, la colonisation du thymus et l'apparition du précurseur T le plus précoce ne sont pas inhibés chez ces souris reconstituées (Tomita et al., 1999).

D'autres régulateurs transcriptionnels de cette famille, comme E2A et HEB, ont été impliqués dans l'engagement vers la lignée B (Bain and Murre, 1998), mais sont également exprimés par les thymocytes. L'inactivation des gènes *HEB* ou *E2A* provoque une réduction de 5 à 10 fois du nombre de cellules T $\alpha\beta$ dans les souris mutantes (Bain et al., 1997; Barndt et al.,

1999), avec chez les souris HEB^{-/-} un blocage notable lors de la transition vers le stade DP. En concordance avec cette observation, il a été suggéré que HEB est impliqué dans la restriction de l'expression de la chaîne pT α à la lignée T $\alpha\beta$ (Herblot et al., 2000).

Globalement, le rôle des protéines E2A et HEB est confirmé par les études de leurs inhibiteurs Id et SCL, qui appartiennent à la même famille bHLH, mais qui ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN : l'hétérodimérisation entre les protéines inhibitrices et les protéines E (E2A et HEB) empêche ces dernières d'agir sur leurs gènes cibles en bloquant leur fixation à l'ADN. Ainsi, les souris transgéniques pour Id-1, Id-2 ou SCL montrent un blocage similaire entre les stades TN et DP, et les souris déficientes pour Id-1 et Id-2 possèdent un développement thymique relativement normal (revue par (Berg and Kang, 2001)). Il existe donc sans doute une balance entre les protéines E et leurs inhibiteurs pour réguler de manière fine la prolifération et la différenciation (T $\alpha\beta$ versus T $\gamma\delta$, NK) des thymocytes lors du stade TN.

2) La population double-positif

a) Généralités

La population des thymocytes DP (CD4⁺ CD8⁺) représente, numériquement parlant, environ 80% des cellules du thymus d'une souris adulte. La plupart des cellules DP sont des thymocytes de petite taille et au repos, même si des cellules en division peuvent également être observées. On estime que les thymocytes restent environ 3 à 4 jours au stade DP (Huesmann et al., 1991).

Les thymocytes TN4, définitivement engagés dans la lignée T $\alpha\beta$, et exprimant un pré-TCR capable de transduire des signaux, évoluent vers le stade DP via une phase de transition, les thymocytes immatures simple-positifs (ISP). Ces derniers expriment soit l'un, soit l'autre des deux co-récepteurs CD4 et CD8, mais pas encore de TCR $\alpha\beta$ complet. En effet, c'est durant la transition entre le stade TN4 et le stade DP que le réarrangement des gènes codant pour la chaîne α du TCR a lieu. Cette observation est confirmée chez les souris déficientes pour l'expression de la chaîne α du TCR, le développement T chez les animaux ne pouvant exprimer de chaîne β étant bloqué plus précocement (stade TN3) lors de la β -sélection (Mombaerts et al., 1992a; Philpott et al., 1992).

L'expression de surface, d'abord faible puis forte, d'un TCR $\alpha\beta$ complet est donc en général observée dans la population DP (Ohashi et al., 1990). Cet événement important impose que les thymocytes puissent exprimer le résultat d'un réarrangement productif des gènes codant

pour la chaîne α du TCR, et que cette chaîne α s'associe correctement avec la chaîne β sélectionnée auparavant via le pré-TCR. A ce point, les thymocytes DP doivent alors traverser un « contrôle de qualité » qui doit répondre à deux contraintes : les TCR testés doivent dans une certaine mesure reconnaître le soi, mais les thymocytes portant un TCR « dangereux » pour le soi doivent être éliminés. Il s'agit donc pour les thymocytes de traverser les étapes d'une sélection positive et d'une sélection négative, qui conduisent à l'élimination d'une écrasante majorité d'entre eux (Shortman et al., 1990). Ces étapes de sélection, dont les mécanismes seront détaillés dans la troisième section de ce chapitre, permettent également aux thymocytes de s'engager plus en avant dans la différenciation vers la lignée soit des cellules T CD4⁺, soit des cellules T CD8⁺.

b) Quelques molécules impliquées dans la différenciation vers le stade DP

De nombreux facteurs de transcription ont été identifiés comme étant essentiels pour le passage des thymocytes au stade DP . En guise d'exemple, on peut citer le cas des deux facteurs de transcription LEF-1 (Lymphoid Enhancer-binding Factor-1) et TCF-1 (T Cell Factor-1). LEF-1 et TCF-1 sont exprimés dans un grand nombre de tissus durant le développement embryonnaire, puis cette expression se restreint aux lymphocytes après la naissance (Oosterwegel et al., 1993). Le facteur TCF-1 peut interagir avec une séquence nucléotidique consensus trouvée notamment dans les régions régulatrices des gènes codant pour CD3- ϵ , TCR α , TCR β et TCR δ (Oosterwegel et al., 1991), et des exemples similaires ont été identifiés pour LEF-1 (revue par (Kuo and Leiden, 1999)). Il a été constaté que ces deux facteurs de transcription se révèlent importants lors du développement des thymocytes, en particulier lors de la transition entre les stades TN2 et TN3, et plus fortement encore entre les stades ISP et DP (Okamura et al., 1998). Ainsi, LEF-1 et TCF-1 sont impliqués dans l'expansion des thymocytes TN et dans leur différenciation en cellules DP. Toutefois, les mécanismes d'action de ces facteurs de transcription ne sont pas encore totalement élucidés, et leurs gènes cibles pas encore clairement identifiés.

On retrouve également à ce stade des facteurs de transcription de la famille bHLH, et plus particulièrement les protéines E2A et HEB (revue par (Quong et al., 2002)). Nous avons déjà indiqué que la balance entre les différentes protéines E et leurs inhibiteurs joue sans doute un rôle d'importance dans la différenciation précoce des précurseurs de la lignée lymphoïde. Le phénotype des souris déficientes pour E2A en donne une autre illustration. En effet, ces animaux possèdent une population DP amoindrie et montrent de plus un biais sensible vers la population de cellules SP8 (Bain et al., 1997). Cet effet du dosage de E2A sur la sélection

positive des thymocytes semble donc particulièrement important pour la différenciation en thymocytes matures CD8⁺. L'analyse des souris déficientes à la fois pour l'expression de E2A et de RAG-1, enzyme nécessaire pour le réarrangement des gènes du TCR, se révèle particulièrement intrigante (Engel et al., 2001). En effet, on y observe une progression inattendue, puisque ayant lieu indépendamment du pré-TCR, des thymocytes vers le stade DP. De plus, on note l'apparition d'une population de thymocytes CD4⁻ CD8⁺, de taille cependant réduite. En revanche, l'absence de thymocytes simple-positifs CD4⁺ CD8⁻ dans ce système semble indiquer que d'autres signaux sont impliqués dans la différenciation des cellules T CD4⁺.

3) Les populations simple-positives

Le stade simple-positif est la phase finale de maturation des thymocytes, qui prend place au niveau de la jonction cortico-médullaire et de la médulla. Dans ce micro-environnement, les thymocytes SP sont mis en contact avec des cellules particulières de l'épithélium médullaire. Ces contacts pourraient permettre d'effectuer une étape supplémentaire de sélection négative, en plus de celle ayant lieu au stade DP à la jonction cortico-médullaire. Cependant, l'impact exact de cette dernière étape de sélection sur les thymocytes SP pourrait s'avérer mineure en ne touchant que les moins matures des thymocytes SP, comme cela a été suggéré dans le cas des cellules TCR-CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ (SP4) (Kishimoto and Sprent, 1997). En fin de parcours, les cellules T matures obtenues sont prêtes à sortir du thymus et à rejoindre les organes lymphoïdes périphériques.

Les deux populations simple-positives matures, soit TCR-CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ (SP4), soit TCR-CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺ (SP8), représentent à elles-deux environ 15% des thymocytes d'une souris adulte. Chez les souris de la lignée C57Bl/6, on note un ratio SP4/SP8 proche de 2, mais il s'avère que ce ratio varie selon les lignées (Kraal et al., 1983) ou encore selon les individus chez l'homme (Amadori et al., 1995). Enfin, il est estimé que la différenciation prend à ce stade au maximum deux semaines supplémentaires (revue par (Scollay and Godfrey, 1995)). Au final, entre la colonisation du thymus par le progéniteur T le plus précoce et la sortie de lymphocytes T matures, il aura fallu attendre environ 3 à 4 semaines.

La différenciation des thymocytes immatures en cellules T matures prêtes à être exportées hors du thymus peut être divisée en une succession d'étapes discrètes. Ces étapes sont notamment caractérisées par l'expression à la surface des co-récepteurs CD4 et CD8, et des chaînes formant le complexe TCR $\alpha\beta$ -CD3. L'évolution le long de la séquence TN (1-2-3-4) \rightarrow ISP \rightarrow DP \rightarrow SP4/SP8 implique que les thymocytes reçoivent des signaux de survie et de différenciation adéquats. A titre indicatif, il est estimé que le précurseur thymique le plus précoce mettra environ 3 à 4 semaines avant de devenir une cellule T mature.

B. Le récepteur des cellules T (TCR)

Le TCR est la clef de l'activité des cellules T dans leur action contre les pathogènes. En effet, cette molécule permet aux lymphocytes T de reconnaître des antigènes étrangers qui lui sont présentés dans un contexte particulier. Le TCR possède d'ailleurs un certain nombre de points communs, génétiques ou structuraux, avec les immunoglobulines (Ig), c'est-à-dire les récepteurs des lymphocytes B (revue par (Davis and Chien, 1999)).

Nous allons maintenant examiner les mécanismes génétiques qui permettent à l'organisme de générer le TCR $\alpha\beta$ propre à chaque lymphocyte. Puis, nous verrons quels sont les partenaires moléculaires formant le complexe du TCR et comment les deux chaînes α et β du TCR sont amenées à être exprimées à la surface des cellules T.

1) La construction du TCR $\alpha\beta$

a) L'organisation des gènes du TCR $\alpha\beta$

Dans leur action contre une multitude de pathogènes, les lymphocytes T doivent fournir un répertoire d'une variabilité poussée à l'extrême. Ainsi, l'ensemble des cellules T est constitué par la juxtaposition d'un grand nombre de clones T exprimant chacun un TCR précis. Ceci est rendu possible par une combinatoire de segments de gène, qui sont associés les uns aux autres. Ce système est génétiquement intéressant car il permet une économie d'espace en sortant du schéma classique « un gène \rightarrow un TCR ». En effet, la diversité du répertoire qui peut être construit n'est pas dû à un grand nombre de gènes codant chacun pour un TCR donné, mais à la combinaison d'un nombre limité d'éléments.

i- Locus TCR α/δ

Le locus contenant les segments de gène codant pour la chaîne α du TCR présente la particularité d'être situé de part et d'autre du locus codant pour la chaîne δ (**Figure 8**). Cette organisation est retrouvée chez l'homme et la souris, avec une taille similaire d'environ 1,1Mb (Boysen et al., 1997). Le locus TCR α contient (1) 70 à 80 segments variables V α , mélangés avec une quinzaine de segments V δ ; (2) une soixantaine de segments de jonction J α , dont au moins 8 ne sont pas fonctionnels ; (3) et enfin un segment de gène constant C α , commun à toutes les chaînes α et composé de 4 exons (Arden et al., 1995; Koop et al., 1992; Winoto et al., 1985).

La chaîne α du TCR est formée en associant les uns aux autres un segment V α , un segment J α et le segment commun C α . Comparativement aux locus codant pour les chaînes lourde (H) et légères (κ , λ) des Ig, et qui affichent respectivement 6 segments J_H, 5 J κ et 3 J λ , on observe que le locus TCR α est riche en segments J. Ceci débouche sur une influence accrue des segments J α dans la génération de la diversité des chaînes α du TCR. Enfin, suivant leur degré d'homologie, les segments V α sont regroupés dans des familles identifiées à l'aide d'anticorps spécifiques. Usuellement, on utilise donc le nom de la famille de segment V pour nommer des sous-populations de lymphocytes T dont le TCR est formé avec ledit segment.

ii- Locus TCR β

Globalement, la structure du locus TCR β est similaire à celle du locus TCR α , à quelques différences près (**Figure 8**). Sa taille s'élève à 685 kb chez l'homme (Rowen et al., 1996). On retrouve les trois types de segments V β , J β et C β mais également des segments de diversité D β . On compte environ une vingtaine de segments V β chez la souris (Arden et al., 1995), contre une cinquantaine chez l'homme. L'organisation du locus est moins linéaire en comparaison avec le locus TCR α , du fait de la présence de deux groupes 1D β -6J β -1C β en tandem. Chez la souris, les deux segments C β sont identiques alors que les 12 segments J β (6 par groupe) présentent peu d'homologie entre eux (Gascoigne et al., 1984; Malissen et al., 1984). La séquence d'association des segments pour former la chaîne β du TCR est V β -D β -J β -C β .

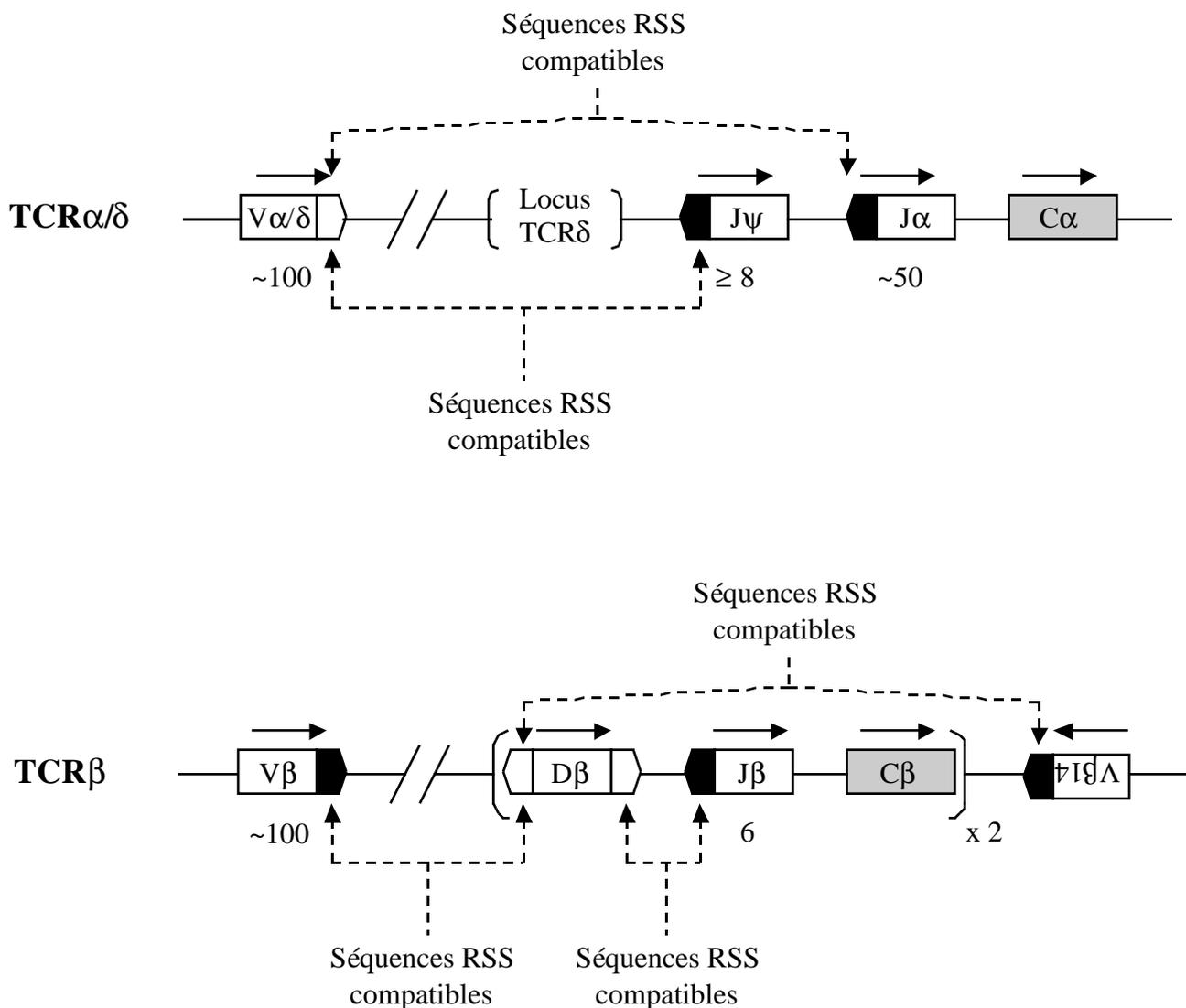


Figure 8: Organisation des gènes codant pour les chaînes α et β du TCR

L'organisation des locus TCR α et TCR β est similaire chez l'homme et la souris. Dans les deux cas, on note que le locus TCR δ est niché dans le locus TCR α . L'emplacement des segments de gènes variables (V), de jonction (J), de diversité (D) et constants (C) sont indiqués, ainsi que leur nombre. J ψ indique un segment J non-fonctionnel (pseudo-gène). Les séquences RSS sont placées aux extrémités des segments (en blanc: « spacer » de 12bp; en noir: « spacer » de 23bp). Un événement de réarrangement ne peut avoir lieu qu'entre deux RSS compatibles (règle du 12/23). Les flèches placées au-dessus des segments de gène indiquent leur orientation de transcription.

b) La machinerie de réarrangement des gènes du TCR $\alpha\beta$

i- *Le mécanisme du réarrangement V(D)J*

Le réarrangement des segments de gène codant pour les deux chaînes α et β du TCR se déroule au niveau somatique, en suivant un ordre précis, similaire à ce qui est observé dans le cas du réarrangement des gènes codant pour les Ig (revue par (Fugmann et al., 2000; Grawunder et al., 1998; Krangel et al., 1998)). Durant le processus de recombinaison V(D)J – les segments de diversité D n'interviennent que dans le cas de la chaîne β –, un exon codant pour la partie variable du TCR est monté de toute pièce via l'association entre un segment V, un segment D et un segment J. Dans le cas des chaînes α du TCR, les segments de gènes V et J sont joints directement.

Les réarrangements du locus TCR β ont lieu avant ceux du locus TCR α (Raulet et al., 1985). Initialement, le progéniteur thymique le plus précoce (CD4^{low}) possède généralement les 4 locus α , β , δ et γ du TCR en configuration germinale (Wu et al., 1991b), même si nous avons déjà vu précédemment que certaines populations de pro-thymocytes peuvent présenter des réarrangements limités du locus TCR β (Rodewald et al., 1994). Ainsi, c'est tout d'abord le locus TCR β qui est réarrangé en deux étapes durant la transition entre les stades TN2 et TN3 des thymocytes. La première étape associe un segment D β à un segment J β , puis la seconde étape un segment V β au segment DJ β . Après l'étape de β -sélection, et pendant la transition vers le stade DP, c'est le locus TCR α qui subit le processus de réarrangement.

La réaction de recombinaison est menée par un complexe enzymatique qui assure son caractère site-spécifique. En effet, des séquences-signal de recombinaison (RSS) flanquent les segments V, D et J et sont reconnues par la machinerie de recombinaison. Chaque RSS consiste en une séquence contenant deux palindromes – un heptamère, et un nonamère riche en bases A/T – séparés par une région appelée « spacer » formée soit de 12 paires de bases (bp), soit de 23 bp (Tonegawa, 1983). Un événement de recombinaison respecte en général la règle dite du « 12/23 bp », c'est-à-dire qu'il se déroule entre deux RSS possédant deux « spacer » de taille différente. On trouve de telles séquences RSS autour des segments de gène V, D, et J codant pour les chaînes α et β du TCR (**Figure 8**) (Chien et al., 1984; Kavalier et al., 1984).

Il semble que le même complexe enzymatique soit impliqué dans les deux processus de réarrangement des gènes du TCR et des Ig. La réaction est initiée par les deux enzymes RAG-1 (Recombination Activating Gene-1) et RAG-2 exprimées uniquement dans les

cellules de la lignée lymphoïde. Le caractère indispensable de ces deux enzymes est confirmé par le phénotype des souris déficientes pour l'expression de RAG-1 (Mombaerts et al., 1992b) ou de RAG-2 (Shinkai et al., 1992), chez lesquelles le développement des lymphocytes T et B est totalement bloqué au stade précoce TN3. Les enzymes RAG-1 et RAG-2 sont impliquées dans la coupure double-brin de l'ADN au niveau de l'heptamère des RSS (McBlane et al., 1995). Bien qu'elles soient capables de le faire sans aide, RAG-1 et RAG-2 voient leur efficacité de clivage améliorée par d'autres partenaires du complexe de recombinaison, comme HMG-1 (High-Mobility Group) (van Gent et al., 1997). Après la coupure double-brin de l'ADN, le complexe enzymatique de recombinaison joint entre eux les deux segments de gènes d'une part (« coding joint »), et les deux séquences signal RSS d'autre part (« signal joint »). Les partenaires principaux du complexe durant ces étapes sont la protéine DNA-PK (DNA-dépendant Protein Kinase) et l'hétérodimère Ku70/Ku86, mais un certain nombre de nucléases, de DNA polymérase et la DNA ligase IV participent également au processus, en assurant par exemple la fermeture des deux brins d'ADN et la complémentarité entre ces brins (revue par (Grawunder et al., 1998)).

ii- Excision ou inversion d'ADN

En règle générale, on obtient après le réarrangement un produit contenant le « signal joint », et qui se présente sous la forme d'un cercle d'ADN excisé du locus. Ces cercles d'excision sont observés aussi bien après réarrangement des gènes codant pour la chaîne α (Fujimoto and Yamagishi, 1987) que pour la chaîne β (Okazaki et al., 1987). Cela n'est pas sans conséquence, par exemple le réarrangement du locus TCR α implique la délétion pure et simple des segments de gène codant pour la chaîne δ du TCR.

Globalement, les deux locus TCR α et TCR β sont organisés de telle sorte que l'orientation de la transcription est identique pour tous les segments de gène. Pour effectuer le réarrangement, il faut donc bien éliminer une partie du locus via les cercles d'excision d'ADN. Le cas du segment V β 14 sort de l'ordinaire car il est situé à l'extrémité 3' du locus TCR β et son orientation de transcription est inversée. Dans ce cas, le processus de réarrangement est fait par inversion (Malissen et al., 1986), autrement dit par retournement d'un ou des deux groupes de segments D β -J β -C β au sein du locus (**Figure 9**).

iii- Expression des enzymes RAG et réarrangements secondaires

Nous avons vu que les réarrangements concernent d'abord le locus TCR β , durant la transition entre les stades TN2 et TN3, puis le locus TCR α lors du stade DP. Ces observations sont à

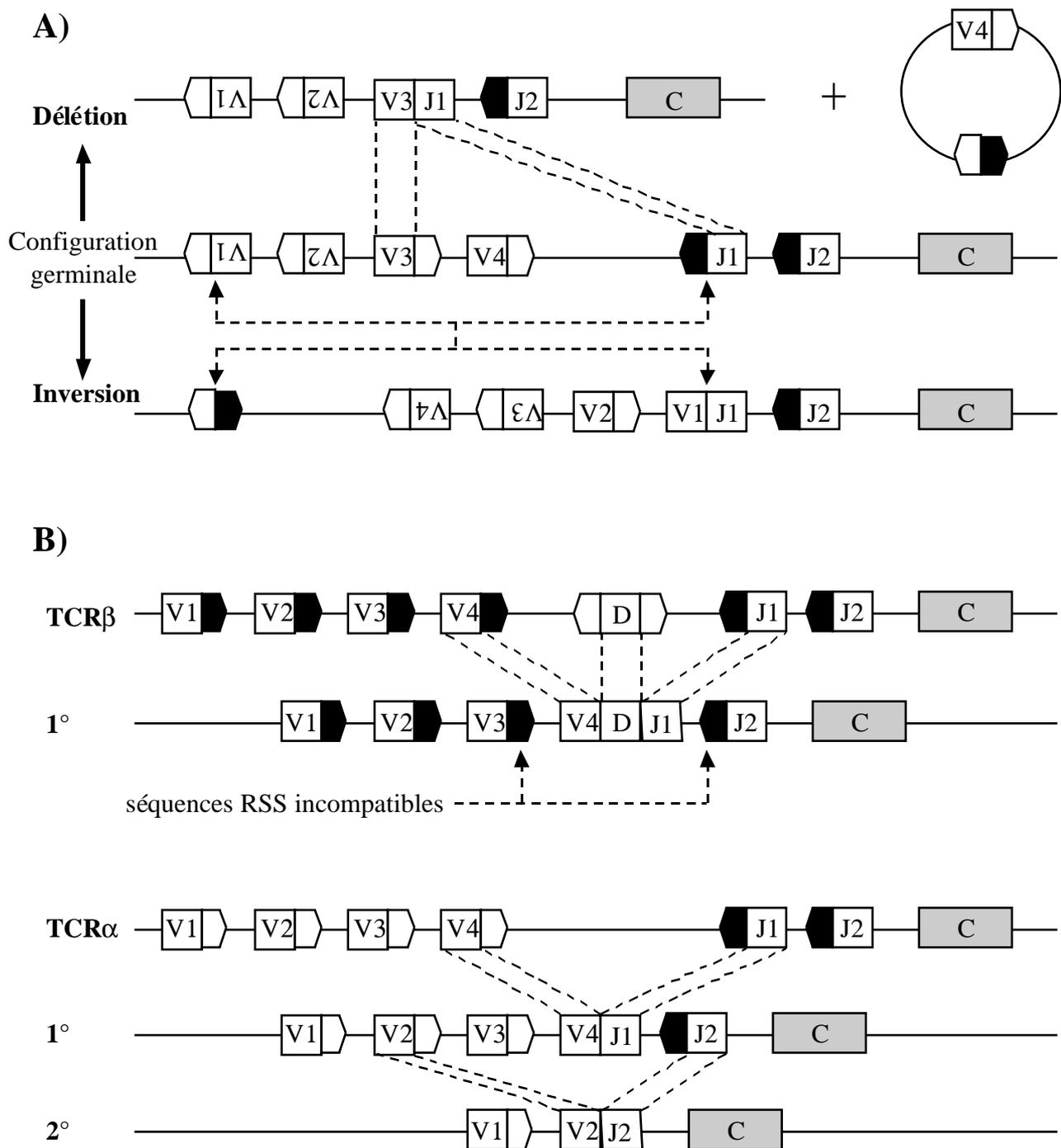


Figure 9: Réarrangements: conséquences et possibilités ultérieures

A) Si les deux segments de gène possèdent la même orientation de transcription, l'événement de réarrangement se produit par déletion d'une portion du locus. Ce type de réarrangements produit un cercle d'excision d'ADN contenant le « coding joint » et, potentiellement, les segments de gène se situant entre les segments utilisés. Alternativement, le réarrangement se fait par inversion du locus, sans perte de matériel. B) Les réarrangements secondaires sont rares au locus TCR β , du fait de l'existence de seulement deux segments D. Au contraire, il existe au locus TCR α de nombreuses possibilités de réarrangements secondaires.

(d'après Nemazee, Annu. Rev. Immunol., 2000, 18: 19)

mettre en corrélation directe avec deux vagues successives d'expression des enzymes RAG-1 et RAG-2 (revue par (Nagaoka et al., 2000)). Ainsi, l'expression des gènes *RAG* est effectivement détectée en premier lieu dans les thymocytes lors de la transition entre les stades TN2 et TN3, puis pendant la transition vers le stade DP (Godfrey et al., 1994; Wilson et al., 1994). L'expression des enzymes RAG est réprimée lors de la sélection positive des thymocytes, c'est-à-dire après que les cellules aient reçu un signal transduit par un TCR complet à la surface (Brandle et al., 1992; Turka et al., 1991).

En revanche, si un premier réarrangement produit une jonction hors du cadre de lecture, et est autrement dit non fonctionnel, la sélection positive du thymocyte ne peut pas avoir lieu. L'expression des enzymes RAG n'est alors pas réprimée et il est possible que le thymocyte mène un ou plusieurs réarrangements secondaires, sur le même allèle ou bien sur le second (revue par (Nemazee, 2000)). Cependant, cela ne se déroule que si l'organisation du locus γ est favorable du fait de la présence de séquences RSS compatibles. Chaque thymocyte possède ainsi plusieurs chances de donner lieu à un réarrangement productif. Le locus TCR α se prête volontiers aux réarrangements secondaires (**Figure 9**), qui peuvent avoir lieu entre un segment V α situé en amont (5') du premier V α utilisé, et un segment J α en aval (3') du premier segment J α utilisé. On notera que c'est en général le segment J α le plus en 5' du locus, c'est-à-dire le plus proche des segments V α , qui est utilisé préférentiellement lors du premier réarrangement, ce qui permet d'autant plus de réaliser des réarrangements secondaires (Thompson et al., 1990). A l'inverse, le locus TCR β est peu compatible avec ce procédé (**Figure 9**), étant donné que les RSS ne permettent pas de recombinaison entre les segments V β et J β , et que le nombre de segments D β disponibles est très limité. L'analyse de cercles d'excision d'ADN du locus TCR β montre cependant que cet événement rare est possible (Okazaki et al., 1987).

Une hypothèse récente suggère que la ré-expression des enzymes RAG au stade DP ne serait nécessaire que pour réaliser les réarrangements secondaires (Yannoutsos et al., 2001). Pour arriver à cette conclusion, l'équipe de M. Nussenzweig a utilisé des souris RAG-déficientes transgéniques pour un YAC (Yeast Artificial Chromosome) contenant les deux gènes RAG. Cependant, il manque dans la séquence du YAC un élément de régulation en *cis* nécessaire pour la ré-induction des enzymes RAG (Yu et al., 1999). En conséquence, l'expression des gènes *RAG* est fortement réduite (1-2% des niveaux normaux d'ARN messagers) au stade DP. Cela n'empêche pas les animaux transgéniques d'opérer des réarrangements V α -J α , de posséder un compartiment thymique DP de taille normale et des populations SP4/SP8, certes

réduites (30 à 50% de la taille normale). Il s'avère que les segments J α utilisés sont les plus en 5' du locus. Ainsi, les recombinaisons initiales au locus TCR α ont lieu en l'absence des enzymes RAG, mais ces dernières sont essentielles pour les réarrangements secondaires, qui composent la majorité (65%) des réarrangements trouvés dans les cellules T matures (Yannoutsos et al., 2001).

Enfin, plusieurs lignées de souris transgéniques pour un gène rapporteur de l'expression des gènes *RAG* indiquent que les deux enzymes ne sont pas trouvées dans les cellules T matures (Monroe et al., 1999; Yu et al., 1999). Un groupe a cependant rapporté une ré-expression des gènes *RAG-1* et *RAG-2* chez des souris transgéniques pour une chaîne β du TCR, et soumises à l'exposition chronique d'un superantigène spécifique de cette chaîne β (McMahan and Fink, 1998).

iv- Génération de diversité supplémentaire

Comme nous l'avons déjà dit, le premier degré de contribution à la diversité du répertoire des cellules T est fourni par la combinatoire d'association potentielle entre les segments de gène V, D et J. Toutefois, cela ne suffit pas pour générer toute la diversité du répertoire observée chez la souris adulte ou l'homme, d'autres mécanismes interviennent pour augmenter le nombre de TCR différents théoriquement synthétisables (revue par (Max, 1999)). Ainsi, le processus de recombinaison est lui-même générateur de diversité car les étapes de jonction V α -J α , D β -J β et V β -D β sont relativement lâches quant à la position exacte de la jonction de recombinaison, ce qui induit des glissements dans la séquence (nucléotides P). De plus, la jonction entre les segments n'est pas forcément directe et la machinerie de recombinaison peut permettre l'ajout de nucléotides entre les segments de gènes. Il s'agit du mécanisme de N-addition, dont la TdT (Terminal deoxynucleotide Transferase) est responsable. Cette enzyme, spécifiquement détectée dans les cellules de la lignée lymphoïde, n'est synthétisée qu'à l'âge adulte, ce qui fait que les animaux déficients pour la TdT présentent un répertoire réduit, de type embryonnaire (Gilfillan et al., 1993; Komori et al., 1993). Ainsi, d'après une analyse extensive du répertoire disponible chez les souris TdT^{0/0}, Cabaniols et al. estiment que la TdT contribue à hauteur de 90% à la diversité du répertoire TCR $\alpha\beta$ (Cabaniols et al., 2001). Enfin, l'appariement entre les chaînes β et les chaînes α du TCR contribue également à augmenter la diversité du répertoire exprimé par les lymphocytes T, même si toutes les combinaisons ne sont pas possibles du fait de contraintes structurales.

Le domaine variable de chacune des chaînes du TCR $\alpha\beta$ contient donc une région de haute diversité, nommée CDR3 (Complementarity Determining Region-3), située au niveau des

jonctions de segments de gène, similairement aux polypeptides formant les Ig (Davis and Bjorkman, 1988). Comme l'ont montré certaines études structurales, la région CDR3 joue un rôle primordial dans l'interaction entre (a) le TCR et (b) le complexe formé par les peptides antigéniques et les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) (Garboczi et al., 1996; Garcia et al., 1996). Chez l'homme, la région CDR3 des deux chaînes α et β possède une longueur moyenne d'environ 8 acides aminés, alors que la comparaison de cette région entre les chaînes IgH/IgL ou TCR γ /TCR δ montre de grandes différences (Rock et al., 1994).

2) L'exclusion allélique

a) Exclusion allélique de la chaîne TCR β

Le locus TCR β est sujet à l'exclusion allélique (revue par (Khor and Sleckman, 2002; von Boehmer et al., 1998)). Autrement dit, les thymocytes sont sous le contrôle d'un mécanisme qui les empêche de posséder plusieurs réarrangements productifs des gènes codant pour la chaîne β du TCR. Ainsi, chez l'homme, on estime que seuls environ 1% des lymphocytes T $\alpha\beta$ expriment deux chaînes β différentes à leur surface (Davodeau et al., 1995; Padovan et al., 1995). Une proportion similaire a été trouvée chez la souris (Balomenos et al., 1995). L'analyse des réarrangements V β -D β -J β chez des clones T $\alpha\beta$ murins spécifiques pour un peptide de *Plasmodium berghei* a montré que 60% d'entre eux ont un locus TCR β en configuration germinale, et que les 40% restants ont un réarrangement productif et un non-productif au second locus (Casanova et al., 1991). Autrement dit, aucun des clones analysés ne possédaient deux réarrangements TCR β productifs. Il apparaît donc que le réarrangement du locus TCR β n'a pas lieu simultanément pour les deux allèles.

Quel rôle le pré-TCR joue-t-il dans l'exclusion allélique de la chaîne β du TCR ? Nous avons vu que la signalisation par le pré-TCR permet de procéder à la β -sélection et d'initier la prolifération des thymocytes ainsi sélectionnés (Hoffman et al., 1996). Comme nous l'avons déjà souligné, cette étape de prolifération aide également les cellules à effectuer l'exclusion allélique de la chaîne β en permettant l'expansion des clones β -sélectionnés. En comparant les réarrangements dans des thymocytes transgéniques (Tg) pour une chaîne TCR β et exprimant (pT $\alpha^{+/+}$) ou non (pT $\alpha^{-/-}$) le pré-TCR, Xu et al. n'ont relevé aucune différence (Xu et al., 1996). Ces résultats ont été affinés, et il a été observé que d'autres animaux TCR β -Tg⁺ pT $\alpha^{-/-}$ montrent une suppression incomplète (à hauteur de 90%) des réarrangements des segments de gène endogènes (Krotkova et al., 1997).

Ces résultats indiquent que le pré-TCR joue un rôle réduit dans l'exclusion allélique de la chaîne β du TCR, mais il a été rapidement estimé que l'introduction d'un transgène TCR β est potentiellement générateur d'artefacts du fait d'une différenciation « forcée » des thymocytes. Ces expériences ont donc été répétées dans un système non Tg pour le TCR et les résultats obtenus ont infirmé les précédentes conclusions. L'approche expérimentale consistait à comparer les réarrangements au locus TCR β par PCR (Polymerase Chain Reaction) sur cellules uniques (« single cell PCR ») isolées parmi des thymocytes TN3 pT α^+ ou pT α^- (Aifantis et al., 1997). En utilisant ce système plus proche de la physiologie, il a été montré que l'exclusion allélique au locus TCR β n'a pas lieu en l'absence de pré-TCR puisque 35% des cellules TN3 pT α^- possèdent deux allèles TCR β en phase ouverte de lecture. Au final, ces expériences soulignent donc l'importance de pT α dans le phénomène de l'exclusion allélique du TCR β .

Les voies de signalisation impliquées dans ce processus commencent à être identifiées, et il est par exemple connu que l'exclusion allélique du locus TCR β est abolie chez les souris déficientes pour des protéines impliquées au niveau du complexe du TCR (CD3 ϵ , CD3 ζ/η , p56^{lck}), ou encore pour des protéines adaptatrices comme SLP-76. Toutefois, il est suggéré que les voies de signalisation impliquées dans l'exclusion allélique sont distinctes de celles menant à la prolifération et la maturation des lymphocytes T matures (revue par (Pivniouk and Geha, 2000)). Enfin, on peut signaler que la répression de l'expression des enzymes RAG après le stade TN3 (Wilson et al., 1994) participe à l'exclusion allélique en empêchant d'autres réarrangements ultérieurs.

b) Inclusion allélique de la chaîne TCR α

A l'inverse de ce qui est observé avec la chaîne β , il n'est pas rare d'observer *in vivo* un grand nombre de cellules T $\alpha\beta$ possédant deux réarrangements productifs au locus TCR α , et exprimant deux chaînes α à leur surface (Casanova et al., 1991; Heath et al., 1995; Padovan et al., 1993). En tout cas, la plupart des clones T analysés montrent que les deux locus TCR α subissent des réarrangements et qu'environ 30% d'entre eux possèdent deux réarrangements en phase ouverte de lecture (revue par (Malissen et al., 1992)). On parle dans ce cas d'inclusion allélique, en opposition à l'exclusion allélique. On peut préciser toutefois qu'un certain degré d'exclusion allélique « phénotypique » de la chaîne α existe. En effet, un thymocyte possédant deux réarrangements productifs au locus TCR α peut finalement n'exprimer qu'une seule chaîne α en surface, du fait de la compétition lors de l'association

avec la chaîne β ou de contraintes structurales (Gabert et al., 1987; Gascoigne and Alam, 1999; Saito et al., 1989).

c) Cas des souris transgéniques pour les chaînes α et/ou β du TCR

Plusieurs modèles de souris transgéniques pour les chaînes α et β du TCR ont été générés pour décortiquer le processus de l'exclusion allélique (revue par (von Boehmer, 1990)). Ainsi, il a été montré que l'introduction d'un transgène codant pour une chaîne β déjà réarrangée induit le blocage des réarrangements endogènes (Uematsu et al., 1988). De plus, la présence d'un transgène TCR β , chez les souris déficientes pour l'expression de RAG, permet aux thymocytes de passer la β -sélection et de se différencier jusqu'au stade DP (Shinkai et al., 1993). A l'inverse, la présence d'un transgène codant pour une chaîne TCR α n'empêche pas le réarrangement des locus TCR α endogènes, confirmant le phénomène d'inclusion allélique à ce locus (Borgulya et al., 1992). Enfin, l'introduction des transgènes codant pour les chaînes α et β du TCR permet de dépasser les déficiences de la machinerie de réarrangement, par exemple dans les animaux RAG-2^{-/-} (Shinkai et al., 1993).

3) Le complexe TCR-CD3 et son ligand

Les deux chaînes α et β du TCR sont exprimées à la surface des cellules T sous la forme d'un hétérodimère, et la structure de ces deux polypeptides présente de grandes similarités avec les Ig (revue par (Davis and Chien, 1999)). Les chaînes α et β du TCR sont globalement extracellulaires, mise à part une courte portion transmembranaire et intracellulaire de leur domaine constant. On peut signaler que la chaîne pT α présente une structure similaire à celle de la chaîne α mais ne possède pas de domaine variable.

Toutefois, le TCR seul n'est pas véritablement fonctionnel, et d'autres polypeptides pallient à ses défauts. Ainsi, les molécules CD3 sont responsables de la transduction des signaux reçus par le TCR et les co-récepteurs CD4/CD8 apportent une aide précieuse lors des interactions du TCR $\alpha\beta$ avec son ligand.

a) Les molécules CD3

Le complexe CD3 est formé par l'association de 5 polypeptides nommés γ , δ , ϵ , ζ et η (Samelson et al., 1985), ce dernier étant un variant mineur issu de l'épissage alternatif du gène codant pour la chaîne ζ (Clayton et al., 1991). Les expériences menées jusqu'à présent indiquent que deux hétérodimères TCR $\alpha\beta$ sont associés à chaque complexe CD3, et que les chaînes CD3 γ et CD3 δ sont exprimées à différents ratios suivant l'état et le type cellulaire

(revue par (Davis and Chien, 1999)). Ainsi, la stochiométrie proposée pour le complexe TCR-CD3 oscille autour de la formation $(\text{TCR}\alpha\beta)_2(\gamma\delta-\varepsilon)_2(\zeta\zeta)_4$, avec des variations suivant le type cellulaire. Par exemple, les homodimères $\zeta\zeta$ peuvent parfois être remplacés par des hétérodimères $\zeta\eta$ (Orloff et al., 1989).

Les domaines intracellulaires des chaînes CD3 γ , δ , ε et ζ sont responsables de la transduction du signal dans le complexe TCR-CD3, car ils contiennent des tyrosines impliquées dans l'activation cellulaire (Letourneur and Klausner, 1991; Letourneur and Klausner, 1992). La phosphorylation, entre autre, de ces résidus tyrosine est une des étapes de base de l'activation des cellules T, en permettant le recrutement de molécules intracellulaires à même d'amplifier le signal (Klausner and Samelson, 1991).

b) Les co-récepteurs CD4 et CD8

Les molécules CD4 et CD8 sont des glycoprotéines de surface, utilisées notamment pour distinguer les deux populations majeures composant les cellules T $\alpha\beta$ (revue par (Zamoyska, 1998)). La molécule CD4 est formée d'une seule chaîne polypeptidique contenant 4 domaines de type Ig, alors que la molécule CD8 est, chez les cellules T $\alpha\beta$, un hétérodimère de deux sous-unités α et β ne contenant chacune qu'un seul domaine Ig et liées via un pont disulfure.

Même si ces deux récepteurs ne font pas directement partie du complexe du TCR $\alpha\beta$, leur influence est indéniable sur deux plans. Premièrement, le domaine intracellulaire de ces deux molécules contient un site d'interaction avec la tyrosine kinase p56^{lck} (Veillette et al., 1988), dont l'activité sur les résidus tyrosine des chaînes CD3 est essentielle pour la transduction du signal (Straus and Weiss, 1992). Ainsi, CD4 et CD8 agissent effectivement comme des co-récepteurs pour le TCR, dans le sens où la co-agrégation TCR/co-récepteur délivre un signal plus efficace qu'une stimulation du TCR seul (Boyce et al., 1988; Owens et al., 1987). Deuxièmement, les co-récepteurs sont capables d'interagir avec les molécules de classe I ou de classe II du CMH, respectivement (Konig et al., 1992; Norment et al., 1988). Ainsi, l'influence des co-récepteurs sur l'interaction entre le TCR et les molécules du CMH est forte, que ce soit lors de l'activation cellulaire ou encore lors de la sélection thymique. A ce titre, les souris déficientes pour l'expression de CD4 (Rahemtulla et al., 1991) ou de CD8 (Fung-Leung et al., 1991) montrent un défaut, sévère mais pas total, de développement des cellules T reconnaissant respectivement les molécules du CMH de classe II ou de classe I. Enfin, l'interaction entre le TCR et les molécules du CMH est stabilisée lorsque le co-récepteur entre en jeu (revue par (Davis and Chien, 1999)), le blocage de l'interaction avec le co-récepteur

pouvant même transformer un peptide partiellement agoniste en peptide antagoniste (Mannie et al., 1995).

c) Le ligand du TCR $\alpha\beta$: le complexe pAg-CMH

i- *Les molécules du CMH*

Initialement, les molécules du CMH ont été identifiées comme des antigènes impliqués dans la transplantation et nommées système H-2 (Histocompatibility-2) chez la souris et HLA (Human Lymphocyte Antigen) chez l'homme (revue par (Margulies, 1999)). Il existe en fait plusieurs locus *Mhc* (Major histocompatibility complex) identifiés chez les deux espèces, contenant au total plus de 400 gènes, mais l'usage veut que le terme de CMH soit réservé aux molécules de classe I et II du CMH. Chez la souris, les principales molécules du CMH de classe I (CMH-I) sont H-2K et H-2D, celles de classe II (CMH-II) sont H-2IA α , H-2IA β , H-2IE α et H-2IE β . Chaque lignée murine de laboratoire possède un ensemble d'allèles pour les différents gènes, ce qui forme un haplotype. Par exemple, la lignée C57Bl/6 est d'haplotype H-2^b, c'est-à-dire qu'elle possède le lot d'allèles (K^b D^b IA α ^b Ia β ^b IE α ^{null} IE β ^b). Le degré de polymorphisme des molécules du CMH est élevé chez l'Homme, plus de 200 allèles fréquents ayant été identifiés pour certaines molécules CMH-I (HLA-A, HLA-B) ou CMH-II (HLA-DR β) (Schreuder et al., 1999). En conséquence, ce polymorphisme et l'expression co-dominante des deux allèles pour chaque gène sont deux facteurs qui contribuent à la diversité des molécules du CMH exprimées par deux individus. Ceci explique la difficulté de mener à bien une greffe d'organe entre deux individus non apparentés, étant donné qu'il y a peu de chances qu'ils possèdent un locus *Mhc* identique.

Les molécules CMH-I consistent en l'association non-covalente entre une chaîne lourde, codée par exemple par les gènes H-2K ou H-2D, et la β 2-microglobuline (β 2m). L'analyse des souris β 2m^{-/-} montre que la β 2m est nécessaire pour obtenir des niveaux normaux de molécules CMH-I en surface, même si la déficience varie selon les molécules CMH-I considérées (Koller et al., 1990; Zijlstra et al., 1990). Pour leur part, les molécules CMH-II sont des hétérodimères entre chaînes α et β de même isotype, autrement dit soit IA $\alpha\beta$, soit IE $\alpha\beta$. Il arrive cependant que des hétérodimères $\alpha\beta$ d'isotypes différents soient observés (Matsunaga et al., 1990; Natarajan et al., 1992). Malgré ces différences, la structure spatiale des deux classes de molécules du CMH est similaire, comme le montre les analyses cristallographiques (Bjorkman et al., 1987; Brown et al., 1993). Le point important ressortant de ces analyses est la mise en évidence d'un sillon dans lequel viennent se loger les peptides,

qui peuvent de cette façon être « présentés » aux cellules T (Garboczi et al., 1996; Garcia et al., 1996). En effet, l'apprêtement de l'antigène, qui passe par sa dégradation partielle, est nécessaire pour que les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) puissent le présenter sur les molécules CMH-I aux cellules T CD8⁺ (Townsend et al., 1986) ou sur les molécules CMH-II aux cellules T CD4⁺ (Ziegler and Unanue, 1981).

Enfin, l'expression des deux classes de molécules du CMH diffère selon le type cellulaire. Ainsi, les molécules CMH-I sont constitutivement trouvées, à des niveaux variables, à la surface de la totalité des cellules nucléées. Au contraire, l'expression des molécules CMH-II est restreinte aux CPA professionnelles, comme les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales du thymus ou encore les lymphocytes B.

ii- La présentation des peptides sur les molécules du CMH

La fonction principale des molécules du CMH consiste à présenter des fragments d'antigène à la surface cellulaire (revue par (Brodsky and Guagliardi, 1991; York and Rock, 1996)). Cependant, il existe une distinction, notamment fonctionnelle, entre les cellules T CD8⁺ restreintes aux molécules CMH-I, et les cellules T CD4⁺ restreintes aux molécules CMH-II. Cette distinction se retrouve dans le mode de présentation par les molécules du CMH. En effet, Morrison et al. ont montré, en utilisant des clones T spécifiques du virus *Influenza*, que les protéines endocytées ou bien synthétisées dans les cellules infectées sont présentées différemment (Morrison et al., 1986). En conséquence, il a été proposé que chacune des classes de molécules du CMH est spécialisée dans la « capture » de peptides dans des compartiments cellulaires bien séparés (Germain, 1986). Ainsi, on considère que les molécules CMH-I sont amenées à présenter en général des peptides antigéniques d'origine endogène, c'est-à-dire issus de protéines exprimées normalement par la cellule, ou anormalement après une dérégulation (tumeur) ou une infection (virus, parasite intracellulaire). Ces protéines sont découpées dans le cytoplasme par le complexe du protéasome, puis les peptides résultants sont transportés par les protéines TAP (Transporter associated with Antigen Processing) vers le réticulum endoplasmique pour y être chargés sur les molécules du CMH-I (revue par (York and Rock, 1996)). Les souris déficientes pour TAP-1 montrent un phénotype similaire à celui des souris $\beta 2m^{-/-}$, dans le sens où les molécules CMH-I ne peuvent être chargées avec des peptides, ce qui rend leur expression de surface instable et la sélection des cellules T CD8⁺ difficile (Van Kaer et al., 1992). Quant aux molécules CMH-II, elles ont vocation à présenter des fragments provenant de protéines d'origine extracellulaire qui ont été endocytées, mais également de protéines intracellulaires

(revue par (Cresswell, 1994)). Les molécules CMH-II sont correctement repliées dans l'endothélium endoplasmique grâce à l'action d'une protéine chaperon nommée Ii (ou chaîne invariante), qui occupe notamment le sillon formé par les deux chaînes de la molécule CMH-II. Au cours de la maturation des protéines CMH-II au sein de vésicules de type endosomal/lysosomal appelée MIIC (MHC class II Compartment) (Peters et al., 1991), la chaîne Ii est dégradée et il n'en reste qu'un peptide, le CLIP (Class II associated Invariant chain Peptide), couvrant le sillon (Maric et al., 1994). Dans ces MIIC, les peptides d'origine exogène sont chargés dans le sillon des molécules CMH-II (Amigorena et al., 1994; Tulp et al., 1994), et ce grâce à l'action de H-2M qui permet l'échange entre CLIP et les peptides (Denzin and Cresswell, 1995; Sherman et al., 1995; Sloan et al., 1995).

La nature des peptides du soi associés avec les molécules du CMH a été analysée (revue par (Margulies, 1999)). Ainsi, le séquençage des peptides isolés à partir de molécules CMH-I a montré que leur taille s'élève à 9 acides aminés environ, et qu'ils contiennent des résidus d'ancrage relativement conservés dans des positions fixes (Falk et al., 1991). Dans le cas des molécules CMH-II, le sillon n'est pas clos aux deux extrémités, ce qui fait que les peptides y sont généralement plus longs, de 12 à plus de 24 résidus d'acides aminés (Rudensky et al., 1991). Toutefois, similairement aux molécules CMH-I, on retrouve 9 résidus d'acides aminés en interaction dans le sillon peptidique ainsi que des résidus d'ancrage.

iii- La restriction des cellules T aux molécules du CMH

Comme nous l'avons déjà indiqué précédemment, le TCR $\alpha\beta$ a pour ligand le complexe formé par une molécule du CMH et un peptide antigénique, c'est-à-dire qu'il ne reconnaît pas l'antigène dans sa forme native. L'idée selon laquelle les agents infectieux combinés, d'une façon ou d'une autre, avec les molécules du CMH initieraient l'activation des lymphocytes a été émise par H. Lawrence dès 1959 (Lawrence, 1959). Il faudra attendre 15 ans pour voir cette hypothèse validée par Zinkernagel & Doherty, qui ont montré que les lymphocytes T CD8⁺ peuvent reconnaître des cellules infectées, mais que cette reconnaissance est restreinte aux molécules CMH-I.

Cette démonstration (revue par (Zinkernagel and Doherty, 1997)) utilise le modèle du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV). Le LCMV est capable d'induire une immunopathologie létale après infection des cellules méningées du cerveau, et il a été montré que les cellules T en sont responsables (Cole et al., 1972). Partant du constat que la mortalité et la cinétique de l'immunopathologie sont différentes selon l'haplotype H-2 des animaux infectés (Oldstone et al., 1973), Zinkernagel & Doherty ont testé l'activité cytotoxique des

cellules T isolées au pic de la réponse antivirale sur des cellules cibles infectées avec le LCMV (« CTL assay »). Ils ont alors pu observer une activité lytique des cellules T lorsque des cellules cibles de même haplotype H-2 étaient utilisées (Zinkernagel and Doherty, 1974b). Ces résultats ont été rapidement affinés par l'analyse de la restriction après infection d'animaux hétérozygotes pour H-2 (par exemple H-2^{kxb}) ou bien congéniques (par exemple H-2K^k H-2D^d), pour arriver à la conclusion que chaque cellule T est restreinte par une molécule CMH-I précise (Blanden et al., 1975; Zinkernagel and Doherty, 1974a).

La diversité du récepteur des cellules T $\alpha\beta$ est assurée par plusieurs mécanismes : combinatoire entre des segments de gènes ; dégénérescence au niveau des jonctions entre ces segments ; formation du TCR complet par l'assemblage entre les chaînes α et β . La gigantesque diversité potentiellement générée permet la reconnaissance d'une extrême variété de ligands, que forment les molécules du CMH associées aux peptides du soi ou étrangers. Il existe une pression sélective qui pousse les cellules T à n'exprimer qu'une seule chaîne β du TCR, mais ce processus d'exclusion allélique n'a pas lieu dans le cas de la chaîne α . Ainsi, la probabilité d'obtenir une cellule T exprimant deux TCR à sa surface est relativement élevée.

C. La sélection thymique

1) Sélection positive et sélection négative

a) Mise en évidence des deux types de sélection

Arrivées au stade DP, les thymocytes expriment à leur surface un TCR $\alpha\beta$ complet, d'abord faiblement puis fortement, et deviennent alors sujets à la sélection positive et à la sélection négative (revue par (Amsen and Kruisbeek, 1998; Benoist and Mathis, 1997; Marrack and Kappler, 1997; Sebзда et al., 1999)). En effet, les thymocytes ne peuvent se différencier en cellules T $\alpha\beta$ matures que si leur TCR interagit avec les molécules du CMH dans le thymus (Bevan, 1977; Zinkernagel et al., 1978). La sélection positive permet donc de sortir du lot les thymocytes qui expriment un TCR restreint aux molécules du CMH du soi, autrement dit des cellules capables de reconnaître dans une certaine mesure le soi. Ce processus est à lui-seul

responsable de la mort de la plupart des cellules DP, qui meurent en effet par « négligence », autrement dit par défaut de sélection positive (Surh and Sprent, 1994). La sélection positive s'accompagne d'une séparation entre la lignée des cellules T $\alpha\beta$ CD4⁺ restreintes aux molécules CMH-II et la lignée T $\alpha\beta$ CD8⁺ restreinte aux molécules CMH-I. Ainsi, l'analyse de souris transgéniques pour un TCR restreint à une molécule CMH-I (Sha et al., 1988; Teh et al., 1988) ou bien du CMH-II (Berg et al., 1989; Kaye et al., 1989) montre un biais évident pour la lignée T $\alpha\beta$ CD8⁺ ou CD4⁺, respectivement.

Dans le même temps, le système immunitaire doit, pour la sauvegarde de l'organisme, éviter l'*horror autotoxicus*, c'est-à-dire le déclenchement d'une activité immunitaire contre l'organisme lui-même. Pour mettre en évidence l'existence de la sélection négative, une première approche a consisté à utiliser les propriétés d'antigènes du soi capables de réagir avec toutes les cellules T d'une famille V β donnée, les superantigènes. Dans le thymus de souris exprimant un superantigène, on peut ainsi observer la délétion des populations T spécifiques entre le stade DP TCR^{low} et DP TCR^{high} (Kappler et al., 1987; MacDonald et al., 1988). Une seconde approche utilise les souris transgéniques pour le TCR, et c'est le TCR $\alpha\beta$ spécifique pour l'antigène mâle HY, présenté par H-2D^b, qui a été le plus mis à profit (Kisielow et al., 1988). Dans ce système, les souris mâles montrent une délétion clonale massive au stade DP, et les cellules T échappant à l'élimination sont hyporéactives et CD8^{low}. La sélection négative intervient donc pour éliminer, physiquement ou fonctionnellement, les thymocytes portant un TCR spécifique pour un auto-antigène, et ce à nouveau au travers d'une interaction entre le TCR et les molécules du CMH. Suivant le modèle expérimental utilisé, il est estimé que 5% à 75% des thymocytes positivement sélectionnés sont potentiellement sujets à la sélection négative (revue par (Sebzda et al., 1999)), notamment du fait de l'augmentation de l'expression de surface du TCR durant la maturation au stade DP (Ohashi et al., 1990). Au final, il est estimé que 3-5% des thymocytes DP survivent au processus de sélection (Huesmann et al., 1991; Shortman et al., 1991). Toutefois, il est très artificiel de considérer qu'il existe une séquence entre les sélections négative et positive : dans certains cas, la sélection négative aura lieu directement ; dans d'autres situations, elle pourra intervenir après la sélection positive, par exemple lors de l'entrée dans la medulla.

b) Sélection et peptides du complexe pAg-CMH

Le fait que la même interaction TCR/pAg-CMH puisse conduire les deux phénomènes de la sélection positive et négative pose la question de la nature des peptides impliqués. On sait que la nature des complexes pAg-CMH influe directement sur la mise en place du répertoire

durant le développement thymique, les peptides du soi impliqués pendant la sélection positive pouvant être très proches de ceux qui déclenchent la réponse T spécifique (Bevan and Hunig, 1981). Ainsi, en utilisant des mutants de la molécule H-2K^b, il a été montré que la sélection positive d'un répertoire T anti-ovalbumine est directement corrélée avec la capacité de H-2K^b de pouvoir présenter le peptide spécifique issu de l'ovalbumine (Nikolic-Zugic and Bevan, 1990). De même, si l'absence de molécules CMH-I à la surface des cellules $\beta 2m^{-/-}$ ou TAP^{-/-} empêche un développement normal des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ (Koller et al., 1990; Van Kaer et al., 1992; Zijlstra et al., 1990), la sélection positive est restaurée après apport exogène de peptides dans des cultures d'organe thymique fœtal (Foetal Thymic Organ Culture, FTOC) dérivées de ces animaux (Ashton-Rickardt et al., 1993; Hogquist et al., 1993).

Si ces études montrent également que la sélection positive est bien plus efficace lorsque que le lot de peptide est large, on peut également observer qu'un unique peptide permet la sélection d'une population T CD8⁺ polyclonale (Ashton-Rickardt et al., 1993). Dans le même ordre d'idée, des études ont été menées chez des souris présentant un unique complexe pAg-CMH-II. Ces modèles sont obtenus soit avec des souris transgéniques exprimant le ligand IA β^b -pAg Tg dans un fond IA $\beta^{b-/-}$ Ii^{-/-} (Ignatowicz et al., 1996a), soit avec des animaux déficients pour H-2M qui n'ont que le peptide CLIP présenté sur les molécules CMH-II (Fung-Leung et al., 1996; Martin et al., 1996; Miyazaki et al., 1996). Dans ces deux systèmes, un répertoire de cellules T CD4⁺ varié peut être sélectionné *in vivo* avec un ligand unique pAg-CMH, même si on note que la population T CD4⁺ est de taille réduite (20% à 50% de la taille normale).

Les estimations existantes indiquent que le nombre de peptides du soi présentés dans le thymus s'élève environ à 10³-10⁴ peptides différents, alors que le nombre de molécules du CMH exprimées en surface est de 10⁵-10⁶ (Engelhard, 1994), sauf dans le cas des cellules épithéliales thymiques qui expriment environ 10 fois moins de molécules du CMH (Delaney et al., 1998). En conséquence, et en concordance avec les résultats précédents, il est suggéré que le processus de reconnaissance entre le TCR et les ligands pAg-CMH est flexible et partiellement dégénéré, ce qui est nécessaire pour pouvoir générer la grande diversité clonale observée *in vivo*.

c) Induction de tolérance par délétion et par anergie

L'induction de tolérance qui opère au travers de la sélection négative débouche globalement sur deux types d'issue pour les thymocytes. Soit, les thymocytes autoréactifs subissent la délétion clonale, autrement dit une élimination physique par « mort cellulaire programmée »

(apoptose), soit la tolérance est mise en place en induisant chez les thymocytes autoréactifs un état réfractaire appelé anergie (revue par (Kisielow et al., 1991; McConkey et al., 1992)).

Le modèle du TCR anti-mâle aHY est à ce titre particulièrement informatif (Kisielow et al., 1988). Chez les femelles transgéniques, la plupart des cellules T sont de phénotype TCR aHY Tg⁺ CD8⁺. Par contre, la sélection thymique est perturbée chez les mâles et la population DP subit une délétion massive. Cette délétion n'est toutefois pas totale, et les cellules TCR aHY Tg⁺ expriment soit de faibles niveaux de CD8 à leur surface, soit aucun co-récepteur. La stimulation *in vitro* de ces cellules avec de fortes doses du peptide spécifique n'induit pas de prolifération, au contraire de ce qui est observé avec les cellules TCR aHY Tg⁺ des femelles. Alternativement, on peut envisager que les cellules qui sont sélectionnées dans ce contexte ne subissent pas une anergie après la sélection, mais plutôt sur des critères de non-réponse contre la concentration d'Ag présente, d'où leur phénotype inhabituel.

2) Modèle qualitatif et modèle quantitatif

La question de la nature des peptides impliqués dans la sélection thymique est liée à la nature du signal induisant les sélections positive et négative (**Figure 10**). Cela est notamment dû aux résultats, apparemment contradictoires, obtenus en étudiant des FTOCs dérivant de souris TCR-Tg⁺ $\beta 2m^{-/-}$ ou TCR-Tg⁺ TAP^{-/-} (Ashton-Rickardt et al., 1994; Hogquist et al., 1994; Sebzda et al., 1994). La plupart des discussions sont basées sur le caractère supposé activateur (agoniste), ou au contraire inducteur d'un comportement réfractaire (antagoniste) des peptides utilisés (De Magistris et al., 1992).

a) Modèle qualitatif du peptide

Le premier modèle est qualitatif, dans le sens où des peptides différents débouchent soit sur une sélection positive, soit sur une sélection négative. Ainsi, en utilisant des souris transgéniques pour le TCR OT-1, spécifique d'un peptide de l'ovalbumine dans le contexte H-2K^b, il a été montré que des peptides antagonistes soutiennent la sélection positive alors que les peptides agonistes induisent une sélection positive inefficace à très faible concentration, voire une délétion clonale à haute concentration (Hogquist et al., 1994; Jameson et al., 1994). Ces résultats ont été confirmés par la mesure des affinités entre TCR et complexe pAg-CMH, et il a été observé que les ligands pAg-CMH dits antagonistes, soutenant la sélection positive, possèdent une affinité 5 à 10 fois inférieure à celle de l'agoniste (Alam et al., 1996). La transduction du signal est également altérée suivant la nature ligand pAg-CMH, notamment les niveaux relatifs de phosphorylation des chaînes

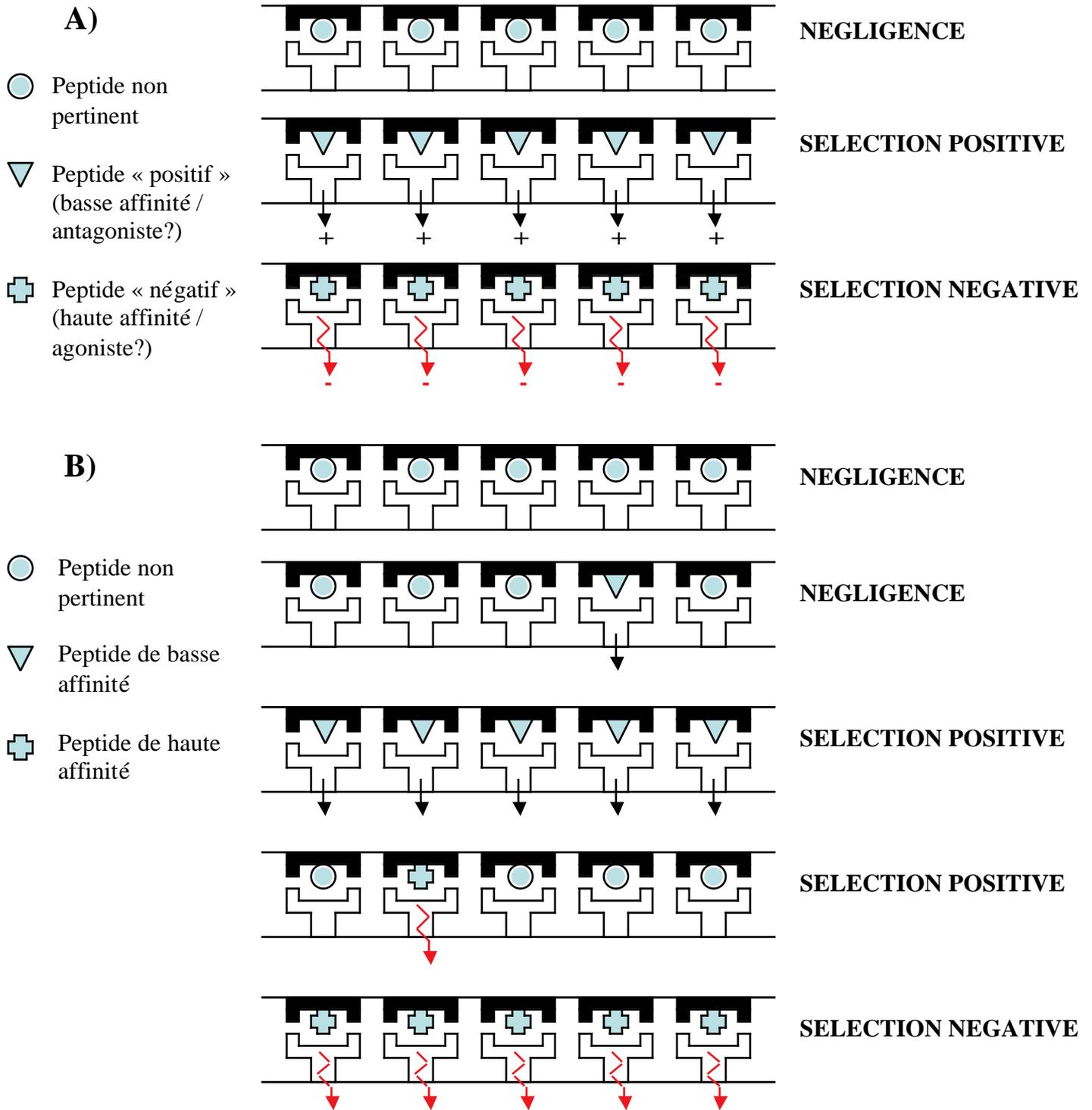


Figure 10: Modèles pour la nature du signal impliqué lors des sélections positive et négative des thymocytes

A) Le modèle qualitatif du peptide considère que chaque peptide délivre un signal différent qui induit soit la sélection positive (+), soit la sélection négative (-). B) Le modèle de l'avidité indique que les signaux conséquents à une faible avidité débouchent sur la sélection positive, à forte avidité sur la sélection négative. C'est l'intégration de la quantité de signaux reçus qui influe sur le devenir cellulaire. TCR: en blanc; CMH: en noir.

(d'après Sebzda & al., Annu. Rev. Immunol., 2000, 17: 829)

CD3 ϵ et CD3 ζ , ce qui renforce l'idée selon laquelle des signaux qualitativement différents influent sur la différenciation des thymocytes (Chau et al., 1998; La Face et al., 1997; Madrenas et al., 1995; Reis e Sousa et al., 1996).

Toutefois, il faut tempérer ces résultats, car il n'a pas toujours été observé qu'un ligand antagoniste puisse induire une sélection positive. Au contraire, on note dans certains cas qu'un peptide antagoniste peut induire une délétion clonale (Page et al., 1994), inhiber la sélection négative (Williams et al., 1996), voire bloquer tout le développement T (Spain et al., 1994). Dans le même ordre d'idée, le ligand responsable de la sélection positive peut également induire une réponse T à l'image d'un agoniste, comme c'est par exemple le cas avec les cellules T CD4⁺ sélectionnées par le ligand IA β^b -pAg Tg⁺ dans un fond IA $\beta^{b/-}$ Ii^{-/-} (Ignatowicz et al., 1996b). Enfin, une étude portant sur les signaux intracellulaires induits par une gamme de peptides mutés, allant d'antagoniste à agoniste, a montré que la différence est purement quantitative, c'est-à-dire que la différence de réponse s'explique par un gradient de signaux intracellulaires (Smyth et al., 1998).

b) Modèle quantitatif de l'avidité

Du fait des précédents constats, il est logique qu'un second modèle propose une vue quantitative de la sélection, où l'avidité globale et l'intégration des signaux priment. Ainsi, des FTOC dérivant de souris TCR Tg, déficientes pour l'expression de molécules CMH-I chargées en peptide endogène, ont montré que l'ajout exogène du peptide agoniste induit une sélection positive à faible concentration et une sélection négative à forte concentration (Ashton-Rickardt et al., 1994; Sebzda et al., 1994). D'ailleurs, les résultats du groupe de M. Bevan avec le modèle OT-1 sont compatibles avec le modèle quantitatif puisque la sélection positive s'y déroule avec une forte concentration de ligand « faible » (Hogquist et al., 1994; Jameson et al., 1994). Dans ce modèle, la somme des signaux intégrés décide du devenir du thymocyte, ce qui veut dire qu'un ligand de faible affinité en grande quantité ou un ligand de forte affinité, mais rare, débouchent tous deux sur une sélection positive. Au contraire, si le ligand de forte affinité est présent en grande quantité, l'avidité globale est trop forte et induit une sélection négative. Des résultats obtenus en comparant deux lignées de souris IA β^b -pAg Tg⁺ dans un fond IA $\beta^{b/-}$ Ii^{-/-}, entre lesquelles le niveau d'expression du transgène diffère de 5 à 10 fois, soutiennent ce modèle (Fukui et al., 1997). En effet, la souche de souris où l'expression du ligand est la plus faible contient une population de cellules T CD4⁺ avec un usage de segments V β varié, à l'image de ce qui a été observé par le groupe de P. Marrack et J. Kappler (Ignatowicz et al., 1996a). A l'inverse, les souris avec l'expression forte du ligand

I-A β^b -pAg n'ont pas de population de cellules T CD4⁺ matures, suggérant qu'une sélection négative massive a eu lieu dans le thymus. De manière intéressante, la différence d'expression entre les deux lignées est du même ordre de grandeur que la différence d'affinité du TCR observée précédemment pour un ligand antagoniste soutenant la sélection positive, ou pour un ligand agoniste inducteur de délétion clonale (Alam et al., 1996).

c) Sélection des thymocytes : « not by TCR alone »

A priori, le modèle de l'avidité est plus satisfaisant, notamment parce qu'il tient également compte des autres récepteurs cellulaires en jeu. Ces molécules peuvent par exemple influencer sur l'interaction entre les thymocytes et les cellules du stroma thymique, comme les co-récepteurs, les molécules d'adhésion (revue par (Amsen and Kruisbeek, 1998)) ou peuvent transduire des signaux, comme c'est le cas avec les glucocorticoïdes (Vacchio and Ashwell, 1997). Ce sont autant d'éléments agissant sur l'avidité globale ou la quantité de signaux transduits. Toutefois, on note que quelques exemples allant contre le modèle de l'avidité ont été rapportés, en montrant notamment que des cellules T sélectionnées par un ligand agoniste peuvent être non-fonctionnelles (Girao et al., 1997; Hogquist et al., 1995). Il faut donc sans doute moduler l'approche quantitative par l'aspect qualitatif que procurent le micro-environnement thymique et les signaux annexes, dus notamment aux interactions autres que TCR-CMH.

En somme, on peut supposer que la sélection des thymocytes est dépendante d'une combinaison entre l'affinité des ligands pAg-CMH disponibles, leur fréquence, l'avidité globale de chaque thymocyte pour les cellules du stroma thymique et enfin la nature des peptides impliqués, qui peut varier en fonction de la localisation et l'origine des différentes CPA.

3) Épithélium thymique et cellules dérivées de la moelle osseuse

La composition du thymus, au sein duquel les thymocytes migrent durant leur maturation, n'est pas homogène. On relève notamment que la plupart des CPA d'origine hématopoïétique se trouvent dans la medulla et à la jonction cortico-médullaire. Si on considère les données précédentes sur les signaux de sélection et sur l'évolution de l'avidité des thymocytes pour leurs ligands durant leur différenciation, on peut penser que la sélection est « compartimentalisée » en terme de CPA.

a) Rôles respectifs durant la sélection positive

La sélection positive est semble-t-il soutenue majoritairement par les cellules épithéliales du cortex thymique. L'expression de l'élément de restriction du CMH par les cellules épithéliales médullaires, ou bien par les cellules thymiques dérivées de la moelle osseuse n'induit pas une sélection positive significative (Benoist and Mathis, 1989; Bill and Palmer, 1989; Brocker et al., 1997; Cosgrove et al., 1992). Les CPA thymiques d'origine hématopoïétique ne peuvent a priori pas soutenir la sélection positive de manière efficace. Par exemple, la reconstitution d'animaux $\beta 2m^{-/}$ irradiés avec de la moelle osseuse de donneur $\beta 2m^{+}$ montre une reprise très limitée de la sélection positive (Bix and Raulet, 1992). Il n'est d'ailleurs pas exclu que cela soit dû à l'expression de molécules du CMH-I sur les cellules épithéliales radio-résistantes du cortex, par exemple sous l'effet d'un apport de la $\beta 2m$ dans l'environnement thymique par les cellules $\beta 2m^{+}$ dérivées de la moelle osseuse.

Il faut toutefois noter que des résultats intrigants ont été obtenus dans des modèles de souris *nu/nu* recevant une greffe de thymus allogénique (Zinkernagel and Althage, 1999; Zinkernagel et al., 1980). Conformément aux résultats démontrant le rôle primordial de l'épithélium thymique dans la sélection positive, des souris *nu/nu* d'haplotype H-2^{bx^d} recevant une greffe de thymus H-2^b ou H-2^d développent une population de cellules T restreinte aux molécules H-2^b ou H-2^d respectivement. De manière étonnante, des souris *nu/nu* H-2^b recevant une greffe de thymus H-2^k donnent des cellules T restreintes à H-2^b. Si ces animaux sont en plus irradiés et reconstitués avec de la moelle osseuse provenant d'un donneur H-2^k, alors les cellules T sont restreintes à H-2^k et H-2^b, avec un biais en faveur de H-2^k (Zinkernagel and Althage, 1999). Enfin, des souris *nu/nu* H-2^b recevant une greffe de thymus H-2^b de donneur CMH-I^{0/0} CMH-II^{0/0}, voire une xéngreffe de rat, donnent des cellules T restreintes à H-2^b (Zinkernagel and Althage, 1999). Ces expériences montrent donc que les CPA d'origine hématopoïétique peuvent jouer un rôle durant la sélection positive, même si cela ne concerne que des cas extrêmes.

Il est suggéré que les cellules épithéliales du cortex thymique possèdent des propriétés uniques leur permettant de soutenir la sélection positive. C'est notamment la conclusion d'expériences de ré-agrégation *in vitro* de thymocytes DP avec une multitude de lignées cellulaires exprimant des complexes pAg-CMH, où seules les cellules corticales déclenchent une sélection positive (Anderson et al., 1994; Vukmanovic et al., 1992). Au contraire, d'autres résultats battent en brèche cette idée, l'exemple le plus probant étant celui d'une sélection positive des thymocytes DP après injection intrathymique de fibroblastes (Hugo et

al., 1993; Pawlowski et al., 1993). Au final, cela ne contredit cependant pas le fait que ce sont les cellules épithéliales du cortex thymique qui supportent le mieux la sélection positive des thymocytes dans des conditions physiologiques normales.

b) Rôles respectifs durant la sélection négative

Les cellules dendritiques du thymus sont clairement des CPA efficaces pour la délétion clonale (Brocker et al., 1997; Carlow et al., 1992; Jenkinson et al., 1992). La situation est plus confuse en ce qui concerne le rôle de l'épithélium thymique dans la sélection négative. Les premières expériences ont été menées dans des chimères de moelle osseuse, l'épithélium thymique étant radio-résistant, et elles ont indiquées l'absence d'induction de tolérance par l'épithélium thymique (revue par (Sprent et al., 1993)). Dans un second temps, ces résultats ont été réévalués, et il a été conclu que l'épithélium thymique peut induire un état de tolérance, mais de manière tissu-spécifique (Bonomo and Matzinger, 1993). Toutefois, si l'épithélium thymique exprimant le ligand spécifique peut induire la délétion clonale de thymocytes TCR Tg (Bonomo and Matzinger, 1993; Speiser et al., 1992), il est moins efficace que les CPA d'origine hématopoïétique (Carlow et al., 1992; Hoffmann et al., 1995). Un résultat similaire est obtenu dans des expériences de ré-agrégation de thymocytes DP avec de l'épithélium thymique, où l'ajout de cellules dendritiques est nécessaire pour induire une délétion par un superantigène (Jenkinson et al., 1992).

L'épithélium thymique peut donc, dans certains cas, promouvoir une sélection négative. Toutefois, il reste à déterminer si les cellules épithéliales du cortex et de la médulla montrent des capacités différentes dans ce domaine. Il semblerait que les cellules corticales ne soient pas de bons partenaires pour la sélection négative. Par exemple, il n'y a pas de délétion induite par un superantigène endogène dans les souris Rel-B^{-/-}, qui n'ont ni cellules dendritiques, ni cellules médullaires (Laufer et al., 1996). Dans cette même étude, l'injection du ligand spécifique dans des souris TCR Tg exprimant les molécules CMH-II uniquement sur les cellules corticales montre l'absence de délétion. Enfin, en utilisant des souris non TCR Tg, où l'expression des molécules CMH-II est à nouveau limitée aux cellules corticales, il n'y a pas de délétion en présence d'un superantigène (Laufer et al., 1996). A l'inverse, les cellules de l'épithélium médullaire ont montré dans un système équivalent qu'elles peuvent induire une délétion (Burkly et al., 1993). Toutefois, on observe dans un certain nombre de systèmes expérimentaux que la délétion clonale des thymocytes a lieu dans le cortex au stade DP TCR^{low} (Kisielow et al., 1988; Murphy et al., 1990; Surh and Sprent, 1994). Ainsi, il est possible que l'épithélium du cortex thymique puisse soutenir la sélection négative, en

particulier lors d'interactions de forte affinité comme c'est le cas du TCR aHY chez les souris mâles (Kisielow et al., 1988).

En somme, il est suggéré que la sélection négative est avant tout induite par les cellules dendritiques du thymus, même si l'épithélium médullaire et l'épithélium cortical, dans une moindre mesure, peuvent soutenir en partie le processus.

4) Modèle stochastique ou instructionniste ?

L'utilisation de modèles animaux TCR Tg a permis de montrer que les thymocytes DP restreints aux molécules CMH-I ou CMH-II se différencient en cellules SP8 (Pircher et al., 1989; Teh et al., 1988) ou SP4 respectivement (Berg et al., 1989; Kaye et al., 1989). Toutefois, la nature du mécanisme se trouvant derrière l'engagement dans la lignée T CD4⁺ ou CD8⁺ reste discutée, notamment pour savoir s'il s'agit d'un choix stochastique (indépendant de l'interaction TCR-CMH) ou au contraire instructionniste (directement décidé par cette interaction).

a) Modèle instructionniste

Le modèle instructionniste postule que c'est le signal délivré par le complexe TCR-co-récepteur qui détermine si c'est l'expression de la molécule CD4 ou CD8 qui doit être réprimée. En effet, au delà des résultats indiqués précédemment et obtenus avec les souris TCR Tg, ce modèle est soutenu par des expériences montrant le rôle clef du co-récepteur dans le processus. En particulier, la partie cytoplasmique de CD4 ou CD8 est impliquée dans le choix de l'engagement, sans doute en permettant l'activation de p56^{lck} (Fung-Leung et al., 1993; Itano et al., 1994; Itano et al., 1996; Matechak et al., 1996). Une explication possible est que l'affinité de CD4 pour p56^{lck} est environ 20 fois supérieure à celle de CD8, et que CD4 recrute donc p56^{lck} de manière plus efficace lors de la stimulation du TCR (Campbell et al., 1995; Wiest et al., 1993). Ainsi, un TCR restreint aux molécules CMH-II peut amener au développement de cellules T CD8⁺ si l'expression de CD4, et donc le recrutement de p56^{lck}, est altérée (Matechak et al., 1996). De même, l'expression d'une forme constitutivement active de p56^{lck} pousse les cellules OT-1 à s'engager dans la lignée T CD4⁺ (Hernandez-Hoyos et al., 2000).

Le modèle instructionniste est donc généralement lié à une notion quantitative des signaux intégrés par les thymocytes (revue par (Hogquist, 2001)). Toutefois, plutôt que la quantité de signal reçu, il apparaît désormais que c'est la durée d'engagement des récepteurs qui est importante. Ainsi, l'équipe de R. Germain propose un modèle « instructionniste/durée du

signal » dans lequel un thymocyte DP se différencie en cellule SP4 s'il reçoit un signal de longue durée (Yasutomo et al., 2000a). Le choix d'engagement intervient avant tout changement dans l'expression des gènes codant pour les co-récepteurs, leur transcription et leur expression en surface étant purement une conséquence de ce choix (Yasutomo et al., 2000a; Yasutomo et al., 2000b).

b) Choix stochastique/sélectif

D'autres groupes ont montré que le choix dans la suppression de l'expression des gènes codant pour CD4 ou CD8 n'est pas déterminé par la restriction du TCR aux molécules du CMH lors de la sélection positive, et que les thymocytes sont par la suite « testés » pour déterminer si la bonne décision a été prise ou non (Chan et al., 1993; Corbella et al., 1994; Crump et al., 1993; Davis et al., 1993; Kirberg et al., 1994). Ainsi, la première étape est le fait d'un processus stochastique, qui est ensuite rattrapé par une sélection stricte. Ce modèle est appuyé par l'observation de populations intermédiaires de thymocytes entre les stades DP et SP ($CD4^+ CD8^{low}$ et $CD4^{low} CD8^+$) exprimant un TCR et un co-récepteur en désaccord avec la restriction (Chan et al., 1993; Davis et al., 1993; van Meerwijk and Germain, 1993). Toutefois, l'utilisation du niveau d'expression en surface de CD4 et CD8 est semble-t-il une source de confusion. En effet, des travaux suggèrent que la disparition des deux co-récepteurs depuis la surface s'effectue à une vitesse différente, l'internalisation de CD8 étant la plus rapide (Lundberg et al., 1995; Suzuki et al., 1995). Ainsi, lorsque des cellules $CD4^+ CD8^{low}$, restreintes aux molécules CMH-I et issues d'un thymus CHM-II^{-/-}, sont transférées dans un thymus normal, elles peuvent éventuellement se différencier en thymocytes SP8 (Benveniste et al., 1996; Kydd et al., 1995; Lundberg et al., 1995). L'analyse de ces cellules $CD4^+ CD8^{low}$ montre d'ailleurs de manière intéressante que la transcription du gène codant pour CD4 est éteinte alors que les gènes codant pour CD8 sont toujours exprimés (Benveniste et al., 1996; Suzuki et al., 1995). Plus récemment, le groupe de C. Benoist & D. Mathis a créé un modèle de souris possédant un gène rapporteur au locus CD4, et l'analyse des populations intermédiaires de thymocytes va dans le sens du modèle stochastique (Chan et al., 1998).

c) Modèle instructionniste/par défaut

En se basant en particulier sur des observations de la population intermédiaire $CD4^+ CD8^{low}$ (Benveniste et al., 1996; Lundberg et al., 1995; Suzuki et al., 1995), un modèle instructionniste/par défaut a été proposé. Ce modèle apparaît non symétrique, du fait d'un biais développemental « par défaut » vers la lignée T $CD4^+$ (Punt et al., 1996). Il partage avec le

modèle instructionniste le fait que la signalisation du complexe TCR-co-récepteur dirige le phénotype final. L'engagement par défaut vers la lignée T CD4⁺ est permis par une diminution pré-programmée de l'expression de CD8 qui a lieu après l'engagement du TCR à la surface des cellules DP, quelque soit la restriction dudit TCR (Brugnera et al., 2000). Ensuite, si le TCR est restreint par les molécules CMH-I, le thymocyte reçoit un signal faible (co-récepteur CD8 en faible quantité, faible affinité de CD8 pour p56^{lck}) ou de courte durée, et il subit un « renversement de co-récepteur », c'est-à-dire une ré-expression de CD8 et l'extinction de CD4. Des signaux spécifiques de la mise en place de la lignée T CD8⁺ pourraient également être mis en jeu, notamment la stimulation du récepteur à l'IL-7 (Brugnera et al., 2000) ou bien l'engagement de Notch-1 (Robey et al., 1996). A l'inverse, un TCR restreint aux molécules CMH-II transduit un signal fort ou de longue durée, et le thymocyte est alors réfractaire à la ré-expression de CD8 et aux signaux poussant les thymocytes vers la lignée T CD8⁺. Ce modèle dit du « renversement de co-récepteur » indique donc que la population CD4⁺ CD8^{low} est au centre du choix d'engagement vers les stades SP4 ou SP8 (revue par (Singer, 2002)). Il permet également de faire une distinction claire entre l'intensité du signal, qui détermine l'efficacité de la sélection positive, et la durée du signal, qui affecte le choix d'engagement CD4/CD8 (Bosselut et al., 2001).

La sélection thymique est un processus majeur dans la mise en place du système immunitaire. Elle assure au travers de la sélection positive une élimination des cellules T incapables de reconnaître les molécules du CMH du soi. La sélection négative permet d'éliminer les cellules T possédant une affinité forte envers un complexe pAg-CMH du soi, c'est-à-dire les cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme. Au final, 3 à 5% des cellules DP survivent au processus et peuvent s'engager vers la lignée T soit CD4⁺, soit CD8⁺.

III. SURVIE & SÉLECTION PÉRIPHÉRIQUE DES CELLULES T CD8⁺ αβ

Après les étapes de sélection thymique, les lymphocytes T αβ s'engagent de manière définitive soit vers la lignée T CD4⁺, soit vers la lignée T CD8⁺. Chacune de ces populations présente des fonctions et caractéristiques précises, qui leurs permettent de remplir efficacement leur rôle dans la lutte constante contre les agents infectieux. Dans ce chapitre, nous allons nous concentrer sur le cas des cellules T CD8⁺ dites « naïves », c'est-à-dire n'ayant pas encore monté de réponse immunitaire contre leurs Ag spécifiques, et les cellules T CD8⁺ « mémoires ». Les différences entre ces deux compartiments seront dégagées, et nous aborderons les mécanismes de régulation des compartiments lymphocytaires.

A. Lymphocytes T CD8⁺ naïfs et mémoires

1) Caractérisation des cellules T CD8⁺ naïves et mémoires/activées

a) Phénotypes et caractéristiques

Lorsqu'un organisme monte une réponse immunitaire primaire contre un agent infectieux et y survit, il devient protégé de manière plus efficace contre une nouvelle infection par le même pathogène (revue par (Sprent, 1997; Zinkernagel et al., 1996)). Ce critère est sans doute le plus fiable pour confirmer l'existence d'une mémoire immunitaire spécifique. Pour aller au delà de cette observation, de nombreux groupes ont cherché à caractériser phénotypiquement et fonctionnellement les cellules T mémoires. Pour commencer, les cellules T ont été divisées en deux catégories suivant l'expression de marqueurs extra- et intracellulaires. Les cellules T CD8⁺ dites « naïves », n'ayant jamais rencontré l'antigène spécifique, possèdent le phénotype CD44^{low} CD62L^{high} et sont opposées aux cellules mémoires et activées, ces deux types de cellules partageant chez la souris le phénotype CD44^{high} CD62L^{low} (Tough and Sprent, 1994). Depuis, d'autres molécules ont été identifiées pour mieux séparer les différentes populations de cellules T, des naïves aux mémoires en passant par les cellules effectrices de la réponse immunitaire (Sprent, 1997). Par exemple, certains marqueurs de surface comme Ly-6C ou les O-glycans, permettent de différencier les cellules mémoires des cellules effectrices ou naïves (Goldrath et al., 2000; Harrington et al., 2000). En outre, des modèles de souris transgéniques pour le TCR ont montré que les cellules naïves, effectrices et mémoires diffèrent dans leur comportement après stimulation quant à leur production de cytokines, leur vitesse de prolifération et leur rapidité à développer des fonctions effectrices (Bachmann et al., 1999a; Cho et al., 1999; Kedl and Mescher, 1998; Veiga-Fernandes et al., 2000). Ainsi, les cellules T

CD8⁺ mémoires mettent en oeuvre plus rapidement leurs mécanismes effecteurs que les cellules naïves (Lalvani et al., 1997; Selin et al., 1999). De plus, les cellules mémoires sont sensibles à de faibles niveaux d'antigène (Ahmed and Gray, 1996), et sont moins dépendantes des signaux de co-stimulation que les cellules naïves (Iezzi et al., 1998). Enfin, les cellules T CD8⁺ mémoires expriment des niveaux plus élevés du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Grayson et al., 2000), similairement à ce qui est observé avec les cellules T CD4⁺ mémoires (Garcia et al., 1999), ou encore d'autres molécules influant sur la survie comme le facteur de transcription LKLF (Schober et al., 1999).

L'ensemble de ces différences qualitatives est compatible avec l'idée selon laquelle la réponse mémoire est plus efficace et plus rapide que la réponse primaire, même si l'augmentation de la fréquence des cellules mémoires après immunisation, par rapport à la fréquence des cellules naïves spécifiques, constitue une différence quantitative fondamentale (revue par (Dutton et al., 1998)). L'ensemble des mécanismes favorisant la survie des cellules mémoires participe sans doute au maintien de cette fréquence accrue, via l'action de facteurs extracellulaires comme l'IL-15 ou bien l'IL-7 (Marrack et al., 2000; Schluns et al., 2000). A cet égard, on remarque que les cellules T CD8⁺ mémoires sont particulièrement affectées dans une lignée de souris déficientes pour l'expression de la chaîne IL-15Rα, sous l'effet d'une réduction de l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Wu et al., 2002). A l'inverse, les cellules T CD8⁺ mémoires prolifèrent plus et expriment de forts niveaux de Bcl-2 lorsqu'elles sont exposées à des niveaux élevés d'IL-15 *in vivo* (Yajima et al., 2002).

Deux modèles s'affrontent quant à l'origine des cellules T mémoires, car elles peuvent dériver soit de cellules effectrices dans un modèle linéaire de différenciation, soit de cellules naïves qui ne développent pas de fonctions effectrices (revue par (Ahmed and Gray, 1996; Farber, 1998)). Des données récentes indiquent que la stimulation antigénique des cellules T CD8⁺ initie un programme pré-établi de divisions cellulaires, indépendant de nouvelles stimulations par l'antigène, jusqu'à la formation de cellules mémoires (Kaech and Ahmed, 2001). Ce constat favorise le second modèle. A l'inverse, l'observation selon laquelle les cellules mémoires conservent l'expression de la perforine, employée par les cellules T CD8⁺ effectrices, va plutôt dans le sens du premier modèle (Opferman et al., 1999). La réponse définitive à cette question n'est donc pas apportée, et il ne semble pas improbable que les cellules T mémoires apparaissent via une combinaison de ces différentes possibilités. Cela est par exemple suggéré chez l'homme par l'identification de plusieurs types de cellules T mémoires/effectrices (Sallusto et al., 1999).

b) Export thymique, migration et dynamique des populations

La plupart des thymocytes sont éliminés pendant les étapes de la sélection thymique, et peu d'entre eux sont finalement exportés vers la périphérie. Chez la jeune souris, il est ainsi estimé que l'export thymique maximal se situe aux environs de 1-2.10⁶ cellules par jour (Shortman et al., 1990). Certains résultats obtenus chez le rat indiquent que les cellules T quittant le thymus ne sont pas véritablement de vrais lymphocytes matures, et que des étapes de maturation post-thymique sont envisageables (revue par (Sprent, 1993)).

Après avoir quittés le thymus, les lymphocytes T colonisent les organes lymphoïdes périphériques, et circulent de manière constante entre ces organes : rate, ganglions lymphatiques, circuits sanguin et lymphatique. Cette circulation peut toutefois être stoppée, lorsque les cellules sont séquestrées dans les zones T des organes lymphoïdes par des CPA (Sprent and Tough, 2001). Elle peut également être réorientée lorsque les cellules T activées acquièrent la capacité de migrer au travers de l'endothélium, ce que les cellules naïves ne peuvent normalement pas faire (Benoist and Mathis, 1999). Les cellules T activées peuvent donc accéder aux sites extra-lymphoïdes comme la peau, les intestins, les poumons, et ce de manière relativement tissu-spécifique grâce à l'expression spécifique d'intégrines (revues par (Butcher and Picker, 1996; Mackay, 1993)), ou bien de récepteurs aux chémokines (revue par (Campbell and Butcher, 2000)). Ainsi, il apparaît que l'adressage des cellules T vers les organes lymphoïdes secondaires (médié par le couple CCR7/SLC) n'utilise pas les mêmes molécules que l'adressage vers la peau (CCR4/TARC) ou les intestins (CCR9/TECK). Le schéma de migration hétérogène des cellules mémoires/effectrices, contrairement au schéma homogène des cellules naïves, est en général corrélé avec le site d'activation. Par exemple, des cellules T activées au niveau des plaques de Peyer auront tendance à exprimer les molécules nécessaires à une migration vers les intestins (Benoist and Mathis, 1999).

Ces observations ont été récemment affinées chez l'homme, les cellules T mémoires ayant été sub-divisées suivant l'expression du récepteur aux chémokines CCR7 (Sallusto et al., 1999). Ainsi, il a été montré que les lymphocytes T mémoires humains CCR7⁺, dits TEM (T Effector Memory), expriment des récepteurs leur permettant de migrer, comme nous l'avons précédemment vu, vers les sites d'inflammation. Les lymphocytes TEM peuvent alors activer leurs fonctions effectrices de manière immédiate. A l'inverse, une seconde population de cellules mémoires T CCR7⁺, dite TCM (T Central Memory), reste dans le circuit lymphatique. Ces cellules TCM ne possèdent pas de fonctions effectrices immédiates, mais peuvent stimuler efficacement les cellules dendritiques et se différencier en cellules TEM (Sallusto et

al., 1999). Chez la souris, il a été montré que des cellules T CD8⁺ activées en présence d'IL-15 (CD8^{IL-15}) donnent des cellules de type TCM, alors que l'activation en présence d'IL-2 donne des cellules (CD8^{IL-2}) de type TEM (Manjunath et al., 2001). Les résultats obtenus chez l'homme ont été confirmés dans ce système murin, puisque les cellules CD8^{IL-2} migrent plus efficacement vers les zones d'inflammation, alors que seules les cellules CD8^{IL-15} peuvent s'établir efficacement dans les ganglions lymphatiques, de manière CCR7-dépendante (Weninger et al., 2001).

2) Sélection périphérique des cellules T CD8⁺

a) Fonction des cellules T CD8⁺ à la périphérie

Les cellules T αβ CD8⁺ sont des acteurs majeurs de la réponse immunitaire adaptative contre les pathogènes intracellulaires comme les virus, les bactéries et les protozoaires (revue par (Harty et al., 2000)). En effet, ces lymphocytes sont activées par les CPA via leurs molécules du CMH-I, autrement dit elles réagissent principalement contre des Ag qui ont accès à un moment ou un autre au cytoplasme des CPA. Les lymphocytes T CD8⁺ peuvent également répondre contre des Ag d'origine exogène ou issus de cellules apoptotiques, et qui sont présentés sur les molécules du CMH-I par les CPA professionnelles uniquement (revue par (den Haan and Bevan, 2001)). Après leur activation, les cellules T CD8⁺ se différencient de manière remarquable, se multiplient fortement et acquièrent des fonctions effectrices. Les cellules T CD8⁺ disposent d'un arsenal de fonctions effectrices contre les cellules infectées, comme la lyse de ces cellules ou la production de cytokines et de chémokines. Le premier mécanisme de lyse cellulaire passe par l'exocytose de granules de perforine, qui possède la capacité de pouvoir former des pores à travers la membrane cytoplasmique des cellules cibles (Berke, 1995). Des enzymes, comme les granzymes A et B (Ebnet et al., 1995; Heusel et al., 1994), sont délivrées par les cellules T effectrices pour induire l'apoptose des cellules cibles, par exemple en activant la cascade des caspases dans le cas du granzyme B (revue par (Shresta et al., 1998)). Le mode de délivrance des granzymes dans le cytoplasme des cellules cibles est discuté, car il semble désormais qu'elle ait lieu sans perméabilisation de la membrane plasmique (Metkar et al., 2002). Le second mécanisme débouchant sur une mort cellulaire est induit par une interaction entre le récepteur Fas (CD95) à la surface des cellules cibles et le ligand FasL (CD95L) exprimé par les cellules T CD8⁺ activées (Berke, 1995). Enfin, les cellules T CD8⁺ peuvent produire des facteurs solubles qui se révèlent importants suivant le type de pathogène impliqué (revue par (Harty et al., 2000)). Les cytokines comme

le TNF (Tumor Necrosis Factor) ou l'interféron- γ (IFN γ), mais aussi les chémokines, peuvent interférer avec l'attachement des pathogènes aux cellules, la réplication intracellulaire des pathogènes ou l'expression de leurs gènes. Ces facteurs permettent également le recrutement et l'activation d'autres cellules effectrices du système immunitaire, comme les macrophages ou les neutrophiles .

Au delà de ce rôle effecteur essentiel, certains résultats attribuent également un rôle régulateur aux cellules T CD8⁺, à l'image de ce qui est bien connu et documenté dans le cas des cellules dites « régulatrices » T CD4⁺ CD25⁺ CD45RB^{low} (Sakaguchi et al., 1995). Ainsi, après un épisode lymphopénique dû à une irradiation, on trouve chez l'homme des cellules T CD8⁺ possédant des capacités fonctionnelles réduites et apparaissant suite à l'expansion périphérique de sous-populations T atypiques. Il a été montré que ces cellules possèdent des fonctions régulatrices car elles peuvent inhiber l'activité cytolytique et la prolifération d'autres cellules T (Autran et al., 1991). Dans le modèle murin des cellules T CD8⁺ exprimant le TCR aHY, les cellules T devenues tolérantes à l'antigène mâle sécrètent de l'IL-10, à l'image des cellules régulatrices T CD4⁺ CD25⁺ CD45RB^{low} (Tanchot et al., 1998). Dans le modèle du TCR 2C, également restreint à une molécule CMH-I, une population de cellules T CD4⁻ CD8⁻ se développe fortement lorsque l'Ag spécifique est persistant (Priatel et al., 2001). De manière intéressante, elle possède une activité lytique sur les cellules T CD8⁺ capables de réagir contre l'Ag persistant, c'est-à-dire, dans ce contexte, sur les cellules T CD8⁺ autoréactives. On note que de telles cellules « double-négatives » périphériques sont également observées en grand nombre dans les souris mâles exprimant le TCR aHY (Kisielow et al., 1988). Il reste encore à déterminer si ces cellules T particulières jouent un véritable rôle de régulation de l'autoimmunité.

b) Activation des cellules T

Dans un animal non manipulé, la fréquence des clones spécifiques pour un Ag donné est du domaine de l'indélectable. Après l'activation lymphocytaire, permise par la rétention des cellules T spécifiques dans la région para-aortique de la rate ou dans les ganglions lymphatiques (Sprent and Tough, 2001), on assiste cependant à une augmentation spectaculaire de cette fréquence. Lors de certaines infections, on peut trouver 1 à 2% de cellules T spécifiques d'un Ag au pic de la réponse (Busch et al., 1998), et cette valeur peut dépasser 50% du répertoire disponible dans des cas d'infections virales (Butz and Bevan, 1998; Murali-Krishna et al., 1998). Ces évaluations sont notamment permises par le marquage des cellules T spécifiques en utilisant des tétramères fluorescents de complexes pAg-CMH,

cet outil permettant de ré-évaluer totalement la cinétique et l'amplitude de la réponse immunitaire T (revue par (Doherty and Christensen, 2000)).

L'activation des cellules T nécessite bien entendu la reconnaissance spécifique de complexes pAg-CMH, mais il est aujourd'hui clair que le TCR agit au sein d'une « synapse immunologique » formée de manière active par la redistribution de molécules de surface sous l'action du cytosquelette. Le centre de cette synapse contient les petites molécules comme le TCR, CD2 et CD28, alors que sa circonférence contient de grosses molécules comme la molécule d'adhésion LFA-1 et des protéines impliquées dans le cytosquelette (revue par (van der Merwe, 2002)). Dans ce contexte, la signalisation nécessaire au déclenchement correct de l'activation spécifique des cellules T dépend d'au moins trois paramètres : 1) l'agrégation et l'oligomérisation du TCR sont importants et sont modulés par la concentration en Ag (Reich et al., 1997) ; 2) la durée de maintien du signal est différente suivant qu'il s'agit de cellules naïves ou mémoires (Valitutti et al., 1995a) ; 3) un petit nombre de complexes pAg-CMH peut stimuler « en série » plusieurs dizaines de TCR, ce qui influe sur l'expansion du signal (Valitutti et al., 1995b). On notera que les cellules T peuvent également être activées en absence de l'Ag spécifique, comme par exemple l'activation « en spectateur » (bystander activation) lors d'une autre réponse immunitaire ou encore la prolifération homéostatique. En effet, pendant les phases précoces d'une réponse immunitaire secondaire, il est suggéré qu'une partie plus ou moins importante des cellules T qui prolifèrent n'est pas spécifique de l'Ag injecté (Murali-Krishna et al., 1998; Tough et al., 1996; Zarozinski and Welsh, 1997). Ce phénomène d'activation « en spectateur » des cellules T pourrait être dû en partie à des cytokines libérées localement par les cellules activées, et en partie à des interactions cellule-cellule indépendantes de l'Ag.

c) Devenir de la réponse immunitaire : rôle de la coopération cellulaire

Classiquement, la réponse immunitaire T est caractérisée par une expansion massive des clones spécifiques de l'Ag, et ce en quelques jours, suivi par une apoptose tout aussi forte des cellules T activées. De manière intéressante, cette mort cellulaire induite par l'activation utilise en partie les mécanismes effecteurs des cellules T (revue par (Harty and Badovinac, 2002)). Par exemple, il s'avère que l'expansion des cellules T CD8⁺ lors d'une infection par *Listeria Monocytogenes* est contrôlée par la perforine, alors que l'immunodominance de certains clones T et la phase de mort cellulaire est régulée par l'IFN γ (Badovinac et al., 2000). Parallèlement à cette mort cellulaire, des cellules T mémoires sont générées chez les animaux après l'élimination du pathogène, à un niveau pouvant atteindre 5-10% de la taille des clones

au pic de la réponse (Murali-Krishna et al., 1998). Autrement dit, au minimum 90% des cellules T spécifiques de l'Ag sont éliminées à la fin de la réponse immunitaire (Harty and Badovinac, 2002; Sprent and Tough, 2001). Enfin, la composition de la population de cellules mémoires n'est pas figée, mais dépend des immunisations successives subies par l'individu (Selin et al., 1999). Suivant la séquence et la nature de ces immunisations, la composition du répertoire des cellules T mémoires peut donc varier considérablement.

Cependant, la situation n'est pas forcément aussi idéale. Pour commencer, si l'Ag n'est pas efficacement éliminé, ou si le pathogène se réplique trop vite et parvient à se maintenir, on peut observer un épuisement des cellules T CD8⁺ spécifiques qui subissent alors une délétion clonale (Moskophidis et al., 1993; Oxenius et al., 1998; Webb et al., 1990). Un second mécanisme d'induction de tolérance à la périphérie est l'anergie des cellules T spécifiques, qui induit une diminution de l'expression en surface du TCR et du co-récepteur et des changements fonctionnels par rapport aux cellules naïves et mémoires (Rellahan et al., 1990; Rocha and von Boehmer, 1991; Tanchot et al., 1998). De plus, l'anergie empêche toute expansion des cellules T concernées, mais présente la caractéristique d'être réversible en absence de l'Ag spécifique (Rocha et al., 1993). Enfin, ces deux mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs, et un élément clef dans l'enclenchement d'un mécanisme d'induction de tolérance par rapport à l'autre pourrait être la concentration de l'Ag. En effet, il est suggéré que des fortes concentration d'Ag induisent plutôt l'anergie, alors que la délétion clonale est observée à des concentrations plus basses (Rocha et al., 1995).

Ces observations mettent en lumière la nécessité d'une collaboration étroite entre les trois types de lymphocytes pour tendre vers une efficacité optimale dans l'élimination des pathogènes (Hunziker et al., 2002; Zajac et al., 1998b). Un des modèles les plus utilisés pour déterminer le rôle relatif des lymphocytes B, T CD4⁺ et T CD8⁺ est celui de l'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaires (LCMV) (revue par (Oldstone, 1997; Zinkernagel et al., 1993)). La plupart des résultats montrent une déficience de surveillance immunitaire lorsqu'une des sous-populations est absente, que ce soit dans la génération ou le maintien d'une mémoire T CD8⁺ efficace, l'élimination définitive du virus ou encore le contrôle du virus pour éviter l'apparition de mutants d'échappement (Ahmed et al., 1988; Gallimore et al., 1998; Moskophidis et al., 1993; Thomsen et al., 1996; von Herrath et al., 1996). Certains modèles, dont celui du TCR aHY, ont toutefois indiqué que des cellules mémoires T CD8⁺ peuvent être générées et maintenues en absence des populations T CD4⁺ et B, ce qui suggère que la nature de l'Ag est déterminante dans la génération des cellules T mémoires (Di Rosa and Matzinger, 1996; Sprent, 1997).

Des cellules mémoires T sont générées suite à une réponse immunitaire, pour permettre à l'organisme de réagir plus efficacement contre une infection ultérieure par le même pathogène. En effet, les cellules T CD8⁺ naïves et mémoires sont qualitativement différentes, tant par leur phénotype que par leur comportement. Toutefois, si la réponse immunitaire n'est pas correctement contrôlée ou pas assez efficace, la sélection périphérique des cellules T peut déboucher sur l'anergie ou la délétion des cellules T activées. Globalement, les compartiments des cellules T naïves, effectrices et mémoires ne sont donc ni homogènes, ni statiques. Ils subissent au contraire un constant renouvellement sous la pression de l'export thymique, la circulation intra- et extra-lymphoïde, la différenciation suite à l'activation par un antigène et la mort cellulaire induite par l'activation. Cette dynamique des populations lymphocytaires T est un paramètre complexe mais essentiel pour pouvoir pleinement appréhender la question de l'homéostasie des cellules T.

B. Homéostasie des populations lymphocytaires T CD8⁺

1) Homéostasie de « l'écosystème » immunitaire

a) Généralités

Homéostasie : n.f. – Angl. *Homeostasis* (1926), du grec *homoios* « semblable », et *stasis* « position ». 1) physiologie : stabilisation, chez les organismes vivants, des différentes constantes physiologiques. 2) écologie : caractéristiques d'un écosystème qui résiste aux changements (perturbations) et conserve un état d'équilibre.

(Grand Larousse Universel, 1993)

Appliqué à un système ou un organe, le terme d'homéostasie désigne les mécanismes internes de régulation propres à ce système ou organe. Il semble intuitivement évident que le système immunitaire soit soumis à des mécanismes de régulation, car l'organisme constitue un environnement clos présentant par conséquent des limites d'espace ou de ressources disponibles (niches de sélection, nutriments, facteurs de croissance, ligands). Les mécanismes

homéostatiques assurent notamment que le nombre de cellules composant le système immunitaire soit conservé à un niveau fixe, et qu'il revienne à l'équilibre après le déclenchement d'une perturbation (revue par (Freitas and Rocha, 2000; Goldrath, 2002; Surh and Sprent, 2000; Tanchot et al., 1997a; Tuma and Pamer, 2002)).

b) Observations expérimentales

Plusieurs observations attestent de l'existence de la régulation homéostatique du système immunitaire. Tout d'abord, la production de cellules T matures par le thymus n'est pas un facteur limitant dans des conditions physiologiques normales, autrement dit le système est potentiellement en « surproduction ». Des souris irradiées létalement et reconstituées avec un mélange de précurseurs immunocompétents (50% de moelle osseuse normale) et incompetents (50% CD3ε^{-/-} ou TCRα^{-/-}) possèdent une population T périphérique de taille identique à celle des animaux contrôles (100% moelle osseuse normale) (Almeida et al., 2001). En mettant en circulation croisée un animal immunocompétent et une souris immunodéficente, c'est-à-dire en augmentant l'espace disponible, il s'avère que la production de cellules T de la souris immunocompétente est suffisante pour remplir les deux compartiments T (Freitas et al., 1996). La greffe d'un nombre croissant de lobes thymiques chez la souris montre une augmentation du nombre de lymphocytes, mais une souris greffée avec deux lobes ne double pas son nombre de lymphocytes (Berzins et al., 1999; Wallis et al., 1979). Il apparaît donc que l'homéostasie limite le nombre de cellules T à la périphérie par rapport au potentiel fourni par le thymus. La pression de l'homéostasie est également mise en évidence à la fin d'une réponse immunitaire, car on y observe un retour à l'équilibre du nombre de cellules T périphériques, suite à l'apoptose massive des clones spécifiques de l'antigène.

Au contraire, lorsque le nombre de précurseurs est extrêmement limité, le nombre de cellules T à la périphérie est maintenu de manière active, par exemple par l'augmentation de l'export thymique, l'accroissement de la survie des cellules T périphériques ou encore leur prolifération (Almeida et al., 2001). Cela a été également observé après transfert adoptif de cellules T vers des animaux immunodéficients *nu/nu*, ces expériences démontrant une grande capacité des cellules T, notamment naïves, à se diviser pour littéralement « remplir » la périphérie de ces souris (Ernst et al., 1999; Rocha et al., 1989). Enfin, lorsque la production thymique est soudainement arrêtée par thymectomie chez la souris ou l'humain adulte, un compartiment T substantiel peut se maintenir à long terme (Haynes et al., 2000; Swain et al., 1991). Globalement, l'homéostasie du système immunitaire permet donc de maintenir à

l'équilibre le nombre de cellules T périphériques, et ce que la production thymique soit optimale ou défectueuse.

c) Homéostasie des sous-populations lymphocytaires

L'homéostasie agit de manière différente selon les sous-populations de lymphocytes T concernées. En premier lieu, les deux populations T CD4⁺ et CD8⁺ sont étroitement liées, car la diminution d'une des deux sous-populations peut être compensée par l'augmentation de l'autre, comme constaté après une déplétion *in vivo* (Rocha et al., 1989). Cet effet compensatoire est également observé, au moins partiellement, dans des animaux déficients pour les molécules du CMH-I ou CMH-II, ou encore pour un des deux co-récepteurs (Cosgrove et al., 1992; Fung-Leung et al., 1991; Rahemtulla et al., 1991; Zijlstra et al., 1990). De plus, de multiples observations chez l'homme et la souris montrent que le ratio CD4/CD8 est conservé suivant les individus ou les souches, tant qu'ils sont dans des conditions physiologiques normales (Amadori et al., 1995; Kraal et al., 1983). Lorsque des souris *nu/nu* sont injectées avec des mélanges de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ à différentes proportions, il est intéressant de constater que le ratio récupéré après un mois est le même dans tous les groupes (Rocha et al., 1989).

Enfin, les cellules T naïves et mémoires/activées n'appartiennent pas à la même « niche de sélection » (Tanchot et al., 1997b), car la taille de chaque compartiment est régulée de manière indépendante. En effet, la taille d'une population de cellules T CD8⁺ CD44⁺ générée par prolifération homéostatique n'est pas affectée par l'export thymique de cellules matures CD44⁻ (Tanchot and Rocha, 1995), alors que les cellules T anergiques sont graduellement éliminées dans un tel système (Tanchot and Rocha, 1997). Il faut cependant préciser que le compartiment mémoire/activé est préférentiellement rempli au détriment du compartiment naïf au travers d'un mécanisme homéostatique fort (Almeida et al., 2001).

d) Perturbation et homéostasie

Lorsque la perturbation est trop forte ou bien constante, l'homéostasie est modifiée afin de permettre à l'organisme de s'adapter à la contrainte pour assurer des conditions de survie optimales. Nous avons déjà cité le cas des animaux greffés avec un grand nombre de lobes thymiques supplémentaires (Berzins et al., 1999). Chez ces souris, l'homéostasie est modifiée et le nombre de cellules T à la périphérie augmente par rapport à la normale, de façon non proportionnelle, sous la contrainte d'un export thymique décuplé. Un second cas concerne les modèles dans lesquels un antigène persiste dans l'organisme, par exemple lors d'infections

chroniques pouvant induire une rupture d'homéostasie. C'est ainsi le cas dans la pathologie du SIDA qui conduit en général à la chute des cellules T CD4⁺ (Margolick and Donnenberg, 1997). Toutefois, un traitement anti-rétroviral efficace permet de restaurer au moins partiellement les populations lymphocytaires, ce qui revient à dire que l'homéostasie fonctionne après disparition de la perturbation (Autran et al., 1997; Mackall et al., 1997). Les cas d'homéostasie réellement déficiente sont peu courants. On peut citer le cas des souris IL-2Rα^{-/-} (CD25^{-/-}), dans lesquelles le nombre de cellules T augmente de manière incontrôlée jusqu'à induire une mort précoce (Willerford et al., 1995).

La plupart de ces situations sont toutefois artificielles, soudaines ou encore pathologiques. Qu'en est-il lorsque les perturbations sont discrètes et étalées sur le long terme ? L'exemple le plus probant consiste dans le vieillissement de l'organisme, et notamment du thymus. En effet, le thymus est, chez l'homme, pleinement formé dès la naissance et son involution a lieu durant toute la vie, indépendamment de la puberté (Steinmann et al., 1985). Cette involution est caractérisée par un remplacement progressif du cortex et de la medulla par du tissu adipeux, ce qui s'accompagne d'une diminution de l'export thymique. Ainsi, chez les enfants, l'export thymique est estimé à plus de 10⁹ cellules par jour, contre 6-7.10⁶ cellules par jour à l'âge de 20 ans (Douek and Koup, 2000). Malgré cette chute de production d'un facteur 150 environ, on constate que le nombre de cellules T naïves est en général efficacement maintenu, sans doute par un mécanisme d'expansion périphérique (Haynes et al., 2000). L'étude chez la souris du nombre d'émigrants thymiques récents, par la mesure des cercles d'excision d'ADN, montre également un déclin en fonction de l'âge (Sempowski et al., 2002). Si une réduction significative du nombre de cellules T est notée, le ratio entre les populations T naïve et mémoire/activée est relativement conservé jusqu'à l'âge d'au moins deux ans chez ces souris (Sempowski et al., 2002). Ainsi, il est clair que l'homéostasie s'adapte à la baisse constante de production thymique durant l'existence.

2) Compétition lymphocytaire

Nous avons indiqué que l'homéostasie maintient le système immunitaire dans un état à l'équilibre, dans une situation où l'espace et les ressources disponibles sont limitées. Puisque le nombre de lymphocytes est maintenu constant, alors que la production thymique de nouvelles cellules T est continue, il semble envisageable qu'un mécanisme de compétition soit nécessaire pour déterminer qui peut survivre. La compétition est définie comme une interaction entre deux populations qui influe sur le taux de renouvellement ou le taux de disparition de ces populations, du fait de la présence du compétiteur. L'existence d'une

compétition entre lymphocytes a été mise en évidence, autant pour les cellules B (Freitas et al., 1995) que les cellules T (Freitas et al., 1996), en se basant sur deux critères principaux : 1) la présence d'une population compétitrice doit modifier la taille à l'équilibre d'une autre population ; 2) la compétition doit s'accompagner de modifications sur la durée de vie de cette population (revue par (Freitas and Rocha, 2000)).

Dans le cas des cellules T, le système utilisé consiste à mettre en compétition des populations de cellules T CD8⁺ Tg ou polyclonales, soit dans des chimères de moelle osseuse, soit dans des chimères après transfert périphérique, ou encore dans des parabioses (Freitas et al., 1996). Ces différentes approches expérimentales montrent que la compétition a lieu à plusieurs moments : 1) durant la transition entre les stades DN et DP ; 2) lors de la sélection positive ; 3) pendant la transition entre le thymus et la périphérie ; 4) et enfin dans les compartiments périphériques. De plus, la compétition n'entre en jeu que lorsque l'état d'équilibre est atteint, autrement dit lorsque les niches de sélection deviennent limitées. L'aptitude de compétition des cellules T est corrélée au degré d'activation et de division cellulaire, sans doute sous l'influence de la réactivité croisée du TCR exprimé avec des antigènes du soi. Enfin, la taille atteinte par chaque population T est fonction de la présence ou non de populations compétitrices. En somme, cette étude indique que la sélection du répertoire et la survie des populations de cellules T sont dépendantes de la présence des niches de sélection adéquates, mais sont en plus sous l'influence des autres cellules T potentiellement compétitrices pour ces niches de sélection (Freitas et al., 1996).

Un mécanisme raisonnable pour expliquer la compétition pourrait être l'accessibilité des cellules T aux CPA, comme les cellules dendritiques ou les macrophages, ou encore pour une interleukine centrale l'IL-7 (Prlic and Jameson, 2002). La mise en évidence de la compétition contribue à donner au système immunitaire l'image d'un écosystème, où chaque clone T représente une population, voire un individu si ce clone est formé par une unique cellule. Ces populations interagissent entre elles ; elles sont en constant renouvellement du fait de la production de nouvelles cellules naïves et des différenciations terminales ; elles sont en compétition pour les ressources nécessaires à leur survie, leur expansion, leur différenciation ; elles peuvent être modifiées à la suite d'une perturbation dans le système. Bref, « l'écosystème immunitaire » possède un caractère dynamique à même d'assurer la génération et le maintien d'un répertoire large et variable (revue par (Freitas and Rocha, 2000)).

3) Prolifération homéostatique

Nous allons ici aborder plus en détail la propriété de « prolifération homéostatique » des cellules T. En effet, de nombreuses données s'accumulent depuis peu sur ce sujet, et la question de la relevance physiologique de ce mécanisme est posée.

a) Quelques résultats anciens...

La prolifération homéostatique pourrait être décrite comme la tendance d'une population de cellules T à proliférer lorsqu'elle se trouve dans un environnement lymphopénique, jusqu'à atteindre un plateau défini par l'homéostasie et par la nature des cellules T considérées. Ce plateau est généralement inférieur à celui constaté chez un animal non manipulé. Il est intéressant de constater que les immunologistes redécouvrent depuis quelques années ce phénomène pourtant identifié il y a plus de 20 ans. Des expériences anciennes montrent que le compartiment T périphérique est capable de se maintenir chez la souris en absence de toute production thymique, puisque seule une thymectomie effectuée juste après la naissance peut induire une déficience drastique en lymphocytes T (Miller, 1979). Ainsi, les cellules T périphériques sont connues pour leur capacité à assurer leur maintien à la périphérie (Rocha et al., 1983), et à proliférer après transfert dans un hôte irradié ou bien génétiquement déficient pour le compartiment des lymphocytes T (Bell et al., 1987; Miller and Stutman, 1984; Rocha, 1987). Cette capacité à proliférer est inhibée lorsque le plateau homéostatique est atteint, et une suite de transferts successifs permet d'évaluer la capacité de division des cellules T. Ainsi, chaque cellule peut se diviser de 47 à 56 fois sur une période de 5 mois pour repeupler 4 souris immunodéficientes successives, ce qui correspond à une augmentation du nombre de cellule de $8 \cdot 10^{15}$ fois par rapport à la première injection (Rocha et al., 1989). Il a été montré que cette grande capacité de division est notamment liée à l'expression de la télomérase par les lymphocytes T pendant la phase d'expansion clonale (Hathcock et al., 1998).

b) ... et les données récentes

En utilisant le CFSE (5,6-CarboxyFluorescein diacetate Succinimyl Ester) pour marquer les protéines intracellulaires, on peut suivre quelques divisions d'une population de cellules (Lyons and Parish, 1994). Cette technique a été mise à profit pour marquer des populations de cellules T et suivre leur devenir après transfert dans des animaux receveurs. A chaque division, les cellules perdent environ la moitié du marquage de fluorescence, le CFSE étant distribué entre les deux cellules filles, et on ne peut en général pas observer plus de 8 divisions avec cette technique. Les résultats obtenus confirment que ces populations se

divisent après transfert dans des hôtes immunodéficients, déplétés en cellules T ou bien irradiés, alors qu'aucune division cellulaire n'est constatée dans des hôtes possédant un compartiment T normal (Ernst et al., 1999). Les populations T polyclonales se comportent de manière hétérogène, et il s'avère que les cellules T CD44⁺, c'est-à-dire avec un phénotype de type mémoire/activé, se divisent plus rapidement que les cellules naïves CD44⁻ (Ernst et al., 1999). Dans le cas de populations T TCR Tg⁺, la progression dans les divisions est plus homogène, mais la comparaison entre différents modèles montre une grande disparité suivant le TCR utilisé (Ernst et al., 1999; Ferreira et al., 2000; Kieper and Jameson, 1999). Cette disparité se retrouve sur l'acquisition d'un phénotype activé/mémoire des cellules T après une certaine période de prolifération homéostatique, à nouveau en corrélation directe avec la réactivité croisée supposée des TCR (Cho et al., 2000; Ernst et al., 1999; Goldrath and Bevan, 1999; Kieper and Jameson, 1999). Il a été suggéré que l'acquisition de ce phénotype activé/mémoire (CD44⁺ Ly6C⁺) pourrait être transitoire (Goldrath et al., 2000), mais ces expériences sont aujourd'hui sujettes à caution. En effet, ces résultats ont été notamment obtenus après des transferts de cellules T spléniques chez des animaux irradiés. Or, il semble maintenant clair que des précurseurs capables de coloniser la moelle osseuse, puis le thymus, se trouvent dans la circulation sanguine et la rate (Tanchot et al., 2002). Ainsi, la réversion de phénotype observée à long terme pourrait s'expliquer par une production *de novo* de lymphocytes T naïfs par le thymus des animaux receveurs (Goldrath et al., 2000).

La survie des cellules T CD8⁺ et CD4⁺ est dépendante de la présence des molécules CMH-I (Tanchot et al., 1997a) et CMH-II (Brocker, 1997) respectivement. La prolifération homéostatique est également dépendante de l'expression correcte des molécules du CMH puisque des cellules CD8⁺ injectées dans des receveurs TAP^{-/-} ne montrent pas de diminution du marquage au CFSE (Goldrath and Bevan, 1999; Kieper and Jameson, 1999). Similairement, aucune prolifération homéostatique n'est observée dans les receveurs I-A^bβ^{-/-} (Viret et al., 1999) et H-2M^{-/-} (Ernst et al., 1999) après transfert de cellules T CD4⁺. En somme, il apparaît que la prolifération homéostatique est fortement dépendante de l'interaction entre le TCR et les complexes pAg-CMH du soi, en l'absence de l'antigène spécifique. Cependant, il est probable que cette dépendance soit inférieure dans le cas des cellules T CD4⁺, différents modèles ayant montré une prolifération de ces lymphocytes dans un environnement déficient pour l'expression des molécules CMH-II (revue par (Dorfman and Germain, 2002)). D'autres facteurs entrent sans aucun doute en jeu dans le micro-environnement pour soutenir ou au contraire inhiber la prolifération homéostatique. L'IL-7,

potentiellement délivrée par des cellules stromales radio-résistantes des organes lymphoïdes secondaires, apparaît comme une cytokine majeure dans l'homéostasie des cellules T CD8⁺ et CD4⁺ (Schluns et al., 2000). D'autres interleukines pourraient réguler le phénomène, l'action stimulatrice de l'IL-12 sur la prolifération homéostatique étant semble-il contrebalancé par l'IL-2 (Kieper et al., 2001).

c) Implication physiologique de la prolifération homéostatique

La prolifération homéostatique pourrait correspondre à un mécanisme de régulation en réponse à une lymphopénie de l'organisme. Ainsi, il est connu que certaines infections virulentes peuvent induire une délétion massive et à long terme des cellules T, comme dans le cas du virus de la grippe ou de la rougeole (Okada et al., 2000; Tumpey et al., 2000). Le VIH induit quant à lui une déplétion sévère en lymphocytes CD4⁺, réversible à l'aide d'une thérapie anti-rétrovirale ((Ho et al., 1995; Wei et al., 1995), revue par (Margolick and Donnenberg, 1997)). De manière intéressante, il a été constaté que les lymphocytes T possèdent un taux de prolifération élevé lorsque la lymphopénie induite par le VIH est effective, alors qu'il est réduit pendant le traitement antiviral (Mohri et al., 2001). Chez l'homme, ce mécanisme de reconstitution périphérique est bien identifié pour les cellules T CD8⁺, que ce soit à la suite d'une infection ou d'une action médicale, comme une irradiation ou une chimiothérapie (Mackall et al., 1997). Toutefois, on constate en général que des désordres dans la composition de la population existent, avec une expansion de sous-populations atypiques possédant des capacités fonctionnelles réduites (Autran et al., 1991; Brinchmann et al., 1994) à l'image de ce qui est progressivement observé chez les personnes âgées (Sansoni et al., 1993).

Chez la souris, des expériences de transfert ont montré que les familles de cellules T, définies par l'expression des segments Vβ, sont capables de s'expandre de manière similaire, mais il est admis que cette observation ne préjuge pas du caractère large ou réduit du répertoire T obtenu (Pereira and Rocha, 1991). Plus récemment, il a été suggéré qu'une certaine oligoclonalité du répertoire T peut se mettre en place lorsque la production thymique est extrêmement réduite (Almeida et al., 2001), et l'analyse du répertoire par évaluation de la distribution des tailles du CDR3 (Immunoscope) montre clairement une oligoclonalité après thymectomie néonatale (La Gruta et al., 2000). Ainsi, l'expansion des cellules T dans un environnement lymphopénique peut tout à fait biaiser le répertoire en sélectionnant certains clones au détriment d'autres.

4) Survie des cellules T CD8⁺

a) Quelques estimations sur la durée de vie

La détermination de la durée de vie des lymphocytes est un sujet de polémique depuis de nombreuses années. Cela est notamment lié à la disparité des méthodes d'étude et à l'hétérogénéité du sens donné à la notion de « durée de vie » d'une cellule. Pour simplifier, on pourrait dire qu'une cellule à longue durée de vie est une cellule qui ne se divise pas et qui ne meurt pas. Dans le cas des cellules T, il a été suggéré que la population dans son ensemble est composée d'un mélange de cellules à longue et à courte durée de vie. En effet, en utilisant des drogues éliminant les cellules en division, il a été montré que la moitié des cellules T sont remplacées tous les 2 à 3 jours, confirmant donc qu'au moins une partie des lymphocytes T possède une courte durée de vie (Freitas et al., 1986; Rocha et al., 1983). Toutefois, des expériences de transfert de cellules T dans des receveurs immunodéficients ont montré que l'état à l'équilibre peut être maintenu pendant de longues périodes : les cellules T transférées ne disparaissent pas (Rocha, 1987). Ces résultats pourraient s'expliquer par la sélection d'une sous-population à longue durée de vie dans ces conditions particulières.

Dans les années 90, de nombreuses expériences ont cherché à déterminer l'état du cycle cellulaire des différentes sous-populations de cellules T, notamment en analysant l'incorporation de BrdU par les cellules en division. L'identification des cellules T périphériques en division peut être réalisée après thymectomie chez la souris adulte, afin de s'affranchir de l'export de nouvelles cellules T. De telles expériences montrent que les lymphocytes T CD8⁺ CD44^{high} prolifèrent plus que les cellules T naïves CD44^{low}, ces dernières apparaissant clairement comme des cellules très majoritairement au repos (Tough and Sprent, 1994). Le marqueur CD44 étant considéré comme un marqueur d'activation des cellules T, la corrélation entre son expression et la prolifération n'est pas étonnante, et aucune conclusion sur la durée de vie des cellules T CD8⁺ mémoires ne peut être tirée. De plus, la toxicité du BrdU *in vivo* couplée à la thymectomie ne facilite pas l'interprétation de ces résultats. En utilisant différentes lignées de souris Tg pour le TCR, il a été montré que l'incorporation de BrdU en l'absence de l'antigène spécifique est toutefois variable suivant le TCR utilisé, ce qui suggère que la réactivité croisée du TCR avec des antigènes environnementaux joue un rôle important dans la définition de l'état d'activation des cellules T (Bruno et al., 1996b). Dans le modèle du TCR aHY, dont la réactivité croisée est très faible, il a été ainsi estimé que la durée de vie des cellules naïves est d'au minimum 8 semaines (von Boehmer and Hafn, 1993).

b) Facteurs de survie

Afin de mieux comprendre les mécanismes qui déterminent le nombre des lymphocytes et qui maintiennent le système à l'équilibre, il semble important de chercher à mettre en évidence les ressources qui régissent la survie des cellules T. Au travers de la littérature disponible, il n'est toutefois pas aisé de faire clairement la distinction entre la survie et la prolifération homéostatique, alors que les facteurs requis lors de la réponse immunitaire sont mieux dissociés.

i- L'interaction TCR/CMH

En premier lieu, la survie des cellules T naïves est dépendante de l'expression des molécules du CMH responsables de la sélection positive (Brocker, 1997; Kirberg et al., 1997; Murali-Krishna et al., 1999; Tanchot et al., 1997a). Ainsi, lorsque des cellules T aHY sont injectées dans des animaux déficients pour leur élément de restriction H-2D^b, elles disparaissent en moins de deux semaines (Tanchot et al., 1997a). Dans le cas des cellules mémoires, la réponse est moins claire, et est sans doute à mettre en relation avec la réactivité croisée des TCR concernés. Ainsi, les cellules T aHY mémoires montrent une certaine dépendance aux molécules CMH-I, et l'absence de l'élément de restriction H-2D^b n'induit pas leur disparition, si tant est que H-2K^b est exprimé dans l'hôte (Tanchot et al., 1997a). D'autres systèmes présentant une réactivité croisée reconnue montrent que les cellules T CD8⁺ mémoires peuvent se maintenir en l'absence des molécules CMH-I, et à des niveaux réduits qui pourraient laisser supposer que certaines populations de cellules mémoires sont sélectionnées dans ces conditions particulières (Murali-Krishna et al., 1999).

Récemment, deux équipes ont cherché à estimer la durée de vie « intrinsèque » des cellules T en l'absence de TCR à la surface (Labrecque et al., 2001; Polic et al., 2001). Considérant que l'interaction TCR/CMH est fondamentalement impliquée dans le maintien de la survie des cellules T, il n'est pas évident que la réponse soit apporté par cette approche. Toutefois, ces expériences donne une bonne idée de la dépendance des cellules T à l'interaction avec les molécules du CMH. Le groupe de D. Mathis et C. Benoist a utilisé le modèle du TCR OT-1 dans un système permettant l'extinction de l'expression de la chaîne α du TCR tant que dure un traitement à la tétracycline (Labrecque et al., 2001). Dans ce système, l'expression du TCR chute de 95% à la surface des cellules T durant la première semaine de traitement, et il n'y a plus de thymocytes SP dans les thymus des animaux après 3 semaines de traitement, contrairement aux animaux contrôles également traités. Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) des populations T CD4⁺ et CD8⁺ dans ces conditions a été évalué à 27 et 19 jours respectivement,

ce qui n'est pas excessivement supérieur aux conclusions tirées des expériences de transfert (Labrecque et al., 2001). Enfin, on remarque que la courbe de disparition des cellules T CD8⁺ semble biphasique, avec une première phase de disparition rapide suivi d'une seconde phase plus lente. Cela pourrait être lié à une différence de dépendance aux signaux de survie du TCR de la part de différentes sous-populations cellulaires. Cette idée semble confirmée par une étude utilisant le système de délétion Cre-LoxP pour induire la disparition du TCR à partir de la surface des cellules T (Polic et al., 2001). Dans ce système polyclonal, la disparition des cellules T CD8⁺ TCR⁻ ($t_{1/2}$ =19 jours) est à nouveau plus rapide que celle des cellules CD4⁺ TCR⁻ ($t_{1/2}$ =46 jours). De manière intéressante, de grandes disparités sont constatées entre les cellules naïves et mémoires/activées, ces dernières montrant une durée de survie accrue dans le cas des cellules T CD8⁺ TCR⁻ ($t_{1/2}$ =52 jours), voire se maintenant à long terme dans le cas des cellules T CD4⁺ TCR⁻ (Polic et al., 2001). Ces résultats semblent donc compatibles avec certains transferts de cellules T mémoires CD4⁺ et CD8⁺ (Murali-Krishna et al., 1999; Swain et al., 1999).

ii- Peptide du soi et antigène

La nature de l'interaction TCR/CMH nécessaire pour maintenir la survie et l'homéostasie des cellules T naïves semble passer par une reconnaissance de complexes CMH-pAg du soi avec une affinité faible (Surh and Sprent, 2000). Cependant, on est loin d'atteindre un consensus sur le fait de savoir si les peptides impliqués dans la sélection thymique et la survie périphérique sont différents ou non. En utilisant un peptide antagoniste, connu pour soutenir la sélection positive des cellules exprimant le TCR OT-1, il a été montré que la prolifération homéostatique peut avoir lieu (Goldrath and Bevan, 1999). Une conclusion similaire a été obtenue pour les cellules T CD4⁺ avec le système des souris H-2M^{-/-}, dans lesquelles toutes les molécules CMH-II sont chargées avec le peptide CLIP (Fung-Leung et al., 1996; Martin et al., 1996; Miyazaki et al., 1996). Dans ces expériences, une population polyclonale de cellules T CD4⁺ transférée dans un receveur H-2M^{-/-} irradié ne montre pas de signe d'activation et ne prolifère pas. Par contre, les cellules T CD4⁺ sélectionnées dans le fond H-2M^{-/-} prolifèrent plus que les cellules CD4⁺ issues d'une souris normale après transfert dans un receveur H-2M^{-/-} (Ernst et al., 1999). Toutefois, la différence n'est pas spectaculaire, et il s'avère que des résultats contraires ont été rapportés dans un système équivalent, où toutes les cellules T sont sélectionnées par un ligand unique IAβ^b-pAg Tg dans un fond IAβ^{b/-} Ii^{-/-} β2m^{-/-} empêchant la présentation par les molécules du CMH endogènes (Bender et al., 1999). Dans ce système, les cellules T prolifèrent lorsqu'elles sont mises en présence d'un spectre large de

complexes pAg-CMH, alors que le complexe IAβ^b-pAg Tg responsable de la sélection thymique n'induit pas de prolifération homéostatique.

Plusieurs groupes ont montré que la survie des cellules T mémoires est dépendante de la persistance de l'antigène (Gray and Matzinger, 1991; Kundig et al., 1996; Oehen et al., 1992). Cela pourrait notamment se faire sous la forme de complexes Ag-immunoglobulines séquestrés au niveau des cellules dendritiques folliculaires (Mandel et al., 1980). Cependant, il a été décrit que le maintien des cellules mémoires T CD8⁺ anti-LCMV n'est pas affecté dans des souris déficientes en cellules B (Asano and Ahmed, 1996). A l'opposé, d'autres études tendent à prouver que l'absence de l'Ag ne gêne en rien le maintien des cellules T mémoires (Mullbacher, 1994; Tanchot et al., 1997a). Il est probable que la diversité des modèles utilisés explique ces résultats divergents. En effet, on constate globalement que la dose d'Ag, la capacité du pathogène à se multiplier, sa localisation et sa voie d'entrée dans l'organisme sont autant de facteurs qui influent sur le déroulement de la réponse immunitaire et le développement de la mémoire immunitaire (Dutton et al., 1998; Zinkernagel et al., 1997).

iii- Les interleukines

L'IL-7 est un bon candidat pour le maintien de la survie des cellules T CD8⁺, comme l'ont montré un certain nombre de systèmes *in vitro* (Hassan and Reen, 1998; Vella et al., 1997) ou *in vivo* (Schluns et al., 2000; Soares et al., 1998; Webb et al., 1999) chez l'homme et la souris. Malheureusement, l'absence de l'indication du nombre de cellules T récupérées après transfert est un élément dommageable pour certaines de ces études, même si les profils de division cellulaire par suivi du marquage au CFSE montrent une absence de prolifération (Schluns et al., 2000). En effet, il est finalement difficile de bien faire la part de l'influence de l'IL-7 sur la survie ou la prolifération homéostatique des cellules T naïves. On remarque toutefois que la présence d'IL-7 dans le milieu cellulaire semble soutenir l'activité métabolique des lymphocytes T et prévient l'atrophie cellulaire (Rathmell et al., 2001). Le fait que les lobes de thymus greffés produisent de l'IL-7 (Marrack et al., 2000) pourrait expliquer, au moins en partie, l'augmentation du nombre de cellules T périphériques après la greffe (Berzins et al., 1999). L'influence de l'IL-4 (Boursalian and Bottomly, 1999; Vella et al., 1997) et de l'IL-6 (Teague et al., 2000) est sans doute moins importante, mais ces deux cytokines pourrait parfaitement se substituer à l'IL-7 dans certaines situations. Enfin, l'IL-15, constitutivement exprimée par les cellules stromales, est essentielle au maintien et à

l'expansion des cellules T CD8⁺ mémoires (Ku et al., 2000; Zhang et al., 1998), et son rôle semble contrebalancé par l'IL-2 via un mécanisme non-identifié (Ku et al., 2000).

Un micro-environnement organisé semble nécessaire pour permettre les interactions cellulaires adéquates à la survie des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes. En effet, le transfert de cellules T dans des animaux déficients pour la lymphotoxine- α , dont la structure des organes lymphoïdes est totalement désorganisée, montre une quasi-absence de division de ces cellules (Dummer et al., 2001). L'influence du micro-environnement cellulaire est sans doute importante, notamment dans le cadre d'une compétition des cellules T pour des niches de survie ou de sélection à la périphérie. Ainsi, cette compétition pourrait avoir lieu au niveau de la délivrance locale de cytokines, pour des complexes CMH-pAg du soi particuliers, ou encore pour des signaux de co-stimulation, bref, au niveau des CPA. En conclusion, la survie des cellules T naïves passe par une stimulation constante, mais discrète, de leur TCR par leur élément de restriction du CMH, et de la disponibilité en IL-7. Dans le cas des cellules mémoires, c'est l'IL-15 qui joue un rôle primordial, alors que l'interaction TCR-CMH est soit moins stricte vis-à-vis de l'élément de restriction, soit non requise. Dans ce contexte, le seuil de perception des ressources par les cellules mémoires semble inférieur au seuil des cellules naïves.

L'homéostasie du système immunitaire est reliée à au moins 5 phénomènes : 1) la génération thymique d'un répertoire mature naïf colonisant les compartiments périphériques ; 2) la réponse immunitaire et ses conséquences sur la composition du répertoire mémoire/activé ; 3) la capacité des cellules T de proliférer suite à un épisode de lymphopénie ; 4) la survie respective des compartiments T naïf et mémoire ; 5) la compétition des cellules T entre elles pour des ressources. Les mécanismes de régulation homéostatique sont différents suivant la sous-population lymphocytaire T considérée, et les cellules T mémoires/activées sont sous le contrôle d'un facteur homéostatique fort qui force avant tout le maintien de cette population. Enfin, l'homéostasie s'adapte aux conditions environnementales, notamment face au vieillissement et à l'involution thymique qui l'accompagne.

Résultats

I. TRAVAIL DE THÈSE

Le travail effectué pendant ma thèse s'articule autour des trois problématiques que sont la sélection thymique, la sélection périphérique, et la dépendance des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ matures vis-à-vis des molécules de classe I du CMH pour leur survie. Ces trois questions ont été abordées en majeure partie à l'aide de souris transgéniques pour l'expression du TCR.

Le TCR aHY (V β 8.2 V α T3.70) reconnaît spécifiquement un épitope issu du produit du gène *Scmy* dans le contexte de la molécule H-2D^b (Markiewicz et al., 1998). Les cellules T exprimant ce TCR possèdent le phénotype CD4⁻ CD8⁺ (Teh et al., 1988). Ce modèle offre la possibilité d'étudier l'influence de la présence (chez le mâle) ou de l'absence (chez la femelle) de l'Ag spécifique sur le développement des lymphocytes T CD8⁺, et a été notamment utilisé pour mettre en évidence la sélection négative des lymphocytes (Kisielow et al., 1988).

Le second modèle que nous avons utilisé est celui du TCR P14 (V β 8.1 V α 2), également restreint à H-2D^b (Pircher et al., 1989). Les cellules T exprimant le TCR P14 possèdent le phénotype CD8⁺ et reconnaissent spécifiquement le peptide gp33-41 dérivé du précurseur de la glycoprotéine d'enveloppe du virus LCMV (Pircher et al., 1990). Nous avons croisé ces deux lignées transgéniques (dans un fond génétique C57/B16) avec la lignée B6.RAG2^{-/-} (Shinkai et al., 1992), afin d'obtenir deux lignées de souris sans cellules B et monoclonales pour le TCR Tg (MoaHY, MoP14). Enfin, nous avons croisé entre elles les deux lignées monoclonales MoaHY et MoP14, dans le but de produire des souris MoP14 x MoaHY double-transgéniques (DTg) pour le TCR.

Comme nous l'avons déjà indiqué, le nombre de lymphocytes T $\alpha\beta$ exprimant deux TCR à leur surface est potentiellement élevé. En effet, si seulement 1% des cellules T $\alpha\beta$ possèdent deux réarrangements productifs au locus TCR β (Balomenos et al., 1995; Padovan et al., 1995), jusqu'à 30% d'entre elles peuvent contenir deux réarrangements productifs au locus TCR α (Casanova et al., 1991; Heath et al., 1995; Padovan et al., 1993). Potentiellement, les cellules T $\alpha\beta$ exprimant deux TCR pourraient être impliquées dans des phénomènes d'auto-immunité. En modulant l'expression d'un premier TCR autoréactif, ces cellules pourraient être sélectionnées positivement via un second TCR exprimé à la surface, ce qui conduirait à l'existence de cellules dangereuses pour le soi à la périphérie (Sarukhan et al., 1998; Zal et al., 1996).

Dans une première partie de ce travail de thèse, j'ai donc analysé le déroulement de la sélection thymique dans les souris DTg pour le TCR, en gardant à l'esprit que l'un des TCR

(aHY) est autoréactif chez les souris mâles (**Article 1**). J'ai également cherché à préciser le comportement des cellules T DTg matures sélectionnées chez les femelles ou les mâles (**Article 2**). Ainsi, j'ai pu comparer le cas des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ en absence ou en présence de l'autoantigène mâle, ainsi que le comportement des cellules DTg avec celui des cellules issues des souris monoclonales.

Le second axe de ma thèse porte sur la sélection périphérique des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺. J'ai analysé la réponse des cellules T $\alpha\beta$ issues des souris DTg, *in vitro* et *in vivo* (**Article 2**). J'ai également cherché à préciser le comportement des souris MoP14 lors d'une infection par le LCMV (**Article 3**). En effet, l'absence de cellules T CD4⁺ « auxiliaires » et de cellules B dans ces animaux, juxtaposée à l'existence d'un compartiment T CD8⁺ entièrement dirigé contre le virus, offre des conditions d'étude intéressantes.

Enfin, la dernière partie de ma thèse concerne l'influence des molécules de classe I du CMH sur la survie des lymphocytes T CD8⁺. Il est en effet connu que les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ naïves sont extrêmement sensibles à l'absence de leur élément de restriction à la périphérie, alors que les données concernant les cellules mémoires sont contradictoires selon les modèles d'étude (Murali-Krishna et al., 1999; Tanchot et al., 1997a). Dans ces conditions, le laboratoire a développé une nouvelle gamme de souris receveuses déficientes pour l'expression des molécules de classe I du CMH. Ces animaux ont été injectés avec des populations directement isolées à partir de souris Tg pour le TCR, restreint soit par H-2D^b (souris MoaHY, MoP14, DTg), soit par H-2K^b, dans le cas du TCR OT-1 (Hogquist et al., 1994). La cinétique de disparition, de survie ou d'expansion des cellules T transférées a été suivie en fonction des molécules du CMH exprimées (**Résultats supplémentaires**).

Au final, l'ensemble de ces résultats amène à imaginer un schéma de l'adaptation de la sélection et de la survie des lymphocytes T $\alpha\beta$ en fonction des conditions environnementales, schéma qui sera discuté à la fin de ma thèse.

Article 1

« CD8⁺ T lymphocytes in double $\alpha\beta$ TCR transgenic mice. I. TCR expression and thymus selection in the absence or in the presence of self antigen »

Nicolas Legrand & A.A. Freitas

The Journal of Immunology, 2001, 167 : 6150-6157

II. SÉLECTION THYMIQUE DANS DES SOURIS DOUBLE-TRANSGÉNIQUES POUR LE TCR

Nous avons créé une lignée de souris double-transgénique (DTg) pour le TCR $\alpha\beta$, dans un fond RAG-2^{-/-}, en croisant entre elles les deux lignées monoclonales MoaHY et MoP14. Ces deux TCR sont restreints par la molécule du CMH-I H-2D^b, et sont spécifiques pour l'antigène mâle H-Y et le peptide gp33-41 issu du LCMV, respectivement. Pour commencer, nous avons analysé le développement thymique des cellules T dans ces animaux.

Chez les femelles DTg, la plupart des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ expriment à leur surface uniquement la chaîne β du TCR aHY, alors que les deux chaînes α sont exprimées. Nous avons en effet observé que les deux chaînes α sont co-intériorisées avec la chaîne β du TCR aHY. De plus, les cellules DTg sont efficacement stimulées *in vitro* par le peptide spécifique du TCR aHY, alors que le peptide gp33-41 n'induit pas de prolifération. L'analyse des populations thymiques les plus précoces chez les animaux MoaHY montre que l'expression de la chaîne β permet de shunter les stades TN1/TN2. Ainsi, la chaîne β du TCR aHY est fortement exprimée au stade TN3 (CD44⁻ CD25^{int}). Par contre, la même analyse chez les animaux MoP14 montre l'existence de deux sous-populations TN3, l'une de phénotype CD44⁻ CD25^{high}, l'autre étant CD44⁻ CD25^{int}. Dans ces deux populations, l'expression des chaînes α et β du TCR P14 est nulle (CD44⁻ CD25^{high}) ou faible (CD44⁻ CD25^{int}). C'est uniquement au stade TN4 que leur expression devient forte.

Pour aller plus loin, nous avons évalué par Immunoscope l'expression des transcrits des deux chaînes β présents dans les cellules T CD8⁺ DTg. Clairement, une majorité (90%) des transcrits TCR β dans ces cellules codent pour l'expression de la chaîne β du TCR aHY, alors que les transcrits TCR β P14 sont rares (10%). Nous avons donc conclu que les lymphocytes T CD8⁺ des femelles DTg expriment à leur surface deux TCR majoritaires, à savoir le TCR aHY et le TCR V β aHY⁺ V α P14⁺. Enfin, H-2D^b est l'élément de restriction des différents TCR exprimés à la surface de ces cellules, comme le montrent des expériences de reconstitution avec de la moelle osseuse DTg et des receveurs exprimant ou non cette molécule de classe I du CMH.

Ensuite, nous avons examiné la sélection thymique des cellules DTg en présence de l'autoantigène, autrement dit dans les souris mâles. Tout d'abord, l'expression de la chaîne α du TCR P14 permet d'éviter une sélection négative drastique, contrairement à ce qui est observé dans les mâles MoaHY. Cela est confirmé par la présence d'un grand nombre de

cellules T $\alpha\beta$ CD8^{low/+} à la périphérie des mâles DTg. Toutefois, ces cellules expriment moins de chaîne α du TCR aHY. De plus, les expériences de co-internalisation et de mesure des transcrits des chaînes TCR β montrent que la chaîne β du TCR P14 est exprimée à des niveaux plus élevés chez les mâles DTg, comparativement aux femelles. Les différences de phénotype entre les différents cas (monoclonal ou DTg, femelles ou mâles) suggèrent que les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ s'adaptent aux conditions environnementales afin de recevoir des signaux de survie à un niveau optimal. Cette adaptation se fait notamment en modulant l'expression du TCR et du co-récepteur.

CD8⁺ T Lymphocytes in Double $\alpha\beta$ TCR Transgenic Mice. I. TCR Expression and Thymus Selection in the Absence or in the Presence of Self-Antigen¹

Nicolas Legrand and Antonio A. Freitas²

We derived Rag2-deficient mice bearing two rearranged $\alpha\beta$ TCR transgenes, one specific for the HY male Ag and the second specific for the gp33-41 peptide of lymphocytic choriomeningitis virus, both restricted to the MHC H-2D^b class I molecule. We found that, in female double transgenic (DTg) mice, most CD8 T cells express only the TCR β chain from the aHY transgene. By comparing the mRNA species for both β -chains, we observed that in T cells from DTg mice the aHY TCR β chain transcripts are abundant, whereas the anti-lymphocytic choriomeningitis virus TCR β chain transcripts are rare. In contrast to TCR β chain expression, most of the T cells from DTg mice express two TCR α chains. We examined the thymus selection of the dual-receptor CD8 T cells in the presence of self-Ag. We found that the presence of a second TCR α chain allows a significant number of CD8 T cells expressing a self-reactive receptor to escape central deletion and migrate to the peripheral pools of male mice. Differences in TCR and coreceptor expression between female and male MoaHY and DTg mice suggest that peripheral T cell survival requires an optimal level of signaling, which implies a process of "adaptation" of lymphocyte populations to the host environment. *The Journal of Immunology*, 2001, 167: 6150–6157.

Antigen receptors of B and T lymphocytes are subjected to allelic exclusion (1). In general, for T cells the TCR β chain gene segments start to rearrange on one chromosome and continue on the second chromosome only when the first attempt resulted in a nonproductive gene (2). Productive rearrangement results in the expression of a TCR β chain, which alone (3) or in association with the pre-TCR α (pT α)³ chain (4, 5) during the early phases of T cell development is essential for TCR β chain allelic exclusion. Allelic exclusion of the TCR, however, is never fail proof. Different studies indicate that ~1% of the mature $\alpha\beta$ T cells contain two productive TCR β alleles (6, 7). Differential kinetics of TCR β chain expression, however, may still contribute to inhibition of the expression of one of the two productive rearrangements. Thus, TCR β chains may compete for limited amounts of pT α (5) and/or the CD3 complex, and in this case it is possible that the first β -chain expressed preempts surface expression of a second β -chain. At the protein level, earlier expression of one TCR β chain may also change the efficiency of the association and expression of distinct TCR heterodimers (8). In contrast to the TCR β locus, TCR α chain rearrangements proceed simultaneously

in both chromosomes (9) and ~30% of the human $\alpha\beta$ T cells express two TCR α chains (10–12). In normal mice, 30% of $\alpha\beta$ T cells show two rearranged α -chains (10) and a variable fraction express two α -chains, suggesting that the likelihood of generation of T cells with dual specificity is elevated.

Potentially the allelically included T cells could play an important role in autoimmunity. In dual-receptor cells, a second self-reactive TCR could bypass negative selection in the thymus, by virtue of its lower expression. If a non-self Ag stimulates the naive dual-receptor T cells, these T cells once activated would acquire a lower threshold of activation, respond to self-peptide/MHC, and cause disease. Several in vivo experimental models have examined this possibility. Studies on the susceptibility to spontaneous autoimmune diseases of nonobese diabetic mice hemizygous for the TCR α locus did not support the role of dual α T cells in autoimmune diabetes (13). However, in different mouse models, co-expression of two TCR transgenes rescues self-reactive T cells from tolerance induction and allows their exit into the periphery (14, 15). These cells could be stimulated in vitro to anti-self effector functions via the second receptor (14), and their in vivo presence was correlated to the induction of autoimmune diabetes when the relevant Ag was expressed by the pancreatic tissue (15).

The role of dual-receptor T cells in autoimmune diseases, however, is strictly dependent in their ability to maintain surface expression of two functional receptors and to be positively selected in the thymus. Because thymus positive selection requires receptor engagement by MHC molecules (16), it is likely that, in the presence of two receptors bearing a different specificity, each may impose some constraints to the selection of dual-receptor T cells. Indeed, it was recently shown that reduced specific receptor density results in reduced thymus positive selection of dual-receptor T cells (17). To examine these questions, we studied thymus T cell selection and TCR expression in Rag2-deficient animals bearing two complete rearranged $\alpha\beta$ TCR transgenes. One receptor is specific for the HY male Ag (18, 19) and the second is specific for the gp33-41 peptide of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) (20), both restricted to the same MHC H-2D^b class I molecule.

Lymphocyte Population Biology Unit, Unité de Recherche Associée, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur, Paris, France

Received for publication July 13, 2001. Accepted for publication September 21, 2001.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by the Institut Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique, Agence Nationale de Recherches sur le SIDA, Association pour la Recherche sur le Cancer, Sidaction, and Ministère de la Recherche et de l'Technologie, France.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Antonio A. Freitas, Lymphocyte Population Biology Unit, Unité de Recherche Associée, Centre National de la Recherche Scientifique, 1961 Institut Pasteur, 25 Rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France. E-mail address: afeitas@pasteur.fr

³ Abbreviations used in this paper: pT α , pre-TCR α ; LCMV, lymphocytic choriomeningitis virus; Tg, transgenic; DTg, double transgenic; MFI, mean fluorescence intensity; LN, lymph node; SP, single positive; BM, bone marrow; DN, double negative; DP, double positive.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6 mice transgenic (Tg) for the anti-HY TCR ($V\alpha T3.70; V\beta 8.2$) (18, 19), or the P14 TCR ($V\alpha 2; V\beta 8.1$) (20), were crossed into a Rag2-deficient background (21). The mice obtained (MoahY and MoP14) were intercrossed to give rise to MoahY.MoP14 double-transgenic (DTg) mice. All these strains were maintained in specific pathogen-free isolators at the Centre de Développement des Techniques Avancées pour l'Expérimentation Animale-Centre National de la Recherche Scientifique (Orléans, France). B6.CD3 $\epsilon^{-/-}$ mice (22) were from the Centre de Développement des Techniques Avancées pour l'Expérimentation Animale-Centre National de la Recherche Scientifique. Double CD3 $\epsilon^{-/-}$ H-2D $b^{-/-}$ mice (23) were maintained specific pathogen-free in our animal facilities at the Pasteur Institute and at the Centre de Développement des Techniques Avancées pour l'Expérimentation Animale.

Flow cytometry

The following mAbs were used: anti-CD8 α (53-6.7), anti- $V\alpha 2$ (B20.1), pan-TCR β chain (H57-597), anti- $V\beta 8.1/2$ (MR5-2), anti-CD3 ϵ (145-2C11), anti-CD4 (L3T4/RM4-5), anti-CD69 (H1.2F3), anti-CD25 (PC61), and anti-CD24/HSA (M1/69) from BD PharMingen (San Diego, CA) and anti-CD44 (IM781) and anti-CD62L (MEL14) from Caltag Laboratories (San Francisco, CA). The anti- $V\alpha T3.70$ and the F23.2 anti- $V\beta 8.2$ were from B. Rocha (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U345, Institut Necker, Paris, France). Cell-surface staining was performed with the appropriate combinations of FITC, PE, TRI-Color (Caltag Laboratories), PerCP (BD Biosciences, San Jose, CA), Biotin, and APC-coupled Abs. Biotin-coupled Abs were revealed by APC-, TRI-Color-, or PerCP-coupled streptavidin. Dead cells were excluded by light-scattering gating. All analyses were performed with a FACScalibur (BD Biosciences) interfaced to Macintosh CellQuest software (Apple Computer, Cupertino, CA). For TCR co-internalization analysis, spleen cells from Tg mice were incubated (37°C, 5% CO $_2$) in Na $_3$ -free balanced salt solution for different periods of time in the presence of Abs specific for either one of the Tg TCR α or TCR β chains. At the end of the incubation periods, cells were washed in 0.2% Na $_3$ and kept in the dark at 4°C. Next, the cells were stained with fluorescent Abs directed against TCR chains and were analyzed. Results are expressed as a percentage of the geometric mean of fluorescence intensity (MFI), compared with control cells incubated in absence of the first capping Ab.

Immunoscope

We followed the Immunoscope analysis previously described (24). In brief, total RNA extracted from lymph node (LN) CD8 T cells of the different Tg

mice by TRIzol (Life Technologies, Mannheim, Germany) was treated with DNase I (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). From each RNA sample, cDNA was prepared using (dT) $_{12-18}$ and Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies). The cDNAs for the different TCR β chains were amplified by PCR (40 cycles) using primers specific for the TCRV $\beta 8$ family (5'-TCC CTG ATG GRT ACA AGG CC-3') and TCR-C $\beta 2$ (5'-GCC AGA AGG TAG CAG AGA CCC-3'). The resulting PCR products were used for a run-off reaction (two cycles) using a nested fluorescent primer specific for the TCR-C $\beta 2$ segment (5'-CCT GGG TGG AGT CAC ATT TCT C-3'). Finally, the run-off products were resolved on an automatic 373A DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA), and the results were analyzed using the Immunoscope software (24).

Bone marrow (BM) chimeras

Host mice were lethally irradiated (900 rad) in a ^{137}Ce source and injected i.v. with 2–4 $\times 10^6$ BM cells. Thymus, spleen, inguinal, and mesenteric LN cell suspensions were prepared, and the number and phenotype of the cells were evaluated.

In vitro proliferation assays

Spleen cells from Tg mice were incubated in 96-well plates (10 5 cells/well) at 37°C, 5% CO $_2$, in a final volume of 200 μl in complete RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS (Boehringer Mannheim). Cells were stimulated with Con A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), anti-CD3 (BD PharMingen), or the TCR Tg specific peptides gp33-41 (25) (KAVYNFATM) and *Smcy*-3 peptides (26) (KCSRNRQYL) purchased from Neosystem (Strasbourg, France) and used with a >95% purity. After 1–4 days of culture, cells were pulsed overnight with 0.5 μCi of [^3H]thymidine (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA).

Results

CD8 $^+$ T cells in female $\alpha\beta$ TCR DTg Rag2-deficient mice

Mice expressing Tg TCRs specific for the male HY Ag (aHY) and for the gp33-41 peptide of the LCMV (P14) were crossed with B6.Rag2 $^{-/-}$ mice to obtain two lines of mice harboring homogeneous populations of CD8 $^+$ T cells all expressing the same TCR specificity. Monoclonal MoahY ($V\beta 8.2^+ V\alpha T3.70^+$) and MoP14 ($V\beta 8.1^+ V\alpha 2^+$) mice were intercrossed to obtain MoahY.MoP14 (DTg) mice bearing two MHC H-2D b class I-restricted TCR transgenes.

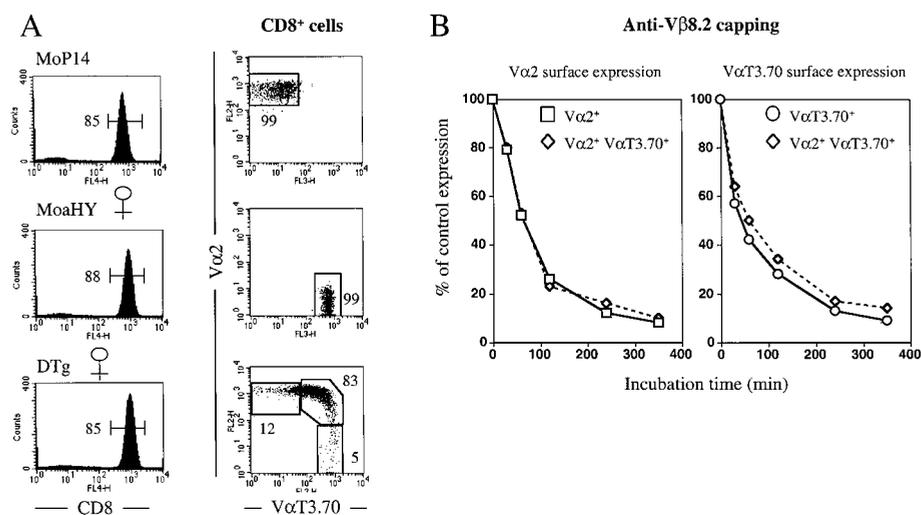


FIGURE 1. Peripheral T cells in MoP14, MoahY and MoahY.MoP14DTg female mice. *A*, Expression of CD8 (histograms) and of $V\alpha 2$ and $V\alpha T3.70$ TCR transgenes by gated peripheral LN CD8 T cells (dot plots). *B*, Spleen cells from DTg females were incubated for 6 h in the presence of a first anti- $V\beta 8.2$ capping Ab. The expression of the TCR α at different times after incubation was compared with the TCR α expression in absence of the first Ab. The left graph shows the kinetics of $V\alpha 2$ internalization (expressed as a percentage of MFI of control cells) among the $V\alpha 2^+ V\alpha T3.70^-$ (\square) and $V\alpha 2^+ V\alpha T3.70^+$ (\diamond) T cells. The right graph shows $V\alpha T3.70$ down-regulation in $V\alpha 2^- V\alpha T3.70^+$ (\circ) and $V\alpha 2^+ V\alpha T3.70^+$ (\diamond) T cells. We must mention that, in CD8 T cells from monoclonal mice, down-regulation of a TCR β chain correlates with the TCR α chain disappearance and vice versa. Thus, pre-incubation with T3.70 does not internalize the TCR of T cells from MoP14 origin, and pre-incubation with the P14- α chain-specific B20 Ab does not internalize the aHY TCR in T cells from MoahY mice. Similarly, the $V\beta 8.2$ Ab specific for the aHY TCR did not internalize the P14 TCR (data not shown).

In the DTg female mice, dual TCR α chain-expressing (V α 2⁺T3.70⁺) cells represent the majority (~80%) of the peripheral CD8 T cells (Fig. 1A). About 20% of the CD8 T cells express a single V α chain; i.e., they are either V α 2⁺T3.70⁻ (~5–15%) or V α 2⁻T3.70⁺ (~5–15%) (Fig. 1A). Expression of V α T3.70 was lower in DTg than in MoaHY mice, but varied as in aHY.Rag⁺ TCR Tg mice, where endogenous TCR α chains can be co-expressed (18). The vast majority (99%) of the peripheral CD8 T cells express the aHY TCR V β 8.2 chain. Only <1% of the total CD8 T cells are V β 8⁺8.2⁻V α 2⁺T3.70⁻, corresponding to the P14 TCR (data not shown). Although detection of T cells expressing each of the β -chains from the V β 8 family can be done using the F23.1, KJ16, and F23.2 Abs (27), we found that direct analysis of dual TCR β expression was not conclusive due to the lack of a V β 8.1 monospecific Ab. The assembly of the TCR transgenes at the cell surface of the DTg T cells was studied by following the kinetics of co-internalization of the different TCR Tg chains (Fig. 1B). Pre-incubation of DTg cells with anti-V β 8.2 promotes the complete internalization of both V α T3.70⁺ and V α 2⁺ chains, suggesting that the V β 8.2 aHY TCR β Tg chain associates with both the aHY and the P14 TCR α Tg chains. These results also indicate that, in the DTg cells, equivalent levels of surface expression of two TCR β chains must be a rare event. Studies on the in vitro response of DTg CD8 T cells to specific peptides provided further evidence of the poor expression of the V β 8.1 P14 TCR transgene. Thus, whereas the dual-receptor T cells proliferated in response to the *Scmy-3* HY peptide (Fig. 2, A and B), the P14-specific gp33-41 LCMV peptide failed to induce proliferation of DTg cells (Fig. 2C). However, it induced the early CD69 expression in 50% of V α 2⁺T3.70⁺ cells (Fig. 2D), indicating that those cells were still capable of peptide recognition and of a partial agonistic response (28).

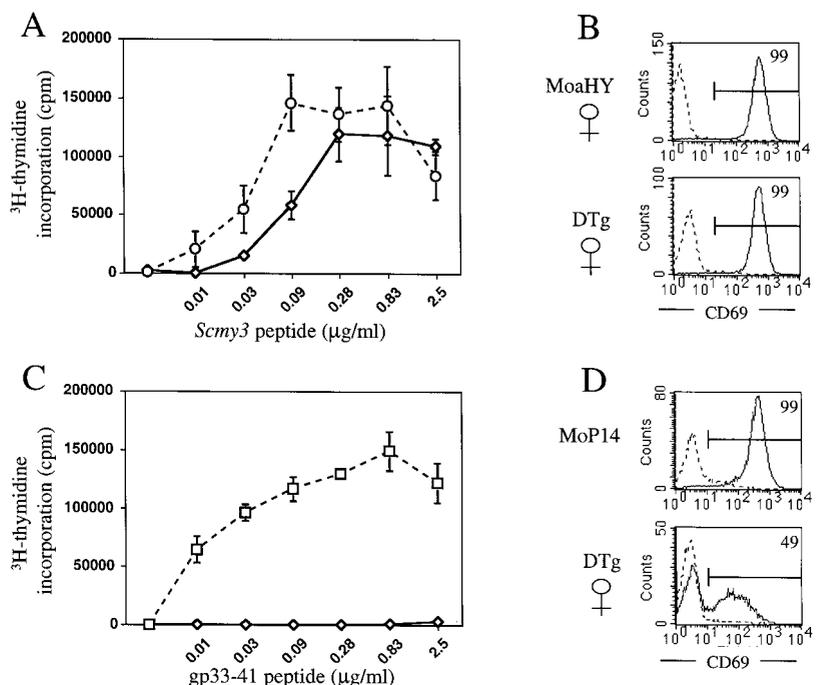
In summary, in female DTg mice, most dual-TCR CD8 cells are V β 8.2⁺V α 2⁺T3.70⁺. A minor fraction of the cells may also express low levels of P14 V β 8.1 chain, which are insufficient to induce cell proliferation by the gp33-41 peptide and only induce up-regulation of CD69 expression in a fraction of the DTg cells.

Thymus T cell development in $\alpha\beta$ TCR (DTg) Rag2^{-/-} female mice

To understand the cellular mechanisms that could lead to the exclusion of one TCR β chain transgene, we compared T cell development in the thymus of the DTg females, MoaHY females, and MoP14 mice (Fig. 3). The total number of thymocytes (~75 × 10⁶ cells) and the double negative (DN) (10%), double positive (DP) (80%), and single positive (SP) CD8⁺ (10%) distributions were similar in all mice (Fig. 3A). The composition of the DN populations as well as their levels of TCR expression (Fig. 3B) varied. In both MoaHY and DTg mice, CD44⁻CD25^{high} populations were absent, and all DN T cells, CD44⁻CD25^{int} and CD44⁻CD25⁻, expressed high levels of the aHY TCR β Tg V β 8.2. In the MoP14 mice, CD44⁻CD25^{high} cells were present and they did not express TCR. Expression of the P14 TCR β transgene was first detected among CD44⁻CD25^{int} cells, but the frequency of these cells with TCR^{high} expression was much lower than that found at similar stages of differentiation in the thymus of both MoaHY and DTg mice. Therefore, the aHY TCR β transgene was expressed earlier than the P14 TCR β chain. This earlier expression, probably before the CD44⁻CD25^{high} stage, induces the rapid transition of immature thymocytes into CD44⁻CD25^{int} DN cells and the disappearance of the CD44⁻CD25^{high} DN population. The kinetics of expression of the TCR α chain transgenes also differed. In MoaHY females, all CD44⁻CD25^{int} DN cells expressed high levels of V α T3.70, whereas in the MoP14 thymus, V α 2 expression was low in CD44⁻CD25^{int} DN cells and high levels of expression could only be detected among CD44⁻CD25⁻ DN cells.

In conclusion, the presence of a TCR transgene leads to the rapid transition of the thymus cells through the earlier steps of DN differentiation. The differential kinetics for the expression of the two TCR β chain transgenes show that T cell maturation occurs faster in MoaHY and DTg than in MoP14 mice. The earlier expression of the aHY TCR β transgene may lead to the functional exclusion of the second P14 TCR β Tg.

FIGURE 2. In vitro stimulation of T cells from MoP14, MoaHY, and MoaHY.MoP14 DTg mice. *A*, Spleen T cells from MoaHY female (○) and DTg female (◇) mice were stimulated in cultures with the *Scmy3* aHY TCR-specific peptide. Results show the [³H]thymidine incorporation at day 2 of culture obtained in one typical experiment (mean of triplicate ± SD). *B*, Peptide activated (solid line) and nonactivated (dotted line) cells were stained at 24 h for the surface expression of the early activation marker CD69. The percentage of CD69⁺ cells is indicated inside each histogram. *C* and *D*, The same analysis was performed for T cells from MoP14 mice (□) and DTg female (◇) using the gp33-41 P14 TCR-specific peptide.



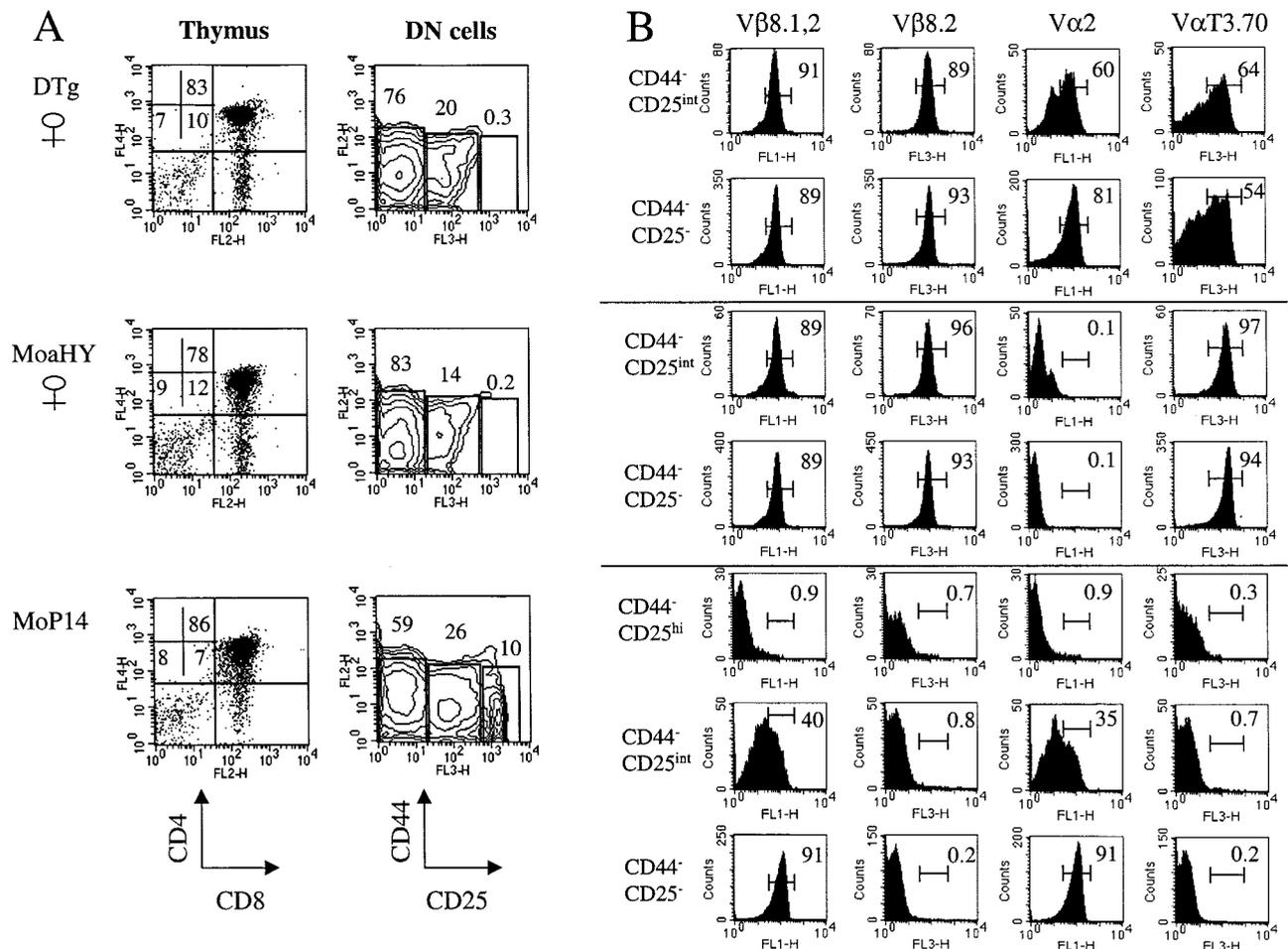


FIGURE 3. T cell development in the thymus of single- and double-TCR Tg Rag2-deficient female mice. *A*, Thymus cells from MoaHY.MoP14DTg, MoaHY, and MoP14 mice were stained for the expression of CD4 and CD8 (*left panels*). The relative proportions of the different DN, DP, and SP populations are shown in the quadrants inside each dot plot. The *right panels* show the pattern of expression of CD25 and CD44 among the gated DN thymocytes. *B*, The histograms show the expression of the V β and V α TCR Tg chains among the different subpopulations of DN thymocytes defined according to intensity of expression of CD25 and CD44.

Decreased P14 TCR β chain mRNA levels in dual $\alpha\beta$ TCR Tg CD8 T cells

The exclusion of the P14 TCR β transgene could occur at the transcription and/or at a posttranscription (protein) level. The high sequence homology between the two Tg TCR β chains prevented RT-PCR analysis of the specific mRNA transcripts. However, the size of the hypervariable CDR3-like region of the two chains differs. Therefore, it was possible to evaluate the frequency of the TCR β chain transcripts using a method of PCR amplification and primer extension with fluorescent oligonucleotides (24). We must mention that we used the same amplification and extension primers for both TCR β chains. By measuring the area corresponding to the transcripts of each β -chain from a 1:1 mixture of both transgene T cells, we found that the level of the P14 TCR β Tg mRNA was 3- to 4-fold lower than that of the aHY TCR β transgene (Fig. 4). Correspondingly, the surface expression of TCR β by mature CD8 T cells is 20–30% lower in MoP14 mice than in MoaHY mice. The lower level of transcription of the P14 transgene may be due to the types of promoters and transgene vectors used. Indeed, the aHY vector includes both the TCR β chain promoter and the TCR β chain enhancer, whereas the P14 vector uses an MHC class I promoter and the Ig H chain enhancer, without regulatory elements specific for TCR expression (19, 20).

In dual $\alpha\beta$ TCR Tg CD8 T cells, the transcripts for the aHY TCR β chain were 9–10 times more frequent than those of the P14 TCR β chain (Fig. 4). It is possible that the presence of TCR regulatory elements favors a stronger and earlier expression of the aHY TCR β chain that subsequently reduces transcription or stability of the mRNA for the late V β 8.1 chain of the P14 transgene. In summary, our results suggest that exclusion of the P14 TCR β chain in dual $\alpha\beta$ TCR Tg CD8 T cells occurs at the message level.

DTg T cells are H-2D^b restricted

Do new combinations of TCR chains due to the random association between the different TCR Tg chains confer a new MHC restriction specificity to the MoaHY.MoP14 DTg cells? Lymphocyte development in the thymus of the DTg females only gives rise to CD4⁻CD8⁺ SP cells (Fig. 3A). The lack of CD4 SP cells indicates that any potential association between α - and β -chains from the two TCR transgenes does not permit positive selection by MHC class II. Selection of DTg cells in the absence of the aHY and P14 TCR MHC class I H-2D^b restricting element was also investigated. In female CD3^{-/-}H-2D^{b/-/-} chimeras reconstituted with BM cells from female DTg donors (Fig. 5), the number of thymocytes is reduced. The few CD8⁺ SP cells present in the thymus are immature because

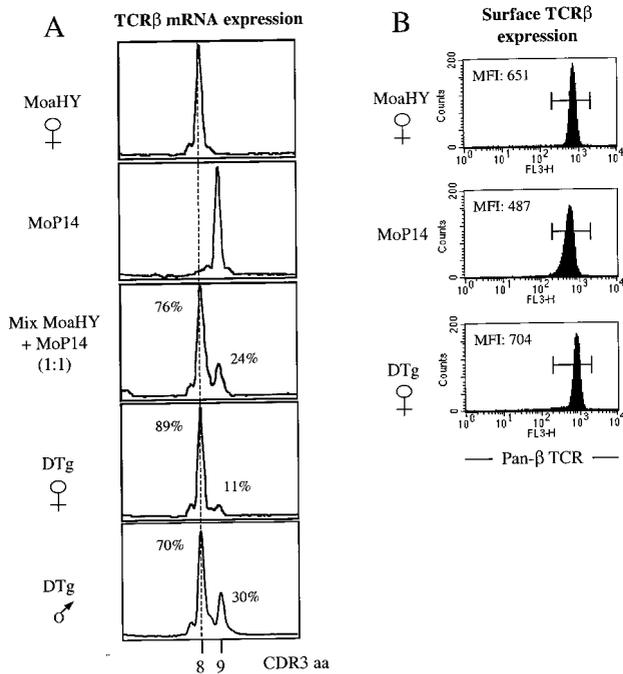


FIGURE 4. TCR β chain expression in single- and double-TCR Tg Rag2-deficient female mice. *A*, The aHY and P14 TCR β chain mRNA expression was studied by Immunoscope, using lymph node cells from MoaHY, MoP14, and MoaHY.MoP14DTg female and male mice. A 1:1 mixture of LN CD8 T cells from MoaHY and MoP14 mice was used to compare the relative transcription of both TCR β chain transgenes. *B*, CD8⁺ T cells from MoaHY, MoP14, and MoaHY.MoP14DTg mice were stained for total TCR β chain surface expression using a pan β Ab (H57). The MFI obtained is indicated in each histogram.

TCR^{high}CD8⁺ SP cells are almost absent (Fig. 5) and the number of peripheral CD8 T cells is 20-fold lower (i.e., $<0.5 \times 10^6$ cells) than in CD3^{-/-}H-2D^{b/+} chimeras. The few peripheral CD8 SP cells present express the aHY V β 8.2 and the P14 V α 2 chains (data not shown). From these results, we conclude that, in DTg mice, dual-receptor expression does not hinder thymus T cell positive selection and that SP CD8 cells are restricted to MHC H-2D^b class I molecules.

Thymus selection of dual-receptor CD8 T cells in the presence of self-Ag

We next investigated whether the presence of two TCR transgenes could rescue cells from deletion in the presence of male HY self-Ag. We compared T cell development in the thymus of MoaHY and DTg male mice. In MoaHY male mice, the presence of the HY Ag blocks thymus T cell differentiation at the DN to DP transition. The number of thymocytes is reduced to 5×10^6 , of which 92% are DN (18). In the thymus of DTg males, T cell development is also impaired, but in contrast to MoaHY male mice, the presence of the second V α 2 TCR transgene rescues a significant fraction of cells into the DP compartment (Fig. 6, *A* and *B*). This allows the selection of cells co-expressing both P14-specific V α 2 and low levels of HY-specific V α T3.70 into the SP CD8 T cell compartment (Fig. 6*B*). At the periphery of the MoaHY males, 70% of the peripheral TCR⁺ cells are CD8⁻CD4⁻ DN (Fig. 7*A*), and the few TCR⁺ CD8⁺ T cells present (4×10^6) express low levels of TCR (18). In the DTg males, TCR⁺ DN cells are practically absent and we recovered 3-fold more peripheral CD8⁺ T cells (12×10^6), of which most (~80%) express two TCR α chains (Fig. 7*A*) and diminished levels of CD8 β (data not shown). In contrast with DTg

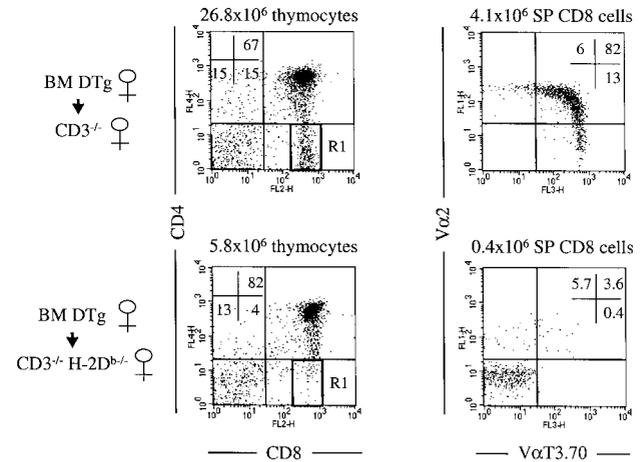


FIGURE 5. Development of MoaHY.MoP14DTg T cells in BM chimeras. Irradiated CD3 $\epsilon^{-/-}$ (*top*) or CD3 $\epsilon^{-/-}$ H-2D^{b-/-} mice (*bottom*) were reconstituted with BM cells from DTg donors. Two months later, T cell development was examined. The panels show the expression of CD4 and CD8 in the thymus of both BM chimeras and the expression of V α 2 and V α T3.70 among the SP CD8⁺ cells (R1 gate). Note the rarity of SP TCR⁺ cells in the CD3 $\epsilon^{-/-}$ H-2D^{b-/-} hosts. The relative proportions of the DN, DP, and SP populations are shown in the quadrants inside each dot plot. The total numbers of thymocytes and SP CD8 thymus cells are indicated above each dot plot.

females (Fig. 1*A*), single V α 2⁺T3.70⁻ cells are more abundant (~20%) and V α 2⁻T3.70⁺ cells are rare ($\leq 2\%$). We examined the density of expression and the assembly of the different TCR chains in DTg cells from male mice. Compared with dual TCR α cells from DTg females, the expression of the V α T3.70 TCR chain, though variable, was consistently reduced (compare Figs. 1*A* and

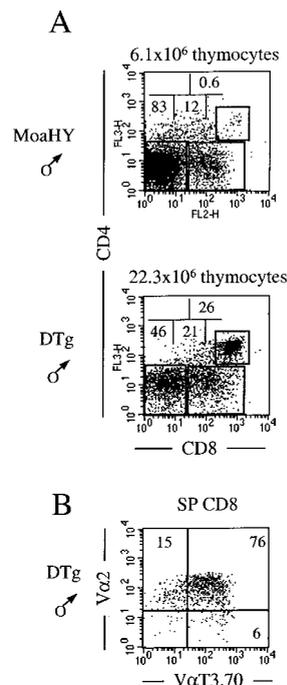


FIGURE 6. T cell development in the presence of the HY male Ag. *A*, Thymocytes from MoaHY and DTg male mice were stained for CD4 and CD8 surface expression. The relative proportions of the different DN, DP, and SP populations are shown in the quadrants inside each dot plot. *B*, The dot plots show the expression of V α 2 and V α T3.70 chains by SP CD8 thymus cells in DTg male mice.

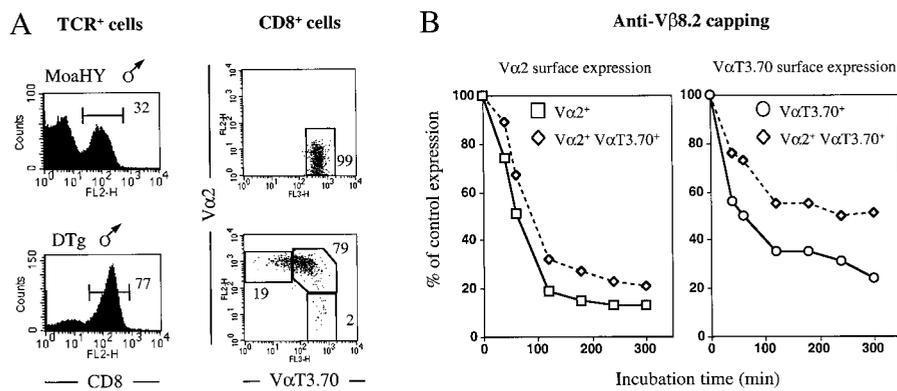


FIGURE 7. Peripheral T cells in MoaHY and MoaHY.MoP14DTg male mice. *A*, Expression of CD8 (histograms) by gated TCR⁺ LN cells and of Vα2 and VαT.3.70 TCR transgenes by gated peripheral LN CD8 T cells (dot plots). *B*, Spleen cells from DTg male mice were incubated for 5 h in the presence of a first anti-Vβ8.2 capping Ab. The expression of the TCRα at different times after incubation was compared with the TCRα expression in absence of the first Ab. The *left graph* shows the kinetics of Vα2 internalization (expressed as a percentage of MFI of control cells) among the Vα2⁺VαT.3.70⁻ (□) and Vα2⁺VαT.3.70⁺ (◇) T cells. The *right graph* shows VαT.3.70 down-regulation in Vα2⁻VαT.3.70⁺ (○) and Vα2⁺VαT.3.70⁺ (◇) T cells.

7A). Pre-incubation of dual receptor cells from DTg males with anti-Vβ8.2 Abs fails to internalize 50% of the VαT.3.70 chains (Fig. 7B). This observation contrasts with the results obtained with dual-receptor cells from DTg females and suggests an increased expression of the P14 Vβ8.1, which associates with the VαT.3.70 chains at the surface (Figs. 1B and 7B). Indeed, the level of the P14 TCRβ Tg mRNA in cells from DTg male mice is higher than in cells from DTg female mice (Fig. 4A). Thus, deletion of dual-receptor T cells bearing the aHY TCR is abrogated, allowing the selection of the cells expressing low levels of the self-reactive TCR and higher levels of the second non-self-reactive P14 TCR (15). These findings show that most peripheral CD8⁺ T cells in DTg males are Vβ8.1^{+/low}8.2⁺Vα2⁺T3.70^{low}. We conclude that in male DTg mice, the presence of a second TCR transgene prevents deletion of cells expressing a self-reactive receptor. The types and the levels of receptor expression differ from those observed in female mice, indicating a process of adaptation of the population of CD8 T cells determined by their antigenic microenvironment.

Discussion

The role of dual-receptor T cells in autoimmune diseases is dependent on the ability of the dual TCR cells to escape negative selection, to be positively selected in the thymus, and to survive and remain functionally active in the peripheral pools. In the present study, we investigated the thymus selection of dual-receptor CD8 T cells from B6.Rag2^{-/-} mice Tg for two complete TCRs, namely the α- and the β-chains of the anti-LCMV P14 TCR and of the anti-male Ag aHY TCR (18, 20).

In the MoaHY.MoP14 DTg mice, thymus T cell development only gives rise to CD8 T cells, indicating that the association between the different αβ-chains of the two TCR transgenes was not able to generate MHC class II-restricted CD4 T cells. The lack of significant T cell development in MHC class I H-2D^b-/- chimeras further demonstrates that the all TCR chain combinations that can be generated from the two transgenes are restricted only to the H-2D^b molecule. These results are not due to the inability of the different TCR chains to associate (29). Indeed, the study of the co-internalization of the TCR chains in CD8 cells from female and male DTg mice shows that the two β-chains and the two α-chains of both transgenes can form αβ heterodimers in all possible combinations. These observations contrast with previous reports, in which DTg mice using TCR transgenes restricted to MHC class I and MHC class II or to two different MHC class I molecules were

shown to express a new MHC specificity (14, 17, 30). The fidelity of the dual MoaHY.MoP14 TCR transgene cells to the H-2D^b restricting element allows comparing the selection of dual- and single-receptor T cells, without the biases that could be introduced by the generation of a new MHC restriction specificity.

In female DTg mice, whereas ~80% of the peripheral CD8 T cells express two TCRα chains, the vast majority of the CD8 T cells only express one TCRβ chain; i.e., they functionally “excluded” one of the TCRβ chain transgenes. Indeed, several findings suggest that, although 99% of the CD8 T cells from DTg mice are Vβ8.2⁺, most cells either do not express or poorly express the Vβ8.1 chain of the P14 TCR. First, internalization of the Vβ8.2 chain of the aHY TCR transgene leads to complete co-internalization of both Vα chains. Secondly, in vitro stimulation of CD8 T cells from DTg mice with the LCMV gp33-41 peptide failed to induce cell proliferation. Because the peripheral pools of MoP14 mice contain a high number of CD8 T cells, the absence of the P14 β-chain in DTg mice is not due to its poor expression or the inability of cells expressing it to be positively selected. Moreover, in DTg mice a minority (1%) of CD8 T cells are Vβ8⁺8.2⁻Vα2⁺T3.70⁻; i.e., they express only the P14 Vβ8.1 chain. By comparing the kinetics of expression of the Tg TCR chains during T cell development, we found that, in MoaHY mice, 96% of the CD44⁻CD25^{int} DN cells already express the TCRβ chain, whereas, in MoP14 mice, expression of the TCRβ chain occurs at a later CD44⁻CD25⁻ stage. The different kinetics of TCR expression may relate to the type of vectors used. The aHY transgene contains both the TCRβ chain promoter and enhancer, whereas the P14 transgene uses an MHC class I promoter and an IgH enhancer (19, 20). The presence of the correct TCRβ chain enhancer justifies both the earlier and the higher transcription of the aHY TCRβ chain. By comparing the mRNA species of both β-chains, we observed that the TCRβ chain transcripts in the CD8 T cells from the MoP14 mice are less abundant than in the CD8 T cells from the MoaHY mice. Accordingly, TCRβ chain surface expression was found to be lower in MoP14 CD8 T cells than in MoaHY CD8 T cells. More importantly, in the dual-receptor T cells, the P14 β-chain transcripts are very poorly represented (10% of total). These results suggest that, in dual-receptor T cells, silencing of the P14 β-chain occurs at the mRNA level. The exact mechanisms that regulate the levels of the P14 β-chain transcripts remain unknown. Double-TCR transgenic mice have been previously shown to produce cells with mutual exclusion of the TCR

transgenes posttranscriptionally (31) or which express both receptors equally (32, 33). The effect on P14 TCR β chain allelic exclusion could be due to the earlier and stronger expression of the aHY β -chain that may affect expression of the second P14 β -chain transgene at the posttranscriptional level. It may reduce the stability and the half-life of the P14 β -chain transcripts. It may compete for limited amounts of pT α or for the CD3 complex required for surface receptor expression. It may also inhibit transcription of the second P14 β -chain transgene. In the latter case, any possible regulatory mechanisms involved in suppressing transcription of the P14 β -chain might act through the IgH enhancer used in the P14 vector. In the rare V β 8⁺8.2⁻V α 2⁺T3.70⁻ CD8 T cells, the reverse must occur because these cells express only the P14 V β 8.1 chain and exclude the aHY β -chain. These effects may simply reflect vagaries of the TCR constructs. However, all these mechanisms are selective for the β -chain transgene, in that they do not affect expression of the P14 TCR α transgene under the control of the same promoter and enhancer (20), suggesting that they may have some physiological relevance. Examples of silencing of one transgene have also been reported in mice that bear two complete rearranged Ig transgenes (34, 35). Overall, these findings indicate that the presence of two productive β -chain rearrangements (6) does not necessarily correlate with double β -chain expression, as shown for the TCR α locus (29). This represents yet another mechanism for functional TCR β chain exclusion. As a result of this process, most of the CD8 T cells from the DTg mice express one TCR β associated with two TCR α chains, like ~30% of the peripheral T cells from a normal mouse.

What happens to the development of dual-receptor-expressing T cells in the presence of the male HY self-Ag? Thymus T cell development has been shown to be particularly sensitive to changes in TCR expression levels (17, 36). In male DTg mice, the presence of a second TCR transgene reduces the expression of the aHY TCR, allowing the appearance of significant numbers of DP thymocytes and TCR^{high}CD8⁺ SP T cells. During the DP to SP transition, only the cells expressing lower levels of CD8 and of the aHY TCR are positively selected. SP cells in the thymus and CD8⁺ cells at the periphery of DTg males mostly express two V α chains, as in DTg females, but in contrast to the female mice, single T3.70⁺ cells are rare and single V α 2⁺ cells are more abundant. The lack of complete internalization of the TCR α chains after anti-V β 8.2 treatment indicates that the dual-receptor cells express increased levels of the P14 V β 8.1 chain. In agreement, P14 β -chain transcripts were more represented in the cells from DTg male mice than in those from DTg females. Overall, the presence of the HY Ag leads to the counterselection of cells bearing high levels of the aHY-specific receptors both in DTg and in MoaHY mice. Alternatively, cells may modulate expression of specific receptors as a function of the levels of Ag encountered in the developing environment.

In contrast with MoaHY males, in which TCR⁺CD8⁻ (DN) cells represent 60% of the peripheral TCR⁺ cell pool (18), in DTg male mice most peripheral TCR⁺ cells are CD8⁺. It has been claimed that, in aHY Tg mice, the peripheral DN cells belong to $\gamma\delta$ T cell lineage (37, 38) and that expression of the $\gamma\delta$ TCR receptor could ensure maturation and survival of the cells. Our current observations in Rag2^{-/-} MoaHY mice demonstrate that expression of $\gamma\delta$ TCRs is not required for the survival of the TCR⁺ DN cells. Overall, these findings suggest that successful lymphocyte survival at the periphery requires optimal levels of signaling. Thus, in male MoaHY the presence of an excess of self-Ag counter selects CD8⁺ cells and allows the peripheral accumulation and survival of aHY TCR⁺ T cells, which do not express the CD8 or CD4 coreceptors. In DTg males, in the presence of the same levels of self-Ag, T cells

expressing CD8 can accumulate due to the dilution of the aHY TCR. In fact, the few peripheral TCR⁺ DN cells that survive in DTg male mice express higher levels of the aHY-specific TCR (data not shown).

We show here, by using double-TCR Tg mice, that TCR β chain usage is tightly controlled and that mechanisms other than classical allelic exclusion can affect expression of a second TCR β chain transgene. In contrast, control of TCR α chain is loose, allowing the co-expression of two TCR α chain transgenes. As a consequence, the majority of CD8 T cells from the MoaHY.MoP14 DTg female and male mice, like ~30% of the peripheral T cells from a normal mouse (11, 12), express one TCR β chain associated with two different TCR α chains. Therefore, these DTg mice provide a unique model for studying the in vivo functional behavior of the dual-TCR α CD8 T cells. We examined the thymus selection of the dual-receptor CD8 T cells in the presence of self-Ag. We found that the presence of a second TCR α chain allows a significant number of CD8 T cells expressing a self-reactive receptor to escape central deletion and migrate to the peripheral pools of male mice. Differences in TCR and coreceptor expression between female and male MoaHY and DTg mice suggest that peripheral T cell survival requires an optimal level of signaling, which implies a process of "adaptation" of lymphocyte populations to the host environment.

Acknowledgments

We thank Benedita Rocha for criticism, Laurent Ferradini for suggestions, James Di Santo for reviewing the manuscript, and Annick Lim for help with the immunoscope analysis.

References

1. Pernis, B., G. Chiappino, A. S. Kelus, and P. G. Gell. 1965. Cellular localization of immunoglobulins with different allotypic specificities in rabbit lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* 122:853.
2. Uematsu, Y., S. Ryser, Z. Dembic, P. Borgulya, P. Krimpenfort, A. Berns, H. von Boehmer, and M. Steinmetz. 1988. In transgenic mice the introduced functional T cell receptor β gene prevents expression of endogenous β genes. *Cell* 52:831.
3. Xu, Y., L. Davidson, F. W. Alt, and D. Baltimore. 1996. Function of the pre-T-cell receptor α chain in T-cell development and allelic exclusion at the T-cell receptor β locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2169.
4. Aifantis, I., J. Buer, H. von Boehmer, and O. Azogui. 1997. Essential role of the pre-T cell receptor in allelic exclusion of the T cell receptor β locus. [Published erratum appears in 1997 *Immunity* 7:895.] *Immunity* 7:601.
5. Krotkova, A., H. von Boehmer, and H. J. Fehling. 1997. Allelic exclusion in pT α -deficient mice: no evidence for cell surface expression of two T cell receptor (TCR)- β chains, but less efficient inhibition of endogenous V β →(D)J β rearrangements in the presence of a functional TCR- β transgene. *J. Exp. Med.* 186:767.
6. Padovan, E., C. Giachino, M. Cella, S. Valitutti, O. Acuto, and A. Lanzavecchia. 1995. Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor β chains: implications for the mechanism of allelic exclusion. *J. Exp. Med.* 181:1587.
7. Balomenos, D., R. S. Balderas, K. P. Mulvany, J. Kaye, D. H. Kono, and A. N. Theofilopoulos. 1995. Incomplete T cell receptor V β allelic exclusion and dual V β -expressing cells. *J. Immunol.* 155:3308.
8. Saito, T., J. L. Sussman, J. D. Ashwell, and R. N. Germain. 1989. Marked differences in the efficiency of expression of distinct $\alpha\beta$ T cell receptor heterodimers. [Published erratum appears in 1990 *J. Immunol.* 144:2847.] *J. Immunol.* 143:3379.
9. Malissen, M., J. Trucy, E. Jouvin-Marche, P. A. Cazenave, R. Scollay, and B. Malissen. 1992. Regulation of TCR α and β gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol. Today* 13:315.
10. Casanova, J. L., P. Romero, C. Widmann, P. Kourilsky, and J. L. Maryanski. 1991. T cell receptor genes in a series of class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a *Plasmodium berghei* nonapeptide: implications for T cell allelic exclusion and antigen-specific repertoire. *J. Exp. Med.* 174:1371.
11. Padovan, E., G. Casorati, P. Dellabona, S. Meyer, M. Brockhaus, and A. Lanzavecchia. 1993. Expression of two T cell receptor α chains: dual receptor T cells. *Science* 262:422.
12. Heath, W. R., F. R. Carbone, P. Bertolino, J. Kelly, S. Cose, and J. F. Miller. 1995. Expression of two T cell receptor α chains on the surface of normal murine T cells. *Eur. J. Immunol.* 25:1617.
13. Elliott, J. I., and D. M. Altmann. 1996. Non-obese diabetic mice hemizygous at the T cell receptor α locus are susceptible to diabetes and sialitis. *Eur. J. Immunol.* 26:953.

14. Zal, T., S. Weiss, A. Mellor, and B. Stockinger. 1996. Expression of a second receptor rescues self-specific T cells from thymic deletion and allows activation of autoreactive effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9102.
15. Sarukhan, A., C. Garcia, A. Lanoue, and H. von Boehmer. 1998. Allelic inclusion of T cell receptor α genes poses an autoimmune hazard due to low-level expression of autospesific receptors. *Immunity* 8:563.
16. von Boehmer, H. 1990. Developmental biology of T cells in T-cell receptor transgenic mice. *Annu. Rev. Immunol.* 8:531.
17. Dave, V. P., D. Allman, D. L. Wiest, and D. J. Kappes. 1999. Limiting TCR expression leads to quantitative but not qualitative changes in thymic selection. *J. Immunol.* 162:5764.
18. Kisielow, P., H. Bluthman, U. D. Staerz, M. Steinmetz, and H. von Boehmer. 1988. Tolerance in T cell receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4⁺CD8⁺ thymocytes. *Nature* 333:742.
19. Teh, H. S., P. Kisielow, B. Scott, H. Kishi, Y. Uematsu, H. Bluthman, and H. von Boehmer. 1988. Thymic MHC antigens and the $\alpha\beta$ TCR determine the CD4/CD8 phenotype of mature T cells. *Nature* 333:229.
20. Pircher, H., K. Burki, R. Lang, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1989. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 342:559.
21. Shinkai, Y., G. Rathbun, K.-P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendensohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall, and F. W. Alt. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855.
22. Malissen, M., A. Gillet, L. Ardouin, G. Bouvier, J. Trucy, P. Ferrier, E. Vivier, and B. Malissen. 1995. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3- ϵ gene. *EMBO J.* 14:4641.
23. Perarnau, B., M. F. Saron, B. R. San Martin, N. Bervas, H. Ong, M. J. Soloski, A. G. Smith, J. M. Ure, J. E. Gairin, and F. A. Lemonnier. 1999. Single H2K^b, H2Db and double H2K^bD^b knockout mice: peripheral CD8⁺ T cell repertoire and anti-lymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses. *Eur. J. Immunol.* 29:1243.
24. Pannetier, C., M. Cochet, S. Darche, A. Casrouge, M. Zoller, and P. Kourilsky. 1993. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor β chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4319.
25. Pircher, H., D. Moskophidis, U. Rohrer, K. Burki, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1990. Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants in vivo. *Nature* 346:629.
26. Markiewicz, M. A., C. Girao, J. T. Opferman, J. Sun, Q. Hu, A. A. Agulnik, C. E. Bishop, C. B. Thompson, and R. P. Ashton. 1998. Long-term T cell memory requires the surface expression of self-peptide/major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3065.
27. MacDonald, H. R., R. Schneider, R. K. Lees, R. C. Howe, H. Acha-Orbea, H. Festenstein, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1988. T-cell receptor V β use predicts reactivity and tolerance to Mlsa-encoded antigens. *Nature* 332:40.
28. Reis e Sousa, C., E. H. Levine, and R. N. Germain. 1996. Partial signaling by CD8⁺ T cells in response to antagonist ligands. *J. Exp. Med.* 184:149.
29. Gascoigne, N. R., and S. M. Alam. 1999. Allelic exclusion of the T cell receptor α -chain: developmental regulation of a post-translational event. *Semin. Immunol.* 11:337.
30. Hardardottir, F., J. L. Baron, and C. A. Janeway, Jr. 1995. T cells with two functional antigen-specific receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:354.
31. Sant'Angelo, D. B., P. Cresswell, C. A. Janeway, Jr., and L. K. Denzin. 2001. Maintenance of TCR clonality in T cells expressing genes for two TCR heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:6824.
32. Dittel, B. N., I. Stefanova, R. N. Germain, and C. A. Janeway, Jr. 1999. Cross-antagonism of a T cell clone expressing two distinct T cell receptors. *Immunity* 11:289.
33. Daniels, M. A., S. L. Schober, K. A. Hogquist, and S. C. Jameson. 1999. Cutting edge: a test of the dominant negative signal model for TCR antagonism. *J. Immunol.* 162:3761.
34. Lam, K.-P., and K. Rajewsky. 1999. B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development. *J. Exp. Med.* 190:471.
35. Rosado, M., and A. A. Freitas. 2000. B cell positive selection by self-antigens and counter-selection of dual BCR cells in the peripheral B cell pools. *Eur. J. Immunol.* 30:2181.
36. Paterson, R. K., H. Bluethmann, P. Tseng, A. Dunlap, and T. H. Finkel. 1999. Development and function of autospesific dual TCR⁺ T lymphocytes. *Int. Immunol.* 11:113.
37. Bruno, L., H. J. Fehling, and H. von Boehmer. 1996. The $\alpha\beta$ T cell receptor can replace the $\gamma\delta$ receptor in the development of $\gamma\delta$ lineage cells. *Immunity* 5:343.
38. Terrence, K., C. P. Pavlovich, E. O. Matechak, and B. J. Fowlkes. 2000. Premature expression of T cell receptor (TCR) $\alpha\beta$ suppresses TCR $\gamma\delta$ gene rearrangement but permits development of $\gamma\delta$ lineage T cells. *J. Exp. Med.* 192:537.

Article 2

« CD8⁺ T lymphocytes in double $\alpha\beta$ TCR transgenic mice. II. Competitive fitness of dual $\alpha\beta$ TCR CD8⁺ T lymphocytes in the peripheral pools »

Nicolas Legrand N. & A.A. Freitas

The Journal of Immunology, 2001, 167 : 6158-6164

III. SÉLECTION PÉRIPHÉRIQUE DANS DES SOURIS DOUBLE-TRANSGÉNIQUES POUR LE TCR

Nous avons continué notre analyse des animaux DTg, en nous concentrant cette fois sur le comportement des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ au niveau des compartiments périphériques. En effet, ces animaux peuvent être considérés comme un modèle d'étude des cellules double-expresser de chaîne α du TCR, situation courante (~30% des cellules T) chez la souris. Comme nous l'avons indiqué précédemment, la majorité des cellules T CD8⁺ DTg expriment les deux chaînes α des TCR aHY et P14, en association avec la chaîne β du TCR aHY (population V α T3.70⁺ V α 2⁺ ; ~85% dans les toutes les souris DTg). Toutefois, il existe également deux populations minoritaires exprimant uniquement l'une (population V α T3.70⁺ V α 2⁻ ; 5-15% chez les femelles, \leq 2% chez les mâles) ou l'autre (population V α T3.70⁻ V α 2⁺ ; 5-15% chez les femelles, 15-20% chez les mâles) des chaînes α .

En absence de l'autoantigène, les trois sous-populations CD8⁺ DTg sont exclues des compartiments périphériques lorsqu'elles sont mises en compétition, dans des chimères de moelle osseuse, avec des cellules T CD8⁺ exprimant le TCR P14. La compétition DTg/MoaHY montre que la population double-expresser V α T3.70⁺ V α 2⁺ peut se maintenir, alors que la population V α T3.70⁻ V α 2⁺ a tendance à être sur-représentée, mimant ainsi partiellement le comportement des cellules T P14⁺. Ainsi, la hiérarchie de capacité compétitrice est P14 > DTg \approx aHY. Le transfert des cellules T CD8⁺ DTg ou monoclonales dans des receveurs sans cellules T (CD3 ϵ ^{-/-}) montre que la capacité de prolifération homéostatique des cellules DTg et MoaHY est similairement faible.

En présence de l'autoantigène, la capacité compétitrice des cellules DTg est réduite, au profit de la population V α T3.70⁻ V α 2⁺, qui devient plus abondante. Toutefois, les cellules T CD8⁺ double-expresser résistent mieux que celles n'exprimant que le TCR aHY, qui sont quasiment absentes. Cette observation est confirmée lors de la réponse immunitaire des cellules DTg issues de souris femelles et directement transférées dans un mâle. Après le pic de la réponse, les cellules qui n'expriment que le TCR aHY (V α T3.70⁺ V α 2⁻) disparaissent, alors que les double-expressers (V α T3.70⁺ V α 2⁺) se maintiennent. Globalement, les cellules T CD8⁺ issues des mâles DTg répondent faiblement contre le peptide mâle *in vitro*. Les expériences *in vivo* montrent un comportement intéressant, car les cellules T CD8⁺ DTg de mâles injectées dans des mâles prolifèrent et s'accumulent, alors que ce n'est pas le cas dans les receveurs femelles.

Trois conclusions peuvent être tirées de cette comparaison de situation. Tout d'abord, les cellules T CD8⁺ double-expresser montrent une capacité de compétition réduite en présence de l'antigène, même si elle est supérieure à celle des cellules n'exprimant que le TCR aHY. Ensuite, les cellules T CD8⁺ DTg deviennent difficiles à stimuler avec l'Ag mâle, que ce soit après la réponse immunitaire des cellules DTg de femelles, ou bien en utilisant directement des cellules DTg de mâles. Enfin, l'expression de deux chaînes α permet cependant aux cellules DTg de résister à la délétion centrale, mais également à la délétion périphérique après la réponse immunitaire. Il est suggéré que les cellules T CD8⁺ de ce type peuvent jouer un rôle de cellules régulatrices, que nous n'avons pas cherché à préciser pour l'instant. Globalement, le processus d'adaptation des cellules T CD8⁺ DTg à leurs conditions environnementales pourrait être un mécanisme utile pour diminuer le risque d'autoimmunité que ces cellules représentent.

CD8⁺ T Lymphocytes in Double $\alpha\beta$ TCR Transgenic Mice. II. Competitive Fitness of Dual $\alpha\beta$ TCR CD8⁺ T Lymphocytes in the Peripheral Pools¹

Nicolas Legrand and Antonio A. Freitas²

We studied Rag2-deficient mice bearing two rearranged $\alpha\beta$ TCR transgenes, both restricted to the MHC H-2D^b class I molecule. We have previously shown that, in these DTg mice, most peripheral CD8 T cells express one TCR β chain associated with two TCR α chains, as in one-third of the mature T cells from normal mice. We examined the functional behavior of the dual-receptor CD8 T cells developing either in the absence or in the presence of self-Ag. The dual-receptor CD8 T cells, which develop in absence of self-Ag, show efficient responses to immunization and remain sensitive to induction of peripheral tolerance. In contrast to single TCR T cells, the dual-TCR cells, when tolerized upon exposure to high levels of self-Ag, are not deleted and therefore may exert important regulatory functions. When developing in the presence of self-Ag, the dual-receptor-expressing CD8 T cells escape central deletion, but are not fully competent to respond to cognate stimuli. Overall, we found that the dual-TCR CD8 T cells show a poor competitive value and can be out-competed by single-TCR cells, both in the course of immune responses and in reconstitution experiments. The decreased fitness of the dual-receptor cells may contribute to diminishing the autoimmune hazard that they could represent. *The Journal of Immunology*, 2001, 167: 6158–6164.

In normal mice, despite mechanisms of TCR allelic exclusion, the generation of T cells with dual specificity is relatively high. First, this is because allelic exclusion of the TCR β chain is never fail proof and \sim 1% of the mature $\alpha\beta$ T cells contain two productive TCR β alleles (1, 2). Second, it is because TCR α chain rearrangements proceed simultaneously in both chromosomes (3, 4) and \sim 30% of the human $\alpha\beta$ T cells (5) and a fraction of the mouse $\alpha\beta$ T cells (6, 7) express two TCR α chains (4–6). Potentially these dual-receptor T cells could play an important role in autoimmunity. The presence of a second TCR would allow cells bearing a self-reactive TCR to bypass negative selection in the thymus, in virtue of its lower expression. At the periphery, these T cells once activated by a non-self Ag would acquire a lower threshold of activation, respond to self-peptide/MHC, and cause disease. Several *in vivo* experimental models have examined this possibility. Studies on mice hemizygous for the TCR α locus do not seem to support the role of dual-TCR α -expressing T cells to develop autoimmune diseases, *i.e.*, diabetes in nonobese diabetic mice (8). However, in transgenic (Tg)³ mouse models, co-expression of two TCRs has been shown to rescue self-reactive T cells from tolerance induction, allowing their exit into the peripheral pools (9, 10).

These self-reactive T cells could be stimulated *in vitro* to anti-self effector functions via the second receptor (9), and their *in vivo* presence was correlated to the induction of autoimmune diabetes when the relevant Ag was expressed by the target tissue (10).

The role of dual-receptor T cells in autoimmune diseases, however, is strictly dependent on their ability to be positively selected in the thymus, to survive, and to remain fully reactive in the peripheral pools. Both thymus positive selection (11) and peripheral T cell survival require receptor engagement by MHC molecules (12–16). The presence of two receptors with different specificity imposes some constraints on the selection, survival, and functional abilities of dual-receptor T cells. Indeed, it was recently shown that the decreased surface density of specific receptors reduces the thymus positive selection of dual-receptor T cells (17). Moreover, the functional capacity of peripheral dual-receptor T cells has also been challenged because expression of two TCRs does not always confer reactivity to two unrelated Ags (18).

We have derived a line of Rag2-deficient mice bearing two complete rearranged $\alpha\beta$ TCR transgenes, one specific for the HY male Ag (15, 19) and the second specific for the gp33-41 peptide of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) (20). Both receptors are restricted to the same MHC H-2D^b class I molecule. We have examined the thymus selection of the CD8 T cells in these double transgenic (DTg) mice in the absence or in the presence of the HY male self-Ag (35). In female DTg mice, most mature peripheral CD8 T cells express only the TCR β chain from the aHY transgene associated with the two TCR α chain transgenes. In male mice, the presence of a second TCR α chain allows a significant number of CD8 T expressing a self-reactive receptor to escape central deletion and migrate to the peripheral pools. Thus, in both cases, most of the CD8 T cells from the DTg mice express one TCR β associated with two TCR α chains, like \sim 30% of the peripheral T cells from a normal mouse. Therefore, these DTg mice provide a unique model for studying the functional behavior of dual-TCR α CD8 T cells. In the present investigation, we compared the capacity of single- and dual-receptor CD8 T cells to colonize and repopulate

Lymphocyte Population Biology Unit, Unité de Recherche Associée, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur, Paris, France

Received for publication July 13, 2001. Accepted for publication September 21, 2001.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by the Institute Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique, Agence Nationale de Recherches sur le SIDA, Association pour la Recherche sur le Cancer, Sidaction, and Ministère de la Recherche et de l'Espace, France.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Antonio A. Freitas, Lymphocyte Population Biology Unit, Unité de Recherche Associée, Centre National de la Recherche Scientifique, 1961 Institut Pasteur, 25 Rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France. E-mail address: afreitas@pasteur.fr

³ Abbreviations used in this paper: Tg, transgenic; LCMV, lymphocytic choriomeningitis virus; DTg, double transgenic; BM, bone marrow; LN, lymph node; DN, double negative; SP, single positive; DP, double positive.

peripheral pools, as well as to respond to antigenic stimulation *in vivo*.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6 mice Tg for the anti-HY TCR ($V\alpha T3.70.V\beta 8.2$) (15, 19) or the P14 TCR ($V\alpha 2.V\beta 8.1$) (20) were crossed into a Rag2-deficient background. The mice obtained (MoahY and MoP14) were intercrossed to give rise to MoahY.MoP14 DTg mice. All of these strains were maintained in specific pathogen-free isolators at the Centre de Développement des Techniques Avancées pour l'expérimentation Animale-Centre National de la Recherche Scientifique (Orléans, France). B6.Rag2^{-/-} mice (21) and B6.CD3ε^{-/-} mice (22) were from the Centre de Développement des Techniques Avancées pour l'expérimentation Animale-Centre National de la Recherche Scientifique, and C57BL/6 mice were from IFFA-CREDO (Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France).

Flow cytometry

The following mAbs were used: anti-CD8α (53-6.7), anti-Vα2 (B20.1), anti-Vβ8.1/2 (MR5-2), anti-Thy1.1 (OX-7), anti-Thy1.2 (30-H12), anti-CD3ε (145-2C11), anti-CD4 (L3T4/RM4-5), anti-CD69 (H1.2F3), anti-CD25 (PC61), and anti-CD24/HSA (M1/69) from BD PharMingen (San Diego, CA) and anti-CD44 (IM781) and anti-CD62L (MEL14) from Caltag Laboratories (San Francisco, CA). The anti-VαT3.70 and the F23.2 anti-Vβ8.2 were from B. Rocha (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 345, Institut Necker, Paris, France). Cell-surface staining was performed with the appropriate combinations of FITC, PE, TRI-Color (Caltag Laboratories), PerCP (BD Biosciences, San Jose, CA), Biotin, and APC-coupled Abs. Biotin-coupled Abs were revealed by APC-, TRI-Color-, or PerCP-coupled streptavidin. Dead cells were excluded by light-scattering gating. All analyses were performed with a FAC-Scalibur (BD Biosciences) interfaced to Macintosh CellQuest software (Apple Computer, Cupertino, CA).

Bone marrow (BM) chimeras and peripheral T cell transfers

Host Rag2^{-/-}B6 mice were lethally irradiated (900 rad) in a ¹³⁷Ce source and injected *i.v.* with 2–4.10⁶ BM cells. This inoculum contained BM cells from different donors, mixed at several ratios (23). Nonirradiated female or male B6.CD3ε^{-/-} hosts were also injected *i.v.* with CD8 LN T cell populations. By using mice differing by Thy1 or Ly5 allotype and Tg TCR chains, we were able to discriminate the cells that originated from the different donor and host mice. Spleen, inguinal, and mesenteric lymph node (LN) cell suspensions were prepared, and the number and phenotype of the cells from each donor population were evaluated. The total peripheral T cell numbers shown in *Results* represent the number of cells recovered in the host's spleen added to twice the number of cells recovered from the host's inguinal and mesenteric LNs.

In vitro proliferation assays

Spleen cells from Tg mice were incubated in 96-well plates (10⁵ cells/well) at 37°C, 5% CO₂, in a final volume of 200 μl in complete RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Cells were stimulated with Con A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), anti-CD3 (BD PharMingen), or the Tg TCR specific peptides gp33-41 (24) (KAVYNFATM) and *Smyc*-3 peptides (25) (KCSRNRQYL) purchased from Neosystem (Strasbourg, France) and used with a >95% purity. After 1–4 days of culture, cells were pulsed overnight with 0.5 μCi [³H]thymidine (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA).

Results

The peripheral pool of female αβ TCR DTg Rag2-deficient mice

By crossing two different lines of TCR Tg B6.Rag2^{-/-} mice, we obtained MoahY.MoP14 (DTg) mice bearing two MHC H-2D^b class I-restricted TCR transgenes. One receptor, aHY, is specific for the HY male Ag ($V\beta 8.2^+V\alpha T3.70^+$) and the second, P14, is specific for the gp33-41 peptide of the LCMV ($V\beta 8.1^+V\alpha 2^+$). In these DTg mice, due to the absence of Rag2, lymphocytes can only express chains from the two rearranged TCR transgenes (21). Lymphocyte development in the thymus only gives rise to CD4⁻CD8⁺ single positive (SP) cells, indicating that the random association between the α- and the β-chains from the two transgenes does not allow positive selection by MHC class II. Studies

on the reconstitution of CD3^{-/-}H-2D^b^{-/-} chimeras reconstituted with BM cells from DTg donors have shown that, in the DTg mice, >99% of the CD8 cells are restricted to the MHC H-2D^b class I molecule (35).

In female DTg mice, we have found that 99% of the peripheral CD8 T cells express only the TCR Vβ8.2⁺ chain from the aHY transgene (35). Less than 1% of the total CD8 T cells are $V\beta 8^+8.2^-V\alpha 2^+T3.70^-$. In contrast, the majority (~80%) of the peripheral CD8 T cells (Fig. 1A) express the two TCRα chains. These $V\alpha 2^+T3.70^+$ CD8 T cells have a naive phenotype, in that they are CD44⁻, CD62L^{high}, CD25⁻, and CD69⁻ (data not shown). About 20% of the CD8 T cells express a single TCRα chain; *i.e.*, they are either $V\alpha 2^+T3.70^-$ (~5–15%) or $V\alpha 2^-T3.70^+$ (~5–15%) (Fig. 1A). Whereas both DTg and $V\alpha 2^-T3.70^+$ single cells are CD44⁻, the single $V\alpha 2^+$ cells are CD44^{int}, as in the MoP14 mice (Fig. 1B). In conclusion, in the peripheral pools of female DTg mice, most CD8 cells are $V\beta 8.2^+V\alpha 2^+T3.70^+$; *i.e.*, they express one TCRβ chain and two different TCRα chains, like ~30% of the T cells from a normal mouse (5, 6).

Competitive capacity of dual-TCR CD8 T cells

Because the majority of the cells express two TCRα chains, CD8 T cells from DTg mice represent an ideal model to study the physiological behavior of one-third of the T cells from normal mice. We first addressed the question of whether the expression of two TCR transgenes could hinder the selection and survival fitness of the CD8 T cells. We compared the development and accumulation of single and DTg CD8 T cells in the same Rag2^{-/-} hosts reconstituted with BM precursors from MoP14, MoahY, or MoahY. MoP14 DTg donors either injected alone or mixed at different ratios (23). Two months later, the female chimeras co-injected with BM cells from MoP14, MoahY, and DTg donors showed a hierarchy of T cell selection and accumulation in which MoP14 > MoahY = DTg CD8 T cells (Fig. 2). Thus, in the chimeras co-injected with a 10:90 cell ratio of BM cells from MoP14 (Thy1.2) and MoahY (Thy1.1) donors, >60% of the mature T cells were from P14 origin (Fig. 2A). In the chimeras injected with a 50:50

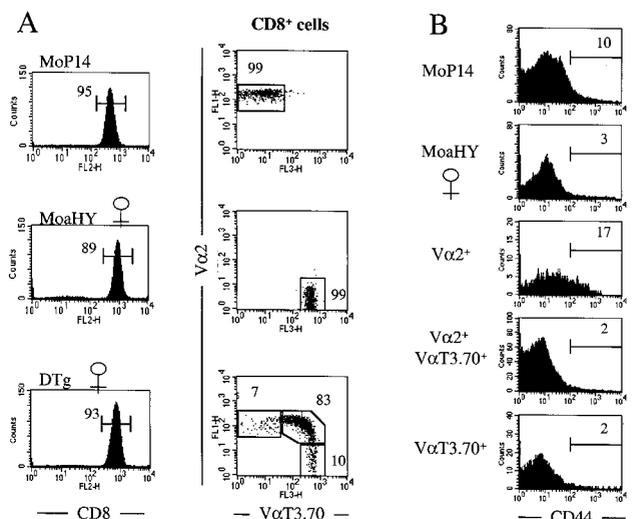


FIGURE 1. Peripheral T cells in MoP14, MoahY, and MoahY.MoP14DTg female mice. *A*, Expression of CD8 (histograms) and of Vα2 and VαT3.70 TCR transgenes by gated peripheral LN CD8 T cells (dot plots). *B*, Expression of CD44 among MoP14, MoahY, DTg $V\alpha 2^+V\alpha T3.70^-$, $V\alpha 2^+V\alpha T3.70^+$, and $V\alpha 2^-V\alpha T3.70^+$ LN CD8 T cells. Note that the expression of CD44 is higher among the $V\alpha 2^+$ single cells.

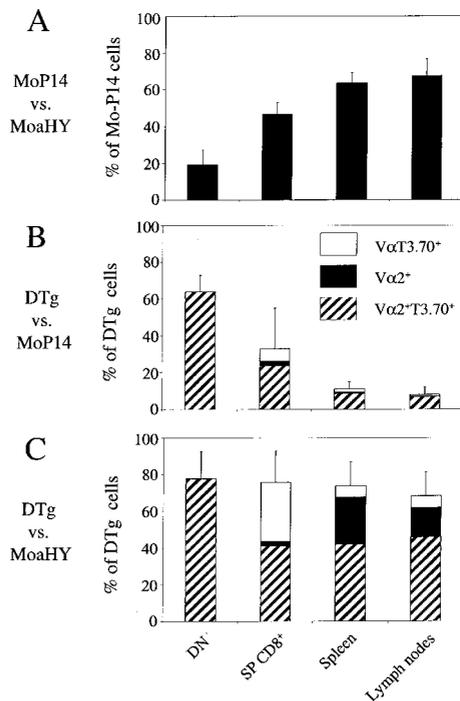


FIGURE 2. Female $Rag2^{-/-}$ host mice were lethally irradiated and reconstituted with mixtures of BM cells from different donors, respectively from MoaHY and MoP14 female mice (A) (injected ratio, 90:10), DTg and MoP14 female mice (B) (ratio, 50:50), and DTg and MoaHY female mice (C) (ratio, 80:20). Eight weeks after reconstitution, the relative proportions of T cells from the different donors were analyzed in the central and peripheral T cell compartments. The results show the relative proportion of MoP14- (A) or DTg-derived (B and C) cells among T cells (mean \pm SD of six to eight mice). B and C, The relative proportion of each T cell subpopulation among cells from DTg origin is shown for SP CD8 thymocytes and peripheral CD8⁺ T cells (dashed bars, $V\alpha 2^+V\alpha T3.70^+$; filled bars, $V\alpha 2^+V\alpha T3.70^-$; open bars, $V\alpha 2^-V\alpha T3.70^+$). Similar results were obtained in chimeras reconstituted with other cell ratios.

ratio of MoP14 and DTg cells, there was also a preferential selection of the P14 CD8 T cells, which occupy ~ 80 – 90% of the peripheral T cell pool (Fig. 2B). In these later chimeras, populations of single TCR α -expressing cells of DTg BM origin were rare or absent. In the chimeras reconstituted with a mixture of MoaHY (Thy1.1) and DTg (Thy1.2) BM, the cells from DTg origin (Thy1.2) represent the majority (~ 75 – 80%) of the thymus double negative (DN) precursors. Among the mature thymus SP and peripheral populations, however, cells expressing two TCR α chains account for 50% of the cells from DTg origin, less than the 80% present either in the original DTg mice (Fig. 1) or in the control chimeras reconstituted with 100% BM from DTg donors (data not shown). This is due to a significant increase in the fraction of single $V\alpha T3.70^-V\alpha 2^+$ in the peripheral pools. These results suggest that, among the CD8 T cells from DTg origin, those cells expressing the TCR $V\alpha T3.70$ chain are competitively less fit to populate the peripheral T cell pools than those expressing the TCR $V\alpha 2$ chain alone.

Immune responses and “homeostatic” proliferation of DTg CD8 cells

We next compared the *in vivo* immune responses and the proliferation of mature CD8 T cells from MoP14, MoaHY female, and DTg female mice transferred into T cell-deficient $CD3\epsilon^{-/-}$ adoptive hosts (Fig. 3). In absence of Ag, in female hosts, CD8 T cells from MoaHY or DTg female donors persist at similar numbers

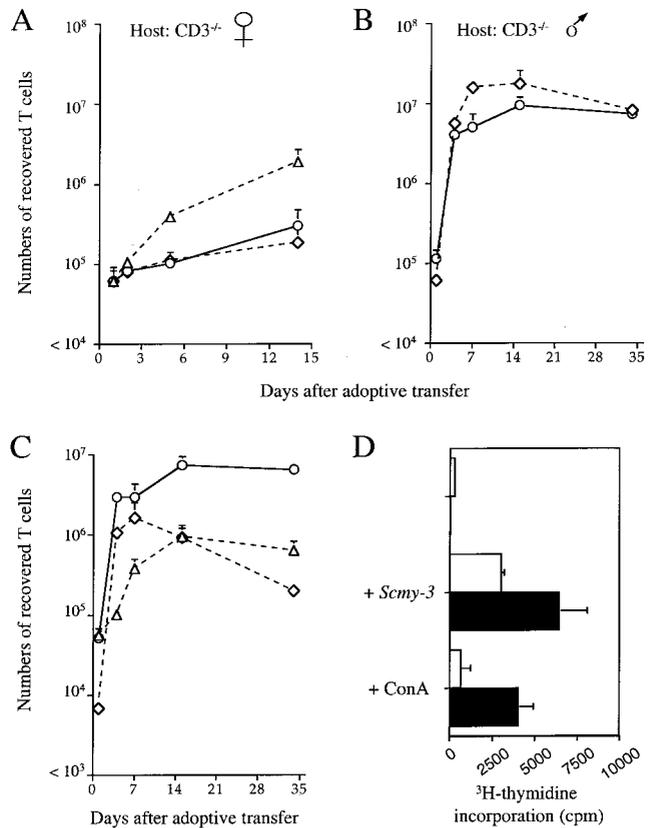


FIGURE 3. T cell survival and expansion in T cell-deficient hosts. Around 6.10^5 LN cells from MoP14 (Δ), MoaHY (\diamond), and DTg (\circ) female mice were transferred into $B6.CD3\epsilon^{-/-}$ female (A) and male (B) hosts. Results show the kinetics of the total number of donor Tg T cells recovered in the spleen and LN of the host mice (mean \pm SD of three mice per time point). C, Results show the kinetics of expansion of the different DTg donor T cell subsets in the male hosts: $V\alpha 2^+V\alpha T3.70^+$ (\circ), $V\alpha 2^-V\alpha T3.70^+$ (\diamond), and $V\alpha 2^+V\alpha T3.70^-$ (Δ ; mean \pm SD of three mice). D, Proliferation of purified T cells from female MoaHY (open bars) and DTg (filled bars) donors injected (2.10^5 of each origin) into $B6.CD3\epsilon^{-/-}$ male hosts 35 days before. Results show cpm after 3 days of *in vitro* stimulation with the *Scmy-3* peptide ($2.5 \mu\text{g/ml}$) and Con A. Similar results were obtained after anti-CD3 stimulation. Stimulation of control MoaHY female cells resulted in 10 fold higher proliferation indexes.

from days 1–15 after transfer (Fig. 3A). In contrast, the number of cells from MoP14 donors augments to a plateau of 1 – 2×10^6 cells at day 14. This increase nevertheless was 10-fold lower than that observed for transferred polyclonal CD8 T cell populations (data not shown).

In the presence of the HY Ag, in male hosts, cells from MoaHY female and DTg female donors respond to antigenic stimulation and expand to reach a plateau of 10^7 cells at day 15 (Fig. 3B). The kinetics of response and the long-term persistence differed between the dual and the single $V\alpha$ -expressing CD8 T cell populations from DTg donors (Fig. 3C). The number of cells expressing single $V\alpha 2^-T3.70^+$ and dual $V\alpha 2^+T3.70^+$ increased to similar numbers (Fig. 3C). The expansion of the $V\alpha 2^-T3.70^+$ cells continued slightly longer (Fig. 3, B and C) to reach a peak at day 7, but when in the presence of other CD8 T cell populations, they decay thereafter. Thus, after transfer the $V\alpha 2^-T3.70^+$ population becomes the less represented T cell subset (Fig. 3C). These single $V\alpha 2^-T3.70^+$ TCR cells, recovered late after transfer, become refractory and proliferate poorly upon *in vitro* stimulation with the HY-specific peptide or Con A (Fig. 3D) (26). The fraction of dual

$V\alpha 2^+T3.70^+$ cells increased at a similar rate and continued to expand up to day 14 after transfer, but once they reached their peak of growth, their numbers did not decline and remain constant. The dual-receptor cells that persisted after expansion proliferated better than the single $V\alpha 2^-T3.70^+$ cells to the in vitro stimulation by the HY peptide (Fig. 3, B and D). However, this response was 10-fold lower than that of control naive CD8 cells from MoaHY female mice (data not shown). Finally, the fraction of $V\alpha 2^+T3.70^-$ cells augmented 10-fold less at a much slower rate (Fig. 3C); i.e., they mimic the growth of MoP14 cells transferred into $CD3\epsilon^{-/-}$ female hosts (Fig. 3A).

We conclude that mature dual-receptor cells show efficient in vivo responses but are less susceptible to the induction of peripheral tolerance than the single TCR-expressing cells. Indeed, after in vivo stimulation with an excess of Ag, they are not replaced by other cell populations and retain a partial responsiveness when stimulated in vitro with the specific peptide.

Competitive ability and immune responses of DTg CD8 cells from male mice

We have investigated whether the presence of two TCR transgenes could rescue cells from deletion in the presence of male HY self-Ag. Comparing T cell development in the thymus of MoaHY and DTg male mice, we found that the presence of the second $V\alpha 2$ TCR transgene rescues a significant fraction of cells into the double positive (DP) compartment (35). This allows the selection of cells co-expressing both $V\alpha 2$ and low levels of HY-specific $V\alpha T3.70$ into the SP CD8 T cell compartment (35). At the periphery of the DTg males, we recovered significant numbers of $CD8^+$ T cells (12×10^6), of which the majority (~80%) express two TCR α chains (Fig. 4A). In contrast to DTg females (Fig. 1A), single $V\alpha 2^+T3.70^-$ cells are more abundant (15–20%) and $V\alpha 2^-T3.70^+$ cells are rare ($\leq 2\%$). A significant fraction of the $CD8^+T3.70^+$ cells are activated, i.e., they express intermediate or high levels of CD44 (Fig. 4B).

We investigated the selection fitness and functional abilities of dual-TCR-expressing CD8 T cells that developed in the presence of self-Ag in male DTg mice. For this purpose, we compared the development and peripheral accumulation of dual- and single-receptor CD8 T cells in male chimeras co-injected with MoaHY (Thy1.1) and DTg (Thy1.2) BM cells mixed at a 50:50 ratio. We found that, among the DN, DP, and SP thymus compartments and

at the periphery, ~90% of the cells were from DTg origin (Fig. 5A). The fraction of MoaHY and single $V\alpha 2^-T3.70^+$ cells is strongly reduced, whereas the $V\alpha 2^+T3.70^-$ cells become more abundant (Fig. 5A). These findings show a preferential selection of the cells that lose expression of the HY-specific $V\alpha T3.70$, suggesting that, when in the presence of self-Ag, dual TCR α CD8 T cells expressing the $V\alpha T3.70$ aHY chain are counter selected and less fit to integrate the peripheral T cell pool.

The anti-HY responses of the dual-receptor CD8 T cells from DTg male mice were studied. In vivo, the CD8 T cells from DTg male donors when exposed to the HY Ag in male adoptive hosts expanded, but 10-fold less and at a slower rate (Fig. 5B) than CD8 cells from DTg female donors (see Fig. 3B). After transfer, the fraction of the single $V\alpha 2^+T3.70^-$ expressing donor cells increased both in male and female adoptive hosts (Fig. 5C). In vitro, upon stimulation with the *Scmy-3* HY-specific peptide, the response of the T cells from DTg males was of lower intensity and delayed compared with the T cells from female DTg mice, but it was significantly detectable in the presence of high concentrations of the stimulating ligands (Fig. 6A). The T cells from male DTg mice up-regulated CD69 expression after stimulation with the HY peptide (Fig. 6B). In contrast, the CD8 T cells from DTg males did not proliferate upon stimulation with the gp33-41 peptide (Fig.

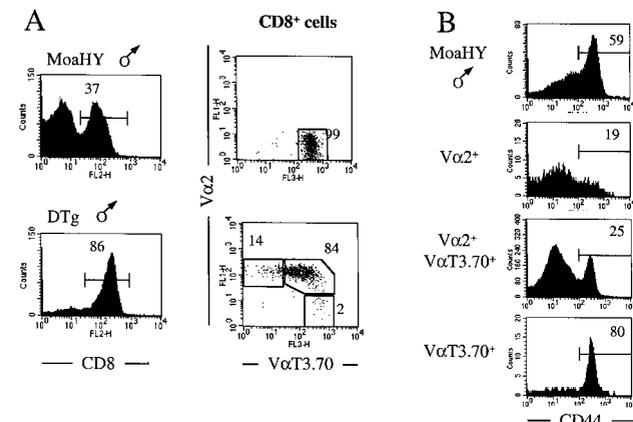


FIGURE 4. Peripheral T cells in MoaHY and MoaHY.MoP14DTg male mice. A, Expression of CD8 (histograms) and of $V\alpha 2$ and $V\alpha T3.70$ TCR transgenes by gated peripheral LN CD8 T cells (dot plots). B, Expression of CD44 among MoaHY, DTg $V\alpha 2^+V\alpha T3.70^-$, $V\alpha 2^+V\alpha T3.70^+$, and $V\alpha 2^-V\alpha T3.70^+$ LN CD8 T cells.

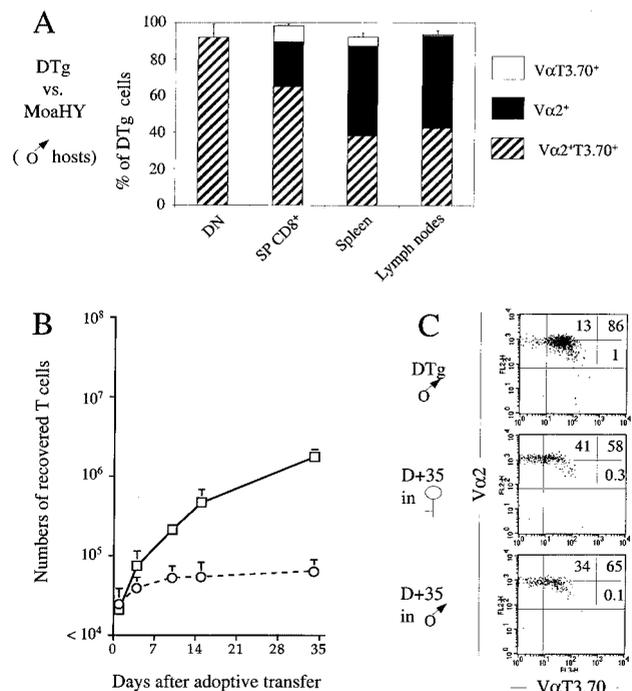
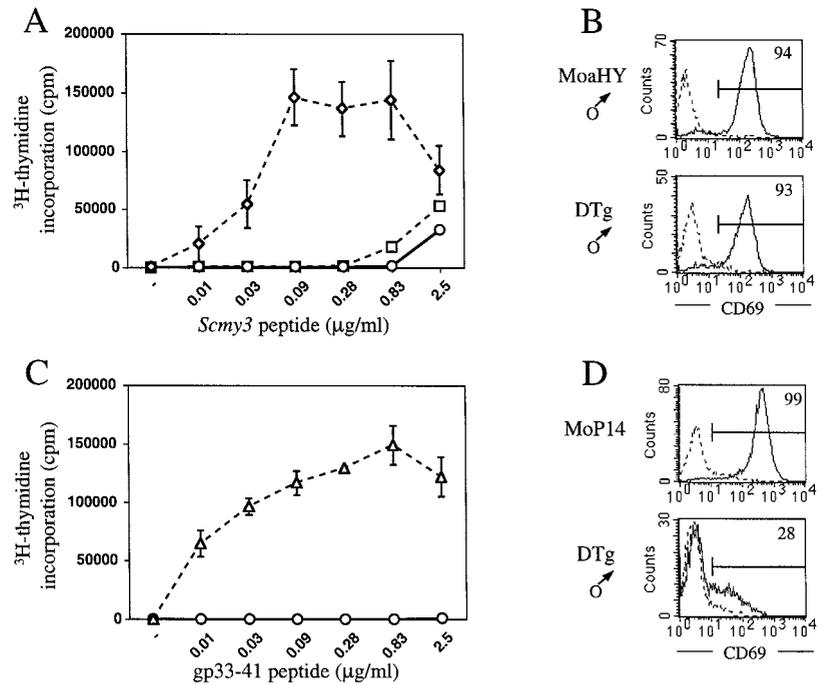


FIGURE 5. A, Male $Rag2^{-/-}$ host mice were irradiated and reconstituted with mixtures of BM cells from MoaHY and DTg male donor mice (ratio, 50:50). Eight weeks after reconstitution, the relative proportions of T cells from the different donors were analyzed in the central and peripheral T cell compartments (results show the mean \pm SD of six to eight mice). The relative proportion of each T cell subpopulation among cells from DTg origin is shown for SP CD8 thymocytes and peripheral $CD8^+$ T cells (dashed bars, $V\alpha 2^+V\alpha T3.70^+$; filled bars, $V\alpha 2^-V\alpha T3.70^-$; open bars, $V\alpha 2^-V\alpha T3.70^+$). B, LN cells from DTg male mice were transferred into $B6.CD3\epsilon^{-/-}$ male (\square) or female (\circ) hosts. Results show the kinetics of the total number of donor Tg T cells recovered in the spleen and LN of the host mice (mean \pm SD of three mice per time point). C, Dot plots show the expression of $V\alpha 2$ and $V\alpha T3.70$ TCR transgenes by gated peripheral LN CD8 T cells from DTg male mice before (*top panel*) and 35 days after transfer into female and male adoptive hosts. Note the increase in the fraction of single $V\alpha 2^+V\alpha T3.70^-$ cells in both types of recipient mice.

FIGURE 6. In vitro stimulation of T cells from MoP14, MoaHY, and MoaHY.MoP14 DTg mice. *A*, Spleen T cells from MoaHY female (\diamond), MoaHY male (\square), and DTg males (\circ) were stimulated in cultures with the *Scmy3* aHY TCR-specific peptide. Results show the [3 H]thymidine incorporation at day 2 of culture obtained in one typical experiment (mean of triplicate \pm SD). *B*, Peptide-activated (filled line) and nonactivated (dotted line) cells were stained at 24 h for the surface expression of the early activation marker CD69. The percentage of CD69 $^+$ cells is indicated inside each histogram. *C* and *D*, The same analysis was performed for T cells from MoP14 mice (\triangle) and DTg males (\circ) using the gp33-41 P14 TCR-specific peptide.



6C). The fraction of T cells that up-regulate CD69 after gp33-41 stimulation was reduced (Fig. 6D) compared with T cells from DTg females (data not shown). Overall, these results show that CD8 T cells from DTg male mice, though functionally impaired, retain some functional capabilities in that they can expand in vivo and proliferate in vitro when stimulated with high concentrations of the specific peptide.

Discussion

The role of dual-receptor T cells in autoimmune diseases depends on the ability of the dual-TCR cells to be positively selected in the thymus, to escape negative selection, to survive, and to remain functionally active in the peripheral T cell pools. We have derived a line of B6.Rag2 $^{-/-}$ mice Tg for two complete TCRs, namely the α - and the β -chains of the anti-LCMV P14 TCR and of the anti-male Ag aHY TCR (15, 20). We have reported that, in these DTg mice, most CD8 T cells express only the TCR β chain from the aHY transgene. By comparing the mRNA species for both TCR β chains, we previously have shown that, in DTg T cells, the anti-LCMV TCR β chain transcripts were less abundant (35), suggesting that the earlier and higher expression of the aHY TCR β chain inhibits the late transcription of the anti-LCMV TCR β chain. As a result of this process, \sim 80% of the peripheral CD8 T cells from the DTg mice express one TCR β associated with two TCR α chains. Therefore, these DTg mice provide a unique model for studying the functional behavior of the dual-TCR α CD8 T cells. Here, we investigated the peripheral selection and competitive survival fitness of these dual-receptor CD8 T cells.

Exposure of mature naive DTg cells from female mice to the male HY Ag in vivo, i.e., after transfer into male hosts, resulted in the selective expansion of both HY-specific single V α 2 $^{-}$ T3.70 $^{+}$ and dual V α 2 $^{+}$ T3.70 $^{+}$ cells. The immune response of single V α 2 $^{-}$ T3.70 $^{+}$, however, was more efficient, as indicated by their faster rate of expansion. Thus, the lower surface expression of the aHY-specific TCR may decrease the overall T cell avidity to the HY Ag and render the dual V α 2 $^{+}$ T3.70 $^{+}$ cells less efficient responders (27). A similar expansion of single LCMV-specific V α 2 $^{+}$ T3.70 $^{-}$ cells was observed upon immunization of the DTg

mice with the virus (N.L., unpublished observations). In the DTg mice, the single V α 2 $^{-}$ T3.70 $^{+}$ aHY-specific cells were susceptible to the tolerogenic effects of excess Ag, because 7 days after transfer into male hosts, they became refractory and unable to proliferate upon in vitro stimulation (26). Later, in vivo, both dual V α 2 $^{+}$ T3.70 $^{+}$ cells and V α 2 $^{-}$ T3.70 $^{-}$ non-HY-specific cells replaced the "anergic" V α 2 $^{-}$ T3.70 $^{+}$ cells (Fig. 3). Indeed, tolerant MoaHY CD8 T cells have been shown to persist when alone (28) (Fig. 3) but are rapidly substituted when in the presence of other competing populations (26, 29). In contrast, the dual-receptor cells exposed in vivo to an excess of male Ag, though still susceptible to the induction of tolerance, were not substituted and did not disappear later after transfer. The fact that these tolerant dual-TCR α cells persist and are not replaced may allow them to exert important regulatory functions in vivo (30).

We have shown that the presence of a second TCR transgene reduces the level of surface expression of the aHY-specific TCR, allowing the appearance of significant numbers of DP thymocytes and SP TCR $^{\text{high}}$ CD8 $^{+}$ T cells in male DTg mice (35). In DTg males, peripheral CD8 $^{+}$ cells express two V α chains, but in contrast to female DTg mice, the single T3.70 $^{+}$ cells are rare and the single V α 2 $^{+}$ cells are more abundant. Overall, the presence of the HY Ag leads to the counterselection of cells bearing high levels of the aHY-specific receptors in DTg mice. What functional roles do the dual-receptor-expressing T cells, which develop in the presence of self-Ag, play? We show that, although the presence of a second TCR permits the development and emigration of mature CD8 T cells expressing a self-reactive TCR, these peripheral dual-receptor T cells are functionally tolerant. They express low levels of CD8 and of the aHY-specific TCR, and like CD8 T cells from Rag $^{+}$ aHY Tg and MoaHY males, proliferate poorly to high doses of ligand (15, 26, 28) and up-regulate CD69 expression, mimicking partial agonistic responses (31). In vivo exposure of DTg cells from male mice to the HY Ag, i.e., after transfer into male hosts, results in a limited increase in the number of DTg cells. Despite the increased expression of the P14 TCR β chain, the dual-receptor CD8 cells from male mice are unable to proliferate to the LCMV gp33-41 peptide. A significant fraction of the dual-receptor cells

from male mice, however, express the activation/memory CD44 marker and produce γ -IFN (data not shown) and IL-10 mRNAs (30), suggesting that these tolerant cells are not fully anergic and may have important regulatory functions. These findings support the notion that tolerance induction, rather than a state of complete functional "anergy" (20), represents a change in the functional behavior of the cell (30), which may be due to changes in the thresholds of cell activation.

Using a competitive repopulation strategy, we directly accessed the accumulation of dual- and single-receptor CD8 T cells in the peripheral pools of different BM chimeras. When alone, T cells from DTg and single transgenic donors show similar behavior and generate peripheral pools of similar size. When mixed in the same host, CD8 T cells colonized the peripheral pools, following a hierarchy in which MoP14 > MoaHY = DTg cells. In these experiments, the advantage of the P14 cells may be due to their ability to recognize cross-reactive Ags present at the periphery but absent in the thymus. Indeed, after transfer into syngeneic T cell-deficient hosts, the P14 CD8 T cells express CD44⁺ and expand moderately (32). In agreement with these observations, we found that, in mixed DTg vs MoaHY chimeras, the fraction of single V α 2⁺T3.70⁻ cells increases in the peripheral pool, again suggesting a broader reactivity of the cells expressing the V α 2 TCR. We must mention that, in the mixed DTg vs P14 chimeras, the fraction of the same V α 2⁺T3.70⁻ of DTg origin decreases. In these chimeras, it is possible that the V α 2⁺T3.70⁻ cells of DTg origin are out-competed by the V α 2⁺ cells of P14 origin. Thus, CD8 T cells expressing the P14 V β 8.1⁺V α 2⁺ TCR are more fit than V β 8.2⁺V α 2⁺-expressing cells from the DTg donors, and they both out-compete the aHY-specific V β 8.2⁺V α 3.70⁺ cells. These results suggest that fine TCR specificity and/or promiscuity may be determinant for the peripheral survival and accumulation of CD8 T cells. They also indicate that dilution of each specific TCR may reduce the survival fitness of the dual-TCR CD8 T cells, favoring the occupation of peripheral pools by single-receptor T cells. Lymphocyte competition for survival signals is likely part of the homeostatic processes that regulate the peripheral T cell pool size (33, 34). Comparing peripheral CD8 T cells in male MoaHY and DTg mice, we found that, in contrast to MoaHY males where TCR⁺CD8⁻ (DN) cells represent 60% of the peripheral TCR⁺ cell pool (15), in DTg male mice most peripheral TCR⁺ cells are CD8⁺. These results suggest that an optimal level of signal is required to ensure peripheral T cell survival. Successful survival may reflect a process of "adaptation" of lymphocyte populations to the host environment. Thus, according to the antigenic environment, surviving T cell populations express the correct levels of TCR and coreceptors; i.e., low TCR and CD8 levels compensate for an excess of ligand, high TCR expression for the lack of CD8 coreceptors, etc.

In normal mice, TCR α inclusion occurs in 30% of T cells, which may represent an autoimmune hazard. Using double-TCR Tg mice, we characterized the functional behavior of dual-receptor CD8 T cells. Naive dual-receptor cells, which develop in absence of self-Ag, respond to Ag immunization, though less efficiently than single-receptor T cells. The naive dual-receptor cells remain sensitive to induction of peripheral tolerance after exposure to high levels of self-Ag. However, the tolerant dual-receptor cells are more resistant to *in vivo* replacement by nonspecific T cell populations than single-receptor cells. They persist and, therefore, may exert important regulatory functions *in vivo*. We found that the presence of a second TCR allows a significant number of dual-receptor CD8 T cells expressing a self-reactive receptor to escape central deletion by self-Ag. These nondeleted cells migrate to the peripheral pools but are not fully competent to respond to cognate

stimuli. The ensemble of these characteristics may contribute to a decrease in the autoimmune hazard that dual-receptor cells could represent in normal physiological conditions.

Acknowledgments

We thank Dr. B. Rocha for criticism and suggestions and J. Di Santo and L. Ferradini for reviewing the manuscript.

References

- Padovan, E., C. Giachino, M. Cella, S. Valitutti, O. Acuto, and A. Lanzavecchia. 1995. Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor β chains: implications for the mechanism of allelic exclusion. *J. Exp. Med.* 181:1587.
- Balomenos, D., R. S. Balderas, K. P. Mulvany, J. Kaye, D. H. Kono, and A. N. Theofilopoulos. 1995. Incomplete T cell receptor V β allelic exclusion and dual V β -expressing cells. *J. Immunol.* 155:3308.
- Malissen, M., J. Trucy, E. Jouvin-Marce, P. A. Cazenave, R. Scollay, and B. Malissen. 1992. Regulation of TCR α and β gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol. Today* 13:315.
- Casanova, J. L., P. Romero, C. Widmann, P. Kourilsky, and J. L. Maryanski. 1991. T cell receptor genes in a series of class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a *Plasmodium berghei* nonapeptide: implications for T cell allelic exclusion and antigen-specific repertoire. *J. Exp. Med.* 174:1371.
- Padovan, E., G. Casorati, P. Dellabona, S. Meyer, M. Brockhaus, and A. Lanzavecchia. 1993. Expression of two T cell receptor α chains: dual receptor T cells. *Science* 262:422.
- Heath, W. R., F. R. Carbone, P. Bertolino, J. Kelly, S. Cose, and J. F. Miller. 1995. Expression of two T cell receptor α chains on the surface of normal murine T cells. *Eur. J. Immunol.* 25:1617.
- Gascoigne, N. R., and S. M. Alam. 1999. Allelic exclusion of the T cell receptor α -chain: developmental regulation of a post-translational event. *Semin. Immunol.* 11:337.
- Elliott, J. I., and D. M. Altmann. 1996. Non-obese diabetic mice hemizygous at the T cell receptor α locus are susceptible to diabetes and sialitis. *Eur. J. Immunol.* 26:953.
- Zal, T., S. Weiss, A. Mellor, and B. Stockinger. 1996. Expression of a second receptor rescues self-specific T cells from thymic deletion and allows activation of autoreactive effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9102.
- Sarukhan, A., C. Garcia, A. Lanoue, and H. von Boehmer. 1998. Allelic inclusion of T cell receptor α genes poses an autoimmune hazard due to low-level expression of autospecific receptors. *Immunity* 8:563.
- von Boehmer, H. 1990. Developmental biology of T cells in T-cell receptor transgenic mice. *Annu. Rev. Immunol.* 8:531.
- Tanchot, C., F. A. Lemonnier, B. Perarnau, A. A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276:2057.
- Rooke, R., C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis. 1997. Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity* 7:123.
- Brocker, T. 1997. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J. Exp. Med.* 186:1223.
- Kisielow, P., H. Bluthman, U. D. Staerz, M. Steinmetz, and H. von Boehmer. 1988. Tolerance in T cell receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4⁺CD8⁺ thymocytes. *Nature* 333:742.
- Nesic, D., and S. Vukmanovic. 1998. MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8⁺ thymic emigrants. *J. Immunol.* 160:3705.
- Dave, V. P., D. Allman, D. L. Wiest, and D. J. Kappes. 1999. Limiting TCR expression leads to quantitative but not qualitative changes in thymic selection. *J. Immunol.* 162:5764.
- Hardardottir, F., J. L. Baron, and C. A. Janeway, Jr. 1995. T cells with two functional antigen-specific receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:354.
- Teh, H. S., P. Kisielow, B. Scott, H. Kishi, Y. Uematsu, H. Bluthman, and H. von Boehmer. 1988. Thymic MHC antigens and the $\alpha\beta$ TCR determine the CD4/CD8 phenotype of mature T cells. *Nature* 333:229.
- Pircher, H., K. Burki, R. Lang, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1989. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 342:559.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, K.-P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendensohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall, and F. W. Alt. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855.

22. Malissen, M., A. Gillet, L. Ardouin, G. Bouvier, J. Trucy, P. Ferrier, E. Vivier, and B. Malissen. 1995. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3- ϵ gene. *EMBO J.* 14:4641.
23. Freitas, A. A., F. Agenes, and G. C. Coutinho. 1996. Cellular competition modulates the survival and selection of CD8 T cells. *Eur. J. Immunol.* 26:2640.
24. Pircher, H., D. Moskophidis, U. Rohrer, K. Burki, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1990. Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants in vivo. *Nature* 346:629.
25. Markiewicz, M. A., C. Girao, J. T. Opferman, J. Sun, Q. Hu, A. A. Agulnik, C. E. Bishop, C. B. Thompson, and R. P. Ashton. 1998. Long-term T cell memory requires the surface expression of self-peptide/major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3065.
26. Rocha, B., and H. von Boehmer. 1991. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 251:1225.
27. Munthe, L. A., E. Blichfeldt, A. Sollien, Z. Dembic, and B. Bogen. 1996. T cells with two Tcr β chains and reactivity to both MHC/idiotypic peptide and superantigen. *Cell. Immunol.* 170:283.
28. Rocha, B., A. Grandien, and A. A. Freitas. 1995. Anergy and exhaustion are independent mechanisms of peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 181:993.
29. Tanchot, C., and B. Rocha. 1995. The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8⁺ T cell pools. *Eur. J. Immunol.* 25:2127.
30. Tanchot, C., S. Guillaume, J. Delon, C. Bourgeois, A. Franzke, A. Sarukhan, A. Trautmann, and B. Rocha. 1998. Modifications of CD8⁺ T cell function during in vivo memory or tolerance induction. *Immunity* 8:581.
31. Reis e Sousa, C., E. H. Levine, and R. N. Germain. 1996. Partial signaling by CD8⁺ T cells in response to antagonist ligands. *J. Exp. Med.* 184:149.
32. Ernst, B., D. S. Lee, J. M. Chang, J. Sprent, and C. D. Surh. 1999. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 11:173.
33. Freitas, A. A., and B. A. Rocha. 1993. Lymphocyte lifespans: homeostasis, selection and competition. *Immunol. Today* 14:25.
34. Freitas, A. A., and B. Rocha. 2000. Lymphocyte population biology: the flight for survival. *Annu. Rev. Immunol.* 18:83.
35. Legrand, N., and A. A. Freitas. 2001. CD8⁺ T lymphocytes in double $\alpha\beta$ TCR transgenic mice. I. TCR expression and thymus selection in the absence or in the presence of self-antigen. *J. Immunol.* 167:6150.

Article 3

« Co-adaptation of virus and virus-specific CD8 T cells through viral mutations and partial agonist induced T cell anergy »

Nicolas Legrand, A. de La Coste, M-P. Lembezat, A.A. Freitas & M-F. Saron

(soumis)

IV. ADAPTATION DES CELLULES T SPÉCIFIQUES LORS DE L'ÉTABLISSEMENT D'UNE INFECTION VIRALE CHRONIQUE

Nous avons étendu notre étude de l'adaptation des cellules T en examinant la réponse immunitaire des souris MoP14 lors d'une infection par le LCMV. Cette situation est particulière, car tous les lymphocytes de ces animaux sont des cellules T CD8⁺ spécifiques d'un épitope du virus.

Durant la phase aiguë de l'infection, c'est-à-dire la première semaine, les cellules T CD8⁺ des souris MoP14 sont activées et prolifèrent fortement. Des cellules effectrices cytotoxiques sont générées puis recrutées aux sites d'infection. Ainsi, l'inoculation du virus par voie intra-crânienne est létale en moins d'une semaine, et l'inoculation dans la voûte plantaire induit une réaction inflammatoire locale qui culmine à 7 jours. La réponse primaire des souris MoP14 est donc comparable à celle d'animaux possédant des compartiments T CD4⁺ et B intacts. Toutefois, la réponse primaire ne parvient pas à éliminer le virus et les souris MoP14 infectées deviennent porteuses chroniques du virus. De manière intéressante, ce sont exclusivement des variants du virus, mutés uniquement pour l'épitope gp33-41, qui sont trouvés dans les souris porteuses. Testés *in vitro*, les épitopes mutés donnent une gamme de comportement allant de l'agoniste partiel à aucune stimulation des cellules T CD8⁺ exprimant le TCR P14.

Parallèlement à l'établissement de l'infection chronique, les cellules T CD8⁺ des souris MoP14 perdent progressivement leur capacité à monter une réponse cytotoxique et à proliférer, mais elles maintiennent en partie leur production d'IFN γ . En conséquence, l'inoculation intra-crânienne du virus n'induit plus la mort des animaux après l'établissement de l'infection chronique. Toutefois, de nombreuses cellules T CD8⁺ se maintiennent dans les souris MoP14 infectées chroniquement par le LCMV. Elles possèdent un phénotype activé (CD44⁺ CD62L^{low}), avec notamment une forte proportion de cellules CD69⁺. Cette observation est intéressante car ce marqueur est connu pour être exprimé précocément à la surface des lymphocytes T après activation.

En somme, les cellules T CD8⁺ spécifiques du LCMV s'adaptent à l'omniprésence du virus, alors que le virus s'adapte via des mutants d'échappement. Ce processus de co-adaptation permet la survie à la fois de la population virale et de l'hôte infecté, grâce à l'établissement d'un nouvel équilibre dans l'organisme. De plus, nos résultats suggèrent que les variants viraux possèdent un rôle important dans la maintenance des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ spécifiques

dans un état d'anergie, sans doute via la stimulation chronique permise par les épitopes agissant comme agonistes partiels. Enfin, nos données renforcent l'idée selon laquelle il est essentiel que l'organisme développe de multiples stratégies de défense pour combattre les infections. Ainsi, en mettant en place les réponses T cytotoxiques, T auxiliaires et anticorps, le système immunitaire assure son maintien en réduisant la probabilité de devoir s'adapter à l'établissement d'une infection chronique.

Co-adaptation of virus and virus-specific CD8⁺ T cells through viral mutations and partial agonist maintained T cell anergy.

By

**Nicolas Legrand¹, Alix de La Coste¹, Marie-Pierre Lembezat¹,
Antonio A. Freitas¹ and Marie-Françoise Saron^{2,3}**

¹ Unité de Biologie des Populations Lymphocytaires, URA CNRS 1961
Institut Pasteur, 25 Rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France
<http://www.pasteur.fr/units/BPL/Welcome.html>

² Laboratoire de Virologie Expérimentale
Institut Pasteur, 25 Rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

³ current address: Institut Pasteur de Dakar
36, avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal.

Running title: **Lymphocyte adaptation during LCMV infection**

Number of pages: 29

Number of figures: 8 (5 figures + 3 tables)

Corresponding author:

Nicolas Legrand, Unité de Biologie des Populations Lymphocytaires, URA CNRS
1961, Institut Pasteur, 25 Rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

Phone : +33 1 45 68 85 44

Fax: : +33 1 45 68 89 21

Email: nlegrand@pasteur.fr

Keywords:

anti-viral response, cytotoxic T lymphocyte, LCMV, lymphocyte adaptation, TCR transgenic mice.

Abstract

We studied the anti-LCMV immune response in mice carrying a single monoclonal population of CD8⁺ T lymphocytes expressing a TCR $\alpha\beta$ transgene specific for the gp33-41 peptide of the LCMV glycoprotein. We found that in the absence of both CD4⁺ T cell help and B cells, during the acute phase of infection, virus specific T cells expand, CTLs responses are generated, and the effector CD8⁺ T cells are correctly recruited into the sites of infection. This early response fails, however, to clear the infection and the mice became virus carriers. Persistent viruses were variants bearing mutations in the gp33-41 epitope recognized by the cytotoxic CD8⁺ T cells. These mutants were either poorly recognized or induced a partial agonist sustained stimulation of the virus-specific cells, which resulted in the progressive loss of the cytotoxic responses and the maintenance of the capacity to produce IFN- γ . Consequently, the chronically infected MoP14 mice do not die after the intra-cerebral virus inoculation but maintain DTH responses to secondary LCMV challenge. Our findings show that LCMV specific peripheral CD8⁺ T cells persist but adapt to the chronic viral infection. This process of mutual co-adaptation allows the survival of both host and virus and results in a state of co-existence between virus and virus specific T cells with no pathological consequences for the carrier organism.

Introduction

The mechanisms involved in the generation of efficient/protective T cell responses to viral infections are not yet fully understood. Several parameters, as the immunization vector, antigen dose, route of inoculation or cytokine environment, are known to influence the fate of an immune response and the establishment of immunological memory (1,2). Lymphocyte sub-populations, namely B cells, CD4⁺ helper and CD8⁺ cytotoxic T cells play variable roles depending on the invading pathogen. It is however clear that the CD8⁺ T lymphocytes play a major role in the defense against viral infections (3).

The relative role of B and T helper cells in the control of viral infections has been studied in the mouse using LCMV as a model (4,5). Antibodies have been shown to play a determining role in the maintenance of T cell memory by the sequestration of antigen on follicular dendritic cells (6,7). Contradictory results have, however, been reported concerning the generation of T cell memory after LCMV infection of B cell deficient ($\mu_{MT}^{-/-}$) mice (8,9). Thus, Asano et al. have reported that cytolytic (CTL) memory, as assessed by the frequency of virus-specific CTL or protective immunity, does not decline in the absence of B cells (8). In contrast, Thomsen et al. have shown that in B cell deficient mice, antibodies and/or B cells are required for permanent virus clearance (9). These differences could be explained by the divergent tropism of the LCMV strains used (8,9). The requirements for T cell help have also been studied upon LCMV infection of mice either after the *in vivo* depletion of CD4⁺ T cells using anti-CD4 therapy (10), or in CD4^{-/-} or MHC class II-deficient mice (11,12). In the absence of CD4⁺ T cell help, generation of CD8⁺ cytotoxic T cells still occurs during primary response after LCMV infection, but the magnitude and maintenance of the CTL response are both reduced (10). When CD4^{-/-} mice are infected with high doses of LCMV, the virus-specific CD8⁺ CTLs disappear

(13), the mice are not able to clear viremia and become life-long virus carriers (14,15). On the contrary, when $CD4^{-/-}$ mice are infected with a low dose of virus, the initial $CD8^{+}$ CTL response is sufficient to clear the virus during the early phases of replication and secondary cytotoxic T cell responses are kept for at least 5 months (13). Other groups have reported that the generation of long-term $CD8^{+}$ T cell memory is impaired in $CD4^{-/-}$ mice (16) and MHC class II $^{-/-}$ (9), allowing a late virus outspread. Again, the different tropism of the several viral strains used in these studies may be responsible for the discrepancy between these observations.

In the present study, we evaluate the anti-viral $CD8^{+}$ T cell responses that can be generated in the absence of both $CD4^{+}$ T cell help and B cells. For this purpose, we used mice transgenic for the LCMV-specific P14 TCR (17) crossed on a $B6.Rag2^{-/-}$ background. These monoclonal P14 animals were infected with the WE strain of LCMV and the behavior of a single population of virus specific $CD8^{+}$ T cells was analyzed throughout the infection.

Methods

Mice and peptides. Mice transgenic for the P14 TCR (V α 2 V β 8.1) (17,18) specific for the gp33-41 epitope (19) of the LCMV glycoprotein were crossed with B6.Rag2^{-/-} mice (20). These monoclonal P14 mice (MoP14) were bred at the CDTA-CNRS (Orléans, France). Non monoclonal P14 mice were used as controls. Infected animals were maintained in sterile negative air boxes throughout the experiments. Wild-type and variant gp33-41 LCMV peptides were synthesized by Neosystem (Strasbourg, France) and were >95% pure: WT (KAVYNFATM), V35→A (KAA \underline{A} YNFATM), V35→L (KAL \underline{Y} YNFATM), A34→T (K \underline{T} IVYNFATM), Y36→C (KAV \underline{C} NFATM), Y36→F (KAV \underline{E} NFATM).

Virus and inoculation procedures. Virus titers of the LCMV-WE strain, produced on L929 cells, were determined using an in situ enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT) (21,22). Mice were inoculated into the left hind footpad with 30 μ l (10^{3.6} IF) of LCMV-WE and delayed type hypersensitivity (DTH) was monitored using a gauge caliper from day 0 to day 21 after each infection. Secondary challenges were performed 35 days after by intra footpad injection of 30 μ l containing 10^{1.6} IF LCMV. Results are expressed as the daily difference, in 1/100mm, between the infected left hind footpad and the right non-infected one. The capacity of MoP14 mice to develop acute meningitis was studied after the intra-cerebral inoculation of 30 μ l with 30 to 300 IF of LCMV-WE virus. Mice were observed daily from the second day of infection.

Flow Cytometry analysis. Cell suspensions were stained with the following monoclonal antibodies: anti-CD8 α (53-6.7), anti-V α 2 (B20.1), anti-CD3 ϵ (145-2C11), anti-CD69 (H1.2F3), anti-CD25 (PC61) from Pharmingen, and anti-CD44 (IM781), anti-CD62L (MEL14) from Caltag. APC-, TRI-Color- (Caltag) or PerCP-coupled

(Becton Dickinson) streptavidin was used as a second step reagent with biotin-coupled antibodies. All washings and reagent dilutions were done with BSS containing 2% fetal calf serum (FCS) and 0.2% NaN_3 , and each step of staining was done at 4°C in the dark for 20 minutes. Before acquisition, cells were fixed in BSS 2% paraformaldehyde for 20 minutes. Dead cells were excluded according to their light-scattering characteristics. All acquisitions were done with a FACScalibur (Becton Dickinson) interfaced to the Macintosh CellQuest software. Electronic cell sorting was done with a FACStar⁺ (Becton Dickinson) and the purity of sorted cells was >95%.

Enzyme-linked Immunospot assay for IFN- γ -secreting cells. The Enzyme-linked Immunospot (ELISPOT) assays were performed as described (23). In brief, 96-well filtration plates (Multiscreen filtration system, Millipore) were coated with rat anti-mouse IFN- γ antibodies (R4-6A2, Pharmingen) and the responder cells were added into the wells together with 5×10^5 γ -irradiated syngeneic feeder cells. Cells were incubated 36 hours either in the presence or absence of 0,1 μ g/ml gp33-41 WT peptide. After culture, the plates were washed and incubated (overnight at 4°C or 2h at 37°C) with biotinylated anti-mouse IFN- γ antibody (XMG 1.2, Pharmingen). After adding peroxydase labeled streptavidin (Sigma), spots were revealed using freshly prepared substrate buffer (0,03% 3-amino-9-ethyl-carbazolone, 0,015% H_2O_2 in 100mM sodium acetate, pH5) and counted.

CTL activity analysis. Direct *ex-vivo* CTL activity was tested at days 4 (acute phase of the infection), 35 and 80 after i.f.p. infection with 10^5 IF of LCMV-WE. Detection of the LCMV-specific CTL precursor cells (secondary CTLs assay) was performed after stimulation of the spleen cells as described (24). In brief, cells (2.5×10^7 cells per 10 ml) from infected mice were co-cultured with 2.5×10^7 syngeneic non-infected irradiated spleen cells pulsed with 1 μ M gp33-41 WT peptide (Neosystem)

for 4 days. These cultures were tested for the presence of CTLp. Cytotoxicity assays were performed by incubating effector cells (direct ex vivo or secondary CTLs) with ^{51}Cr (NEN) radio-labeled MC57 (H-2^b) target cells coated or non-coated with the gp33-41 peptide for 4h. The percentage of specific lysis was calculated as follows: $(\text{experimental cpm} - \text{spontaneous cpm release}) / (\text{total cpm} - \text{spontaneous cpm release}) \times 100$. Background (medium) was less than 15% of maximal release.

Virus detection and sequencing. The presence of LCMV virus in infected mice was assessed 35 or 80 days post-infection. Virus titers in the urine and kidneys of infected mice were determined using an in situ enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT) (21,22). Alternatively, the presence of virus was also evaluated by RT-PCR. Kidneys were harvested, frozen at -80°C before disrupting in HBSS. Total RNA was extracted using TRIzol® (GibcoBRL). RT-PCR was performed using the already defined downstream (GPC11) and upstream (GPC4) primers (25). Controls consisted in mix, and cDNA from negative and positive kidneys. RT-PCR products from individual mice were cloned using the Topo Cloning Kit (Invitrogen) and were subsequently sequenced (Genome Express) using the GPC4 primer.

***In vitro* proliferation assay.** Spleen cells from Tg mice were incubated in 96-wells plates (10^5 cells/well) at 37°C 5% CO_2 in a final volume of 200 μl in complete RPMI 1640 (GibcoBRL) medium supplemented with 10% FCS (Boehringer). Cells were stimulated *in vitro* with Concanavalin A (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma), gp33-41 peptide (WT or variants, 10ng/ml to 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Neosystem), or with coating anti-CD3 ϵ antibodies (145-2C11, 260ng/ml to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Pharmingen). Cultures were set up in triplicates. After 1 to 4 days of culture, cells were pulsed overnight with 0.5 μCi per well of ^3H -thymidine (ICN Pharmaceuticals Inc.) before harvesting and counting (1205 Betaplate, LKB Wallac).

Results

Primary immune responses of monoclonal P14 mice to LCMV infection. TCR transgenic (Tg) P14 mice (17,18) were crossed with Rag2-deficient mice (20) to obtain monoclonal mice (MoP14). In the resulting MoP14 mice all lymphocytes are naive CD8⁺ T cells expressing the P14 TCR (fig. 1) specific for the peptide gp33-41 of the LCMV glycoprotein (19). The numbers of virus specific CD8⁺ cells recovered from the peripheral pool of the MoP14 mice were around $8 \cdot 10^6$, while in Rag⁺P14 mice they were around $15 \cdot 10^6$. We investigated the immune response of MoP14 mice upon LCMV-WE infection. The intra-cerebral (i.c.) inoculation of a low dose of LCMV (30 to 300 infectious foci - IF) killed all mice 5 to 6 days after infection (table 1) both in non-transgenic and P14 transgenic mice (19,26). This is due to the activation and site-specific recruitment of anti-LCMV T cells that induce a lethal immune-pathological disease in the central nervous system (27). In fact, we found that a relatively low number of LCMV specific T cells from MoP14 animals sufficed to induce a fatal outcome. The intravenous (i.v.) transfer of 10^5 MoP14 transgenic T cells together with $10^{4.1}$ IF of LCMV into Rag2^{-/-} adoptive hosts, kills all recipient mice within 7 days (table 1) with evident signs of meningitis. The fatal outcome was independent of the presence or absence of co-transferred purified CD4⁺ T cells from C57Bl/6 donors (not shown). These experiments confirm that during the first steps of primary intra-cerebral LCMV infection effector CD8⁺ T cells do not need any CD4⁺ T cell help to induce lethal meningitis (10,12).

We studied the response of MoP14 mice upon intra-footpad (i.f.p.) inoculation of 4000 IF of LCMV-WE. This route of infection is not lethal and the kinetics of the local immune response can be easily followed. Footpad swelling was monitored and compared in infected P14 and MoP14 mice (fig. 2). We found that the kinetics and the

amplitude of the primary delayed type hypersensitivity (DTH) responses were identical in P14 and MoP14 mice, with a peak of swelling around day 4 after infection. In summary, these results indicate that in the absence of CD4⁺ T cell help and antibody responses a single population of virus specific CD8⁺ T cells is able to mount primary responses against LCMV.

Infected monoclonal P14 mice show modified secondary responses.

One month (day 35) after primary i.f.p. infection, mice were challenged in the footpad with a lower dose of LCMV-WE (40 IF). As observed during the course of the primary response, the kinetics of footpad swelling and secondary DTH responses was similar in P14 and MoP14 mice (fig. 2). The maximal DTH response was observed sooner (day 1) and its amplitude was less important than the one observed during primary response. However, we found that when the primarily i.f.p. infected MoP14 mice were challenged intra-cerebral at day 80 after infection, all mice survived (table 1), while all P14 mice died in the same conditions. Survival of these MoP14 mice suggested that their T cell responses were modified during the primary infection leading to the absence of the lethal immune-pathology usually seen after primary intra-cerebral LCMV inoculation. To confirm this hypothesis we studied the fate of the virus specific T cells during LCMV infection in the MoP14 mice.

Early after infection, in the initial phases of the antiviral response, LCMV-specific CD8⁺ T cells expanded similarly in P14 and MoP14 animals. Four days after the inoculation of 10⁵ IF of LCMV we recovered about 35.10⁶ CD8⁺Vα2⁺ T cells in the spleen of both MoP14 and P14 mice. Later after infection, in infected MoP14 animals, the number of peripheral CD8⁺ TCR⁺ T cells decreased to reach values that were lower than in age-matched non-infected naive MoP14 mice (table 2). The total number of thymus cells was also diminished when compared to age-matched naive MoP14 animals (table 2). All cellular compartments (double negative, double positive

and single positive) of the thymus were equally affected (not shown). The vast majority of the remaining peripheral MoP14 CD8⁺ virus-specific T cells exhibited an activated phenotype, i.e. they expressed high levels of CD44 and down regulated surface expression of CD62L (Fig. 3) as in P14 mice. Moreover, at days 35 and 80, a significant fraction of the MoP14 T cells expressed the early activation marker CD69 (Fig. 3), suggesting that these cells may be under continuous stimulation. In summary, after LCMV infection of MoP14 mice, the population of virus-specific CD8⁺ T cells initially expands to decrease thereafter to numbers that are lower than those present in naive non-infected mice. These findings indicate that in absence of T cell help and B cells, virus infection results in the deletion of a fraction of virus-specific CD8⁺ T cells both in the peripheral T cell pool and in the thymus.

LCMV-infected MoP14 mice become virus carriers.

Several observations indicate that in the MoP14 mice, despite the presence of a detectable primary immune response, the virus was not cleared. Firstly, MoP14 mice resisted a lethal intra-cerebral LCMV challenge and showed decreased numbers of virus-specific CD8⁺ T cells. Secondly, late in the course of the LCMV infection, the remaining virus specific CD8⁺ T cells in MoP14 mice express CD69 an early activation marker. To test for viral persistence, MoP14 mice were tested 35 or 80 days after primary infection for the presence of viral particles and viral RNA. We found that the kidneys of all tested MoP14 mice were positive for the presence of significant numbers of viral particles (10^3 - 10^4 IF/ml of urine and 10^2 - 10^4 IF/ml of kidney culture) and viral RNA. In contrast, all P14 mice tested were negative for both viral particles and LCMV RNA (not shown). In rare cases LCMV escape primary immune responses and by the selection of virus mutants resistant to either cytotoxic T cells or neutralizing antibodies, establishes persistent infections (19,28). We sequenced the LCMV glycoprotein cDNA in virus isolates from the chronically infected MoP14 mice. All persistent viruses are mutant variants, which selectively mutated the gp33-

41 epitope recognized by the monoclonal CD8⁺ T cells, mainly at amino-acid positions 34, 35 and 36 (table 3). We tested the *in vitro* capacity of the most frequent mutant epitopes to be recognized and to activate naive MoP14 CD8⁺ Tg T cells (Fig. 4). Virus variants (A34→T, Y36→C and Y36→F) did not induce T cell proliferation and induced a poor or no increased CD69 expression, that is, they either were not seen or were poorly recognized by the MoP14 CD8⁺ T cells. The V35→A and V35→L peptide variants behaved like partial agonists: compared to the wild-type (WT) peptide they fail to induced strong T cell proliferation (Fig. 4A), but induced partial down-regulation of the TCR and a strong expression of CD69 (Fig. 4B) as the WT peptide. These latter peptides also induced an increased expression of CD44 and a down regulation of CD62L similar to that induced by the WT peptide (not shown).

We concluded that in MoP14 mice virus specific CD8⁺ T cells alone were not able to rapidly eliminate the infecting virus from the organism. This allowed the emergence of new virus variants carrying mutations in the gp33-41 epitope, which either are poorly recognized by the LCMV-specific Tg TCR or behave like partial agonists failing to elicit effective cytolytic responses (29).

Functional capacities of T cells from infected MoP14 mice.

The survival of the carrier MoP14 mice upon a secondary intra-cerebral challenge with wild-type (WT) LCMV WE could be due to the reduction in the number and/or the functional inactivation of remaining virus specific T cells. We studied both proliferation and effector functions after cognate TCR stimulation of the CD8⁺ T cells in MoP14 and P14 mice following LCMV infection. We assessed cytolytic CD8⁺ T cell function by studying *ex-vivo* the presence of cytolytic T cells (CTLs) and the capacity to generate *in vitro* anti-viral CTL responses (CTLp) in P14 and MoP14 mice. As expected, naive MoP14 and P14 animals did not show direct *ex-vivo* CTL activity (fig. 5A). At the peak of the primary response, the *ex-vivo* CTL

activity was identical in both groups of mice, $\approx 55\%$ specific lysis at effector/target ratio of 100/1. Thereafter, in the MoP14 mice this cytolytic activity decreased (fig. 5A) and became undetectable at day 80 after infection. In contrast, in P14 mice the *ex vivo* CTL activity persisted later after virus clearance ($\approx 15\%$ specific lysis at day 35 and 80). We next compared the *in vitro* CTLp responses in MoP14 and P14 mice at days 35 and 80 after LCMV injection. We found that after *in vitro* stimulation with the gp33-41 peptide, spleen T cells from MoP14 mice did not develop any CTLp activity while T cells from P14 mice did develop normal CTLp activity (fig. 5B). T cell proliferation was tested after TCR mediated *in vitro* stimulation with different doses of peptide or anti-CD3 antibodies. *In vitro* peptide stimulation induced weaker T cell responses in cells from P14 mice than from MoP14 mice, as expected since in the latter mice we are dealing with a single population antigen specific T cells. At day 80 post-infection, we found that the response of the CD8⁺ T cells from P14 mice to anti-CD3 was kept and the peptide response was present at about 25-30% of the response observed with CD8⁺ T cells from naïve P14 mice. In contrast, late after infection, CD8⁺ T cells from MoP14 mice completely failed to proliferate after *in vitro* cognate stimulation independently of the gp33-41 peptide or anti-CD3 antibody concentration (Fig. 5C). These findings indicate that in carrier MoP14 mice, virus-specific CD8⁺ T cells are functionally impaired as they show poor proliferative capacity and reduced cytolytic function upon cognate TCR-stimulation.

We also studied IFN- γ production by CD8⁺ T cells from the different groups of mice during the course of the infection. After *in vitro* stimulation for short time periods with the specific peptide gp33-41 (23), IFN- γ producing cells were evaluated by ELISPOT and the results reported as a fraction of the LCMV-specific CD8⁺ T cells (fig. 5D). In the absence of *in vitro* stimulation, P14 and MoP14 T cells from naïve or infected animals did not produce detectable levels of IFN- γ (not shown). *In vitro*

stimulation of T cells from naive animals did not induce IFN- γ production. In contrast, a significant number of T cells from infected P14 and MoP14 animals produced IFN- γ after *in vitro* peptide stimulation (fig. 5D). In the P14 mice, the fraction of IFN- γ producing cells reached 11% of spleen virus-specific T cells in agreement with previous publications (30,31). Thus, late after LCMV infection, when tested in the same experimental conditions i.e. upon *in vitro* exposure to specific peptide, virus specific CD8⁺ T cells from MoP14 mice lost CTLp activity but retained IFN- γ production capacity. The fraction of IFN- γ producing cells in MoP14 mice (4 to 6%) was kept constant from day 4 to day 80 and was comparable to that previously observed among virus specific T cell populations of immunized mice (30,31). However, since T cell numbers decreased in the peripheral organs, the absolute number of CD8⁺ IFN- γ producing T cells in the MoP14 mice was lower than in immune P14 animals. In summary, in virus carrier mice, a single population of virus specific CD8⁺ T cells can persist in the presence of the virus, but shows impaired proliferation and cytotoxic functions, while retaining the IFN- γ production capacity.

Discussion

In this study, we generated MoP14 mice in which all CD8⁺ T cells express the P14 TCR Tg (17,18) specific for the LCMV glycoprotein gp33-41 epitope. This mouse model permits to study how an organism can cope with a monoclonal population of virus specific CD8⁺ T cells in the absence of T cell help and B cells both during the initial phase of infection and later after a new antigenic challenge. We found that in MoP14 mice, in the absence of T cell help and B cells, during the acute phase of the infection, virus specific T cells expanded (day 4), CTLs responses were generated, and the effector CD8⁺ T cells were correctly recruited to the sites of infection. Thus, all MoP14 as well as Rag2⁺ P14 mice died within 5-6 days after the intra-cerebral inoculation of LCMV due to lethal immune-pathology and develop local DTH reactions after the intra-footpad injection of LCMV. T cell help and antibody responses are, therefore, not required for the initiation and recruitment of CD8⁺ T cell effector functions early after infection.

We found, however, that after i.f.p. viral infection the MoP14 mice, in contrast to Rag⁺P14 mice, failed to clear the virus and became virus carriers. Virus isolates from carrier MoP14 mice revealed that persistent LCMV escape immune elimination by adapting to the immune response through the mutation of the gp33-41 epitope recognized by the population of cytotoxic CD8⁺ T cells. In the chronically infected MoP14 hosts, we isolate 8 different variants for the relevant gp-33-41 epitope, mostly concentrated at the amino-acid positions 34, 35 and 36 of the epitope, some of which (V35→A, V35→L, Y36→F) had already been isolated in other experimental systems (19,29). Whereas the epitope variants generated after mutation at positions 34 or 36, were poorly recognized by the Tg CD8⁺ T cells (A34→T, Y36→C, Y36→F), the mutation of the ³⁵Valine gives rise to variants with a partial agonist behavior (V35→A, V35→L). This was probably due to changes in the affinity of the mutant

peptides for the H-2D^b molecule or the P14 TCR. The crystal resolution of gp33-41/H-2D^b structure shows that the amino-acid residues 34 and 35 are deeply buried in the MHC groove, whereas amino-acid 36 is exposed in the outside and must interact directly with the TCR (32). Measurements of the K_D dissociation constant showed a decrease in the avidity of the TCR interaction with the gp33-41/H-2D^b complex when using peptide variants V35→L (264μM) and Y36→F (681μM), as compared with the commonly used epitope KAVYNFATM (6μM) (32). Similar results were obtained using the V35→L variant in competition assays (29). It is important to note that previous studies have shown a complete absence of P14 cells cytotoxic activity against target cells coated with these peptide variants (19,29). Variants V35→A, V35→L behave, however, as partial agonist peptides and were able to induce the expression of an activation phenotype and a poor T cell proliferation.

What happens to the virus-specific CD8⁺ T cells in the MoP14 LCMV carrier mice? We found that when the carrier MoP14 mice were re-challenged with an intracerebral inoculation of WT LCMV, all mice survived (table 1). This observation suggests that T cell responses in carrier MoP14 mice were modified. Indeed, after the initial phase of expansion the numbers of virus specific CD8⁺ T cells decreased to values lower than those present in non-infected naive mice. It was previously shown that the presence of very high doses of LCMV antigen induce strong antiviral CD8⁺ cytotoxic T cell response, which are followed by death of all virus specific T cells and virus persistence (14). The absence of either T cell help (13,16) or an antibody response (9) also facilitated the establishment of an LCMV carrier state and favored elimination of virus specific CD8⁺ T cells, due to the absence of T/B cell help *per se* or to disruption of lymphoid microarchitecture (33). Recent observations with a P14 TCR⁺ cells transfer system into chronically infected hosts clearly showed that CD8⁺ T cells can clear the LCMV infection rapidly when they are co-transferred with B and

CD4⁺ T cells and that B and CD4⁺ T cells are necessary to prevent exhaustion of naive CD8⁺ T cells (34). In agreement, when antiviral cytotoxic memory CD8⁺ T cells are transferred alone into immune deficient mice persistently infected with LCMV, they disappear within a few days (35). It was also shown that in these conditions the rare persisting virus specific CD8⁺ T cells were exhausted or functionally impaired, i.e. anergic (31,35). In fact, it is claimed that viral carrier state is always associated with T cell exhaustion (14) or loss of effector functions (31). We showed that the deletion of virus specific CD8⁺ T cells in MoP14 mice was never complete and that significant numbers of virus specific CD8⁺ T cells co-exist with a virus carrier state. The co-existing CD8⁺ T cells are impaired as they are refractory to proliferate or to induce target cytolysis after *in vitro* cognate stimulation, but retain other effector functions like INF γ production.

In MoP14 mice persistently infected with different LCMV variants, what mechanisms maintain the functional impairment of the remaining virus specific CD8⁺ T cells? *In vitro* stimulation of CD8⁺ T cells from naïve MoP14 mice with some of the variant peptides expressed by persistent virus induced increased expression of CD69 and poor proliferative T cell responses. Virus specific CD8⁺ T cells in the carrier mice showed signs of sustained activation and expressed high levels of CD69. The presence of virus variants expressing peptides that induce partial agonist *in vitro* responses is likely to maintain a state of chronic stimulation responsible for a state of partial anergy of the virus-specific CD8⁺ T cells. It was recently shown that low avidity engagement of TCR by low densities of agonist peptides induces memory T cell anergy (36). Memory T cells show a lower threshold of activation (37) that may facilitate anergy induction by partial agonists. The state of anergy of the CD8⁺ T cells is not complete as they kept the capacity to produce IFN- γ . Carrier MoP14 mice retained a DTH inflammatory reaction after secondary LCMV challenge similar to

that of P14 mice that cleared infection. “Anergic” T cells may exert important regulatory functions through the secretion of IFN- γ (38,39). IFN- γ is known to play an important role in the control of intracellular infection (3). Elimination of LCMV is delayed in γ IFN $R^{-/-}$ mice suggesting that IFN- γ plays a role in the control of viremia and virus dissemination (40,41) probably by repressing virus replication (42). The contribution of non-cytolytic mechanisms, in particular the role of cytokines, in the control of viral infections is well characterized (43). It may both control viral spread to vital organs and/or prevent their destruction by cytolytic responses. In carrier MoP14 mice long term IFN- γ production by CD8 $^{+}$ T cells could also represent a way to control the viremia at an acceptable level to avoid deletion of all CD8 $^{+}$ T cells from the lymphoid compartments without the potential deleterious effects of cytotoxic responses (43,44). In overall the present results indicate that in situations when CD4 $^{+}$ T cell help and consequently antibody production are compromised, as is the case of HIV infections, immune responses may evolve to a situation of chronic infection and co-existence of virus specific CD8 $^{+}$ T cells. Recent studies of chronic HIV infection in humans reported that virus-specific CD8 $^{+}$ T cell clones show reduced cytolytic functions, but are still able to produce several cytokines ex vivo including IFN- γ (45). These may well represent the result of chronic stimulation of the virus-specific T cells by mutated virus variants. Thus, the present study suggests an important role for virus mutants in the maintenance of T cell anergy.

In summary, after a viral infection, virus self-replication and tropism implicate that the quantity of antigen and its localization evolve during the course of the infection. Starting with a limited amount of replicating virus particles, the levels of available antigen rapidly accumulate. The fate of anti-viral T cells is therefore influenced by the efficiency of the initial control of virus outspread. In LCMV infected MoP14 mice, because of the lack of T cell help or antibody responses, the

early immune response fails to clear rapidly the virus and allows the establishment of a chronic carrier state (13-15) by LCMV escape variants. Some of the mutants express partial agonist peptides that maintain chronic low stimulation of the virus specific CD8⁺ T cells. In these carrier mice, peripheral T cells adapt to the chronic infection and adjust their behavior. The process of lymphocyte adaptation results in the progressive loss of proliferative and cytotoxic capacities. The adapted T cells shift to produce only IFN- γ , which may further contribute to regulate immune responses and control viral replication. Virus specific T cells and persistent mutant virus reach new steady state equilibrium. Our results suggest the establishment of a state of co-adaptation between the virus and the host's immune system with no pathological consequences to the host allowing the survival of both virus and lymphocytes. Our findings reinforce the idea that in order to prevail and eliminate fast replicating viral infections, the organism has to develop multiple strategies of defense, namely cytotoxic, T cell help and antibody responses, that strongly reduce the probability of establishment of viral escape mutants and of T cell adaptation.

Abbreviations:

LCMV, lymphocytic choriomeningitis virus

CTL, cytolytic T lymphocyte

DTH, delayed type hypersensitivity

Tg, transgenic

CTLp, CTL precursor

MFI, mean fluorescence intensity

Acknowledgments:

We thank Sylvie Garcia for suggestions, Beatrice Clerc, Jeanine Foulon, and Josiane Grégoire for technical assistance and Antonio Membreillera-Pizarro for taking care of the mice in our animal facilities. This work was supported by Institut Pasteur, Association pour la Recherche contre le Cancer, Agence Nationale de Recherche contre le SIDA, Sidaction and the Ministère de la Recherche et des Technologies.

References

- 1 Zinkernagel, R. M., Ehl, S., Aichele, P., Oehen, S., Kundig, T., and Hengartner, H. 1997. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol. Rev.* 156:199-209.
- 2 Dutton, R. W., Bradley, L. M., and Swain, S. L. 1998. T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* 16:201-23.
- 3 Harty, J. T., Tvinnereim, A. R., and White, D. W. 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* 18:275-308.
- 4 Zinkernagel, R. M., Moskophidis, D., Kundig, T., Oehen, S., Pircher, H., and Hengartner, H. 1993. Effector T-cell induction and T-cell memory versus peripheral deletion of T cells. *Immunol. Rev.* 133:199-223.
- 5 Oldstone, M. B. 1997. How viruses escape from cytotoxic T lymphocytes: molecular parameters and players [published erratum appears in *Virology* 1997 Nov 10;237(1):166]. *Virology* 234:179-85.
- 6 Mandel, T. E., Phipps, R. P., Abbot, A., and Tew, J. G. 1980. The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol. Rev.* 53:29-59.
- 7 Gray, D. 1993. Immunological memory. *Annu. Rev. Immunol.* 11:49-77.
- 8 Asano, M. S. and Ahmed, R. 1996. CD8 T cell memory in B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 183:2165-2174.
- 9 Thomsen, A. R., Johansen, J., Marker, O., and Christensen, J. P. 1996. Exhaustion of CTL memory and recrudescence of viremia in lymphocytic choriomeningitis virus-infected MHC class II-deficient mice and B cell-deficient mice. *J. Immunol.* 157:3074-80.

- 10 Ahmed, R., Butler, L. D., and Bhatti, L. 1988. T4+ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody responses. *J. Virol.* 62:2102-6.
- 11 Rahemtulla, A., Fung-Leung, W. P., Schilham, M. W., Kundig, T. M., Sambhara, S. R., Narendran, A., Arabian, A., Wakeham, A., Paige, C. J., and Zinkernagel, R. M. 1991. Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 353:180-4.
- 12 Battegay, M., Bachmann, M. F., Burhkart, C., Viville, S., Benoist, C., Mathis, D., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. 1996. Antiviral immune responses of mice lacking MHC class II or its associated invariant chain. *Cell. Immunol.* 167:115-21.
- 13 Battegay, M., Moskophidis, D., Rahemtulla, A., Hengartner, H., Mak, T. W., and Zinkernagel, R. M. 1994. Enhanced establishment of a virus carrier state in adult CD4+ T-cell-deficient mice. *J. Virol.* 68:4700-4.
- 14 Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H., and Zinkernagel, R. M. 1993. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 362:758-61.
- 15 Gallimore, A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A. C., Pluckthun, A., Elliott, T., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. 1998. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J. Exp. Med.* 187:1383-93.
- 16 von Herrath, M. G., Yokoyama, M., Dockter, J., Oldstone, M. B., and Whitton, J. L. 1996. CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. *J. Virol.* 70:1072-9.

- 17 Pircher, H., Burki, K., Lang, R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. 1989. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 342:559-61.
- 18 Pircher, H., Mak, T. W., Lang, R., Ballhausen, W., Ruedi, E., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M., and Burki, K. 1989. T cell tolerance to Mlsa encoded antigens in T cell receptor V beta 8.1 chain transgenic mice. *EMBO J.* 8:719-27.
- 19 Pircher, H., Moskophidis, D., Rohrer, U., Burki, K., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. 1990. Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants in vivo. *Nature* 346:629-33.
- 20 Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.-P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., and Alt, F. W. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855-867.
- 21 Okuno, Y., Fukunaga, T., Tadano, M., Okamoto, Y., Ohnishi, T., and Takagi, M. 1985. Rapid focus reduction neutralization test of Japanese encephalitis virus in microtiter system. Brief report. *Arch. Virol.* 86:129-35.
- 22 Battegay, M., Cooper, S., Althage, A., Banziger, J., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. 1991. Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates [published errata appears in *J Virol Methods* 1991 Nov;35(1):115 and 1992 Aug;38(2):263]. *J. Virol. Methods* 33:191-8.
- 23 Sourdive, D. J. D., Murali-Krishna, K., Altmann, J. D., Zajac, A. J., Whitmire, J. K., Pannetier, C., Kourilsky, P., Evavold, B., Sette, A., and Ahmed, R. 1998. Conserved T cell receptor repertoire in primary and memory CD8 T cell responses to an acute viral infection. *J. Exp. Med.* 188:71-82.

- 24 Fayolle, C., Sebo, P., Ladant, D., Ullmann, A., and Leclerc, C. 1996. In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying viral CD8+ T cell epitopes. *J. Immunol.* 156:4697-706.
- 25 Park, J. Y., Peters, C. J., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., Gray, B., Waites, K. B., and Stephensen, C. B. 1997. Development of a reverse transcription-polymerase chain reaction assay for diagnosis of lymphocyte choriomeningitis virus infection and its use in a prospective surveillance study. *J. Med. Virol.* 51:107-114.
- 26 Doherty, P. C., Allan, J. E., Lynch, F., and Ceredig, R. 1990. Dissection of an inflammatory process induced by CD8+ T cells. *Immunol. Today* 11:55-9.
- 27 Cole, G. A., Nathanson, N., and Prendergast, R. A. 1972. Requirement for theta-bearing cells in lymphocytic choriomeningitis virus-induced central nervous system disease. *Nature* 238:335-7.
- 28 Ciurea, A., Klenerman, P., Hunziker, L., Horvath, E., Senn, B. M., Ochsenbein, A. F., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. 2000. Viral persistence in vivo through selection of neutralizing antibody- escape variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2749-54.
- 29 Puglielli, M. T., Zajac, A. J., van der Most, R. G., Dzuris, J. L., Sette, A., Altman, J. D., and Ahmed, R. 2001. In vivo selection of a lymphocytic choriomeningitis virus variant that affects recognition of the GP33-43 epitope by H-2Db but not H-2Kb. *J Virol* 75:5099-107.
- 30 Murali-Krishna, K., Altman, J. D., Suresh, M., Sourdive, D. J., Zajac, A. J., Miller, J. D., Slansky, J., and Ahmed, R. 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8:177-87.

- 31 Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. J. D., Suresh, M., Altman, J. D., and Ahmed, R. 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 188:2205-2213.
- 32 Tissot, A. C., Ciatto, C., Mittl, P. R., Grutter, M. G., and Pluckthun, A. 2000. Viral escape at the molecular level explained by quantitative T-cell receptor/peptide/MHC interactions and the crystal structure of a peptide/MHC complex. *J Mol Biol* 302:873-85.
- 33 Muller, S., Hunziker, L.,ENZLER, S., Buhler-Jungo, M., Di Santo, J. P., Zinkernagel, R. M., and Mueller, C. 2002. Role of an intact splenic microarchitecture in early lymphocytic choriomeningitis virus production. *J Virol* 76:2375-83.
- 34 Hunziker, L., Klenerman, P., Zinkernagel, R. M., and Ehl, S. 2002. Exhaustion of cytotoxic T cells during adoptive immunotherapy of virus carrier mice can be prevented by B cells or CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 32:374-82.
- 35 Moskophidis, D., Laine, E., and Zinkernagel, R. M. 1993. Peripheral clonal deletion of antiviral memory CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 23:3306-11.
- 36 Mirshahidi, S., Huang, C. T., and Sadegh-Nasseri, S. 2001. Anergy in peripheral memory CD4(+) T cells induced by low avidity engagement of T cell receptor. *J Exp Med* 194:719-31.
- 37 Tanchot, C., Lemonnier, F. A., Pérarnau, B., Freitas, A. A., and Rocha, B. 1997. Differential requirement for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276:2057-2062.
- 38 Tanchot, C., Guillaume, S., Delon, J., Bourgeois, C., Franzke, A., Sarukhan, A., Trautmann, A., and Rocha, B. 1998. Modifications of CD8+ T cell function during in vivo memory or tolerance induction. *Immunity* 8:581-90.

- 39 Sarukhan, A., Lanoue, A., Franzke, A., Brousse, N., Buer, J., and von Boehmer, H. 1998. Changes in function of antigen-specific lymphocytes correlating with progression towards diabetes in a transgenic model. *Embo J* 17:71-80.
- 40 Lohman, B. L. and Welsh, R. M. 1998. Apoptotic regulation of T cells and absence of immune deficiency in virus-infected gamma interferon receptor knockout mice. *J. Virol.* 72:7815-21.
- 41 Leist, T. P., Eppler, M., and Zinkernagel, R. M. 1989. Enhanced virus replication and inhibition of lymphocytic choriomeningitis virus disease in anti-gamma interferon-treated mice. *J. Virol.* 63:2813-9.
- 42 Moskophidis, D., Bategay, M., Bruendler, M. A., Laine, E., Gresser, I., and Zinkernagel, R. M. 1994. Resistance of lymphocytic choriomeningitis virus to alpha/beta interferon and to gamma interferon. *J. Virol.* 68:1951-5.
- 43 Guidotti, L. G. and Chisari, F. V. 2001. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 19:65-91.
- 44 Rehmann, B., Lau, D., Hoofnagle, J. H., and Chisari, F. V. 1996. Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* 97:1655-65.
- 45 Appay, V., Nixon, D. F., Donahoe, S. M., Gillespie, G. M., Dong, T., King, A., Ogg, G. S., Spiegel, H. M., Conlon, C., Spina, C. A., Havlir, D. V., Richman, D. D., Waters, A., Easterbrook, P., McMichael, A. J., and Rowland-Jones, S. L. 2000. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J. Exp. Med.* 192:63-75.

Figure legends

Figure 1: Spleen T cells from P14 and MoP14 mice. FACS profiles show the proportion of V α 2⁺ CD8⁺ cells among spleen cells from representative P14 (left panel) and MoP14 (right panel) mice. All of these cells are V β 8.1⁺. The percentage of V α 2⁺ CD8⁺ T cells is indicated in each dot plot.

Figure 2: Delayed type hypersensitivity after intra footpad LCMV infection of P14 and MoP14 mice. P14 (open squares) and MoP14 (open diamonds) mice were infected i.f.p. with LCMV-WE at day 0 (first arrow, 4000 IF) and received a secondary i.f.p. injection at day 35 (second arrow, 40 IF). Results show the daily mean footpad swelling (in 1/100 mm, + SD) measured on 25 mice (day 0 to 35) or 11 to 14 mice (day 35 to 40) pooled from 3 independent experiments.

Figure 3: T cell phenotype in LCMV-infected MoP14 mice. The expression of activation markers on the surface of CD8⁺ TCR Tg spleen T cells was analyzed 1 month after infection (day 35) or 45 days after the secondary infection (day 80). Histograms show CD44, CD62L and CD69 surface expression by gated T cells from infected MoP14 mice (full line), as compared with naive MoP14 cells (dotted line). The proportion of CD44⁺, CD62L^{low} and CD69⁺ are indicated in each plot. The percentages obtained in naive controls are 5%, 22% and 7% respectively.

Figure 4: Effect of variant peptide on T cell activation. (A) The expression of the early activation marker CD69 (left histograms) and TCR β (right histograms) by MoP14 T cells is shown after 24 hours of *in vitro* stimulation using the wild-type (WT, KAVYNFATM) or one of the variant peptides (2,5 μ g/ml). The CD69 expression in the CD69⁺ population is the following (MFI): WT (517); V35 \rightarrow A (520); A34 \rightarrow T (169); V35 \rightarrow L (426); Y36 \rightarrow F (95). The MFI of TCR β expression is indicated in the histograms (B) Naive MoP14 T cells proliferation induced by WT and variant peptides. Results

show the thymidine incorporation (mean of triplicate + SD) measured at the peak of response at each day of culture (day 1 to 4 after the onset of the culture).

Figure 5: Functional capacities of T cells from chronically infected MoP14 mice. (A) The presence of CTLs was assessed among spleen cells harvested from non-infected or infected P14 (upper graphs) and MoP14 (bottom graphs) mice. Direct CTL activity *ex vivo* was tested in naive animals (D0) and at day 4, day 35 and day 80 after infection. Results show the percentage of specific lysis (\pm SD) obtained with gp33-41 coated MC57 target cells. (B) CTL precursors were detected among spleen cells using similar assays after 4 days of *in vitro* cultures. Graphs show the results obtained at day 35 and day 80. (C) Left hand panels: Peptide induced proliferation of P14 (top) and MoP14 (bottom) T cells. MoP14 spleen cells harvested from naïve (squares) or at day 35 (diamonds) or 80 (circles) after infection were stimulated *in vitro* with LCMV gp33-41 peptide. Results show the proliferation index (mean of triplicate + SD) measured at day 3 after the onset of the culture. The proliferation index was calculated as follows: cpm measured in presence of the peptide/background cpm in absence of the peptide. Proliferation background was higher in the P14 cultures because of the presence of CD4⁺ T and B cells. Right hand panels: anti-CD3 stimulation of P14 (top) and MoP14 (bottom) T cells studied in naïve cells (squares) and 80 days after infection (circles). (D) IFN- γ secretion after *in vitro* stimulation. P14 (black bars) and MoP14 (white bars) spleen cells harvested from naive or LCMV-infected animals were stimulated *in vitro* with LCMV gp33-41 peptide. IFN- γ secretion was determined using an ELISPOT assay. Results show the percentages of IFN- γ producing cells among CD8⁺Tg⁺ spleen T cells.

Table 1. Immunopathology induction after LCMV-WE infection in MoP14 mice

Inoculated mice	Cell transfer	Inoculation route ¹⁾	Mean survival time ²⁾	Numbers of animals
MoP14	-	i.c.	5.2 days	5
MoP14	-	i.f.p.	∞	25
MoP14	-	i.f.p./i.c. (at day 80)	∞	6
Rag2 ^{-/-}	10 ⁵ CD8 ⁺ P14 ⁺ 3)	i.v.	7days	5

1) i.c. intracerebral; i.f.p. intrafootpad; i.v. intravenous.

2) mice were observed twice per day after infection for clinical signs of meningitis, and death was noted when it occurred.

3) CD8⁺ anti-LCMV T cells were sorted from MoP14 mice and injected into Rag2^{-/-} recipients together with the virus.

Table 2. T cell numbers in MoP14 mice after LCMV-WE infection

Organs	Non-infected mice ^{1,2)} (x10 ⁶ cells)	Day +30 (x10 ⁶ cells) ²⁾	Day +80 (x10 ⁶ cells) ²⁾
Thymus	78.4 ±19.4	40.2 ±14.7	43.2 ±18.1
Bone marrow	0.81 ±0.03	0.66 ±0.14	1.1 ±0.4
Spleen	8.3 ±0.7	1.9 ±0.9	3.0 ±1.8
Lymph nodes	4.4 ±0.9	0.39 ±0.33	2.6 ±1.6

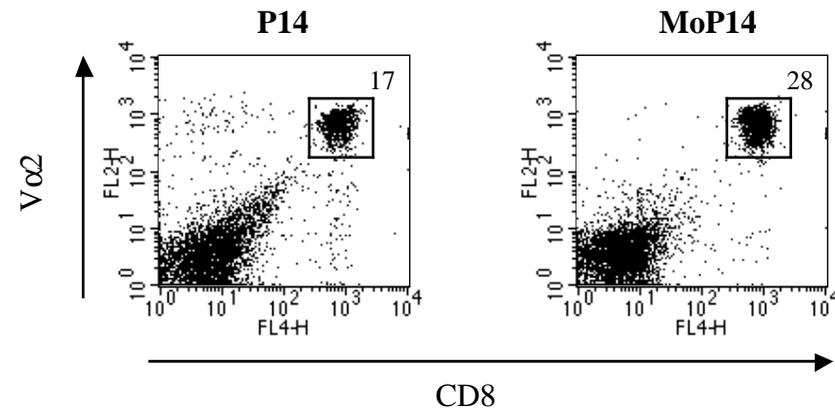
1) Control mice are matched for age and are kept in the same conditions than infected mice from the experimental group. Cell counts from control mice are equivalent at day 30 or day 80.

2) Results indicate the absolute number of CD8⁺ P14 TCR⁺ T cells per organ (mean of 3 mice ± SD).

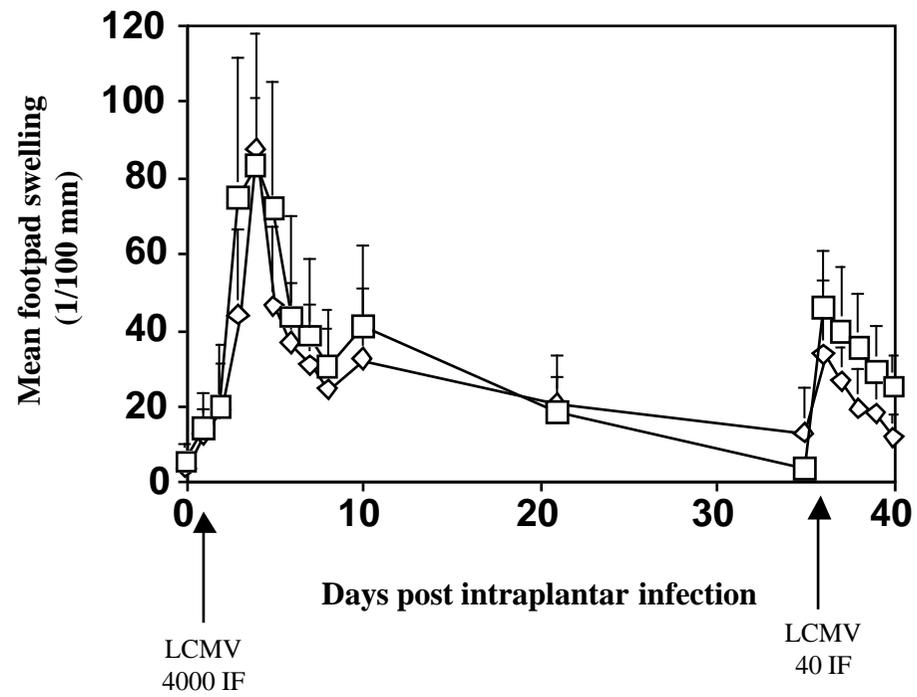
Table 3. Virus variants found in infected MoP14 mice¹⁾

Mouse	Virus variants	Frequency	Amino acid position								
			33	34	35	36	37	38	39	40	41
	WT		K	A	V	Y	N	F	A	T	C
#1	A34→T	26/32	K	T	V	Y	N	F	A	T	C
	V35→A	4/32	K	A	A	Y	N	F	A	T	C
	T40→N	2/32	K	A	V	Y	N	F	A	N	C
#2	Y36→C	15/32	K	A	V	C	N	F	A	T	C
	Y36→F	7/32	K	A	V	F	N	F	A	T	C
	V35→L	6/32	K	A	L	Y	N	F	A	T	C
	V35→A	2/32	K	A	A	Y	N	F	A	T	C
	V35→C	2/32	K	A	C	Y	N	F	A	T	C
#3	A34→T	13/32	K	T	V	Y	N	F	A	T	C
	V35→L	10/32	K	A	L	Y	N	F	A	T	C
	V35→A	6/32	K	A	A	Y	N	F	A	T	C
	Y36→F	2/32	K	A	V	F	N	F	A	T	C
	N37→S	1/32	K	A	V	Y	S	F	A	T	C
#1+2+3		TOTAL:	-	41%	31%	25%	1%	-	-	2%	-

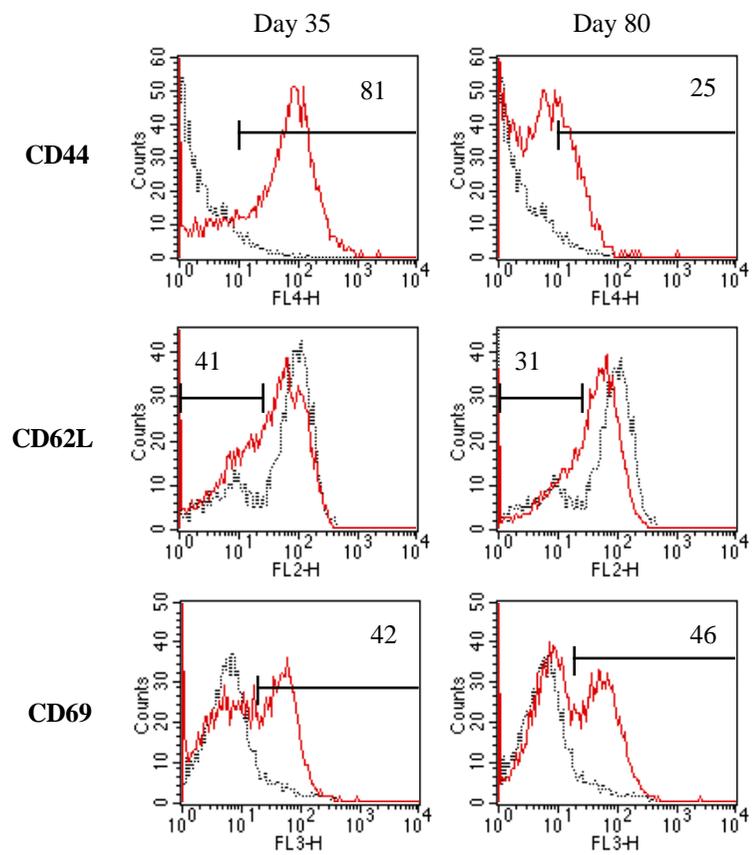
1) Results show the amino-acid sequence and frequency of the GP33-41 epitopes found at day 80 in the kidneys of three individual MoP14 infected mice. The last line of the table gives the total percentage of mutation at a given position inside the GP.



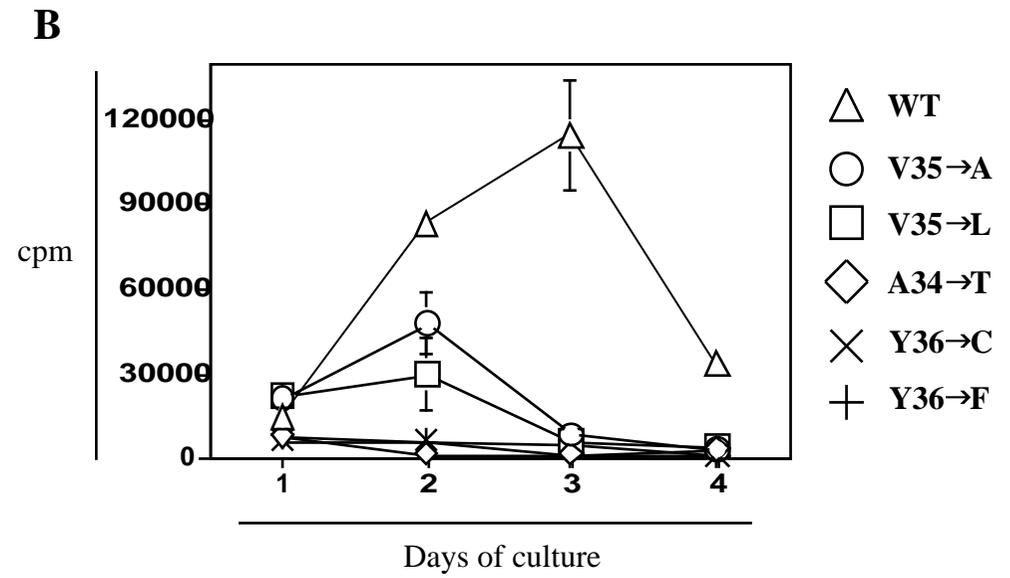
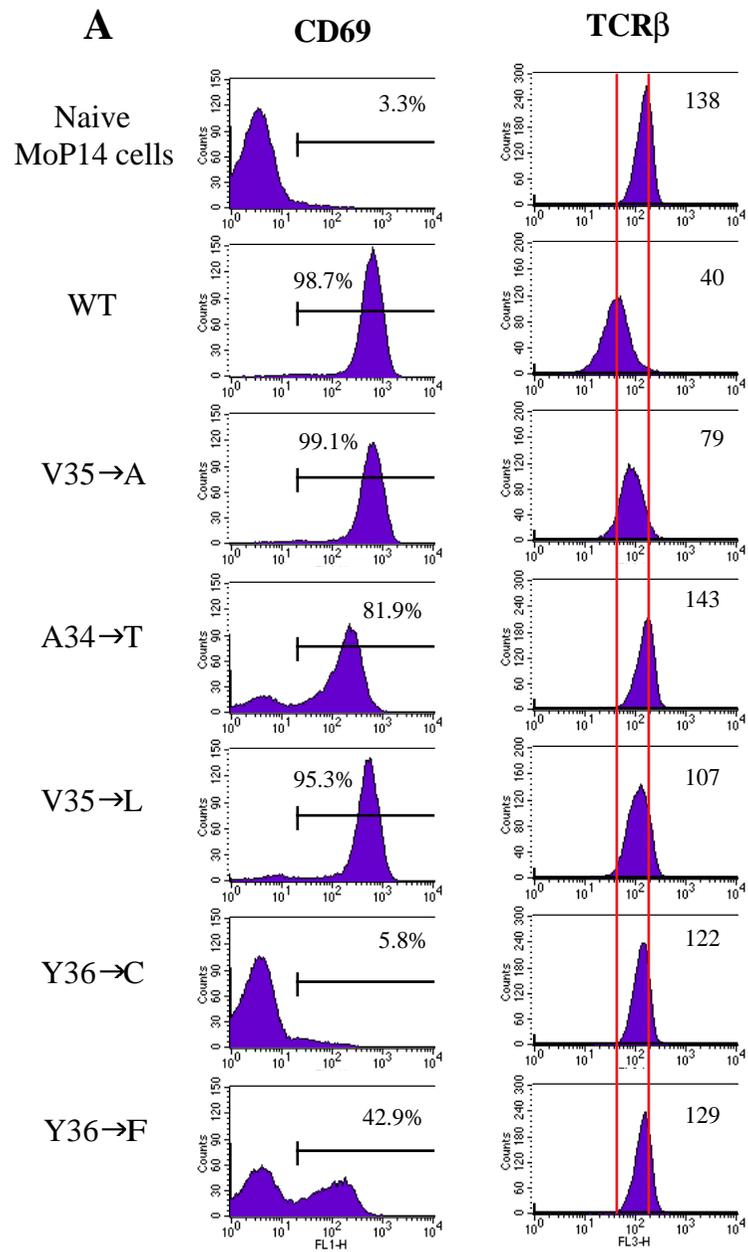
Legrand & al. - "Co-adaptation of virus and virus-specific CD8⁺ T cell through viral mutations and partial agonist maintained energy"
Figure 1.



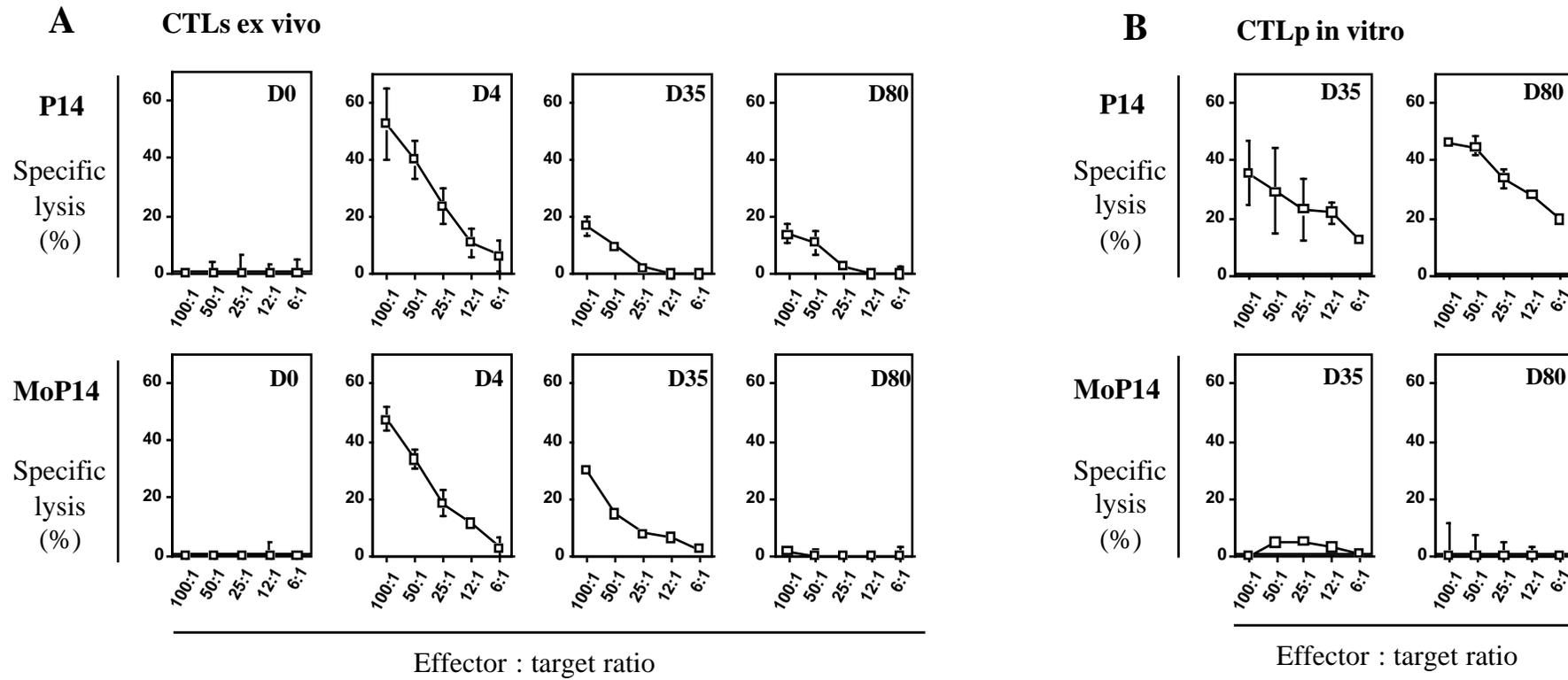
Legrand & al. - "Co-adaptation of virus and virus-specific CD8+ T cell through viral mutations and partial agonist maintained anergy"
Figure 2.



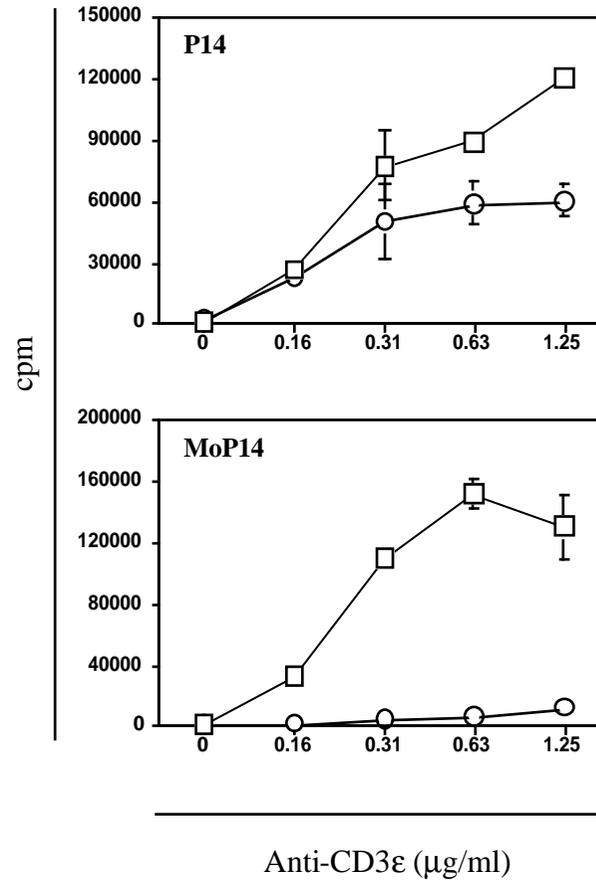
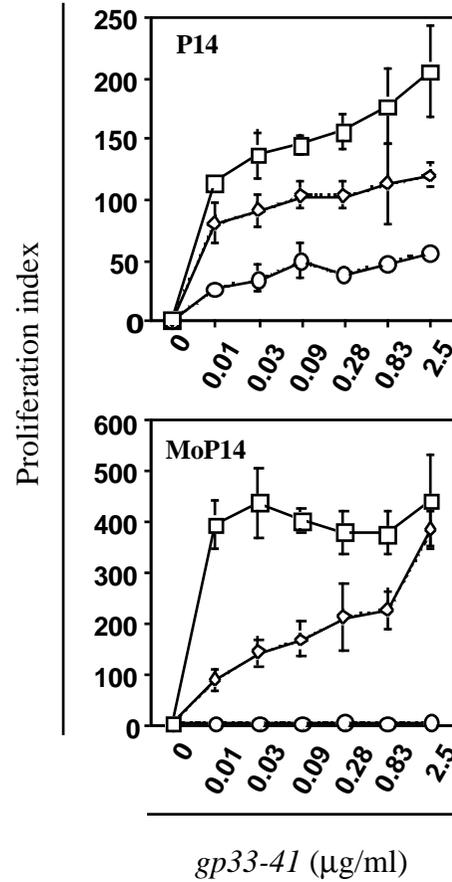
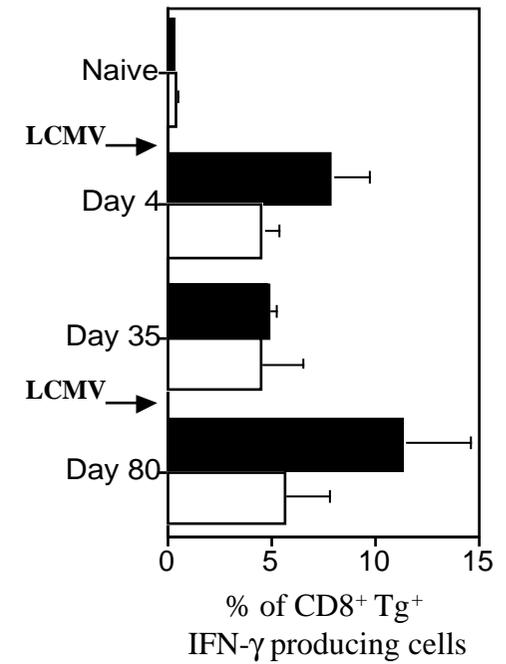
Legrand & al. - "Co-adaptation of virus and virus-specific CD8+ T cell through viral mutations and partial agonist maintained anergy"
Figure 3.



Legrand & al. - "Co-adaptation of virus and virus-specific CD8⁺ T cell through viral mutations and partial agonist maintained energy"
Figure 4.



Legrand & al. - "Co-adaptation of virus and virus-specific CD8+ T cell through viral mutations and partial agonist maintained energy"
Figure 5A/B.

C**D**

Legrand & al. - "Co-adaptation of virus and virus-specific CD8⁺ T cell through viral mutations and partial agonist maintained energy"
Figure 5C/D.

Résultats supplémentaires

V. INFLUENCE DES MOLÉCULES DE CLASSE I DU CMH SUR LA SURVIE ET L'EXPANSION DES CELLULES T CD8⁺ (RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES)

A. Modèles expérimentaux

Les molécules de classe I du CMH constituent une ressource essentielle au maintien des populations T $\alpha\beta$ CD8⁺ naïves. Plus précisément, la présence de l'élément de restriction, c'est-à-dire de la molécule du CMH-I impliquée lors de la sélection positive dans le thymus, est nécessaire pour la survie à la périphérie (Freitas and Rocha, 2000). Le cas des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ mémoires est plus discuté, et dépend grandement du système utilisé (Murali-Krishna et al., 1999; Tanchot et al., 1997a). Un certain nombre d'expériences menées sur ce sujet consistent à transférer des populations de cellules T, naïves ou mémoires, dans des receveurs allogéniques irradiés sub-létalement. L'irradiation est nécessaire pour éliminer les cellules T du receveur (CMH classe I), qui induisent le rejet des cellules T transférées (CMH classe I⁺) par. Mais l'irradiation est potentiellement problématique car elle induit une fonte des organes lymphoïdes et la production de facteurs en réponse au stress cellulaire. En conséquence de la fonte des organes, la probabilité d'une présentation croisée de complexes pAg-CMH entre les cellules T transférées est potentiellement élevée. Il pourrait donc exister un biais sur la cinétique de survie des populations injectées.

Pour répondre à ces questions, nous avons cherché à développer une gamme de souris receveuses, déficientes en cellules T et en molécules du CMH-I. Ainsi, nous avons croisé la lignée CD3 ϵ ^{-/-} (Malissen et al., 1995) avec les lignées H-2D^{b/-} ou H-2K^{b/-} (Pascolo et al., 1997; Perarnau et al., 1999), et nous avons établi deux lignées CD3 ϵ ^{-/-} x H-2D^{b/-} et CD3 ϵ ^{-/-} x H-2K^{b/-}. Afin d'appréhender le plus de situations possibles, nous avons utilisés 5 types de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ à transférer. Le premier groupe de cellules T est restreint à la molécule de classe I du CMH H-2D^b, et est issu des animaux transgéniques suivants : 1) les souris MoaHY, spécifiques pour l'antigène mâle H-Y (Kisielow et al., 1988) ; 2) les souris MoP14, spécifiques pour un antigène du LCMV (Pircher et al., 1989) ; 3) et les souris DTg (MoP14 x MoaHY) décrites précédemment. Parallèlement, nous avons utilisé les souris MoOT-1, transgéniques pour un TCR reconnaissant un peptide de l'ovalbumine présentée dans le contexte de H-2K^b (Hogquist et al., 1994). Ces quatre lignées sont déficientes pour l'expression de l'enzyme RAG-2, ce qui limite le répertoire au TCR transgénique, et les ganglions lymphatiques de ces animaux représentent une source concentrée ($\geq 90\%$) de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺. Enfin, nous avons également utilisé comme donneurs des animaux

C57Bl/6 à partir desquels nous avons isolé des populations polyclonales de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺.

B. Résultats des transferts

Les cellules aHY, P14 et DTg ont été transférées dans des receveurs soit intacts pour l'expression des molécules du CMH-I (CD3 ϵ ^{-/-}), soit déficientes pour l'une des deux molécules H-2D^b ou H-2K^b (CD3 ϵ ^{-/-} x H-2D^{b/-} ou CD3 ϵ ^{-/-} x H-2K^{b/-}). Le nombre de cellules T transférées est de l'ordre de 0.5.10⁶ à 1.10⁶ cellules suivant l'expérience. A chaque point de la cinétique, 3 animaux de chaque groupe sont sacrifiés, les organes lymphoïdes (rate, ganglions mésentériques et inguinaux) sont prélevés et analysés par cytométrie de flux pour la présence des cellules T transférées.

Dans notre système, l'absence de l'élément de restriction H-2D^b provoque une disparition extrêmement rapide des cellules T CD8⁺, puisque les populations injectées passent sous le seuil de détection par cytométrie de flux en moins de 2 jours. Le transfert dans les souris CD3 ϵ ^{-/-} montre un maintien (aHY, DTg), voire une expansion (P14) des cellules T (**Figure 11**). Il a déjà été montré que les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ aHY ne subissent quasiment pas de prolifération homéostatique après transfert dans un receveur femelle déficient pour le compartiment des cellules T (Ernst et al., 1999; Rocha and von Boehmer, 1991). Le cas des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ P14 est différent, car ces cellules atteignent un plateau à environ 4.10⁶ cellules, un mois après le transfert. Cela est dû à une prolifération rapide après le transfert, comme le montre le profil de marquage au CFSE : 3 jours après le transfert, plus de la moitié des cellules ont effectuées au minimum 3 divisions (**Figure 12**). Durant la cinétique, les cellules P14 diminuent l'expression de leur TCR et expriment progressivement de forts niveaux de CD44, à l'image de cellules activées. Les transferts dans les receveurs CD3 ϵ ^{-/-} x H-2K^{b/-} donnent des résultats très hétérogènes (**Figure 11**) : les cellules aHY se maintiennent, les cellules DTg disparaissent graduellement en une semaine et les cellules P14 prolifèrent puis chutent rapidement 7 jours après le transfert pour se maintenir à peine au-dessus du seuil de détection. La phase précoce de prolifération des cellules P14 est similaire à celle observée après transfert dans les receveurs CD3 ϵ ^{-/-} (**Figure 12**).

Puis, des transferts ont été effectués avec les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ OT-1, restreintes par H-2K^b. Ces cellules montrent une forte capacité à s'engager dans la prolifération homéostatique, que ce soit dans les receveurs CD3 ϵ ^{-/-} ou dans les receveurs CD3 ϵ ^{-/-} x H-2D^{b/-} (**Figure 13**). Le plateau atteint est de l'ordre de 8.10⁶ cellules. De manière inattendue, les cellules OT-1 ne

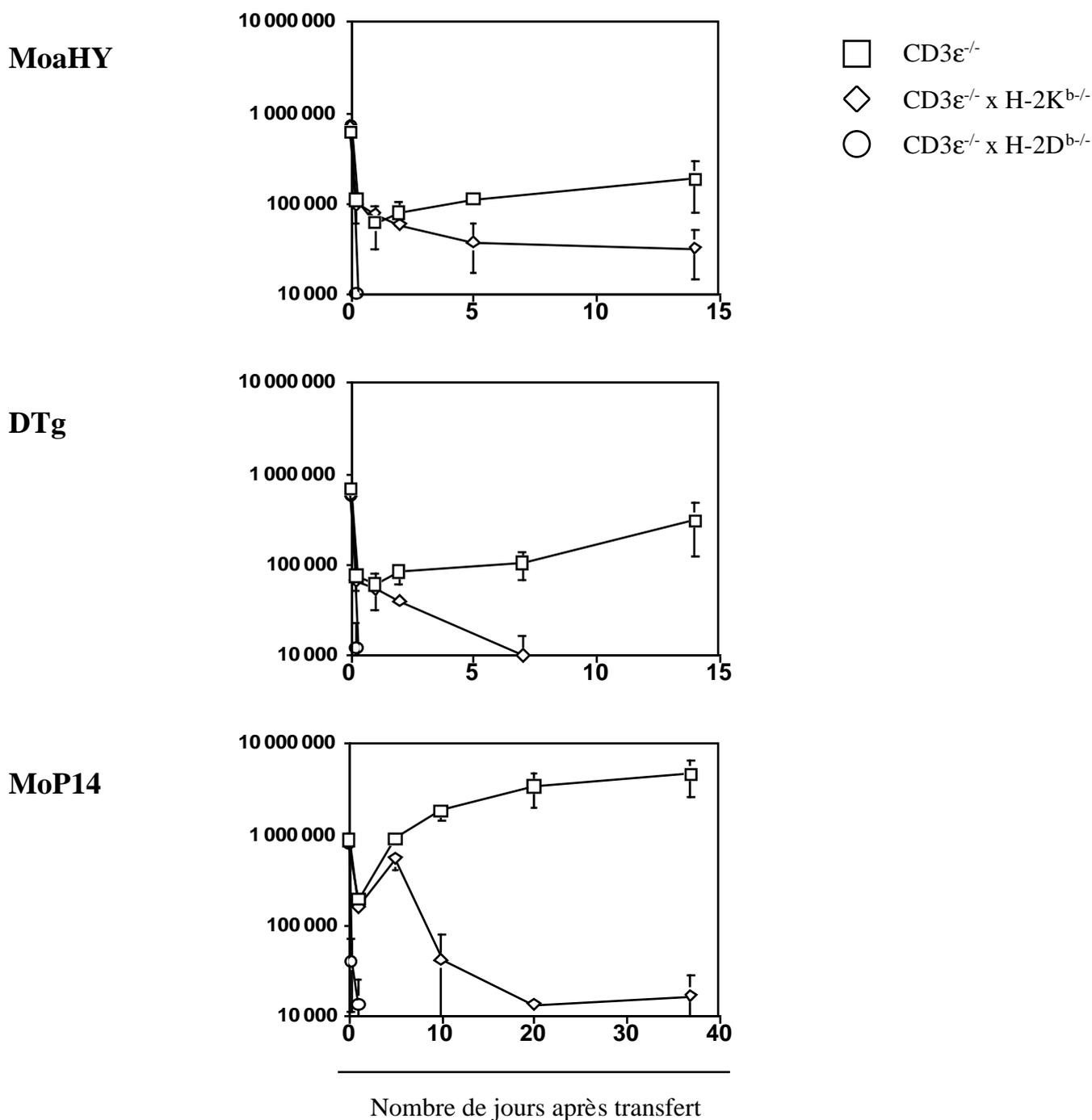


Figure 11: Cinétique après transfert de cellules $T \alpha\beta CD8^+$ restreintes par $H-2D^b$
 Les ganglions lymphatiques des souris monoclonales MoaHY, MoP14 ou double-transgéniques DTg (MoaHY x MoP14) ont été isolés et mis en suspension, puis ont été injectés dans des receveurs dépourvus de cellules T et déficients ou non pour l'expression d'une molécule de classe I du CMH. Les populations injectées sont constituées à 90% ou plus de cellules $T CD8^+$. Les résultats donnent le nombre total de cellules $T \alpha\beta CD8^+$ (rate + 2xganglions) trouvées dans chaque receveur (3 animaux par point, \pm écart-type). Chaque expérience a été effectuée au moins 2 fois, avec des résultats similaires.

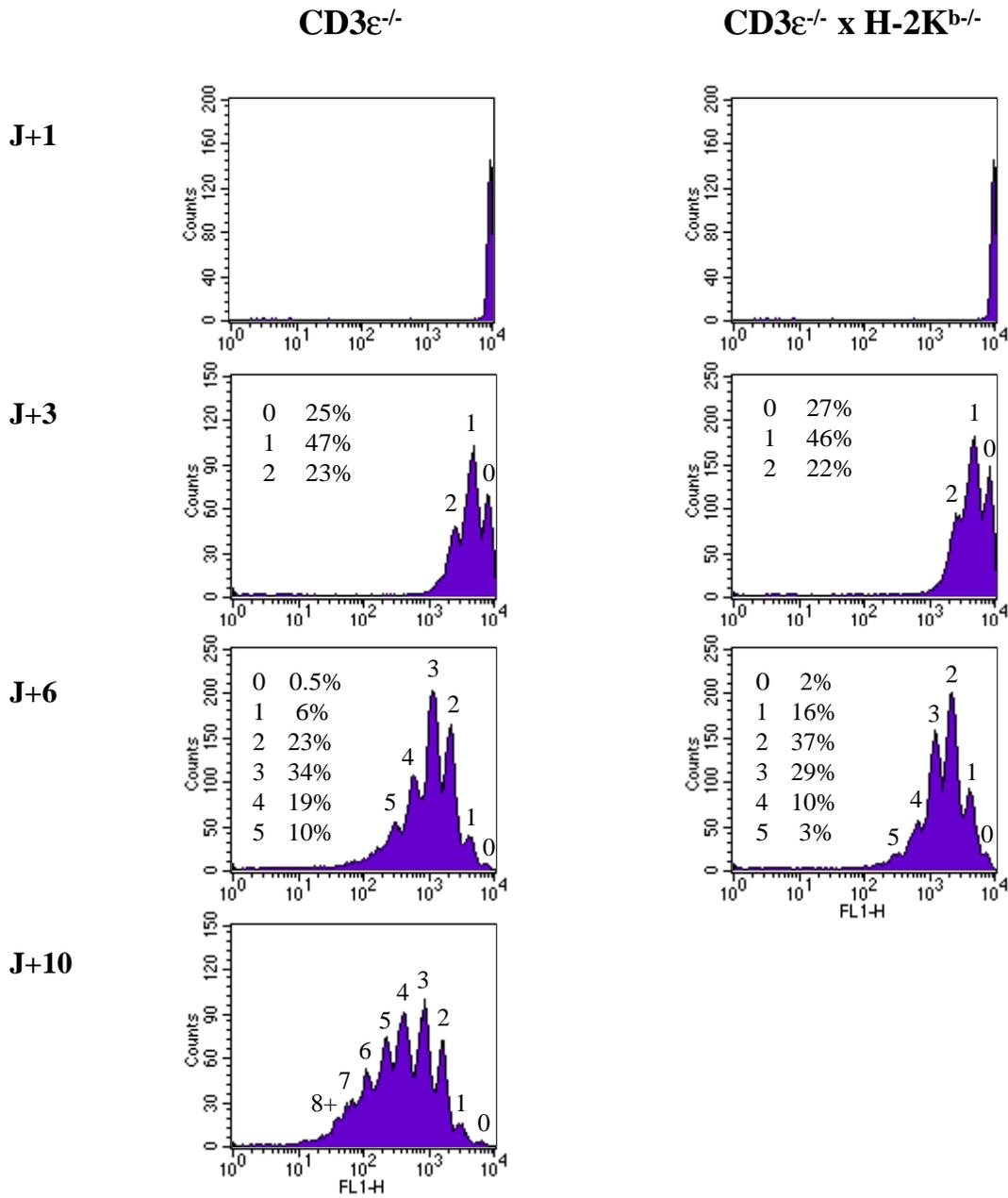


Figure 12: Cinétique de division des cellules $T \alpha\beta CD8^+ P14^+$

Les ganglions lymphatiques des souris monoclonales P14 ont été isolés et mis en suspension. Les cellules ont été marquées avec du CFSE puis ont été injectés dans des receveurs dépourvus de cellules T et déficients ou non pour l'expression de H-2K b . La cinétique de division est suivie par la dilution du CFSE à chaque division cellulaire et le nombre de division effectué par les cellules $T CD8^+ P14^+$ est indiqué au-dessus de chaque population. Le peu de cellules récupérées dans les receveurs $CD3\epsilon^{-/-}$ x H-2K $^{b-/-}$ ne permet pas d'obtenir un profil au jour 10 de la cinétique. Chaque expérience a été répétée au moins deux fois, avec des résultats similaires.

MoOT-1

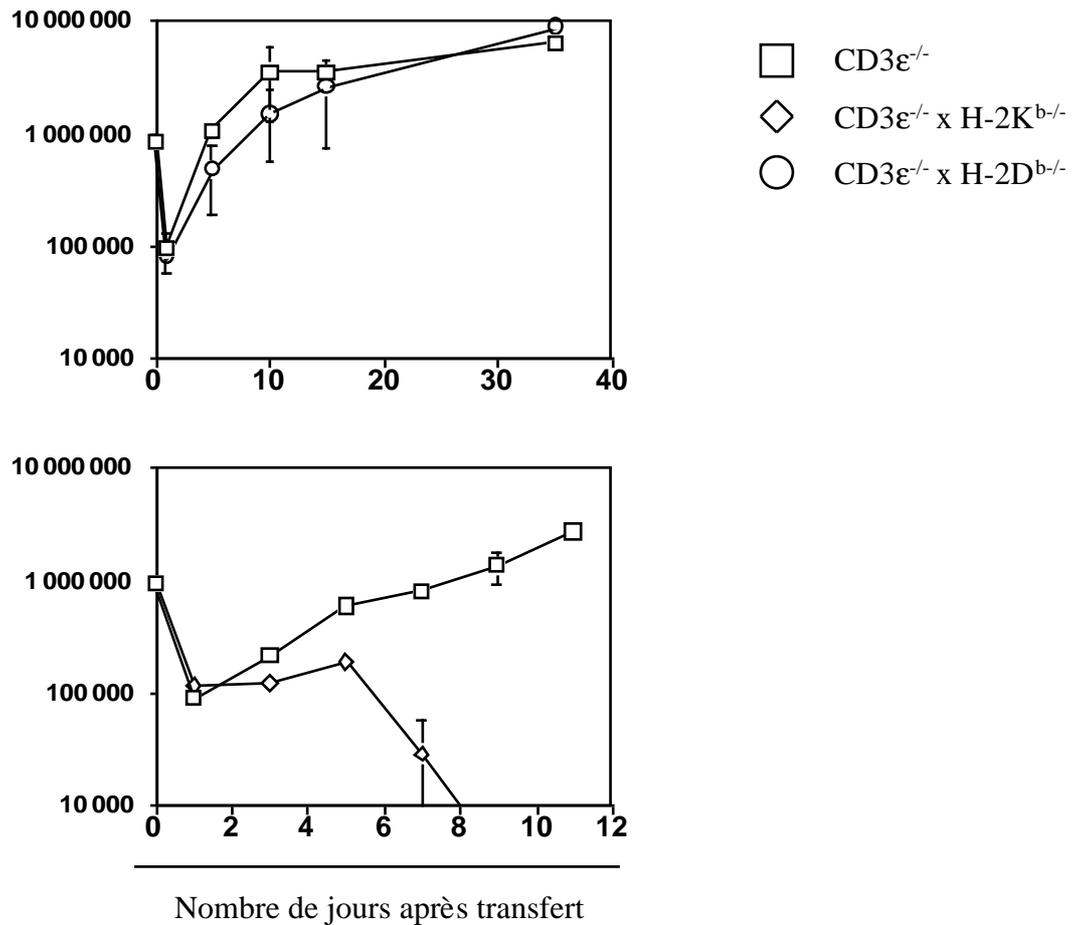


Figure 13: Cinétique après transfert de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ restreintes par H-2K^b

Les ganglions lymphatiques des souris monoclonales MoOT-1 ont été isolés et mis en suspension, puis ont été injectés dans des receveurs dépourvus de cellules T et déficients ou non pour l'expression d'une molécule de classe I du CMH. Les populations injectées sont constituées à 90% ou plus de cellules T CD8⁺. Les résultats donnent le nombre total de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ (rate + 2xganglions) trouvées dans chaque receveur (3 animaux par point, \pm écart-type). Chaque expérience a été effectuée au moins 2 fois, avec des résultats similaires.

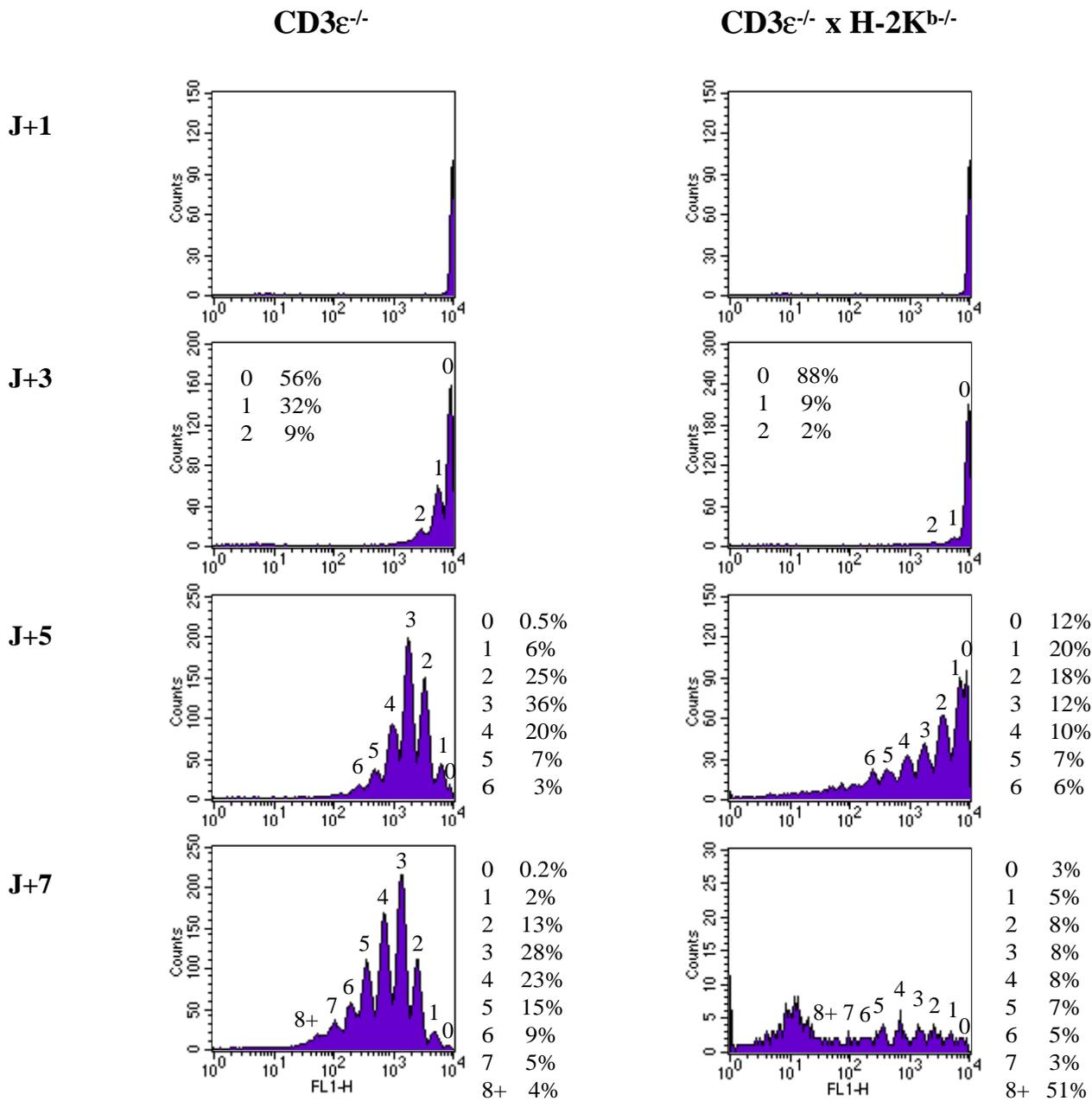


Figure 14: Cinétique de division des cellules T $\alpha\beta$ CD8 $^{+}$ OT-1 $^{+}$

Les ganglions lymphatiques des souris monoclonales MoOT-1 ont été isolés et mis en suspension. Les cellules ont été marquées avec du CFSE puis injectées dans des receveurs dépourvus de cellules T et déficients ou non pour l'expression de H-2K b . La cinétique de division est suivie par la dilution du CFSE à chaque division cellulaire et le nombre de divisions effectuées par les cellules T CD8 $^{+}$ OT-1 $^{+}$ est indiqué au-dessus de chaque population. Chaque expérience a été répétée au moins deux fois, avec des résultats similaires.

disparaissent pas rapidement en l'absence de l'élément de restriction H-2K^b, ce qui pourrait refléter son haut niveau de réactivité croisée. Le déclin des cellules OT-1 a lieu environ 5 jours après le transfert, après une phase de maintien apparent (**Figure 13**). Le profil de marquage au CFSE montre que les cellules OT-1 se divisent plus rapidement que les cellules P14 après transfert dans les receveurs CD3 $\epsilon^{-/-}$ (**Figure 14**). Comme dans le cas des cellules P14, la distribution suivant le nombre de divisions effectuées est de type gaussien. De manière intéressante, les cellules OT-1 se divisent également en absence de leur élément de restriction H-2K^b, et avec un profil de division beaucoup plus désordonné. Les rares cellules récupérées au jour 7 de la cinétique se sont divisées 8 fois ou plus dans la moitié des cas (**Figure 14**).

Enfin, ces expériences ont été répétées avec des populations polyclonales de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ afin de contrôler l'absence de rejet des cellules T transférées dans les différents receveurs. Ainsi, ces populations prolifèrent fortement après transfert dans les receveurs CD3 $\epsilon^{-/-}$ et CD3 $\epsilon^{-/-}$ x H-2D^{b/-}, ce qui confirme l'absence de rejet observé avec les cellules OT-1 dans les receveurs CD3 $\epsilon^{-/-}$ x H-2D^{b/-}. De manière plus inattendue, les populations polyclonales T $\alpha\beta$ CD8⁺ ne parviennent pas à s'établir dans les receveurs CD3 $\epsilon^{-/-}$ x H-2K^{b/-} et montrent une cinétique similaire à celle des cellules OT-1 (**Figure 15A**). Des résultats similaires ont été obtenus avec des populations de cellules T $\alpha\beta$ CD4⁺ triées.

C. Résultats des transferts dans les receveurs déplétés en cellules NK

Les données précédentes nous ont poussé à tester l'hypothèse d'un rejet des cellules transférées dans les receveurs CD3 $\epsilon^{-/-}$ x H-2K^{b/-} par les cellules NK de l'hôte, qui sont connues pour tuer préférentiellement les cellules perdant l'expression des molécules du CMH-I (Lanier, 2001). Le rejet pourrait s'expliquer par le niveau d'expression de H-2D^b dans ces receveurs, supérieur en moyenne de 42% au niveau trouvé dans les receveurs CD3 $\epsilon^{-/-}$ (**Figure 15B**). Ainsi, les cellules NK seraient « éduquées » en présence d'un niveau élevé de H-2D^b, et les cellules T transférées seraient éliminées du fait de leur expression inférieure de H-2D^b.

Pour tester cette hypothèse, nous avons traité les receveurs CD3 $\epsilon^{-/-}$ x H-2K^{b/-} avec 200 μ g d'anticorps anti-NK1.1 par voie intrapéritonéale, et ce 2 jours avant le transfert. Ce traitement est supposé éliminer quasiment toutes les cellules NK des animaux receveurs (**Figure 16A**). A ce jour, nous avons effectué le transfert des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ OT-1 et T $\alpha\beta$ CD8⁺ polyclonales (**Figure 16B**). La cinétique des cellules OT-1 est identique, que les receveurs soient traités ou non. Dans le cas des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ polyclonales, on note un

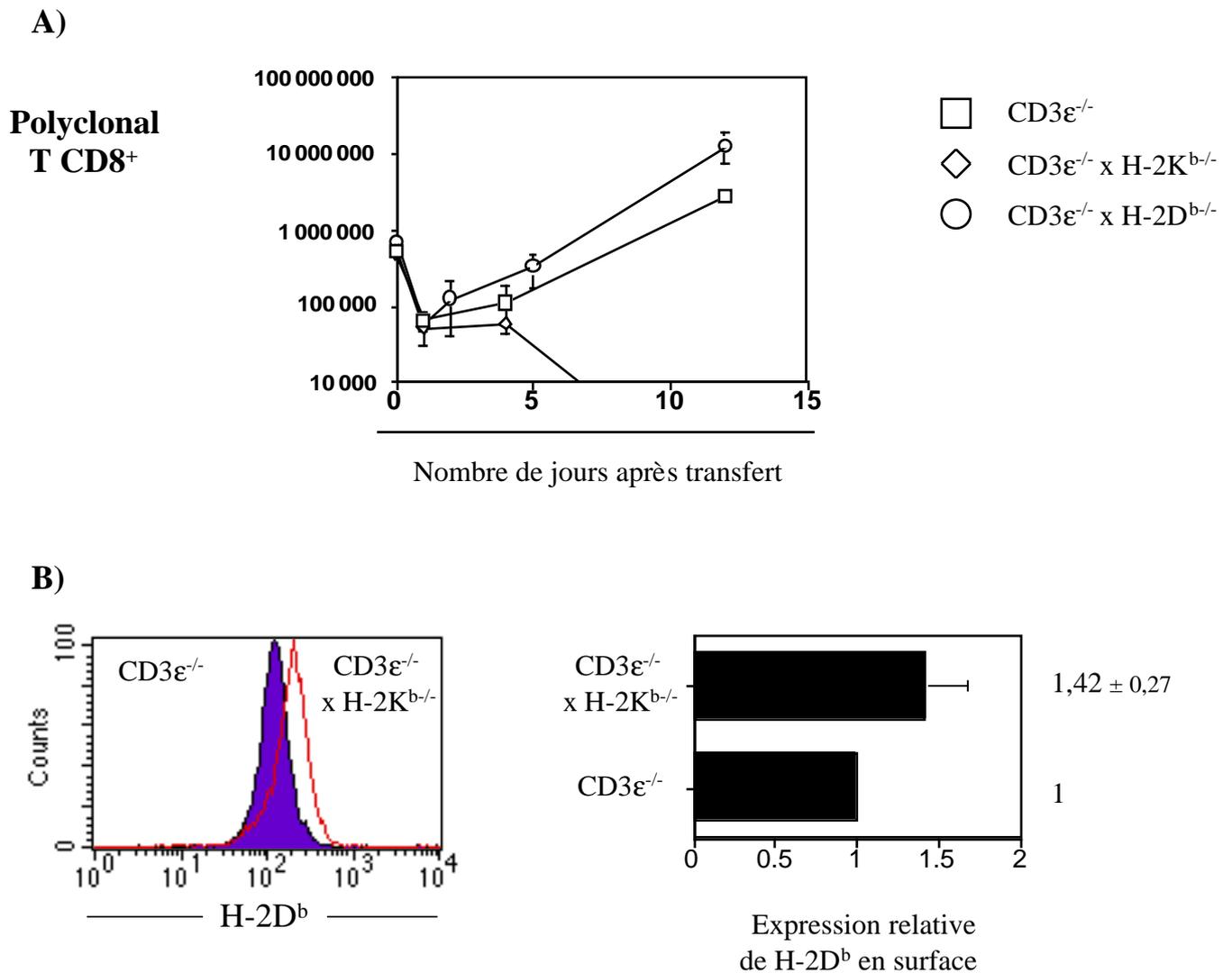
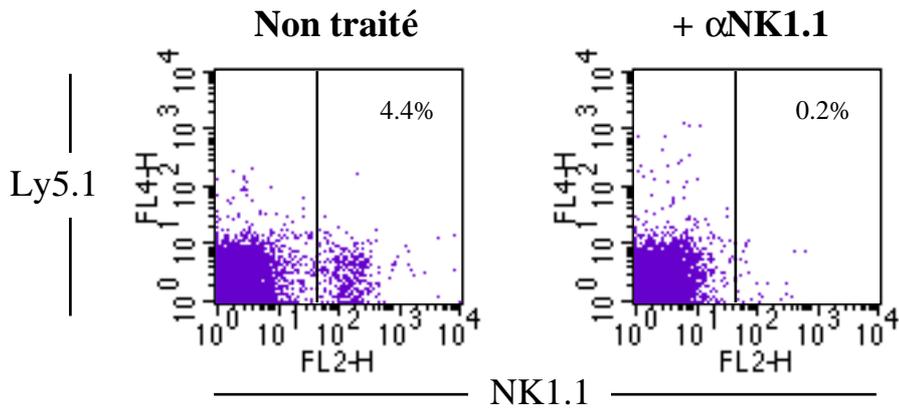


Figure 15: Cinétique après transfert de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ polyclonales

A) Les ganglions lymphatiques des souris C57Bl/6 ont été isolés et mis en suspension. Les cellules T CD4⁺ et B220⁺ ont été déplétées, puis les cellules restantes ont été injectées dans des receveurs dépourvus de cellules T et déficients ou non pour l'expression d'une molécule de classe I du CMH. Les populations injectées sont constituées à 95% ou plus de cellules T CD8⁺. Les résultats donnent le nombre total de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ (rate + 2xganglions) trouvées dans chaque receveur (3 animaux par point, \pm écart-type).

B) Le niveau d'expression de H-2D^b a été analysé à la surface des cellules B des receveurs, après normalisation par rapport au niveau d'expression dans les souris CD3 $\epsilon^{-/-}$ (valeur arbitraire fixée à 1). Le niveau observé est de 42% supérieur dans les animaux CD3 $\epsilon^{-/-}$ x H-2K $^{b-/-}$, comparé à celui trouvé dans les souris CD3 $\epsilon^{-/-}$, et ce dans plusieurs expériences indépendantes. Un exemple de marquage est donné à gauche (histogramme plein: receveur CD3 $\epsilon^{-/-}$; histogramme en ligne rouge: receveur CD3 $\epsilon^{-/-}$ x H-2K $^{b-/-}$).

A)



B)

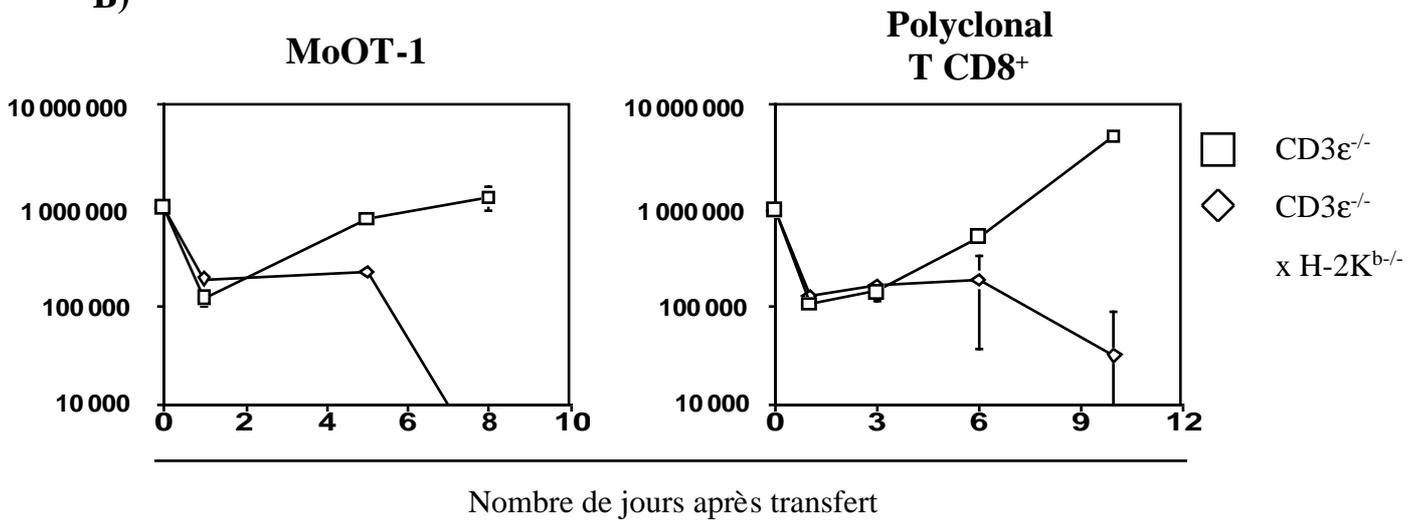


Figure 16: Cinétique après transfert de cellules T $\alpha\beta$ CD8 $^{+}$ polyclonales

A) Profil en cytométrie de flux obtenu avec des cellules spléniques d'animaux traités ou non avec l'anticorps α NK1.1.

B) Les ganglions lymphatiques des souris MoOT-1 ou C57Bl/6 ont été isolés et mis en suspension. Dans le cas des cellules polyclonales, les cellules T CD4 $^{+}$ et B220 $^{+}$ ont été déplétées. Les cellules isolées ont été injectées dans des receveurs traités avec 200 μ g d'un anticorps α NK1.1 deux jours avant le transfert. Les populations injectées sont constituées à 90% ou plus de cellules T CD8 $^{+}$. Les résultats donnent le nombre total de cellules T $\alpha\beta$ CD8 $^{+}$ (rate + 2xganglions) trouvées dans chaque receveur (3 animaux par point, \pm écart-type).

maintien renforcé dans les ganglions lymphatiques, mais les cellules T finissent par disparaître en 10 à 15 jours. Soit notre traitement n'est pas suffisant, et l'anticorps pur injecté bloque le marquage par l'anticorps fluorescent pour l'analyse par cytométrie (**Figure 16A**), soit les cellules NK ne sont pas liées à la disparition des cellules T injectées dans les receveurs CD3 $\epsilon^{-/-}$ x H-2K $^{b-/-}$. Des expériences ultérieures devraient nous permettre de répondre à ces questions. Nous allons notamment tester une méthode alternative pour la déplétion des cellules NK en utilisant un anticorps anti-IL-2R β (Tanaka et al., 1993).

Discussion

Les différents compartiments formés par les populations lymphocytaires sont soumis à un processus dynamique constant. En effet, le thymus est colonisé par des précurseurs à même de se différencier pour donner des cellules T matures, suite à un mécanisme de sélection basé essentiellement sur l'aptitude à reconnaître les molécules du CMH du soi. Ces lymphocytes T sont ensuite exportés du thymus vers la périphérie, et doivent être suffisamment compétitif pour s'établir au sein du compartiment des cellules naïves. Enfin, la sélection périphérique de certains clones T permet leur entrée dans les compartiments effecteurs et mémoires, entre lesquels des allers et venues peuvent avoir lieu (**Figure 17**).

Le présent travail s'est concentré sur le cas des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ chez la souris. Trois systèmes d'étude ont été mis à profit afin d'approcher les questions de la sélection centrale, la sélection périphérique et la survie des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ : 1) la sélection en présence ou en absence d'un autoantigène dans un modèle de souris transgéniques pour les deux TCR $\alpha\beta$ anti-mâle aHY et anti-LCMV P14 ; 2) l'établissement d'une infection chronique par le LCMV dans des animaux transgéniques pour le TCR $\alpha\beta$ P14 spécifique d'un épitope du virus, et en absence de cellules B et T $\alpha\beta$ CD4⁺ ; 3) les molécules de classe I en tant que ressource et leur influence sur la survie des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ naïves.

A. Cellules T exprimant deux TCR $\alpha\beta$ et implication dans l'autoimmunité

L'inclusion allélique de la chaîne α du TCR rend hautement probable l'existence de cellules T $\alpha\beta$ exprimant deux TCR à leur surface, ou cellules DTE (Dual TCR Expressing cells). On estime qu'environ 30% des cellules T $\alpha\beta$ contiennent deux réarrangements productifs au locus TCR α , même si cela ne débouche pas forcément sur l'expression de deux TCR à la surface (Malissen et al., 1992). Ce constat a poussé un certain nombre d'équipes à poser la question du risque autoimmun que représentent les lymphocytes DTE (Heath and Miller, 1993; Padovan et al., 1993). En effet, la dilution en surface d'un TCR autoréactif par l'expression d'un second TCR non-autoréactif pourrait permettre d'échapper à la sélection négative dans le thymus. Une fois à la périphérie, l'activation des cellules DTE pourrait alors déboucher sur une pathologie autoimmune.

C'est exactement ce qui est observé dans un modèle de souris transgéniques à la fois pour le TCR *Désiré* (Des-TCR) et son ligand spécifique H-2K^b, dont l'expression est restreinte au pancréas (RIP-K^b) (Heath and Miller, 1993). Dans ces animaux, les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ exprimant de hauts niveaux du TCR (Des^{high}) subissent une délétion clonale, mais cela n'empêche pas le déclenchement d'un diabète autoimmun. Des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ Des^{int} sont

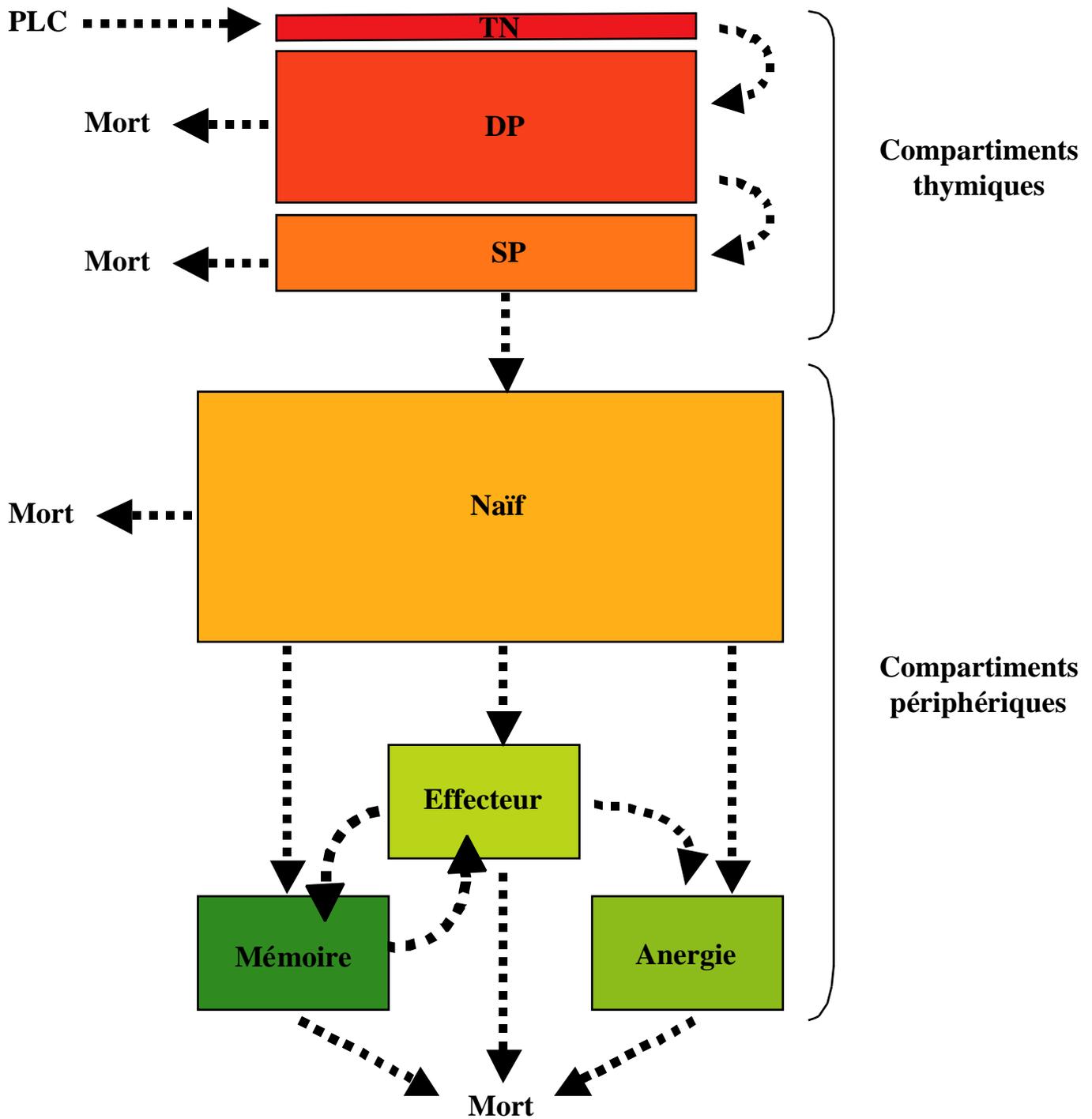


Figure 17: La dynamique des populations lymphocytaires T

Ce schéma illustre le fait que les différents compartiments lymphocytaires sont traversés par un flux constant de cellules des stades les plus immatures jusqu'à la mort cellulaire. Les mécanismes de contrôle homéostatique régulent la taille de chaque compartiment. Ainsi, à l'équilibre, toute entrée de nouvelles cellules doit s'accompagner de la sortie de cellules. Un phénomène de compétition pour les niches de sélection et de survie a alors lieu. PLC: progéniteur lymphoïde commun; DN: double-négatif; DP: double-positif; SP: simple-positif.

détectées dans ces animaux, et il a été montré qu'elles peuvent exprimer une chaîne TCR α endogène. Ainsi, il est supposé dans ce modèle que les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ échappent à la délétion clonale grâce à l'expression d'un second TCR à la surface, qu'elles sont activées via ce second TCR, et qu'elles peuvent alors infiltrer le tissu pancréatique et déclencher une pathologie autoimmune (Heath and Miller, 1993). Des conclusions identiques ont été atteintes par le groupe de H. von Boehmer avec un modèle transgénique à la fois pour un TCR spécifique de l'hémagglutinine du virus *Influenza* (TCR-HA) et pour son ligand sous le contrôle du promoteur de l'insuline (INS-HA) (Sarukhan et al., 1998). A nouveau, l'induction du diabète est liée à la présence de cellules T TCR-HA^{low} exprimant des chaînes TCR α endogènes, puisqu'aucune pathologie n'est détectée lorsque l'expression de ces chaînes endogènes est empêchée (fond TCR-C α ^{-/-}). Le risque autoimmun des cellules DTE a été confirmé par l'équipe de B. Stockinger à l'aide de souris RAG-2^{-/-} double-transgéniques pour le TCR, l'un étant sélectionné par une molécule du CMH-I (TCR BM3), l'autre par une molécule du CMH-II (TCR A18) (Zal et al., 1996). Le TCR A18 est spécifique d'un peptide issu de la protéine du complément C5 dans le contexte H-2E^k : C5 représente donc l'autoantigène dans ce modèle. En présence du ligand spécifique du TCR A18, on trouve à la périphérie des cellules DTE CD8⁺ et quelques rares cellules DTE CD4⁺, qui expriment toutes à leur surface de forts niveaux du TCR BM3 et de faibles niveaux du TCR A18. Dans ce système, les cellules T A18⁺ échappent donc à la délétion clonale, du fait de l'expression du TCR BM3. Lorsque ces cellules DTE CD4⁺ sont stimulées *in vitro* via le TCR BM3, elles peuvent ensuite lyser des cellules exprimant la protéine C5, alors que la stimulation en présence de C5 ne leur permet pas d'acquérir de capacité cytotoxique. L'absence de réponse des cellules DTE face à l'autoantigène peut donc être abolie après une activation cellulaire via le second TCR.

Nous avons analysé la sélection centrale et périphérique de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ double-transgéniques pour les TCR aHY et P14 dans un fond RAG-2^{-/-}, tous deux étant restreints à la molécule de classe I du CMH H-2D^b. Les animaux DTg constituent un modèle pour l'étude des cellules DTE CD8⁺. En effet, la caractérisation des lymphocytes T de ces animaux montre que la grande majorité d'entre eux expriment à leur surface le TCR aHY et un TCR formé par l'association des chaînes TCR α -P14 et TCR β -aHY. La spécificité de ce TCR hybride n'est pas connue. Cela ne nous empêche pas de confirmer l'effet salvateur de l'expression d'un second TCR sur la sélection négative de cellules T exprimant pourtant le TCR aHY autoréactif (**Article 1**). En effet, le compartiment thymique des cellules DP est partiellement

reconstitué chez les souris DTg mâles, alors qu'il est absent chez les souris mâles MoaHY. Cependant, les cellules T V β aHY⁺ V α aHY⁺ V α P14⁺ issues des souris DTg mâles montrent une faible capacité à être activées *in vitro* par le peptide issu de l'antigène mâle H-Y. De plus, des expériences de reconstitution de moelle osseuse, par les précurseurs DTg et en présence de l'Ag mâle, montrent que les cellules DTE sont contre-sélectionnées et sont moins compétitives pour intégrer les compartiments périphériques (**Article 2**). Ainsi, malgré l'expression d'un TCR autoréactif, les cellules DTE trouvées dans les mâles DTg sont fonctionnellement tolérantes. Il est probable que cette tolérisation ait lieu lors de la transition entre les compartiment DP et SP8, considérant l'expression réduite du co-récepteur CD8 et de la chaîne TCR α aHY par les cellules SP8. Dans notre système, les cellules DTE possèdent donc un ensemble de caractéristiques qui pourraient contribuer à diminuer le risque autoimmunitaire qu'elles représentent.

B. Développement des cellules T dans les souris DTg et exclusion allélique

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les lymphocytes T CD8⁺ des souris DTg expriment majoritairement à leur surface le TCR aHY et un TCR formé par l'association des chaînes TCR α -P14 et TCR β -aHY. Nous sommes arrivés à cette conclusion en combinant les résultats obtenus par trois approches (**Article 1**).

En premier lieu, la stimulation *in vitro* des cellules T CD8⁺ des souris femelles DTg est efficace si le peptide *Scmy3*, reconnu par le TCR aHY, est utilisé. Ce résultat est confirmé *in vivo* après transfert des cellules T CD8⁺ des souris DTg femelles dans des souris mâles CD3 ϵ ^{-/-} (**Article 2**). En revanche, le peptide gp33-41 issu du LCMV, et reconnu spécifiquement par le TCR P14, n'induit pas de prolifération des cellules DTg. Ce premier résultat indique que le TCR P14 n'est a priori pas fonctionnellement présent à la surface des cellules T CD8⁺ DTg. En second lieu, des expériences de co-intériorisation des chaînes Tg du TCR confirment cette observation. En effet, en cultivant les lymphocytes T CD8⁺ DTg en présence d'un anticorps spécifique pour la chaîne β du TCR aHY, l'intériorisation cellulaire de tous les TCR contenant cette chaîne est induite. Dans ces conditions, nous constatons non seulement la disparition de la chaîne V α aHY de la surface des cellules T exprimant les deux chaînes Tg TCR α (V α aHY⁺ V α P14⁺), mais également celle de la chaîne V α P14.

Le fait que les deux chaînes TCR β Tg appartiennent à la même famille (V β 8.1 pour le TCR P14 ; V β 8.2 pour le TCR aHY) empêche toute investigation supplémentaire utilisant des anticorps, pour réaliser par exemple des immunoprécipitations ou des marquages

intracellulaires. En effet, l'anticorps MR5-2 utilisé pour marquer la chaîne V β P14 reconnaît les deux familles V β 8.1/2. Pour contourner cette limite dans notre étude de l'expression de la chaîne β du TCR P14, nous avons cherché à mesurer la quantité de transcrits pour les deux transgènes TCR β (**Article 1**). Les séquences des deux segments variables des transgènes TCR β aHY (Uematsu et al., 1988) et TCR β P14 (Pircher et al., 1987) montrent une forte homologie, qui limite toute analyse par RT-PCR. Toutefois, la taille de la région CDR3 est de 8 acides aminés dans le cas du TCR aHY, contre 9 pour le TCR P14. Ainsi, la technique de l'Immunoscope (Pannetier et al., 1993) permet de différencier les ARN messagers des deux transgènes. Cette approche permet de confirmer la moindre représentation des transcrits de la chaîne TCR β P14 au sein des cellules T CD8⁺ DTg (~10% des messagers codant pour une chaîne TCR β). De manière intéressante, les ARN messagers sont encore moins présents que dans un mélange 1/1 de cellules monoclonales MoaHY et MoP14 (~25% des messagers TCR β).

Cette différence laisse penser qu'il existe un mécanisme d'exclusion allélique réprimant la transcription de la chaîne TCR β P14, pourtant réarrangée, alors que la chaîne TCR β aHY est favorisée. Elle peut s'expliquer par les promoteurs et constructions utilisées dans chacun des transgènes. Ainsi, la construction codant pour le TCR aHY contient le promoteur TCR β et ses éléments de régulation (Teh et al., 1988), alors que la construction du TCR P14 utilise le promoteur du gène *H-2K^b* et l'élément activateur du locus *IgH* (Pircher et al., 1989). Or, l'analyse des compartiments thymiques les plus précoces montre clairement que la construction codant pour le TCR aHY est exprimée plus rapidement que celle codant pour le TCR P14 (**Article 1**). Cela n'explique pas la sous-représentation des transcrits de la chaîne β du TCR P14. Le mécanisme impliqué dans cette exclusion allélique de la chaîne TCR β P14 peut agir soit sur la transcription du transgène, soit sur la durée de vie des transcrits, ou encore sur l'adressage du polypeptide vers la surface. Ainsi, il pourrait s'avérer que les chaînes du TCR aHY s'associent avec plus de facilité à la chaîne pT α ou aux protéines de la famille CD3, ce qui amènerait compétitivement à exclure la chaîne TCR β P14 de la surface des cellules T CD8⁺ DTg.

Deux éléments renforcent cette hypothèse. Tout d'abord, ce mécanisme cible spécifiquement la chaîne Tg TCR β P14, alors que l'expression de la chaîne α ne semble pas affectée. Pourtant, les deux chaînes sont sous le contrôle du même promoteur et d'éléments de régulation identiques. Ensuite, la situation inverse est trouvée dans les souris DTg, dans lesquelles une population extrêmement minoritaire n'exprime que la chaîne TCR β P14 et

exclue la chaîne TCR β aHY. Cette population exprime un TCR P14 fonctionnel, car l'inoculation des souris DTg avec le LCMV provoque son expansion spécifique (observation non publiée). Ces données soulignent le caractère physiologique de ce mécanisme potentiel. Il est difficile de comparer nos observations avec la littérature concernant les cellules DTE, mais nous pouvons remarquer dans le système utilisé par B. Stockinger que l'expression de surface des deux chaînes β utilisées était détectable (Zal et al., 1996). Par contre, nous pouvons signaler l'existence d'observations similaires aux nôtres dans le cas des cellules B, où des souris double-transgéniques pour des Ig réarrangées n'expriment qu'un des transgènes (Lam and Rajewsky, 1999; Rosado and Freitas, 2000). En somme, nos résultats montrent que la présence de deux réarrangements productifs pour la chaîne β du TCR ne corrèle pas forcément avec l'expression des deux chaînes.

C. Cellules DTE : répertoire T disponible et activité régulatrice

En laissant les cellules DTE « échapper » à la sélection négative, l'organisme prend le risque de voir s'établir dans ses compartiments périphériques des populations de cellules T potentiellement dangereuses. Nous pouvons toutefois essayer de cerner les côtés positifs que représente cette prise de risque. L'existence des cellules DTE peut se révéler bénéfique en permettant d'accroître le répertoire T disponible dans l'organisme à un moment donné (Gavin and Rudensky, 2002), même si la dilution des spécificités à la surface des cellules DTE peut influencer sur leur capacité à répondre contre un antigène.

Récemment, cette hypothèse a été avancée dans un modèle où l'expression d'un TCR endogène permet de suppléer à l'absence de sélection positive d'un TCR transgénique, du fait de l'haplotype H-2 des souris utilisées (He et al., 2002). En d'autres termes, ce TCR transgénique (TCR KB, spécifique de la chaîne $\alpha 2$ du collagène IV humain) ne peut être trouvé dans les compartiments T périphériques qu'à la surface d'une cellule DTE, qui aura été sélectionnée positivement via un TCR $\alpha\beta$ endogène. Malgré l'absence de sélection positive du TCR KB dans le fond génétique des souris utilisées, les cellules DTE exprimant le TCR KB répondent efficacement contre l'antigène spécifique. Mieux, elles constituent potentiellement la totalité des cellules T impliquées dans la réponse immunitaire, malgré la fréquence très faible des cellules DTE KB⁺ dans le répertoire T naïf. Ainsi, les cellules DTE peuvent participer de manière majeure à une réponse immunitaire, via un TCR qui n'aura pas été préalablement sélectionné positivement (He et al., 2002).

Nous avons analysé le comportement des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ issues des femelles DTg après transfert dans des receveurs mâles (**Article 2**). Lors de cette réponse immunitaire, les sous-populations T $\alpha\beta$ CD8⁺ sont en compétition, à savoir la population DTE (V β aHY⁺ V α aHY⁺ V α P14⁺), et les populations exprimant une seule des chaînes TCR α transgéniques. Les lymphocytes n'exprimant que le TCR aHY et les cellules DTE répondent clairement contre l'Ag mâle, avec une cinétique différente. Ainsi, la population mineure n'exprimant que le TCR aHY montre une phase d'expansion plus longue et plus forte, puis elle décroît après le pic de la réponse (jour 7). Les cellules DTE participent fortement à la réponse immunitaire, mais, si elles représentent environ 95% des cellules exprimant un TCR aHY lors du transfert, elles ne sont plus que 65% au pic de la réponse, ce qui confirme le potentiel supérieur des cellules n'exprimant que le TCR aHY. Ainsi, la dilution des spécificités à la surface des cellules DTE influe clairement sur la réponse antigénique et diminue leur capacité compétitrice pour l'Ag. A la différence des cellules n'exprimant que le TCR aHY, les cellules DTE se maintiennent après la réponse immunitaire. Clairement, l'expression d'un second TCR à la surface de ces lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ leur permet d'échapper d'une façon ou d'une autre à la mort cellulaire induite par l'activation. Cette différence majeure pourrait s'expliquer par la moindre exposition des cellules DTE à la forte concentration en autoantigène, du fait de la dilution du TCR aHY à la surface. Une autre explication pourrait être que des signaux de survie sont spécifiquement transduits via le second TCR non-autoréactif.

Une autre fonction des cellules DTE pourrait être un rôle régulateur. Chez la souris, il est connu que les cellules T aHY CD8⁺ anergiques, après une exposition forte et constante à l'antigène, sécrètent de l'IL-10 (Tanchot et al., 1998). La fonction immunorégulatrice supposée de cette interleukine laisse suggérer que les cellules T CD8⁺ tolérisées pourraient posséder une fonction régulatrice, même si la démonstration formelle d'un rôle régulateur de ces cellules n'a pas encore été apportée. Récemment, il a été montré que la présentation de ligands de haute affinité par les cellules du cortex thymique aux thymocytes DP génère des cellules T DN (CD4⁻ CD8⁻ TCR⁺) (Wang et al., 2002), à l'image de ce qui est observé dans les mâles aHY. Il est intéressant de constater que ces cellules DN produisent de l'IL-10 après stimulation antigénique et montrent des facultés immunorégulatrices *in vitro* (Wang et al., 2002).

Dans nos expériences, l'antigène mâle est non-seulement présent en forte quantité, mais sa présence est évidemment permanente. Ainsi, les cellules DTE obtenues après transfert de

cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ de donneurs DTg femelles vers des receveurs mâles présentent les caractéristiques de cellules « anergiques ». Les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ des mâles DTg sont fonctionnellement tolérantes malgré le haut niveau d'antigène environnant. Cela ne veut pas dire qu'elles sont totalement amorphes, car leur transfert dans des mâles montre qu'elles peuvent proliférer de manière modérée et s'accumuler à la périphérie, d'une manière qui ressemble plus à la prolifération homéostatique plutôt qu'à une réponse immunitaire (**Article 2**). En outre, un test de protection à la RNase met en évidence dans les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ des mâles DTg des ARN messagers codant pour l'IL-10 ou l'IFN- γ , ce qui renforce l'idée que ces cellules ne sont pas véritablement anergiques, mais qu'elles ont plutôt acquis un comportement fonctionnel et un seuil d'activation différents (Tanchot et al., 1998).

Considérant l'ensemble de ces données, il serait par exemple intéressant de mener une étude sur la fréquence des cellules DTE au sein du compartiment des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ CD44⁺ (cellules mémoires/activées ou anergiques) après une réponse immunitaire polyclonale, en comparaison avec le compartiment des cellules naïves. En effet, il serait particulièrement significatif de trouver une forte proportion de cellules DTE dans ces compartiments mémoires/activées et anergiques.

D. Adaptation des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ à leurs conditions environnementales

L'induction de la tolérance de cellules T autoréactives peut se faire à la périphérie par une réduction de l'expression du TCR et du co-récepteur à la surface cellulaire (Schonrich et al., 1991). Ainsi, l'expression de ces récepteurs est modulable, et l'analyse des mâles aHY montre l'existence d'une population T aHY^{low} CD8^{low} et d'une population T aHY^{high} CD8⁻, que les animaux soient dans un fond génétique RAG-2⁺ (Kisielow et al., 1988) ou bien RAG-2^{-/-} (**Article 1 & 2**). Il a été précédemment suggéré que les cellules aHY^{high} CD8⁻ RAG-2⁺ appartiennent à la lignée des cellules T $\gamma\delta$, l'expression d'un TCR $\gamma\delta$ permettant leur survie et leur maturation (Bruno et al., 1996a; Terrence et al., 2000). L'expression d'un TCR $\gamma\delta$ étant impossible dans nos souris, du fait de l'inactivation de l'enzyme RAG-2, il semble clair que les cellules T aHY^{high} CD8⁻ des mâles peuvent survivre en l'absence de ce récepteur. Au contraire, ces observations suggèrent plutôt l'existence d'un mécanisme d'adaptation des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ aux conditions environnementales. Ainsi, face à la concentration excessive d'Ag mâle, les cellules aHY peuvent soit totalement réprimer l'expression du co-récepteur CD8, soit diminuer l'expression du TCR et du co-récepteur. Ces comportements

permettent aux cellules T aHY de s'adapter à un niveau optimal de signaux requis pour permettre leur survie.

L'étude des souris DTg va dans le sens de cette interprétation. Dans ce système, la majorité des cellules T expriment les deux chaînes α transgéniques et la chaîne β du TCR aHY (**Article 1**). En présence de l'autoantigène, nous notons que la population de cellules T CD8⁺ est fortement réduite dans les souris DTg, en comparaison avec le cas des mâles aHY. La dilution du TCR aHY, du fait de l'expression du second TCR transgénique, permet l'accumulation de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ chez les mâles DTg, même si le niveau d'expression de CD8 est réduit par rapport aux femelles DTg. Enfin, les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ des souris DTg mâles expriment des niveaux supérieurs du TCR aHY, de manière similaire à ce qui est observé dans les mâles aHY. Ainsi, nous constatons que le profil d'expression des chaînes du TCR par les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ des souris DTg mâles ressemble à celui des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ des souris DTg femelles.

Dans les cas précédents, le système est « figé » du point de vue de l'Ag : qu'elles y soient transférées ou qu'elles s'y développent, les cellules T sont plongées dans un environnement contenant une concentration élevée et fixe en Ag mâle. Nos expériences d'infection de souris MoP14 par le LCMV abordent la question de l'adaptation à la fois du virus et des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ spécifiques (**Article 3**). En effet, la quantité et la localisation de l'Ag varient durant l'infection, et les cellules T spécifiques du virus doivent s'adapter au fait qu'elles ne peuvent pas éliminer seules le pathogène. Le virus, quant à lui, est soumis à une pression de sélection car l'ensemble des lymphocytes T des souris MoP14 est spécifiquement dirigé contre lui. Il adopte donc une stratégie d'échappement qui débouche sur la disparition de la souche virale sauvage inoculée et l'apparition de variants viraux, tous mutés uniquement dans l'épitope reconnu par le TCR P14. Il est intéressant de noter que certains des variants que nous avons isolés ont également été mis en évidence dans d'autres systèmes d'infection chronique au LCMV (Pircher et al., 1990; Puglielli et al., 2001). Il a été montré, par l'étude cristallographique du complexe gp33-41/H-2D^b, que les résidus d'acide aminé en position 34, 35 et 36 de l'épitope sont impliqués fortement soit dans l'interaction avec le sillon de la molécule du CMH (résidus 34 et 35), soit dans l'interaction avec le TCR (résidu 36) (Tissot et al., 2000). Les variants que nous avons isolés sont majoritairement mutés à une de ces positions, ce qui diminue fortement l'avidité du TCR P14 pour les complexes pAg-CMH obtenus (Puglielli et al., 2001; Tissot et al., 2000). De plus, les cellules T P14 ne montrent pas de fonction cytolytique contre des cellules cibles préalablement incubées avec les variants de

l'épitope gp33-41 (Pircher et al., 1990; Puglielli et al., 2001). Toutefois, nous avons pu observer avec deux de ces variants majeurs (V35gA ; V35gL) une activation partielle des cellules T P14 *in vitro*, qui se traduit par l'induction d'une faible prolifération et l'expression incomplète de marqueurs d'activations (**Article 3**). Ces deux variants viraux agissent donc comme des agonistes partiels des cellules T exprimant le TCR P14.

En parallèle, les cellules T $\alpha\beta$ P14 CD8⁺ s'adaptent à l'état d'infection chronique qui se met en place. Après une phase d'épuisement, nous constatons que les cellules T restantes perdent graduellement leur capacité à proliférer et à développer une fonction cytolytique. Cela est sans doute lié à l'action d'agoniste partiel observée de la part de certains variants du virus découverts dans les animaux infectés de manière chronique, et corrèle avec l'existence de nombreuses cellules T $\alpha\beta$ P14 CD8⁺ activées (CD69⁺) dans ces animaux. Nos résultats suggèrent que les variants viraux pourraient jouer un rôle essentiel dans la maintenance de l'état anergique des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ spécifiques. Toutefois, l'état d'anergie des cellules T $\alpha\beta$ P14 CD8⁺ n'est pas total, car elles conservent dans une certaine mesure la capacité de produire de l'IFN- γ , dont l'activité inhibitrice sur la réplication du LCMV est connue (Guidotti and Chisari, 2001; Moskophidis et al., 1994). Il est intéressant de comparer ce système avec l'infection par le HIV, où la réponse immunitaire peut également évoluer vers une situation d'infection chronique accompagnée d'un défaut des cellules T CD4⁺ et de production d'anticorps. Dans une telle situation, il a été rapporté que les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ de patients perdent leur activité cytotoxiques, mais conservent la possibilité de produire des cytokines, dont l'IFN- γ (Appay et al., 2000).

Il est difficile d'estimer l'impact de la production d'IFN- γ par les cellules T $\alpha\beta$ P14 CD8⁺. Cependant, il est connu que l'IFN- γ est une cytokine majeure dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires (Harty et al., 2000). De manière plus spécifique au cas du LCMV, il a été montré que l'élimination de l'infection est plus tardive dans les animaux déficients pour le récepteur de l'IFN- γ (Leist et al., 1989; Lohman and Welsh, 1998). Il est suggéré que l'IFN- γ influe directement sur la réplication du virus et sur sa dissémination (Leist et al., 1989; Moskophidis et al., 1994). En conséquence, on peut imaginer que la production d'IFN- γ par les cellules T $\alpha\beta$ P14 CD8⁺ des souris infectées chroniquement par le LCMV permet de contrôler à un certain degré la virémie.

L'ensemble de ces données montre que les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ s'adaptent aux conditions environnementales, que ce soit à la périphérie ou dans les compartiments centraux. Cette adaptation est dépendante de la quantité d'Ag, de sa capacité à s'autorépliquer et de sa

localisation. De plus, la nécessité de la diversification des stratégies d'élimination des pathogènes par l'organisme est mise en avant. Ainsi, il est connu que l'absence de cellules T CD4⁺ (Battegay et al., 1994; von Herrath et al., 1996) ou de cellules B (Thomsen et al., 1996) favorise l'établissement d'une infection chronique par le LCMV et l'élimination des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ spécifiques. Alternativement, les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ spécifiques peuvent se maintenir lors de l'infection chronique de souris CD4^{-/-} par une souche du LCMV se disséminant rapidement, mais cela se fait au prix de la perte de toute fonction effectrice, y compris la synthèse d'IFN- γ (Zajac et al., 1998a). Les cellules T CD4⁺ sont donc importantes lorsqu'une infection perdure, afin de permettre aux cellules T CD8⁺ de conserver leurs fonctions effectrices (Battegay et al., 1994; Matloubian et al., 1994). Lorsque les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ sont transférées seules dans des receveurs infectés chroniquement par le LCMV, elles sont rapidement « épuisées » (Hunziker et al., 2002). L'épuisement fonctionnel des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ est évité par un co-transfert de cellules T $\alpha\beta$ CD4⁺ mémoires, ce qui permet d'éliminer l'infection. De plus, l'injection de cellules B mémoires ne permet d'éliminer le virus que si ce sont des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ mémoires qui sont transférées. La co-injection de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ et d'anticorps anti-LCMV n'a pas d'effet permanent sur l'état chronique de l'infection, et induit même la sélection de variant viraux échappant à ces anticorps. En somme, plusieurs combinaisons de transferts de cellules permettent d'éliminer des souris porteuses l'infection chronique par le LCMV (cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ mémoires + B mémoires ; cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ naïves/mémoires + T $\alpha\beta$ CD4⁺ mémoires). Néanmoins, il apparaît que l'efficacité maximale est obtenue par le co-transfert des 3 populations (cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ naïves/mémoires + T $\alpha\beta$ CD4⁺ mémoires + B mémoires), ce qui permet notamment le maintien d'une fréquence élevée de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ spécifiques du virus (Hunziker et al., 2002). Ainsi, ces expériences « d'immunothérapie » sur des souris infectées de manière chronique par le LCMV confirment cette nécessité d'une collaboration entre les différentes stratégies de défense afin d'éviter le coût d'une adaptation forcée de certains des acteurs du système immunitaire, dont les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ (Zajac et al., 1998b).

E. Molécules de classe I du CMH et survie des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺

Afin d'assurer leur maintien au sein des organes lymphoïdes périphériques, les lymphocytes T doivent constamment intégrer des signaux de survie et ne peuvent pas se contenter d'attendre passivement l'antigène (Freitas and Rocha, 1997; Freitas and Rocha, 1999). Les cellules T naïves ont notamment besoin d'intégrer des signaux via l'interaction entre leur TCR et les

molécules du CMH afin de pouvoir se maintenir dans les compartiments périphériques (Brocker, 1997; Murali-Krishna et al., 1999; Tanchot et al., 1997a). Cette interaction est également nécessaire pour la prolifération homéostatique des cellules T, puisqu'une déficience dans l'expression de surface des molécules du CMH-I (TAP^{-/-}) ou du CMH-II (I-A^b β ^{-/-}; H-2M^{-/-}) empêche respectivement la division des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ (Goldrath and Bevan, 1999; Kieper and Jameson, 1999) et T $\alpha\beta$ CD4⁺ (Ernst et al., 1999; Viret et al., 1999), après transferts adoptif de ces cellules.

Comme nous l'avons déjà indiqué, les systèmes de transferts de cellules T nécessitent soit l'utilisation de receveurs irradiés sub-létalement, soit de receveurs immunodéficients. Dans le cas de l'irradiation, il y a fonte des organes lymphoïdes et production de facteurs en réponse au stress cellulaire. L'ensemble de ces caractéristiques peut largement influencer la cinétique de survie des populations de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ naïves injectées. Dans le cas des receveurs immunodéficients, il est par exemple observé que la récupération des cellules T après transfert est meilleure chez les souris CD3 ϵ ^{-/-} que chez les animaux RAG-2^{-/-}. Cela est sans doute lié en partie à la conservation de l'organisation des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) en présence des lymphocytes B. D'ailleurs, des résultats obtenus avec des receveurs déficients pour la lymphotoxine- α (LT α ^{-/-}), présentant une structure perturbée des organes lymphoïdes, confirme l'importance d'une organisation correcte de ces organes pour l'expansion des lymphocytes T (Dummer et al., 2001).

Les molécules de classe I du CMH peuvent être considérées comme une ressource essentielle pour la survie des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ naïves. Afin de prolonger les études existantes et élargir le spectre des TCR testés, nous avons cherché à développer un ensemble de souris receveuses déficientes pour une molécule du CMH-I et déficientes en cellules T, afin d'éviter l'étape d'irradiation avant transfert (**Résultats supplémentaires**). Ainsi, trois lignées de souris ont été utilisées comme receveuses lors de nos expériences, à savoir les animaux CD3 ϵ ^{-/-}, CD3 ϵ ^{-/-} x H-2D^{b/-} et CD3 ϵ ^{-/-} x H-2K^{b/-}. Nous avons testé le comportement de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ transgéniques restreintes soit par H-2D^b (aHY, P14, DTg), soit par H-2K^b (OT-1) ou de populations T $\alpha\beta$ CD8⁺ polyclonales. Les transferts chez les animaux CD3 ϵ ^{-/-} donnent une indication du potentiel de prolifération homéostatique des populations T injectées. La hiérarchie obtenue montre que le plateau le plus élevé après 1 mois est atteint par les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ polyclonales ($\sim 20 \cdot 10^6$), suivi par les cellules OT-1 ($\sim 8 \cdot 10^6$) et P14 ($\sim 5 \cdot 10^6$). Les cellules aHY et DTg ne s'accumulent que lentement à la périphérie des receveurs, et le nombre de cellules initialement injectées n'est pas retrouvé. De manière remarquable, le

niveau du plateau atteint par les cellules T Tg corrèle avec l'expression de marqueurs d'activation comme CD44, ou l'état d'avancement dans le cycle cellulaire, par exemple au niveau de l'expression de certaines cyclines (Henrique Vega-Fernandes, observation non publiée). Dans le même ordre d'idée, il est intéressant de remarquer l'existence d'une population SP4 dans le thymus des souris MoOT-1, et de quelques cellules T OT-1⁺ CD4⁺ à la périphérie de ces animaux. La réactivité croisée des TCR considérés est donc un facteur déterminant pour l'ensemble de ces phénomènes.

Les transferts chez les souris CD3 ϵ ^{-/-} x H-2D^{b/-} montrent une dépendance forte des cellules T aHY, P14 et DTg à leur élément de restriction H-2D^b. Dans ces trois cas, le nombre de cellules T trouvées dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) passe sous la limite de détection en moins de 2 jours. L'effet est ici spectaculairement rapide, comparé au système des souris H-2D^{b/-} irradiées, dans lesquelles les cellules aHY disparaissent en deux semaines environ (Tanchot et al., 1997a). De la même manière, des cellules P14 transférées chez des receveurs β 2m^{-/-} x H-2D^{b/-} x H-2K^{b/-} irradiés se maintiennent pendant 17 jours quasiment sans se diviser, et sont encore détectables après 40 jours (Murali-Krishna et al., 1999). Notre système met donc en évidence de façon beaucoup plus nette la dépendance des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ naïves vis-à-vis de leur élément de restriction, sans doute en évitant la présentation TCR/CMH entre les cellules T injectées pouvant potentiellement avoir lieu dans les organes atrophiés des receveurs irradiés. Il ne s'agit pas ici d'un rejet des cellules T transférées, car autant les cellules T OT-1 que les populations T $\alpha\beta$ CD8⁺ ou CD4⁺ polyclonales prolifèrent et s'accumulent dans les receveurs CD3 ϵ ^{-/-} x H-2D^{b/-}, similairement à ce qui est observé avec les receveurs CD3 ϵ ^{-/-}.

Les résultats obtenus lors des transferts chez les souris CD3 ϵ ^{-/-} x H-2K^{b/-} sont plus complexes. En effet, l'injection de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ ou CD4⁺ polyclonales ne permet pas de reconstituer un compartiment T périphérique. Ces lymphocytes T polyclonaux se maintiennent durant 5-7 jours puis sont ensuite rapidement perdus. Un résultat identique est obtenu après transfert des cellules OT-1, alors que le profil de division en CFSE montre une intense activité proliférative d'une partie de ces cellules. Ce résultat est surprenant puisque l'élément de restriction de ces cellules T est absent. De manière intéressante, les cellules P14 se divisent de manière similaire chez les souris CD3 ϵ ^{-/-} et CD3 ϵ ^{-/-} x H-2K^{b/-} pendant les 6 premiers jours de la cinétique, puis disparaissent brutalement en l'espace d'une semaine. Elles sont cependant encore détectables chez certains animaux receveurs pendant plus d'un mois.

Enfin, les cellules DTg disparaissent graduellement en une semaine, alors que les cellules aHY se maintiennent pendant au moins deux semaines.

En premier lieu, ces résultats suggèrent que les cellules T transférées sont rejetées par les receveurs, les cellules NK étant un bon candidat pour ce phénomène. Cette possibilité est en cours d'évaluation. Nous avons remarqué que la molécule H-2D^b est exprimée plus fortement chez les animaux CD3 ϵ ^{-/-} x H-2K^b^{-/-} que chez les souris donneuses ou contrôles CD3 ϵ ^{-/-}. Les cellules T transférées sont donc potentiellement vues comme perdant l'expression de cette molécule du CMH. En second lieu, il est intéressant de noter que l'intensité du rejet est directement liée à la capacité des cellules T transférées à engager une prolifération homéostatique. Ainsi, les populations de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ polyclonales ou exprimant un TCR Tg connu pour sa haute réactivité croisée (OT-1) sont éliminées plus rapidement que les cellules exprimant un TCR à réactivité croisée moyenne (P14) ou faible (aHY). Ces résultats demandent à être complétés, et l'implication potentielle des cellules NK doit être confirmée ou non.

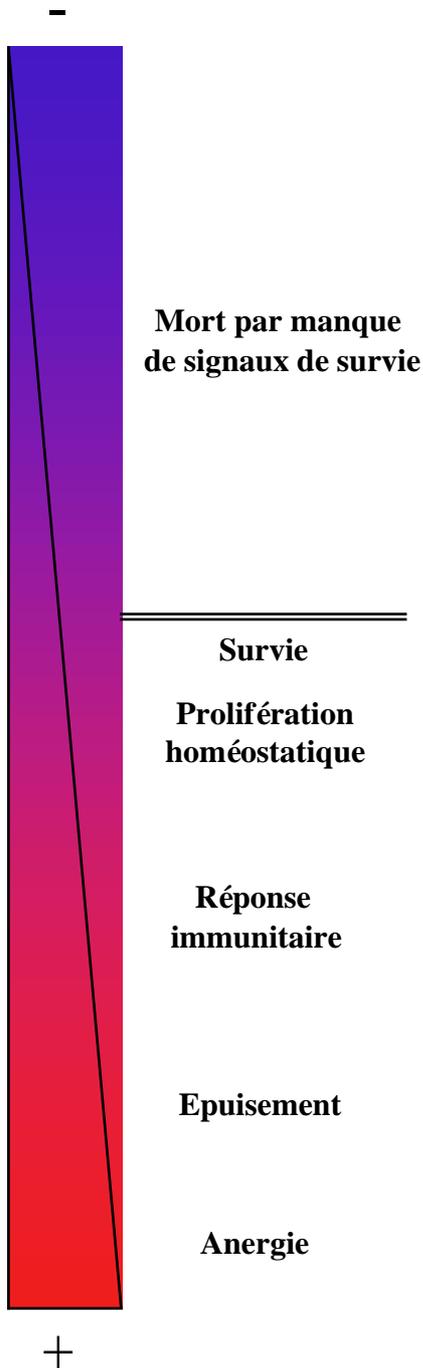
F. Perspectives

Une avancée majeure a été accomplie en considérant que les cellules T périphériques ne sont pas passives, mais doivent au contraire se démener de manière constante pour assurer leur survie (Freitas and Rocha, 1997). L'interaction TCR/CMH est impliquée de manière majeure dans ce phénomène. Dès lors, il est tentant de penser que la compétition pour les molécules du CMH-I peut influencer sur la survie d'une population des cellules T CD8⁺. Pour tester cette hypothèse, nous souhaitons tester l'influence d'une quantité réduite de ressource (molécule du CMH-I) sur la survie d'une population de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺. Pour cela, nous disposons désormais d'une lignée de souris dite « Tétra *knock-out* » (TétraKO), déficiente pour les quatre gènes CD3 ϵ , β 2m, H-2K^b et H-2D^b, c'est-à-dire n'exprimant aucune molécule de classe I du CMH et ne possédant aucune cellule T. Ces souris seront irradiées puis reconstituées avec des mélanges de moelle osseuse en partie TétraKO et en partie CD3 ϵ ^{-/-} x H-2D^b^{-/-}, par exemple. En jouant sur le ratio entre les deux types de moelle osseuse, nous obtiendrons une gamme de chimères contenant plus ou moins de cellules exprimant H-2K^b à la périphérie. Nous devrions alors pouvoir déterminer, dans cet exemple, la relation entre la quantité de l'élément de restriction et la survie/expansion des cellules T OT-1 injectées dans les chimères.

Idéalement, l'ensemble de ces expériences (transferts direct dans les receveurs ou dans les chimères) devrait être mené avec les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ naïves, mais également mémoires. En effet, il existe une certaine controverse sur le fait que les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ mémoires soient dépendantes ou non des molécules du CMH-I pour leur survie. Dans le modèle des cellules aHY, lorsque des cellules T aHY mémoires sont injectées, en absence de l'Ag, dans des receveurs irradiés sans cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ (femelles CD8^{-/-}) ou déficients pour l'élément correct de restriction (femelles H-2D^{b/-}), ces cellules T prolifèrent et s'accumulent (Tanchot et al., 1997a). Par contre, le transfert chez des animaux sans molécules de classe I du CMH ($\beta 2m^{-/-}$ x H-2D^{b/-}) montre une disparition des cellules T aHY mémoires (Tanchot et al., 1997a). Autrement dit, les cellules T aHY mémoires peuvent se maintenir via l'interaction avec des molécules du CMH-I autres que leur élément de restriction H-2D^b. L'étude du comportement des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ mémoires générées après une infection par le LCMV donne des résultats qui se veulent plus drastiques, puisque ces cellules mémoires peuvent survivre à long terme (au moins 8 mois) chez des souris receveuses $\beta 2m^{-/-}$ x H-2K^{b/-} x H-2D^{b/-} (Murali-Krishna et al., 1999). Cependant, le nombre de cellules obtenu est au moins dix fois inférieur à celui trouvé dans le groupe contrôle (souris intactes pour l'expression des molécules du CMH-I). La survie CMH-indépendante observée dans ce système pourrait donc ne concerner qu'une minorité de cellules mémoires. Malgré quelques différences dans les résultats, ces deux études atteignent tout de même une conclusion similaire, à savoir que les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ naïves et mémoires ne possèdent pas les mêmes prérequis de survie vis-à-vis des molécules de classe I du CMH.

En somme, l'ensemble des données disponibles sur la survie et l'activation des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ indiquent que le seuil de perception des ressources (Ag, molécules du CMH, cytokines) par les cellules T mémoires est inférieur au seuil de perception des cellules T naïves (**Figure 18**). Le fait que les cellules T aHY mémoires ont besoin pour leur survie d'interagir avec des molécules de classe I du CMH, mais pas nécessairement avec leur élément de restriction, est une bonne illustration de cet état de fait. Il est donc probable qu'un signal bien défini sur une cellule naïve ou mémoire donne deux comportements différents. L'élément de restriction du CMH est nécessaire pour la survie des cellules naïves, alors qu'il promeut une forte prolifération homéostatique des cellules mémoires. Lors d'une réponse immunitaire, il est également connu que les cellules mémoires se contentent d'une quantité moindre d'Ag pour enclencher une réponse immunitaire, comparé aux cellules naïves.

CELLULES T NAIVES



CELLULES T MEMOIRES

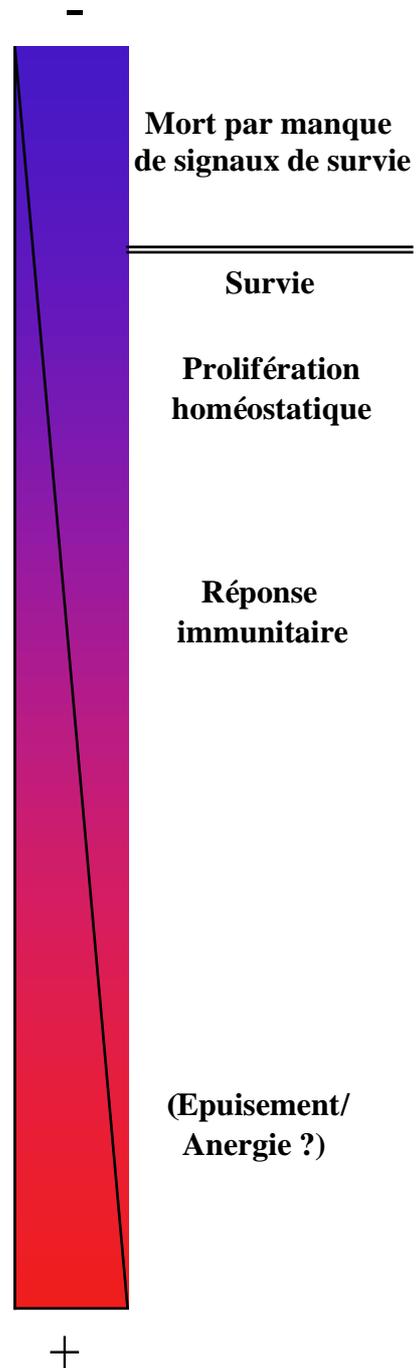


Figure 18: Seuil de perception réduit pour les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ mémoires

Ce schéma donne une vue simplifiée de la différence de comportement entre les cellules naïves et mémoires suivant la force globale du signal reçu. Les cellules T mémoires perçoivent de faibles quantités de ressources, contrairement aux cellules naïves. Cela est notamment le cas des prérequis de survie, l'élément de restriction du CMH n'étant pas nécessaire pour la survie des cellules T mémoires alors qu'il est essentiel à la survie des cellules naïves.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ces différences de sensibilité. Ainsi, il a été décrit que l'activation des cellules T induit un changement dans l'organisation de la chromatine, ce qui permet de « fermer » ou d'« ouvrir » certains locus, notamment ceux codant pour des cytokines (Agarwal and Rao, 1998; Bird et al., 1998). Ces modifications, notamment le degré de méthylation de l'ADN, peuvent être conservées et transmises au cours de la division cellulaire d'un clone de cellules T mémoires (Fitzpatrick et al., 1998). Des différences entre cellules naïves et mémoires/activées sont également observées au niveau de la distribution des molécules de surface et dans l'organisation du cytosquelette (Moran and Miceli, 1998). C'est notamment le cas de la protéine p56^{Lck}, qui est peu associée au co-récepteur CD8 et distribuée de manière homogène au sein des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ naïves (Bachmann et al., 1999b). Au contraire, l'analyse des cellules T activées révèle que p56^{Lck} est spécifiquement recrutée au niveau du co-récepteur CD8 à la membrane. Cette organisation est conservée dans les cellules mémoires, qui bénéficient du faible « recyclage » cellulaire du co-récepteur CD8 (Bachmann et al., 1999b). L'ensemble de ces caractéristiques assure sans doute une meilleure réactivité des cellules T mémoires, via une machinerie de signalisation plus sensible et plus réactive.

Bibliographie

A

- Agarwal, S., and Rao, A. (1998). Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* 9, 765-775.
- Ahmed, R., Butler, L. D., and Bhatti, L. (1988). T4⁺ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody responses. *J Virol* 62, 2102-2106.
- Ahmed, R., and Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272, 54-60.
- Aifantis, I., Buer, J., von Boehmer, H., and Azogui, O. (1997). Essential role of the pre-T cell receptor in allelic exclusion of the T cell receptor beta locus. *Immunity* 7, 601-607.
- Akashi, K., Kondo, M., von Freeden-Jeffry, U., Murray, R., and Weissman, I. L. (1997). Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* 89, 1033-1041.
- Akashi, K., Kondo, M., and Weissman, I. L. (1998). Role of interleukin-7 in T-cell development from hematopoietic stem cells. *Immunol Rev* 165, 13-28.
- Akashi, K., Reya, T., Dalma-Weiszhausz, D., and Weissman, I. L. (2000). Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol* 12, 144-150.
- Alam, S. M., Travers, P. J., Wung, J. L., Nasholds, W., Redpath, S., Jameson, S. C., and Gascoigne, N. R. (1996). T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 381, 616-620.
- Allman, D., Karnell, F. G., Punt, J. A., Bakkour, S., Xu, L., Myung, P., Koretzky, G. A., Pui, J. C., Aster, J. C., and Pear, W. S. (2001). Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. *J Exp Med* 194, 99-106.
- Almeida, A. R., Borghans, J. A., and Freitas, A. A. (2001). T cell homeostasis: thymus regeneration and peripheral T cell restoration in mice with a reduced fraction of competent precursors. *J Exp Med* 194, 591-599.
- Amadori, A., Zamarchi, R., De Silvestro, G., Forza, G., Cavatton, G., Danieli, G. A., Clementi, M., and Chieco-Bianchi, L. (1995). Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med* 1, 1279-1283.
- Amigorena, S., Drake, J. R., Webster, P., and Mellman, I. (1994). Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 369, 113-120.
- Amsen, D., and Kruisbeek, A. M. (1998). Thymocyte selection: not by TCR alone. *Immunol Rev* 165, 209-229.
- Anderson, G., and Jenkinson, E. J. (2001). Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature Rev Immunol* 1, 31-40.
- Anderson, G., Owen, J. J., Moore, N. C., and Jenkinson, E. J. (1994). Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes in vitro. *J Exp Med* 179, 2027-2031.
- Ansel, K. M., and Cyster, J. G. (2001). Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development. *Curr Opin Immunol* 13, 172-179.
- Appay, V., Nixon, D. F., Donahoe, S. M., Gillespie, G. M., Dong, T., King, A., Ogg, G. S., Spiegel, H. M., Conlon, C., Spina, C. A., *et al.* (2000). HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 192, 63-75.
- Ardavin, C., Wu, L., Li, C. L., and Shortman, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362, 761-763.
- Arden, B., Clark, S. P., Kabelitz, D., and Mak, T. W. (1995). Mouse T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42, 501-530.

Arroyo, A. G., Yang, J. T., Rayburn, H., and Hynes, R. O. (1996). Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell* 85, 997-1008.

Arroyo, A. G., Yang, J. T., Rayburn, H., and Hynes, R. O. (1999). Alpha4 integrins regulate the proliferation/differentiation balance of multilineage hematopoietic progenitors in vivo. *Immunity* 11, 555-566.

Asano, M. S., and Ahmed, R. (1996). CD8 T cell memory in B cell-deficient mice. *J Exp Med* 183, 2165-2174.

Ashton-Rickardt, P. G., Bandeira, A., Delaney, J. R., Van Kaer, L., Pircher, H. P., Zinkernagel, R. M., and Tonegawa, S. (1994). Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 76, 651-663.

Ashton-Rickardt, P. G., Van Kaer, L., Schumacher, T. N., Ploegh, H. L., and Tonegawa, S. (1993). Peptide contributes to the specificity of positive selection of CD8⁺ T cells in the thymus. *Cell* 73, 1041-1049.

Autran, B., Carcelain, G., Li, T. S., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., Katlama, C., Debre, P., and Leibowitch, J. (1997). Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4⁺ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 277, 112-116.

Autran, B., Leblond, V., Sadat-Sowti, B., Lefranc, E., Got, P., Sutton, L., Binet, J. L., and Debre, P. (1991). A soluble factor released by CD8⁺CD57⁺ lymphocytes from bone marrow transplanted patients inhibits cell-mediated cytotoxicity. *Blood* 77, 2237-2241.

B

Bachmann, M. F., Barner, M., Viola, A., and Kopf, M. (1999a). Distinct kinetics of cytokine production and cytotoxicity in effector and memory T cells after viral infection. *Eur J Immunol* 29, 291-299.

Bachmann, M. F., Gallimore, A., Linkert, S., Cerundolo, V., Lanzavecchia, A., Kopf, M., and Viola, A. (1999b). Developmental regulation of Lck targeting to the CD8 coreceptor controls signaling in naive and memory T cells. *J Exp Med* 189, 1521-1530.

Badovinac, V. P., Tvinnereim, A. R., and Harty, J. T. (2000). Regulation of antigen-specific CD8⁺ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science* 290, 1354-1358.

Bain, G., Engel, I., Robanus Maandag, E. C., te Riele, H. P., Volland, J. R., Sharp, L. L., Chun, J., Huey, B., Pinkel, D., and Murre, C. (1997). E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* 17, 4782-4791.

Bain, G., and Murre, C. (1998). The role of E-proteins in B- and T-lymphocyte development. *Semin Immunol* 10, 143-153.

Balomenos, D., Balderas, R. S., Mulvany, K. P., Kaye, J., Kono, D. H., and Theofilopoulos, A. N. (1995). Incomplete T cell receptor V beta allelic exclusion and dual V beta-expressing cells. *J Immunol* 155, 3308-3312.

Barndt, R., Dai, M. F., and Zhuang, Y. (1999). A novel role for HEB downstream or parallel to the pre-TCR signaling pathway during alpha beta thymopoiesis. *J Immunol* 163, 3331-3343.

Battegay, M., Moskophidis, D., Rahemtulla, A., Hengartner, H., Mak, T. W., and Zinkernagel, R. M. (1994). Enhanced establishment of a virus carrier state in adult CD4⁺ T-cell-deficient mice. *J Virol* 68, 4700-4704.

Bell, E. B., Sparshott, S. M., Drayson, M. T., and Ford, W. L. (1987). The stable and permanent expansion of functional T lymphocytes in athymic nude rats after a single injection of mature T cells. *J Immunol* 139, 1379-1384.

Bender, J., Mitchell, T., Kappler, J., and Marrack, P. (1999). CD4⁺ T cell division in irradiated mice

- requires peptides distinct from those responsible for thymic selection. *J Exp Med* 190, 367-374.
- Benoist, C., and Mathis, D. (1989). Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell* 58, 1027-1033.
- Benoist, C., and Mathis, D. (1997). Positive selection of T cells: fastidious or promiscuous? *Curr Opin Immunol* 9, 245-249.
- Benoist, C., and Mathis, D. (1999). T-lymphocyte differentiation and biology. In *Fundamental Immunology - 4th edition*, W. E. Paul, ed. (Lippincott-Raven Publishers), pp. 367-409.
- Benveniste, P., Knowles, G., and Cohen, A. (1996). CD8/CD4 lineage commitment occurs by an instructional/default process followed by positive selection. *Eur J Immunol* 26, 461-471.
- Berg, L. J., and Kang, J. (2001). Molecular determinants of TCR expression and selection. *Curr Opin Immunol* 13, 232-241.
- Berg, L. J., Pullen, A. M., Fazekas de St Groth, B., Mathis, D., Benoist, C., and Davis, M. M. (1989). Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand. *Cell* 58, 1035-1046.
- Berke, G. (1995). The CTL's kiss of death. *Cell* 81, 9-12.
- Berzins, S. P., Godfrey, D. I., Miller, J. F., and Boyd, R. L. (1999). A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9787-9791.
- Bevan, M. J. (1977). In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature* 269, 417-418.
- Bevan, M. J., and Hunig, T. (1981). T cells respond preferentially to antigens that are similar to self H-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 1843-1847.
- Bill, J., and Palmer, E. (1989). Positive selection of CD4⁺ T cells mediated by MHC class II-bearing stromal cell in the thymic cortex. *Nature* 341, 649-651.
- Bird, J. J., Brown, D. R., Mullen, A. C., Moskowitz, N. H., Mahowald, M. A., Sider, J. R., Gajewski, T. F., Wang, C. R., and Reiner, S. L. (1998). Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 9, 229-237.
- Bix, M., and Raulet, D. (1992). Inefficient positive selection of T cells directed by haematopoietic cells. *Nature* 359, 330-333.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-512.
- Blanden, R. V., Doherty, P. C., Dunlop, M. B., Gardner, I. D., Zinkernagel, R. M., and David, C. S. (1975). Genes required for cytotoxicity against virus-infected target cells in K and D regions of H-2 complex. *Nature* 254, 269-270.
- Bonomo, A., and Matzinger, P. (1993). Thymus epithelium induces tissue-specific tolerance. *J Exp Med* 177, 1153-1164.
- Borgulya, P., Kishi, H., Uematsu, Y., and von Boehmer, H. (1992). Exclusion and inclusion of alpha and beta T cell receptor alleles. *Cell* 69, 529-537.
- Borowski, C., Martin, C., Gounari, F., Haughn, L., Aifantis, I., Grassi, F., and Boehmer, H. (2002). On the brink of becoming a T cell. *Curr Opin Immunol* 14, 200-206.
- Bosselut, R., Feigenbaum, L., Sharrow, S. O., and Singer, A. (2001). Strength of signaling by CD4 and CD8 coreceptor tails determines the number but not the lineage direction of positively selected thymocytes. *Immunity* 14, 483-494.
- Boursalian, T. E., and Bottomly, K. (1999). Survival of naive CD4 T cells: roles of restricting versus selecting MHC class II and cytokine milieu. *J Immunol* 162, 3795-3801.
- Boyce, N. W., Jonsson, J. I., Emrich, F., and Eichmann, K. (1988). Heterologous cross-linking of

- Lyt-2 (CD8) to the alpha beta-T cell receptor is more effective in T cell activation than homologous alpha beta-T cell receptor cross-linking. *J Immunol* *141*, 2882-2888.
- Boysen, C., Simon, M. I., and Hood, L. (1997). Analysis of the 1.1-Mb human alpha/delta T-cell receptor locus with bacterial artificial chromosome clones. *Genome Res* *7*, 330-338.
- Brakebusch, C., Fillatreau, S., Potocnik, A. J., Bungartz, G., Wilhelm, P., Svensson, M., Kearney, P., Korner, H., Gray, D., and Fassler, R. (2002). Beta1 integrin is not essential for hematopoiesis but is necessary for the T cell-dependent IgM antibody response. *Immunity* *16*, 465-477.
- Brandle, D., Muller, C., Rulicke, T., Hengartner, H., and Pircher, H. (1992). Engagement of the T-cell receptor during positive selection in the thymus down-regulates RAG-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 9529-9533.
- Brinchmann, J. E., Dobloug, J. H., Heger, B. H., Haaheim, L. L., Sannes, M., and Egeland, T. (1994). Expression of costimulatory molecule CD28 on T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection: functional and clinical correlations. *J Infect Dis* *169*, 730-738.
- Brocker, T. (1997). Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* *186*, 1223-1232.
- Brocker, T., Riedinger, M., and Karjalainen, K. (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.
- Brodsky, F. M., and Guagliardi, L. E. (1991). The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* *9*, 707-744.
- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* *364*, 33-39.
- Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Ginter, T. I., Yamashita, Y., Sharrow, S. O., and Singer, A. (2000). Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* *13*, 59-71.
- Bruno, L., Fehling, H. J., and von Boehmer, H. (1996a). The alpha beta T cell receptor can replace the gamma delta receptor in the development of gamma delta lineage cells. *Immunity* *5*, 343-352.
- Bruno, L., von Boehmer, H., and Kirberg, J. (1996b). Cell division in the compartment of naive and memory T lymphocytes. *Eur J Immunol* *26*, 3179-3184.
- Buer, J., Aifantis, I., DiSanto, J. P., Fehling, H. J., and von Boehmer, H. (1997). Role of different T cell receptors in the development of pre-T cells. *J Exp Med* *185*, 1541-1547.
- Burkly, L. C., Degermann, S., Longley, J., Hagman, J., Brinster, R. L., Lo, D., and Flavell, R. A. (1993). Clonal deletion of V beta 5+ T cells by transgenic I-E restricted to thymic medullary epithelium. *J Immunol* *151*, 3954-3960.
- Busch, D. H., Pilip, I. M., Vijn, S., and Pamer, E. G. (1998). Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* *8*, 353-362.
- Butcher, E. C., and Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* *272*, 60-66.
- Butz, E. A., and Bevan, M. J. (1998). Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* *8*, 167-175.

C

- Cabaniols, J. P., Fazilleau, N., Casrouge, A., Kourilsky, P., and Kanellopoulos, J. M. (2001). Most alpha/beta T cell receptor diversity is due to terminal deoxynucleotidyl transferase. *J Exp Med* *194*, 1385-1390.
- Campbell, J. J., and Butcher, E. C. (2000). Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* *12*, 336-341.
- Campbell, K. S., Buder, A., and Deuschle, U. (1995). Interactions between the amino-terminal domain of p56lck and cytoplasmic domains of CD4 and CD8 alpha in yeast. *Eur J Immunol* *25*, 2408-2412.
- Carlow, D. A., van Oers, N. S., Teh, S. J., and Teh, H. S. (1992). Deletion of antigen-specific immature thymocytes by dendritic cells requires LFA-1/ICAM interactions. *J Immunol* *148*, 1595-1603.
- Carlyle, J. R., and Zuniga-Pflucker, J. C. (1998). Requirement for the thymus in alphabeta T lymphocyte lineage commitment. *Immunity* *9*, 187-197.
- Casanova, J. L., Romero, P., Widmann, C., Kourilsky, P., and Maryanski, J. L. (1991). T cell receptor genes in a series of class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a Plasmodium berghei nonapeptide: implications for T cell allelic exclusion and antigen-specific repertoire. *J Exp Med* *174*, 1371-1383.
- Ceredig, R., and Schreyer, M. (1984). Immunohistochemical localization of host and donor-derived cells in the regenerating thymus of radiation bone marrow chimeras. *Thymus* *6*, 15-26.
- Chan, S., Correia-Neves, M., Dierich, A., Benoist, C., and Mathis, D. (1998). Visualization of CD4/CD8 T cell commitment. *J Exp Med* *188*, 2321-2333.
- Chan, S. H., Cosgrove, D., Waltzinger, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1993). Another view of the selective model of thymocyte selection. *Cell* *73*, 225-236.
- Chau, L. A., Bluestone, J. A., and Madrenas, J. (1998). Dissociation of intracellular signaling pathways in response to partial agonist ligands of the T cell receptor. *J Exp Med* *187*, 1699-1709.
- Chien, Y. H., Gascoigne, N. R., Kavalier, J., Lee, N. E., and Davis, M. M. (1984). Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene. *Nature* *309*, 322-326.
- Cho, B. K., Rao, V. P., Ge, Q., Eisen, H. N., and Chen, J. (2000). Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *J Exp Med* *192*, 549-556.
- Cho, B. K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H. N., and Chen, J. (1999). Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 2976-2981.
- Clayton, L. K., D'Adamio, L., Howard, F. D., Sieh, M., Hussey, R. E., Koyasu, S., and Reinherz, E. L. (1991). CD3 eta and CD3 zeta are alternatively spliced products of a common genetic locus and are transcriptionally and/or post-transcriptionally regulated during T-cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 5202-5206.
- Clevers, H., and Ferrier, P. (1998). Transcriptional control during T-cell development. *Curr Opin Immunol* *10*, 166-171.
- Cole, G. A., Nathanson, N., and Prendergast, R. A. (1972). Requirement for theta-bearing cells in lymphocytic choriomeningitis virus-induced central nervous system disease. *Nature* *238*, 335-337.
- Conlon, R. A., Reaume, A. G., and Rossant, J. (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* *121*, 1533-1545.

Corbella, P., Moskophidis, D., Spanopoulou, E., Mamalaki, C., Tolaini, M., Itano, A., Lans, D., Baltimore, D., Robey, E., and Kioussis, D. (1994). Functional commitment to helper T cell lineage precedes positive selection and is independent of T cell receptor MHC specificity. *Immunity* *1*, 269-276.

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

Cresswell, P. (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* *12*, 259-293.

Crisa, L., Cirulli, V., Ellisman, M. H., Ishii, J. K., Elices, M. J., and Salomon, D. R. (1996). Cell adhesion and migration are regulated at distinct stages of thymic T cell development: the roles of fibronectin, VLA4, and VLA5. *J Exp Med* *184*, 215-228.

Crump, A. L., Grusby, M. J., Glimcher, L. H., and Cantor, H. (1993). Thymocyte development in major histocompatibility complex-deficient mice: evidence for stochastic commitment to the CD4 and CD8 lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 10739-10743.

Cumano, A., and Godin, I. (2001). Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. *Curr Opin Immunol* *13*, 166-171.

D

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

Davis, M. M., and Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition [published erratum appears in *Nature* 1988 Oct 20;335(6192):744]. *Nature* *334*, 395-402.

Davis, M. M., and Chien, Y. H. (1999). T-cell antigen receptors. In *Fundamental Immunology* - 4th edition, W. E. Paul, ed. (Lippincott-Raven Publishers), pp. 341-366.

Davodeau, F., Peyrat, M. A., Romagne, F., Necker, A., Hallet, M. M., Vie, H., and Bonneville, M. (1995). Dual T cell receptor beta chain expression on human T lymphocytes. *J Exp Med* *181*, 1391-1398.

De Magistris, M. T., Alexander, J., Coggeshall, M., Altman, A., Gaeta, F. C., Grey, H. M., and Sette, A. (1992). Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell* *68*, 625-634.

Deftos, M. L., and Bevan, M. J. (2000). Notch signaling in T cell development. *Curr Opin Immunol* *12*, 166-172.

DeGrendele, H. C., Estess, P., Picker, L. J., and Siegelman, M. H. (1996). CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med* *183*, 1119-1130.

Delaney, J. R., Sykulev, Y., Eisen, H. N., and Tonegawa, S. (1998). Differences in the level of expression of class I major histocompatibility complex proteins on thymic epithelial and dendritic cells influence the decision of immature thymocytes between positive and negative selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 5235-5240.

den Haan, J. M., and Bevan, M. J. (2001). Antigen presentation to CD8⁺ T cells: cross-priming in infectious diseases. *Curr Opin Immunol* *13*, 437-441.

Denzin, L. K., and Cresswell, P. (1995). HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* *82*, 155-165.

Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1996). Long-lasting CD8 T cell memory in the absence of CD4 T cells or B cells. *J Exp Med* *183*, 2153-2163.

Di Santo, J. P., Aifantis, I., Rosmaraki, E., Garcia, C., Feinberg, J., Fehling, H. J., Fischer, A., von Boehmer, H., and Rocha, B. (1999). The common cytokine receptor gamma chain and the pre-T cell receptor provide independent but critically overlapping signals in early alpha/beta T cell development. *J Exp Med* *189*, 563-574.

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

Di Santo, J. P., and Rodewald, H. R. (1998). In vivo roles of receptor tyrosine kinases and cytokine receptors in early thymocyte development. *Curr Opin Immunol* *10*, 196-207.

Dieterlen-Lievre, F. (1975). On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J Embryol Exp Morphol* *33*, 607-619.

DiSanto, J. P., Muller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A., and Rajewsky, K. (1995). Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 377-381.

Doherty, P. C., and Christensen, J. P. (2000). Accessing complexity: the dynamics of virus-specific T cell responses. *Annu Rev Immunol* *18*, 561-592.

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

Dorfman, J. R., and Germain, R. N. (2002). MHC-dependent survival of naive T cells? A complicated answer to a simple question. *Microbes Infect* *4*, 547-554.

Douagi, I., Andre, I., Ferraz, J. C., and Cumano, A. (2000). Characterization of T cell precursor activity in the murine fetal thymus: evidence for an input of T cell precursors between days 12 and 14 of gestation. *Eur J Immunol* *30*, 2201-2210.

Douagi, I., Colucci, F., Di Santo, J. P., and Cumano, A. (2002). Identification of the earliest prethymic bipotent T/NK progenitor in murine fetal liver. *Blood* *99*, 463-471.

Douek, D. C., and Koup, R. A. (2000). Evidence for thymic function in the elderly. *Vaccine* *18*, 1638-1641.

Dummer, W., Ernst, B., LeRoy, E., Lee, D., and Surh, C. (2001). Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment. *J Immunol* *166*, 2460-2468.

Dutton, R. W., Bradley, L. M., and Swain, S. L. (1998). T cell memory. *Annu Rev Immunol* *16*, 201-223.

E

Ebnet, K., Hausmann, M., Lehmann-Grube, F., Mullbacher, A., Kopf, M., Lamers, M., and Simon, M. M. (1995). Granzyme A-deficient mice retain potent cell-mediated cytotoxicity. *Embo J* *14*, 4230-4239.

Ema, H., Douagi, I., Cumano, A., and Kourilsky, P. (1998). Development of T cell precursor activity in the murine fetal liver. *Eur J Immunol* *28*, 1563-1569.

Engel, I., Johns, C., Bain, G., Rivera, R. R., and Murre, C. (2001). Early thymocyte development is regulated by modulation of E2A protein activity. *J Exp Med* *194*, 733-745.

Engelhard, V. H. (1994). Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol* *12*, 181-207.

Ernst, B., Lee, D. S., Chang, J. M., Sprent, J., and Surh, C. D. (1999). The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* *11*, 173-181.

F

- Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H. G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296.
- Farber, D. L. (1998). Differential TCR signaling and the generation of memory T cells. *J Immunol* 160, 535-539.
- Fehling, H. J., Krotkova, A., Saint-Ruf, C., and von Boehmer, H. (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.
- Fehling, H. J., and von Boehmer, H. (1997). Early alpha beta T cell development in the thymus of normal and genetically altered mice. *Curr Opin Immunol* 9, 263-275.
- Ferreira, C., Barthlott, T., Garcia, S., Zamoyska, R., and Stockinger, B. (2000). Differential survival of naive CD4 and CD8 T cells. *J Immunol* 165, 3689-3694.
- Fine, J. S., and Kruisbeek, A. M. (1991). The role of LFA-1/ICAM-1 interactions during murine T lymphocyte development. *J Immunol* 147, 2852-2859.
- Fitzpatrick, D. R., Shirley, K. M., McDonald, L. E., Bielefeldt-Ohmann, H., Kay, G. F., and Kelso, A. (1998). Distinct methylation of the interferon gamma (IFN-gamma) and interleukin 3 (IL-3) genes in newly activated primary CD8⁺ T lymphocytes: regional IFN-gamma promoter demethylation and mRNA expression are heritable in CD44(high)CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 188, 103-117.
- Foss, D. L., Donskoy, E., and Goldschneider, I. (2001). The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J Exp Med* 193, 365-374.
- 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.
- Freitas, A. A., and Rocha, B. (1997). Lymphocyte survival: a red queen hypothesis. *Science* 277, 1950.
- Freitas, A. A., and Rocha, B. (1999). Peripheral T cell survival. *Curr Opin Immunol* 11, 152-156.
- Freitas, A. A., and Rocha, B. (2000). Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu Rev Immunol* 18, 83-111.
- Freitas, A. A., Rocha, B., and Coutinho, A. A. (1986). Lymphocyte population kinetics in the mouse. *Immunol Rev* 91, 5-37.
- Freitas, A. A., Rosado, M. M., Viale, A. C., and Grandien, A. (1995). The role of cellular competition in B cell survival and selection of B cell repertoires. *Eur J Immunol* 25, 1729-1738.
- Fugmann, S. D., Lee, A. I., Shockett, P. E., Villey, I. J., and Schatz, D. G. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol* 18, 495-527.
- Fujimoto, S., and Yamagishi, H. (1987). Isolation of an excision product of T-cell receptor alpha-chain gene rearrangements. *Nature* 327, 242-243.
- Fukui, Y., Ishimoto, T., Utsuyama, M., Gytoku, T., Koga, T., Nakao, K., Hirokawa, K., Katsuki, M., and Sasazuki, T. (1997). Positive and negative CD4⁺ thymocyte selection by a single MHC class II/peptide ligand affected by its expression level in the thymus. *Immunity* 6, 401-410.
- Fung-Leung, W. P., Louie, M. C., Limmer, A., Ohashi, P. S., Ngo, K., Chen, L., Kawai, K., Lacy, E., Loh, D. Y., and Mak, T. W. (1993). The lack of CD8 alpha cytoplasmic domain resulted in a dramatic decrease in efficiency in thymic maturation but only a moderate reduction in cytotoxic function of CD8⁺ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 23, 2834-2840.
- Fung-Leung, W. P., Schilham, M. W., Rahemtulla, A., Kundig, T. M., Vollenweider, M., Potter, J., van

Ewijk, W., and Mak, T. W. (1991). CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell* 65, 443-449.

Fung-Leung, W. P., Surh, C. D., Liljedahl, M., Pang, J., Leturcq, D., Peterson, P. A., Webb, S. R., and Karlsson, L. (1996). Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice. *Science* 271, 1278-1281.

G

Gabert, J., Langlet, C., Zamoyska, R., Parnes, J. R., Schmitt-Verhulst, A. M., and Malissen, B. (1987). Reconstitution of MHC class I specificity by transfer of the T cell receptor and *Lyt-2* genes. *Cell* 50, 545-554.

Gallimore, A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A. C., Pluckthun, A., Elliott, T., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. (1998). Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med* 187, 1383-1393.

Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E., and Wiley, D. C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384, 134-141.

Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L., and Wilson, I. A. (1996). An alpha-beta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274, 209-219.

Garcia, S., DiSanto, J., and Stockinger, B. (1999). Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity* 11, 163-171.

Gascoigne, N. R., and Alam, S. M. (1999). Allelic exclusion of the T cell receptor alpha-chain: developmental regulation of a post-translational event. *Semin Immunol* 11, 337-347.

Gascoigne, N. R., Chien, Y., Becker, D. M., Kavalier, J., and Davis, M. M. (1984). Genomic organization and sequence of T-cell receptor beta-chain constant- and joining-region genes. *Nature* 310, 387-391.

Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2002). Dual TCR T cells: gaining entry into the periphery. *Nat Immunol* 3, 109-110.

Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The *Ikaros* gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79, 143-156.

Germain, R. N. (1986). Immunology. The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 322, 687-689.

Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C., and Mathis, D. (1993). Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 261, 1175-1178.

Girao, C., Hu, Q., Sun, J., and Ashton-Rickardt, P. G. (1997). Limits to the differential avidity model of T cell selection in the thymus. *J Immunol* 159, 4205-4211.

Godfrey, D. I., Kennedy, J., Mombaerts, P., Tonegawa, S., and Zlotnik, A. (1994). Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8- thymocyte differentiation. *J Immunol* 152, 4783-4792.

Godfrey, D. I., and Zlotnik, A. (1993). Control points in early T-cell development. *Immunol Today* 14, 547-553.

Godin, I. E., Garcia-Porrero, J. A., Coutinho, A., Dieterlen-Lievre, F., and Marcos, M. A. (1993). Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature* 364, 67-70.

Goldrath, A. W. (2002). Maintaining the status quo: T-cell homeostasis. *Microbes Infect* 4, 539-545.

Goldrath, A. W., and Bevan, M. J. (1999). Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of

mature CD8⁺ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity* *11*, 183-190.

Goldrath, A. W., Bogatzki, L. Y., and Bevan, M. J. (2000). Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med* *192*, 557-564.

Grawunder, U., West, R. B., and Lieber, M. R. (1998). Antigen receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol* *10*, 172-180.

Gray, D., and Matzinger, P. (1991). T cell memory is short-lived in the absence of antigen. *J Exp Med* *174*, 969-974.

Grayson, J. M., Zajac, A. J., Altman, J. D., and Ahmed, R. (2000). Cutting edge: increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8⁺ T cells. *J Immunol* *164*, 3950-3954.

Greaves, M. F., Chan, L. C., Furley, A. J., Watt, S. M., and Molgaard, H. V. (1986). Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia. *Blood* *67*, 1-11.

Guidotti, L. G., and Chisari, F. V. (2001). Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* *19*, 65-91.

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

H

Harrington, L. E., Galvan, M., Baum, L. G., Altman, J. D., and Ahmed, R. (2000). Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J Exp Med* *191*, 1241-1246.

Harty, J. T., and Badovinac, V. P. (2002). Influence of effector molecules on the CD8(+) T cell response to infection. *Curr Opin Immunol* *14*, 360-365.

Harty, J. T., Tvinnereim, A. R., and White, D. W. (2000). CD8⁺ T cell effector mechanisms in

resistance to infection. *Annu Rev Immunol* *18*, 275-308.

Hassan, J., and Reen, D. J. (1998). IL-7 promotes the survival and maturation but not differentiation of human post-thymic CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* *28*, 3057-3065.

Hathcock, K. S., Weng, N. P., Merica, R., Jenkins, M. K., and Hodes, R. (1998). Cutting edge: antigen-dependent regulation of telomerase activity in murine T cells. *J Immunol* *160*, 5702-5706.

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

He, X., Janeway, C. A., Jr., Levine, M., Robinson, E., Preston-Hurlburt, P., Viret, C., and Bottomly, K. (2002). Dual receptor T cells extend the immune repertoire for foreign antigens. *Nat Immunol* *3*, 127-134.

Heath, W. R., Carbone, F. R., Bertolino, P., Kelly, J., Cose, S., and Miller, J. F. (1995). Expression of two T cell receptor alpha chains on the surface of normal murine T cells. *Eur J Immunol* *25*, 1617-1623.

Heath, W. R., and Miller, J. F. (1993). Expression of two alpha chains on the surface of T cells in T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* *178*, 1807-1811.

Herblot, S., Steff, A. M., Hugo, P., Aplan, P. D., and Hoang, T. (2000). SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol* *1*, 138-144.

Hernandez-Hoyos, G., Sohn, S. J., Rothenberg, E. V., and Alberola-Ila, J. (2000). Lck activity controls CD4/CD8 T cell lineage commitment. *Immunity* *12*, 313-322.

Heusel, J. W., Wesselschmidt, R. L., Shresta, S., Russell, J. H., and Ley, T. J. (1994). Cytotoxic

lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76, 977-987.

Hirsch, E., Iglesias, A., Potocnik, A. J., Hartmann, U., and Fassler, R. (1996). Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of beta1 integrins. *Nature* 380, 171-175.

Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373, 123-126.

Hoffman, E. S., Passoni, L., Crompton, T., Leu, T. M., Schatz, D. G., Koff, A., Owen, M. J., and Hayday, A. C. (1996). Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo. *Genes Dev* 10, 948-962.

Hoffmann, M. W., Heath, W. R., Ruschmeyer, D., and Miller, J. F. (1995). Deletion of high-avidity T cells by thymic epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9851-9855.

Hogquist, K. A. (2001). Signal strength in thymic selection and lineage commitment. *Curr Opin Immunol* 13, 225-231.

Hogquist, K. A., Gavin, M. A., and Bevan, M. J. (1993). Positive selection of CD8⁺ T cells induced by major histocompatibility complex binding peptides in fetal thymic organ culture. *J Exp Med* 177, 1469-1473.

Hogquist, K. A., Jameson, S. C., and Bevan, M. J. (1995). Strong agonist ligands for the T cell receptor do not mediate positive selection of functional CD8⁺ T cells. *Immunity* 3, 79-86.

Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., and Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.

Huesmann, M., Scott, B., Kisielow, P., and von Boehmer, H. (1991). Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell* 66, 533-540.

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

Hunziker, L., Klenerman, P., Zinkernagel, R. M., and Ehl, S. (2002). Exhaustion of cytotoxic T cells during adoptive immunotherapy of virus carrier mice can be prevented by B cells or CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 32, 374-382.

Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.

I

Iezzi, G., Karjalainen, K., and Lanzavecchia, A. (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8, 89-95.

Ignatowicz, L., Kappler, J., and Marrack, P. (1996a). The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* 84, 521-529.

Ignatowicz, L., Kappler, J., Parker, D. C., and Marrack, P. (1996b). The responses of mature T cells are not necessarily antagonized by their positively selecting peptide. *J Immunol* 157, 1827-1831.

Itano, A., Cado, D., Chan, F. K., and Robey, E. (1994). A role for the cytoplasmic tail of the beta chain of CD8 in thymic selection. *Immunity* 1, 287-290.

Itano, A., Salmon, P., Kioussis, D., Tolaini, M., Corbella, P., and Robey, E. (1996). The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells. *J Exp Med* 183, 731-741.

J

Jameson, S. C., Hogquist, K. A., and Bevan, M. J. (1994). Specificity and flexibility in thymic selection. *Nature* 369, 750-752.

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

Jenkinson, E. J., Van Ewijk, W., and Owen, J. J. (1981). Major histocompatibility complex antigen expression on the epithelium of the developing thymus in normal and nude mice. *J Exp Med* 153, 280-292.

K

Kaech, S. M., and Ahmed, R. (2001). Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2, 415-422.

Kappler, J. W., Roehm, N., and Marrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49, 273-280.

Kavaler, J., Davis, M. M., and Chien, Y. (1984). Localization of a T-cell receptor diversity-region element. *Nature* 310, 421-423.

Kawakami, N., Nishizawa, F., Sakane, N., Iwao, M., Tsujikawa, K., Ikawa, M., Okabe, M., and Yamamoto, H. (1999). Roles of integrins and CD44 on the adhesion and migration of fetal liver cells to the fetal thymus. *J Immunol* 163, 3211-3216.

Kaye, J., Hsu, M. L., Sauron, M. E., Jameson, S. C., Gascoigne, N. R., and Hedrick, S. M. (1989). Selective development of CD4⁺ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature* 341, 746-749.

Kedl, R. M., and Mescher, M. F. (1998). Qualitative differences between naive and memory T cells make a major contribution to the more rapid

and efficient memory CD8⁺ T cell response. *J Immunol* 161, 674-683.

Khor, B., and Sleckman, B. P. (2002). Allelic exclusion at the TCRbeta locus. *Curr Opin Immunol* 14, 230-234.

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

Kieper, W. C., Prlic, M., Schmidt, C. S., Mescher, M. F., and Jameson, S. C. (2001). Il-12 enhances CD8 T cell homeostatic expansion. *J Immunol* 166, 5515-5521.

Kirberg, J., Baron, A., Jakob, S., Rolink, A., Karjalainen, K., and von Boehmer, H. (1994). Thymic selection of CD8⁺ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor. *J Exp Med* 180, 25-34.

Kirberg, J., Berns, A., and von Boehmer, H. (1997). Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med* 186, 1269-1275.

Kishimoto, H., and Sprent, J. (1997). Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med* 185, 263-271.

Kisielow, P., Bluthmann, H., Staerz, U. D., Steinmetz, M., and von Boehmer, H. (1988). Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4⁺8⁺ thymocytes. *Nature* 333, 742-746.

Kisielow, P., Swat, W., Rocha, B., and von Boehmer, H. (1991). Induction of immunological unresponsiveness in vivo and in vitro by conventional and super-antigens in developing and mature T cells. *Immunol Rev* 122, 69-85.

Klausner, R. D., and Samelson, L. E. (1991). T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell* 64, 875-878.

- Klug, D. B., Carter, C., Crouch, E., Roop, D., Conti, C. J., and Richie, E. R. (1998). Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11822-11827.
- Koller, B. H., Marrack, P., Kappler, J. W., and Smithies, O. (1990). Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8⁺ T cells. *Science* 248, 1227-1230.
- Komori, T., Okada, A., Stewart, V., and Alt, F. W. (1993). Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT- deficient lymphocytes. *Science* 261, 1171-1175.
- Kondo, M., Akashi, K., Domen, J., Sugamura, K., and Weissman, I. L. (1997a). Bcl-2 rescues T lymphopoiesis, but not B or NK cell development, in common gamma chain-deficient mice. *Immunity* 7, 155-162.
- Kondo, M., Weissman, I. L., and Akashi, K. (1997b). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Konig, R., Huang, L. Y., and Germain, R. N. (1992). MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 356, 796-798.
- Koop, B. F., Wilson, R. K., Wang, K., Vernooij, B., Zallwer, D., Kuo, C. L., Seto, D., Toda, M., and Hood, L. (1992). Organization, structure, and function of 95 kb of DNA spanning the murine T-cell receptor C alpha/C delta region. *Genomics* 13, 1209-1230.
- Kraal, G., Weissman, I. L., and Butcher, E. C. (1983). Genetic control of T-cell subset representation in inbred mice. *Immunogenetics* 18, 585-592.
- Krangel, M. S., Hernandez-Munain, C., Lauzurica, P., McMurry, M., Roberts, J. L., and Zhong, X. P. (1998). Developmental regulation of V(D)J recombination at the TCR alpha/delta locus. *Immunol Rev* 165, 131-147.
- Krotkova, A., von Boehmer, H., and Fehling, H. J. (1997). Allelic exclusion in pTalpha-deficient mice: no evidence for cell surface expression of two T cell receptor (TCR)-beta chains, but less efficient inhibition of endogeneous Vbeta--> (D)Jbeta rearrangements in the presence of a functional TCR-beta transgene. *J Exp Med* 186, 767-775.
- Ku, C. C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J., and Marrack, P. (2000). Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288, 675-678.
- Kundig, T. M., Bachmann, M. F., Oehen, S., Hoffmann, U. W., Simard, J. J., Kalberer, C. P., Pircher, H., Ohashi, P. S., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1996). On the role of antigen in maintaining cytotoxic T-cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9716-9723.
- Kuo, C. T., and Leiden, J. M. (1999). Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu Rev Immunol* 17, 149-187.
- Kydd, R., Lundberg, K., Vremec, D., Harris, A. W., and Shortman, K. (1995). Intermediate steps in thymic positive selection. Generation of CD4-8⁺ T cells in culture from CD4⁺8⁺, CD4^{int}8⁺, and CD4⁺8^{int} thymocytes with up-regulated levels of TCR-CD3. *J Immunol* 155, 3806-3814.
- ## L
- La Face, D. M., Couture, C., Anderson, K., Shih, G., Alexander, J., Sette, A., Mustelin, T., Altman, A., and Grey, H. M. (1997). Differential T cell signaling induced by antagonist peptide-MHC complexes and the associated phenotypic responses. *J Immunol* 158, 2057-2064.
- La Gruta, N. L., Driegl, I. R., and Gleeson, P. A. (2000). Peripheral T cell expansion in lymphopenic

- mice results in a restricted T cell repertoire. *Eur J Immunol* 30, 3380-3386.
- Labrecque, N., Whitfield, L. S., Obst, R., Waltzinger, C., Benoist, C., and Mathis, D. (2001). How much TCR does a T cell need? *Immunity* 15, 71-82.
- Lalvani, A., Brookes, R., Hambleton, S., Britton, W. J., Hill, A. V., and McMichael, A. J. (1997). Rapid effector function in CD8⁺ memory T cells. *J Exp Med* 186, 859-865.
- Lam, K.-P., and Rajewsky, K. (1999). B Cell Antigen Receptor Specificity and Surface Density Together Determine B-1 versus B-2 Cell Development. *J Exp Med* 190, 471-478.
- Lanier, L. L. (2001). On guard--activating NK cell receptors. *Nat Immunol* 2, 23-27.
- Laufer, T. M., DeKoning, J., Markowitz, J. S., Lo, D., and Glimcher, L. H. (1996). Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 383, 81-85.
- Lawrence, H. W. (1959). Homograft sensitivity. An expression of the immunologic origins and consequences of individuality. *Physiol Rev* 39, 811-859.
- Le Douarin, N. M., and Jotereau, F. V. (1975). Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J Exp Med* 142, 17-40.
- Leist, T. P., Eppler, M., and Zinkernagel, R. M. (1989). Enhanced virus replication and inhibition of lymphocytic choriomeningitis virus disease in anti-gamma interferon-treated mice. *J Virol* 63, 2813-2819.
- Letourneur, F., and Klausner, R. D. (1991). T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell- receptor zeta family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8905-8909.
- Letourneur, F., and Klausner, R. D. (1992). Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science* 255, 79-82.
- Levelt, C. N., Carsetti, R., and Eichmann, K. (1993). Regulation of thymocyte development through CD3. II. Expression of T cell receptor beta CD3 epsilon and maturation to the CD4⁺8⁺ stage are highly correlated in individual thymocytes. *J Exp Med* 178, 1867-1875.
- Lohman, B. L., and Welsh, R. M. (1998). Apoptotic regulation of T cells and absence of immune deficiency in virus-infected gamma interferon receptor knockout mice. *J Virol* 72, 7815-7821.
- Lorenz, E., Uphoff, D. E., Reid, T. R., and Shelton, E. (1951). Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injection. *J Nat Cancer Inst* 12, 197.
- Lundberg, K., Heath, W., Kontgen, F., Carbone, F. R., and Shortman, K. (1995). Intermediate steps in positive selection: differentiation of CD4⁺8^{int} TCR^{int} thymocytes into CD4⁺8⁺TCR^{hi} thymocytes. *J Exp Med* 181, 1643-1651.
- Lyons, A. B., and Parish, C. R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171, 131-137.

M

- MacDonald, H. R. (2002). Development and selection of NKT cells. *Curr Opin Immunol* 14, 250-254.
- MacDonald, H. R., Pedrazzini, T., Schneider, R., Louis, J. A., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1988). Intrathymic elimination of Mlsa-reactive (V beta 6⁺) cells during neonatal tolerance induction to Mlsa-encoded antigens. *J Exp Med* 167, 2005-2010.
- Mackall, C. L., Hakim, F. T., and Gress, R. E. (1997). Restoration of T-cell homeostasis after T-cell depletion. *Semin Immunol* 9, 339-346.

- Mackay, C. R. (1993). Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 5, 423-427.
- Madrenas, J., Wange, R. L., Wang, J. L., Isakov, N., Samelson, L. E., and Germain, R. N. (1995). Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* 267, 515-518.
- Malissen, M., Gillet, A., Ardouin, L., Bouvier, G., Trucy, J., Ferrier, P., Vivier, E., and Malissen, B. (1995). Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3- epsilon gene. *Embo J* 14, 4641-4653.
- Malissen, M., McCoy, C., Blanc, D., Trucy, J., Devaux, C., Schmitt-Verhulst, A. M., Fitch, F., Hood, L., and Malissen, B. (1986). Direct evidence for chromosomal inversion during T-cell receptor beta- gene rearrangements. *Nature* 319, 28-33.
- Malissen, M., Minard, K., Mjolsness, S., Kronenberg, M., Gorman, J., Hunkapiller, T., Prystowsky, M. B., Yoshikai, Y., Fitch, F., Mak, T. W., and et al. (1984). Mouse T cell antigen receptor: structure and organization of constant and joining gene segments encoding the beta polypeptide. *Cell* 37, 1101-1110.
- Malissen, M., Trucy, J., Jouvin-Marche, E., Cazenave, P. A., Scollay, R., and Malissen, B. (1992). Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol Today* 13, 315-322.
- Mallick, C. A., Dudley, E. C., Viney, J. L., Owen, M. J., and Hayday, A. C. (1993). Rearrangement and diversity of T cell receptor beta chain genes in thymocytes: a critical role for the beta chain in development. *Cell* 73, 513-519.
- Mandel, T. E., Phipps, R. P., Abbot, A., and Tew, J. G. (1980). The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev* 53, 29-59.
- Manjunath, N., Shankar, P., Wan, J., Weninger, W., Crowley, M. A., Hieshima, K., Springer, T. A., Fan, X., Shen, H., Lieberman, J., and von Andrian, U. H. (2001). Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* 108, 871-878.
- Mannie, M. D., Rosser, J. M., and White, G. A. (1995). Autologous rat myelin basic protein is a partial agonist that is converted into a full antagonist upon blockade of CD4. Evidence for the integration of efficacious and nonefficacious signals during T cell antigen recognition. *J Immunol* 154, 2642-2654.
- Maraskovsky, E., O'Reilly, L. A., Teepe, M., Corcoran, L. M., Peschon, J. J., and Strasser, A. (1997). Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor- deficient mice but not in mutant rag-1^{-/-} mice. *Cell* 89, 1011-1019.
- Margolick, J. B., and Donnenberg, A. D. (1997). T-cell homeostasis in HIV-1 infection. *Semin Immunol* 9, 381-388.
- Margulies, D. H. (1999). The major histocompatibility complex. In *Fundamental Immunology* - 4th edition, W. E. Paul, ed. (Lippincott-Raven Publishers), pp. 263-285.
- Maric, M. A., Taylor, M. D., and Blum, J. S. (1994). Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2171-2175.
- Markiewicz, M. A., Girao, C., Opferman, J. T., Sun, J., Hu, Q., Agulnik, A. A., Bishop, C. E., Thompson, C. B., and Ashton-Rickardt, P. G. (1998). Long-term T cell memory requires the surface expression of self- peptide/major histocompatibility complex molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3065-3070.
- Marrack, P., Bender, J., Hildeman, D., Jordan, M., Mitchell, T., Murakami, M., Sakamoto, A., Schaefer, B. C., Swanson, B., and Kappler, J.

- (2000). Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells. *Nat Immunol* 1, 107-111.
- Marrack, P., and Kappler, J. (1997). Positive selection of thymocytes bearing alpha beta T cell receptors. *Curr Opin Immunol* 9, 250-255.
- Martin, W. D., Hicks, G. G., Mendiratta, S. K., Leva, H. I., Ruley, H. E., and Van Kaer, L. (1996). H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection. *Cell* 84, 543-550.
- Matechak, E. O., Killeen, N., Hedrick, S. M., and Fowlkes, B. J. (1996). MHC class II-specific T cells can develop in the CD8 lineage when CD4 is absent. *Immunity* 4, 337-347.
- Matloubian, M., Concepcion, R. J., and Ahmed, R. (1994). CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 68, 8056-8063.
- Matsunaga, M., Seki, K., Mineta, T., and Kimoto, M. (1990). Antigen-reactive T cell clones restricted by mixed isotype A beta d/E alpha d class II molecules. *J Exp Med* 171, 577-582.
- Matsuzaki, Y., Gytoku, J., Ogawa, M., Nishikawa, S., Katsura, Y., Gachelin, G., and Nakauchi, H. (1993). Characterization of c-kit positive intrathymic stem cells that are restricted to lymphoid differentiation. *J Exp Med* 178, 1283-1292.
- Max, E. E. (1999). Immunoglobulins: molecular genetics. In *Fundamental Immunology - 4th edition*, W. E. Paul, ed. (Lippincott-Raven Publishers), pp. 111-182.
- McBlane, J. F., van Gent, D. C., Ramsden, D. A., Romeo, C., Cuomo, C. A., Gellert, M., and Oettinger, M. A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83, 387-395.
- McConkey, D. J., Jondal, M., and Orrenius, S. (1992). Cellular signaling in thymocyte apoptosis. *Semin Immunol* 4, 371-377.
- McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J., and Maki, R. A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J* 15, 5647-5658.
- McMahan, C. J., and Fink, P. J. (1998). RAG reexpression and DNA recombination at T cell receptor loci in peripheral CD4+ T cells. *Immunity* 9, 637-647.
- Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897-906.
- Medvinsky, A. L., Samoylina, N. L., Muller, A. M., and Dzierzak, E. A. (1993). An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364, 64-67.
- Merkenschlager, M., Benoist, C., and Mathis, D. (1994). Evidence for a single-niche model of positive selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11694-11698.
- Metkar, S. S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S. M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J. A., and Froelich, C. J. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B- serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* 16, 417-428.
- Miller, J. F. (1979). Experimental thymology has come of age. *Thymus* 1, 3-25.
- Miller, J. F. A. P. (1961). Immunological function of the thymus. *Lancet*, 748-749.
- Miller, R. A., and Stutman, O. (1984). T cell repopulation from functionally restricted splenic progenitors: 10,000-fold expansion documented by using limiting dilution analyses. *J Immunol* 133, 2925-2932.

- Miyazaki, T., Wolf, P., Tourne, S., Waltzinger, C., Dierich, A., Barois, N., Ploegh, H., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* 84, 531-541.
- Mohri, H., Perelson, A. S., Tung, K., Ribeiro, R. M., Ramratnam, B., Markowitz, M., Kost, R., Hurley, A., Weinberger, L., Cesar, D., *et al.* (2001). Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy. *J Exp Med* 194, 1277-1287.
- Mombaerts, P., Clarke, A. R., Rudnicki, M. A., Iacomini, J., Itohara, S., Lafaille, J. J., Wang, L., Ichikawa, Y., Jaenisch, R., Hooper, M. L., and *et al.* (1992a). Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* 360, 225-231.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V. E. (1992b). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869-877.
- Monroe, R. J., Seidl, K. J., Gaertner, F., Han, S., Chen, F., Sekiguchi, J., Wang, J., Ferrini, R., Davidson, L., Kelsoe, G., and Alt, F. W. (1999). RAG2:GFP knockin mice reveal novel aspects of RAG2 expression in primary and peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 11, 201-212.
- Moran, M., and Miceli, M. C. (1998). Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity* 9, 787-796.
- Morgan, B., Sun, L., Avitahl, N., Andrikopoulos, K., Ikeda, T., Gonzales, E., Wu, P., Neben, S., and Georgopoulos, K. (1997). Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *Embo J* 16, 2004-2013.
- Morrison, L. A., Lukacher, A. E., Braciale, V. L., Fan, D. P., and Braciale, T. J. (1986). Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med* 163, 903-921.
- Morrison, S. J., Prowse, K. R., Ho, P., and Weissman, I. L. (1996). Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity* 5, 207-216.
- Moskophidis, D., Bategay, M., Bruendler, M. A., Laine, E., Gresser, I., and Zinkernagel, R. M. (1994). Resistance of lymphocytic choriomeningitis virus to alpha/beta interferon and to gamma interferon. *J Virol* 68, 1951-1955.
- Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H., and Zinkernagel, R. M. (1993). Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 362, 758-761.
- Mullbacher, A. (1994). The long-term maintenance of cytotoxic T cell memory does not require persistence of antigen. *J Exp Med* 179, 317-321.
- Muller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1, 291-301.
- Murali-Krishna, K., Altman, J. D., Suresh, M., Sourdive, D. J., Zajac, A. J., Miller, J. D., Slansky, J., and Ahmed, R. (1998). Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8, 177-187.
- Murali-Krishna, K., Lau, L. L., Sambhara, S., Lemonnier, F., Altman, J., and Ahmed, R. (1999). Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286, 1377-1381.
- Murphy, K. M., Heimberger, A. B., and Loh, D. Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{lo} thymocytes in vivo. *Science* 250, 1720-1723.
- Murray, R., Suda, T., Wrighton, N., Lee, F., and Zlotnik, A. (1989). IL-7 is a growth and

maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets. *Int Immunol* 1, 526-531.

N

Nagaoka, H., Yu, W., and Nussenzweig, M. C. (2000). Regulation of RAG expression in developing lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 12, 187-190.

Natarajan, K., Burstyn, D., and Zauderer, M. (1992). Major histocompatibility complex determinants select T-cell receptor alpha chain variable region dominance in a peptide-specific response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8874-8878.

Nemazee, D. (2000). Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 18, 19-51.

Nichogiannopoulou, A., Trevisan, M., Neben, S., Friedrich, C., and Georgopoulos, K. (1999). Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med* 190, 1201-1214.

Nikolic-Zugic, J., and Bevan, M. J. (1990). Role of self-peptides in positively selecting the T-cell repertoire. *Nature* 344, 65-67.

Norment, A. M., and Bevan, M. J. (2000). Role of chemokines in thymocyte development. *Semin Immunol* 12, 445-455.

Norment, A. M., Bogatzki, L. Y., Gantner, B. N., and Bevan, M. J. (2000). Murine CCR9, a chemokine receptor for thymus-expressed chemokine that is up-regulated following pre-TCR signaling. *J Immunol* 164, 639-648.

Norment, A. M., Salter, R. D., Parham, P., Engelhard, V. H., and Littman, D. R. (1988). Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature* 336, 79-81.

O

Oehen, S., Waldner, H., Kundig, T. M., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1992). Antivirally protective cytotoxic T cell memory to lymphocytic

choriomeningitis virus is governed by persisting antigen. *J Exp Med* 176, 1273-1281.

Ohashi, P. S., Pircher, H., Burki, K., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1990). Distinct sequence of negative or positive selection implied by thymocyte T-cell receptor densities. *Nature* 346, 861-863.

Okada, H., Kobune, F., Sato, T. A., Kohama, T., Takeuchi, Y., Abe, T., Takayama, N., Tsuchiya, T., and Tashiro, M. (2000). Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol* 145, 905-920.

Okamura, R. M., Sigvardsson, M., Galceran, J., Verbeek, S., Clevers, H., and Grosschedl, R. (1998). Redundant regulation of T cell differentiation and TCRalpha gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity* 8, 11-20.

Okazaki, K., Davis, D. D., and Sakano, H. (1987). T cell receptor beta gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell* 49, 477-485.

Oldstone, M. B. (1997). How viruses escape from cytotoxic T lymphocytes: molecular parameters and players [published erratum appears in *Virology* 1997 Nov 10;237(1):166]. *Virology* 234, 179-185.

Oldstone, M. B., Dixon, F. J., Mitchell, G. F., and McDevitt, H. O. (1973). Histocompatibility-linked genetic control of disease susceptibility. Murine lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Exp Med* 137, 1201-1212.

Oosterwegel, M., van de Wetering, M., Dooijes, D., Klomp, L., Winoto, A., Georgopoulos, K., Meijlink, F., and Clevers, H. (1991). Cloning of murine TCF-1, a T cell-specific transcription factor interacting with functional motifs in the CD3-epsilon and T cell receptor alpha enhancers. *J Exp Med* 173, 1133-1142.

Oosterwegel, M., van de Wetering, M., Timmerman, J., Kruisbeek, A., Destree, O., Meijlink, F., and Clevers, H. (1993). Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development* 118, 439-448.

Opferman, J. T., Ober, B. T., and Ashton-Rickardt, P. G. (1999). Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science* 283, 1745-1748.

Orloff, D. G., Frank, S. J., Robey, F. A., Weissman, A. M., and Klausner, R. D. (1989). Biochemical characterization of the eta chain of the T-cell receptor. A unique subunit related to zeta. *J Biol Chem* 264, 14812-14817.

Owens, T., Fazekas de St Groth, B., and Miller, J. F. (1987). Coaggregation of the T-cell receptor with CD4 and other T-cell surface molecules enhances T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9209-9213.

Oxenius, A., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1998). Comparison of activation versus induction of unresponsiveness of virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells upon acute versus persistent viral infection. *Immunity* 9, 449-457.

P

Padovan, E., Casorati, G., Dellabona, P., Meyer, S., Brockhaus, M., and Lanzavecchia, A. (1993). Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science* 262, 422-424.

Padovan, E., Giachino, C., Cella, M., Valitutti, S., Acuto, O., and Lanzavecchia, A. (1995). Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor beta chains: implications for the mechanism of allelic exclusion. *J Exp Med* 181, 1587-1591.

Page, D. M., Alexander, J., Snoke, K., Appella, E., Sette, A., Hedrick, S. M., and Grey, H. M. (1994). Negative selection of CD4⁺ CD8⁺ thymocytes by

T-cell receptor peptide antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4057-4061.

Pandolfi, P. P., Roth, M. E., Karis, A., Leonard, M. W., Dzierzak, E., Grosveld, F. G., Engel, J. D., and Lindenbaum, M. H. (1995). Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet* 11, 40-44.

Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casrouge, A., Zoller, M., and Kourilsky, P. (1993). The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4319-4323.

Pascolo, S., Bervas, N., Ure, J. M., Smith, A. G., Lemonnier, F. A., and Perarnau, B. (1997). HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med* 185, 2043-2051.

Pawlowski, T., Elliott, J. D., Loh, D. Y., and Staerz, U. D. (1993). Positive selection of T lymphocytes on fibroblasts. *Nature* 364, 642-645.

Penit, C., Lucas, B., and Vasseur, F. (1995). Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J Immunol* 154, 5103-5113.

Perarnau, B., Saron, M. F., San Martin, B. R., Bervas, N., Ong, H., Soloski, M. J., Smith, A. G., Ure, J. M., Gairin, J. E., and Lemonnier, F. A. (1999). Single H2Kb, H2Db and double H2KbDb knockout mice: peripheral CD8⁺ T cell repertoire and anti-lymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses. *Eur J Immunol* 29, 1243-1252.

Pereira, P., and Rocha, B. (1991). Post-thymic in vivo expansion of mature alpha beta T cells. *Int Immunol* 3, 1077-1080.

- Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., and et al. (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180, 1955-1960.
- Peters, P. J., Neefjes, J. J., Oorschot, V., Ploegh, H. L., and Geuze, H. J. (1991). Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 349, 669-676.
- Philpott, K. L., Viney, J. L., Kay, G., Rastan, S., Gardiner, E. M., Chae, S., Hayday, A. C., and Owen, M. J. (1992). Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor alpha beta-expressing cells. *Science* 256, 1448-1452.
- Picker, L. J., and Siegelman, M. H. (1999). Lymphoid tissues and organs. In *Fundamental Immunology - 4th edition*, W. E. Paul, ed. (Lippincott-Raven Publishers), pp. 479-531.
- Pircher, H., Baenziger, J., Schilham, M., Sado, T., Kamisaku, H., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1987). Characterization of virus-specific cytotoxic T cell clones from allogeneic bone marrow chimeras. *Eur J Immunol* 17, 159-166.
- Pircher, H., Burki, K., Lang, R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1989). Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 342, 559-561.
- Pircher, H., Moskophidis, D., Rohrer, U., Burki, K., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1990). Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants in vivo. *Nature* 346, 629-633.
- Pivniouk, V. I., and Geha, R. S. (2000). The role of SLP-76 and LAT in lymphocyte development. *Curr Opin Immunol* 12, 173-178.
- Polic, B., Kunkel, D., Scheffold, A., and Rajewsky, K. (2001). How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8744-8749.
- Potocnik, A. J. (2000). Role of beta 1 integrin for hemato-lymphopoiesis in mouse development. *Curr Top Microbiol Immunol* 251, 43-50.
- Priatel, J. J., Utting, O., and Teh, H. S. (2001). TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J Immunol* 167, 6188-6194.
- Prlic, M., and Jameson, S. C. (2002). Homeostatic expansion versus antigen-driven proliferation: common ends by different means? *Microbes Infect* 4, 531-537.
- Prockop, S., and Petrie, H. T. (2000). Cell migration and the anatomic control of thymocyte precursor differentiation. *Semin Immunol* 12, 435-444.
- Puglielli, M. T., Zajac, A. J., van der Most, R. G., Dzuris, J. L., Sette, A., Altman, J. D., and Ahmed, R. (2001). In vivo selection of a lymphocytic choriomeningitis virus variant that affects recognition of the GP33-43 epitope by H-2Db but not H-2Kb. *J Virol* 75, 5099-5107.
- Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., Lee, J. Y., Kadesch, T., Hardy, R. R., Aster, J. C., and Pear, W. S. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11, 299-308.
- Punt, J. A., Suzuki, H., Granger, L. G., Sharrow, S. O., and Singer, A. (1996). Lineage commitment in the thymus: only the most differentiated (TCR β hi) subset of CD4+CD8+ thymocytes has selectively terminated CD4 or CD8 synthesis. *J Exp Med* 184, 2091-2099.
- Q**
- Quong, M. W., Romanow, W. J., and Murre, C. (2002). E protein function in lymphocyte development. *Annu Rev Immunol* 20, 301-322.

R

- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* *10*, 547-558.
- Rahemtulla, A., Fung-Leung, W. P., Schilham, M. W., Kundig, T. M., Sambhara, S. R., Narendran, A., Arabian, A., Wakeham, A., Paige, C. J., Zinkernagel, R. M., and et al. (1991). Normal development and function of CD8⁺ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* *353*, 180-184.
- Rathmell, J. C., Farkash, E. A., Gao, W., and Thompson, C. B. (2001). IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol* *167*, 6869-6876.
- Raulet, D. H., Garman, R. D., Saito, H., and Tonegawa, S. (1985). Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature* *314*, 103-107.
- Reich, Z., Boniface, J. J., Lyons, D. S., Borochoy, N., Wachtel, E. J., and Davis, M. M. (1997). Ligand-specific oligomerization of T-cell receptor molecules. *Nature* *387*, 617-620.
- Reis e Sousa, C., Levine, E. H., and Germain, R. N. (1996). Partial signaling by CD8⁺ T cells in response to antagonist ligands. *J Exp Med* *184*, 149-157.
- Rellahan, B. L., Jones, L. A., Kruisbeek, A. M., Fry, A. M., and Matis, L. A. (1990). In vivo induction of anergy in peripheral V beta 8⁺ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J Exp Med* *172*, 1091-1100.
- Robey, E., Chang, D., Itano, A., Cado, D., Alexander, H., Lans, D., Weinmaster, G., and Salmon, P. (1996). An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell* *87*, 483-492.
- Robey, E., and Fowlkes, B. J. (1998). The alpha beta versus gamma delta T-cell lineage choice. *Curr Opin Immunol* *10*, 181-187.
- Rocha, B., Dautigny, N., and Pereira, P. (1989). Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *Eur J Immunol* *19*, 905-911.
- Rocha, B., Freitas, A. A., and Coutinho, A. A. (1983). Population dynamics of T lymphocytes. Renewal rate and expansion in the peripheral lymphoid organs. *J Immunol* *131*, 2158-2164.
- Rocha, B., Grandien, A., and Freitas, A. A. (1995). Anergy and exhaustion are independent mechanisms of peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* *181*, 993-1003.
- Rocha, B., Tanchot, C., and Von Boehmer, H. (1993). Clonal anergy blocks in vivo growth of mature T cells and can be reversed in the absence of antigen. *J Exp Med* *177*, 1517-1521.
- Rocha, B., and von Boehmer, H. (1991). Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* *251*, 1225-1228.
- Rocha, B. B. (1987). Population kinetics of precursors of IL 2-producing peripheral T lymphocytes: evidence for short life expectancy, continuous renewal, and post-thymic expansion. *J Immunol* *139*, 365-372.
- Rock, E. P., Sibbald, P. R., Davis, M. M., and Chien, Y. H. (1994). CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J Exp Med* *179*, 323-328.
- Rodewald, H. R., Kretzschmar, K., Swat, W., and Takeda, S. (1995). Intrathymically expressed c-kit ligand (stem cell factor) is a major factor driving expansion of very immature thymocytes in vivo. *Immunity* *3*, 313-319.
- Rodewald, H. R., Kretzschmar, K., Takeda, S., Hohl, C., and Dessing, M. (1994). Identification of pro-thymocytes in murine fetal blood: T lineage

commitment can precede thymus colonization. *Embo J* 13, 4229-4240.

Rodewald, H. R., Ogawa, M., Haller, C., Waskow, C., and DiSanto, J. P. (1997). Pro-thymocyte expansion by c-kit and the common cytokine receptor gamma chain is essential for repertoire formation. *Immunity* 6, 265-272.

Ropke, C., Van Soest, P., Platenburg, P. P., and Van Ewijk, W. (1995). A common stem cell for murine cortical and medullary thymic epithelial cells? *Dev Immunol* 4, 149-156.

Rosado, M., and Freitas, A. A. (2000). B cell positive selection by self-antigens and counter-selection of dual BCR cells in the peripheral B cell pools. *Eur J Immunol* 30, 2181-2190.

Rowen, L., Koop, B. F., and Hood, L. (1996). The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 272, 1755-1762.

Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Hong, S. C., Barlow, A., and Janeway, C. A., Jr. (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353, 622-627.

S

Saint-Ruf, C., Panigada, M., Azogui, O., Debey, P., von Boehmer, H., and Grassi, F. (2000). Different initiation of pre-TCR and gammadeltaTCR signalling. *Nature* 406, 524-527.

Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H. J., and von Boehmer, H. (1994). Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 266, 1208-1212.

Saito, T., Sussman, J. L., Ashwell, J. D., and Germain, R. N. (1989). Marked differences in the efficiency of expression of distinct alpha beta T cell receptor heterodimers. *J Immunol* 143, 3379-3384.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2

receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.

Samelson, L. E., Harford, J. B., and Klausner, R. D. (1985). Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* 43, 223-231.

Sansoni, P., Cossarizza, A., Brianti, V., Fagnoni, F., Snelli, G., Monti, D., Marcato, A., Passeri, G., Ortolani, C., Forti, E., and et al. (1993). Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood* 82, 2767-2773.

Sarukhan, A., Garcia, C., Lanoue, A., and von Boehmer, H. (1998). Allelic inclusion of T cell receptor alpha genes poses an autoimmune hazard due to low-level expression of autospecific receptors. *Immunity* 8, 563-570.

Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., and Lefrancois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1, 426-432.

Schober, S. L., Kuo, C. T., Schluns, K. S., Lefrancois, L., Leiden, J. M., and Jameson, S. C. (1999). Expression of the transcription factor lung Kruppel-like factor is regulated by cytokines and correlates with survival of memory T cells in vitro and in vivo. *J Immunol* 163, 3662-3667.

Schonrich, G., Kalinke, U., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A. M., Malissen, B., Hammerling, G. J., and Arnold, B. (1991). Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 65, 293-304.

Schreuder, G. M., Hurley, C. K., Marsh, S. G., Lau, M., Maier, M., Kollman, C., and Noreen, H.

- (1999). The HLA dictionary 1999: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Hum Immunol* 60, 1157-1181.
- Scollay, R., and Godfrey, D. I. (1995). Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips? *Immunol Today* 16, 268-273; discussion 273-264.
- Scott, E. W., Fisher, R. C., Olson, M. C., Kehrli, E. W., Simon, M. C., and Singh, H. (1997). PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity* 6, 437-447.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., and Ohashi, P. S. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 17, 829-874.
- Sebzda, E., Wallace, V. A., Mayer, J., Yeung, R. S., Mak, T. W., and Ohashi, P. S. (1994). Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science* 263, 1615-1618.
- Selin, L. K., Lin, M. Y., Kraemer, K. A., Pardoll, D. M., Schneck, J. P., Varga, S. M., Santolucito, P. A., Pinto, A. K., and Welsh, R. M. (1999). Attrition of T cell memory: selective loss of LCMV epitope-specific memory CD8 T cells following infections with heterologous viruses. *Immunity* 11, 733-742.
- Sempowski, G. D., Gooding, M. E., Liao, H. X., Le, P. T., and Haynes, B. F. (2002). T cell receptor excision circle assessment of thymopoiesis in aging mice. *Mol Immunol* 38, 841-848.
- Sha, W. C., Nelson, C. A., Newberry, R. D., Kranz, D. M., Russell, J. H., and Loh, D. Y. (1988). Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 335, 271-274.
- Sherman, M. A., Weber, D. A., and Jensen, P. E. (1995). DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* 3, 197-205.
- Shinkai, Y., Koyasu, S., Nakayama, K., Murphy, K. M., Loh, D. Y., Reinherz, E. L., and Alt, F. W. (1993). Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* 259, 822-825.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., and et al. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867.
- Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G. J., and Scollay, R. (1990). The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol* 2, 3-12.
- Shortman, K., Vremec, D., and Egerton, M. (1991). The kinetics of T cell antigen receptor expression by subgroups of CD4+8+ thymocytes: delineation of CD4+8+3(2+) thymocytes as post-selection intermediates leading to mature T cells. *J Exp Med* 173, 323-332.
- Shortman, K., and Wu, L. (1996). Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol* 14, 29-47.
- Shresta, S., Pham, C. T., Thomas, D. A., Graubert, T. A., and Ley, T. J. (1998). How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 10, 581-587.
- Singer, A. (2002). New perspectives on a developmental dilemma: the kinetic signaling model and the importance of signal duration for the CD4/CD8 lineage decision. *Curr Opin Immunol* 14, 207-215.
- Sloan, V. S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., and Zaller, D. M. (1995). Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 375, 802-806.
- Smyth, L. A., Williams, O., Huby, R. D., Norton, T., Acuto, O., Ley, S. C., and Kioussis, D. (1998).

Altered peptide ligands induce quantitatively but not qualitatively different intracellular signals in primary thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8193-8198.

Soares, M. V., Borthwick, N. J., Maini, M. K., Janossy, G., Salmon, M., and Akbar, A. N. (1998). IL-7-dependent extrathymic expansion of CD45RA⁺ T cells enables preservation of a naive repertoire. *J Immunol* 161, 5909-5917.

Spain, L. M., Jorgensen, J. L., Davis, M. M., and Berg, L. J. (1994). A peptide antigen antagonist prevents the differentiation of T cell receptor transgenic thymocytes. *J Immunol* 152, 1709-1717.

Speiser, D. E., Pircher, H., Ohashi, P. S., Kyburz, D., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1992). Clonal deletion induced by either radioresistant thymic host cells or lymphohemopoietic donor cells at different stages of class I-restricted T cell ontogeny. *J Exp Med* 175, 1277-1283.

Sprent, J. (1993). Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 5, 433-438.

Sprent, J. (1997). Immunological memory. *Curr Opin Immunol* 9, 371-379.

Sprent, J., Kosaka, H., Gao, E. K., Surh, C. D., and Webb, S. R. (1993). Intrathymic and extrathymic tolerance in bone marrow chimeras. *Immunol Rev* 133, 151-176.

Sprent, J., and Tough, D. F. (2001). T cell death and memory. *Science* 293, 245-248.

Steinmann, G. G., Klaus, B., and Muller-Hermelink, H. K. (1985). The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol* 22, 563-575.

Straus, D. B., and Weiss, A. (1992). Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70, 585-593.

Surh, C. D., and Sprent, J. (1994). T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372, 100-103.

Surh, C. D., and Sprent, J. (2000). Homeostatic T cell proliferation: how far can T cells be activated to self-ligands? *J Exp Med* 192, F9-F14.

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.

Swain, S. L., Bradley, L. M., Croft, M., Tonkonogy, S., Atkins, G., Weinberg, A. D., Duncan, D. D., Hedrick, S. M., Dutton, R. W., and Huston, G. (1991). Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. *Immunol Rev* 123, 115-144.

Swain, S. L., Hu, H., and Huston, G. (1999). Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* 286, 1381-1383.

T

Takeda, S., Shimizu, T., and Rodewald, H. R. (1997). Interactions between c-kit and stem cell factor are not required for B- cell development in vivo. *Blood* 89, 518-525.

Tanaka, T., Kitamura, F., Nagasaka, Y., Kuida, K., Suwa, H., and Miyasaka, M. (1993). Selective long-term elimination of natural killer cells in vivo by an anti-interleukin 2 receptor beta chain monoclonal antibody in mice. *J Exp Med* 178, 1103-1107.

Tanchot, C., Guillaume, S., Delon, J., Bourgeois, C., Franzke, A., Sarukhan, A., Trautmann, A., and Rocha, B. (1998). Modifications of CD8⁺ T cell function during in vivo memory or tolerance induction. *Immunity* 8, 581-590.

Tanchot, C., Le Campion, A., Martin, B., Leament, S., Dautigny, N., and Lucas, B. (2002). Conversion of naive T cells to a memory-like

- phenotype in lymphopenic hosts is not related to a homeostatic mechanism that fills the peripheral naive T cell pool. *J Immunol* *168*, 5042-5046.
- Tanchot, C., Lemonnier, F. A., Perarnau, B., Freitas, A. A., and Rocha, B. (1997a). Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* *276*, 2057-2062.
- Tanchot, C., and Rocha, B. (1995). The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8⁺ T cell pools. *Eur J Immunol* *25*, 2127-2136.
- Tanchot, C., and Rocha, B. (1997). Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output. *J Exp Med* *186*, 1099-1106.
- Tanchot, C., Rosado, M. M., Agenes, F., Freitas, A. A., and Rocha, B. (1997b). Lymphocyte homeostasis. *Semin Immunol* *9*, 331-337.
- Tavian, M., Coulombel, L., Luton, D., Clemente, H. S., Dieterlen-Lievre, F., and Peault, B. (1996). Aorta-associated CD34⁺ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood* *87*, 67-72.
- Teague, T. K., Schaefer, B. C., Hildeman, D., Bender, J., Mitchell, T., Kappler, J. W., and Marrack, P. (2000). Activation-induced inhibition of interleukin 6-mediated T cell survival and signal transducer and activator of transcription 1 signaling. *J Exp Med* *191*, 915-926.
- Teh, H. S., Kisielow, P., Scott, B., Kishi, H., Uematsu, Y., Bluthmann, H., and von Boehmer, H. (1988). Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T- cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* *335*, 229-233.
- Terrence, K., Pavlovich, C. P., Matechak, E. O., and Fowlkes, B. J. (2000). Premature expression of T cell receptor (TCR)alphabeta suppresses TCRgammadelta gene rearrangement but permits development of gammadelta lineage T cells. *J Exp Med* *192*, 537-548.
- Thompson, S. D., Pelkonen, J., and Hurwitz, J. L. (1990). First T cell receptor alpha gene rearrangements during T cell ontogeny skew to the 5' region of the J alpha locus. *J Immunol* *145*, 2347-2352.
- Thomsen, A. R., Johansen, J., Marker, O., and Christensen, J. P. (1996). Exhaustion of CTL memory and recrudescence of viremia in lymphocytic choriomeningitis virus-infected MHC class II-deficient mice and B cell-deficient mice. *J Immunol* *157*, 3074-3080.
- Ting, C. N., Olson, M. C., Barton, K. P., and Leiden, J. M. (1996). Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* *384*, 474-478.
- Tissot, A. C., Ciatto, C., Mittl, P. R., Grutter, M. G., and Pluckthun, A. (2000). Viral escape at the molecular level explained by quantitative T-cell receptor/peptide/MHC interactions and the crystal structure of a peptide/MHC complex. *J Mol Biol* *302*, 873-885.
- Tomita, K., Hattori, M., Nakamura, E., Nakanishi, S., Minato, N., and Kageyama, R. (1999). The bHLH gene *Hes1* is essential for expansion of early T cell precursors. *Genes Dev* *13*, 1203-1210.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* *302*, 575-581.
- Tough, D. F., Borrow, P., and Sprent, J. (1996). Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* *272*, 1947-1950.
- Tough, D. F., and Sprent, J. (1994). Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med* *179*, 1127-1135.
- Townsend, A. R., Rothbard, J., Gotch, F. M., Bahadur, G., Wraith, D., and McMichael, A. J. (1986). The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* *44*, 959-968.

Tulp, A., Verwoerd, D., Dobberstein, B., Ploegh, H. L., and Pieters, J. (1994). Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature* 369, 120-126.

Tuma, R. A., and Pamer, E. G. (2002). Homeostasis of naive, effector and memory CD8 T cells. *Curr Opin Immunol* 14, 348-353.

Tumpey, T. M., Lu, X., Morken, T., Zaki, S. R., and Katz, J. M. (2000). Depletion of lymphocytes and diminished cytokine production in mice infected with a highly virulent influenza A (H5N1) virus isolated from humans. *J Virol* 74, 6105-6116.

Turka, L. A., Schatz, D. G., Oettinger, M. A., Chun, J. J., Gorka, C., Lee, K., McCormack, W. T., and Thompson, C. B. (1991). Thymocyte expression of RAG-1 and RAG-2: termination by T cell receptor cross-linking. *Science* 253, 778-781.

Turpen, J. B., Kelley, C. M., Mead, P. E., and Zon, L. I. (1997). Bipotential primitive-definitive hematopoietic progenitors in the vertebrate embryo. *Immunity* 7, 325-334.

U

Uematsu, Y., Ryser, S., Dembic, Z., Borgulya, P., Krimpenfort, P., Berns, A., von Boehmer, H., and Steinmetz, M. (1988). In transgenic mice the introduced functional T cell receptor beta gene prevents expression of endogenous beta genes. *Cell* 52, 831-841.

Ueno, T., Hara, K., Willis, M. S., Malin, M. A., Hopken, U. E., Gray, D. H., Matsushima, K., Lipp, M., Springer, T. A., Boyd, R. L., *et al.* (2002). Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus. *Immunity* 16, 205-218.

V

Vacchio, M. S., and Ashwell, J. D. (1997). Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-

specific positive selection. *J Exp Med* 185, 2033-2038.

Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H., and Lanzavecchia, A. (1995a). Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J Exp Med* 181, 577-584.

Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E., and Lanzavecchia, A. (1995b). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375, 148-151.

van der Merwe, P. A. (2002). Formation and function of the immunological synapse. *Curr Opin Immunol* 14, 293-298.

van Ewijk, W. (1991). T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu Rev Immunol* 9, 591-615.

van Gent, D. C., Hiom, K., Paull, T. T., and Gellert, M. (1997). Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins. *Embo J* 16, 2665-2670.

Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P. G., Ploegh, H. L., and Tonegawa, S. (1992). TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8⁺ T cells. *Cell* 71, 1205-1214.

van Kooyk, Y., van de Wiel-van Kemenade, P., Weder, P., Kuijpers, T. W., and Figdor, C. G. (1989). Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature* 342, 811-813.

van Meerwijk, J. P., and Germain, R. N. (1993). Development of mature CD8⁺ thymocytes: selection rather than instruction? *Science* 261, 911-915.

Van Vliet, E., Jenkinson, E. J., Kingston, R., Owen, J. J., and Van Ewijk, W. (1985). Stromal cell types in the developing thymus of the normal and nude mouse embryo. *Eur J Immunol* 15, 675-681.

Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A., and Rocha, B. (2000). Response of

naive and memory CD8⁺ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat Immunol* 1, 47-53.

Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., and Bolen, J. B. (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 55, 301-308.

Vella, A., Teague, T. K., Ihle, J., Kappler, J., and Marrack, P. (1997). Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med* 186, 325-330.

Vicari, A. P., Figueroa, D. J., Hedrick, J. A., Foster, J. S., Singh, K. P., Menon, S., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Bacon, K. B., and Zlotnik, A. (1997). TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 7, 291-301.

Viret, C., Wong, F. S., and Janeway, C. A., Jr. (1999). Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity* 10, 559-568.

von Boehmer, H. (1990). Developmental biology of T cells in T cell-receptor transgenic mice. *Annu Rev Immunol* 8, 531-556.

von Boehmer, H., Aifantis, I., Azogui, O., Feinberg, J., Saint-Ruf, C., Zober, C., Garcia, C., and Buer, J. (1998). Crucial function of the pre-T-cell receptor (TCR) in TCR beta selection, TCR beta allelic exclusion and alpha beta versus gamma delta lineage commitment. *Immunol Rev* 165, 111-119.

von Boehmer, H., and Hafen, K. (1993). The life span of naive alpha/beta T cells in secondary lymphoid organs. *J Exp Med* 177, 891-896.

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

von Herrath, M. G., Yokoyama, M., Dockter, J., Oldstone, M. B., and Whitton, J. L. (1996). CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. *J Virol* 70, 1072-1079.

Vukmanovic, S., Grandea, A. G., 3rd, Faas, S. J., Knowles, B. B., and Bevan, M. J. (1992). Positive selection of T-lymphocytes induced by intrathymic injection of a thymic epithelial cell line. *Nature* 359, 729-732.

W

Wallis, V. J., Leuchars, E., Chaudhuri, M., and Davies, A. J. (1979). Studies on hyperlymphoid mice. *Immunology* 38, 163-171.

Wang, R., Wang-Zhu, Y., and Grey, H. (2002). Interactions between double positive thymocytes and high affinity ligands presented by cortical epithelial cells generate double negative thymocytes with T cell regulatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2181-2186.

Webb, L. M., Foxwell, B. M., and Feldmann, M. (1999). Putative role for interleukin-7 in the maintenance of the recirculating naive CD4⁺ T-cell pool. *Immunology* 98, 400-405.

Webb, S., Morris, C., and Sprent, J. (1990). Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 63, 1249-1256.

Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., Hahn, B. H., and et

al. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373, 117-122.

Weninger, W., Crowley, M. A., Manjunath, N., and von Andrian, U. H. (2001). Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J Exp Med* 194, 953-966.

Wiest, D. L., Yuan, L., Jefferson, J., Benveniste, P., Tsokos, M., Klausner, R. D., Glimcher, L. H., Samelson, L. E., and Singer, A. (1993). Regulation of T cell receptor expression in immature CD4+CD8+ thymocytes by p56lck tyrosine kinase: basis for differential signaling by CD4 and CD8 in immature thymocytes expressing both coreceptor molecules. *J Exp Med* 178, 1701-1712.

Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F. W. (1995). Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3, 521-530.

Williams, O., Tanaka, Y., Bix, M., Murdjeva, M., Littman, D. R., and Kiousis, D. (1996). Inhibition of thymocyte negative selection by T cell receptor antagonist peptides. *Eur J Immunol* 26, 532-538.

Wilson, A., Held, W., and MacDonald, H. R. (1994). Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes. *J Exp Med* 179, 1355-1360.

Winoto, A., Mjolsness, S., and Hood, L. (1985). Genomic organization of the genes encoding mouse T-cell receptor alpha-chain. *Nature* 316, 832-836.

Wu, L., Antica, M., Johnson, G. R., Scollay, R., and Shortman, K. (1991a). Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J Exp Med* 174, 1617-1627.

Wu, L., Li, C. L., and Shortman, K. (1996). Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med* 184, 903-911.

Wu, L., Scollay, R., Egerton, M., Pearse, M., Spangrude, G. J., and Shortman, K. (1991b). CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature* 349, 71-74.

Wu, T. S., Lee, J. M., Lai, Y. G., Hsu, J. C., Tsai, C. Y., Lee, Y. H., and Liao, N. S. (2002). Reduced Expression of Bcl-2 in CD8(+) T Cells Deficient in the IL-15 Receptor alpha-Chain. *J Immunol* 168, 705-712.

Wurbel, M. A., Philippe, J. M., Nguyen, C., Victorero, G., Freeman, T., Wooding, P., Miazek, A., Mattei, M. G., Malissen, M., Jordan, B. R., *et al.* (2000). The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol* 30, 262-271.

X

Xu, Y., Davidson, L., Alt, F. W., and Baltimore, D. (1996). Function of the pre-T-cell receptor alpha chain in T-cell development and allelic exclusion at the T-cell receptor beta locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2169-2173.

Y

Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Watase, T., Busch, D. H., Pamer, E. G., Kuwano, H., and Yoshikai, Y. (2002). Overexpression of IL-15 In Vivo Increases Antigen-Driven Memory CD8(+) T Cells Following a Microbe Exposure. *J Immunol* 168, 1198-1203.

Yannoutsos, N., Wilson, P., Yu, W., Chen, H. T., Nussenzweig, A., Petrie, H., and Nussenzweig, M. C. (2001). The role of recombination activating gene (RAG) reinduction in thymocyte development in vivo. *J Exp Med* 194, 471-480.

Yasutomo, K., Doyle, C., Miele, L., Fuchs, C., and Germain, R. N. (2000a). The duration of antigen

receptor signalling determines CD4⁺ versus CD8⁺ T-cell lineage fate. *Nature* *404*, 506-510.

Yasutomo, K., Lucas, B., and Germain, R. N. (2000b). 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.

York, I. A., and Rock, K. L. (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* *14*, 369-396.

Youn, B. S., Kim, C. H., Smith, F. O., and Broxmeyer, H. E. (1999). TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor. *Blood* *94*, 2533-2536.

Yu, W., Misulovin, Z., Suh, H., Hardy, R. R., Jankovic, M., Yannoutsos, N., and Nussenzweig, M. C. (1999). Coordinate regulation of RAG1 and RAG2 by cell type-specific DNA elements 5' of RAG2. *Science* *285*, 1080-1084.

Z

Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. J., Suresh, M., Altman, J. D., and Ahmed, R. (1998a). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* *188*, 2205-2213.

Zajac, A. J., Murali-Krishna, K., Blattman, J. N., and Ahmed, R. (1998b). Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Curr Opin Immunol* *10*, 444-449.

Zal, T., Weiss, S., Mellor, A., and Stockinger, B. (1996). Expression of a second receptor rescues self-specific T cells from thymic deletion and allows activation of autoreactive effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 9102-9107.

Zamoyska, R. (1998). CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr Opin Immunol* *10*, 82-87.

Zarozinski, C. C., and Welsh, R. M. (1997). Minimal bystander activation of CD8 T cells during the virus-induced polyclonal T cell response. *J Exp Med* *185*, 1629-1639.

Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., and Sprent, J. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* *8*, 591-599.

Ziegler, K., and Unanue, E. R. (1981). Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region-restricted antigen presentation to T lymphocytes. *J Immunol* *127*, 1869-1875.

Zijlstra, M., Bix, M., Simister, N. E., Loring, J. M., Raulet, D. H., and Jaenisch, R. (1990). Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8⁺ cytolytic T cells. *Nature* *344*, 742-746.

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

Zinkernagel, R. M., Althage, A., Waterfield, E., Kindred, B., Welsh, R. M., Callahan, G., and Pincetl, P. (1980). Restriction specificities, alloreactivity, and allotolerance expressed by T cells from nude mice reconstituted with H-2-compatible or -incompatible thymus grafts. *J Exp Med* *151*, 376-399.

Zinkernagel, R. M., Bachmann, M. F., Kundig, T. M., Oehen, S., Pirchet, H., and Hengartner, H. (1996). On immunological memory. *Annu Rev Immunol* *14*, 333-367.

Zinkernagel, R. M., Callahan, G. N., Althage, A., Cooper, S., Klein, P. A., and Klein, J. (1978). On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition? *J Exp Med* *147*, 882-896.

Zinkernagel, R. M., and Doherty, P. C. (1974a). Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 251, 547-548.

Zinkernagel, R. M., and Doherty, P. C. (1974b). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-702.

Zinkernagel, R. M., and Doherty, P. C. (1997). The discovery of MHC restriction. *Immunol Today* 18, 14-17.

Zinkernagel, R. M., Ehl, S., Aichele, P., Oehen, S., Kundig, T., and Hengartner, H. (1997). Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time- dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev* 156, 199-209.

Zinkernagel, R. M., Moskophidis, D., Kundig, T., Oehen, S., Pircher, H., and Hengartner, H. (1993). Effector T-cell induction and T-cell memory versus peripheral deletion of T cells. *Immunol Rev* 133, 199-223.

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127.

Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D. R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.

Annexes

Article 4

« Homeostasis of peripheral CD4⁺ T cells : IL-2R α and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4⁺ T cell numbers »

Afonso R.M. Almeida, N. Legrand, M. Papiernick & A.A. Freitas

The Journal of Immunology (in press)

Homeostasis of peripheral CD4⁺ T cells: IL-2R α and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4⁺ T cell numbers.

By

Afonso R.M. Almeida, Nicolas Legrand, Martine Papiernik* & António A. Freitas

Lymphocyte Population Biology, URA CNRS 1961,
Institut Pasteur, 25 Rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France.

<http://www.pasteur.fr/units/BPL/Welcome.html>,

*U345 INSERM,

CHU Necker, 256 rue de Vaugirard, 75015 Paris.

Running title: CD4 T cell homeostasis.

Correspondence: Antonio A. Freitas, Lymphocyte Population Biology Unit, URA CNRS 1961, Institut Pasteur, 25 Rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France.

Email: afreitas@pasteur.fr

tel: 33 1 45 68 85 82. fax: 33 1 45 68 89 21

Key words: Lymphocyte Homeostasis, CD4 T cells, Peripheral expansion, IL-2R α deficiency, Regulatory T cells.

Summary

We show that the lymphoid hyperplasia observed in IL-2R α and IL-2 deficient mice is due to the lack of a population of regulatory cells essential for CD4 T cell homeostasis. In chimeras reconstituted with BM cells from IL-2R α deficient donors, restitution of a population of CD25⁺CD4⁺ T cells prevents the chaotic accumulation of lymphoid cells, and rescues the mice from autoimmune disease and death. The reintroduction of Il-2 producing cells in IL-2 deficient chimeras establishes a population of CD25⁺CD4⁺ T cells, and restores the peripheral lymphoid compartments to normal. The CD25⁺CD4⁺ T cells regulated selectively the number of naïve CD4⁺ T cells transferred into T cell deficient hosts. The CD25⁺CD4⁺/naïve CD4 T cell ratio and the sequence of cell transfer determines the homeostatic plateau of CD4⁺ T cells. Overall, our findings demonstrate that IL-2R α is an absolute requirement for the development of the regulatory CD25⁺CD4⁺ T cells that control peripheral CD4 T cell homeostasis, while IL-2 is required for establishing a sizeable population of these cells in the peripheral pools.

Introduction

Several different lines of evidence demonstrate that thymus T cell production does not determine the number of peripheral T cells. First, in the young adult mouse T cell production in the thymus largely exceeds the number of cells required to replenish the peripheral T cell pools. Mice manipulated to have reduced rates of thymus T cell production can attain normal peripheral T cell numbers (1). Secondly, in mice grafted with multiple thymuses, the increased thymus mass and T lymphocyte production does not lead to the proportional increase of the peripheral T cell pool (2, 3). The number of T cells is also not limited by the peripheral T cell production capacity. Peripheral T cells in absence of the thymus in thymectomized hosts (4) or when transferred into T cell deficient hosts are capable of considerable expansion (5-7). In a normal mouse, there are mechanisms that control both T cell survival and division in the peripheral pools and keep T cell numbers constant. It has been proposed that competition for resources or complex cell interactions play a role in lymphocyte homeostasis (8, 9). The mechanisms involved remain, however, elusive.

Mutant $IL-2R\alpha^{-/-}$ mice represent a paradigm for perturbed lymphocyte homeostasis (10). They develop massive enlargement of peripheral lymphoid organs associated with T and B cell expansion and autoimmune disease (10), indicating that $IL-2R\alpha$ is essential for the control of the size of the peripheral lymphoid compartment. It was generally believed that the defect in $IL-2R\alpha^{-/-}$ mice was cell autonomous and that $IL-2R\alpha$ regulated the balance between clonal expansion and cell death following lymphocyte activation (10, 11). Thus, in the absence of the negative signals mediated by $IL-2R\alpha$, T cells would undergo uncontrolled expansion (10). However, it was recently shown that when placed in a normal environment TCR Tg $IL-2R\alpha^{-/-}$ cells exhibited normal clonal contraction after Ag-induced

expansion (12) suggesting that AICD is kept and that IL-2R α signals could also control bystander T cell activation (12). Alternatively, IL-2R α could be required for the development and/or the function of a sub-population of T cells capable of regulating peripheral T cell homeostasis. Different lines of evidence seem to support this latter alternative. First, recent findings showing that WT T cells could control the expansion of IL-2R β deficient T cells in mixed BM chimeras, a property attributed to a population of cytotoxic CD8 T cells (13). Secondly, previous studies have also shown that antigen-induced expansion of TCR Tg IL-2 deficient T cells could be controlled by CD25⁺ T cells (14). Finally results indicating that regulatory CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ T cells limit naive CD4 T cell expansion and suggesting that they may play a role in the control of peripheral T cell numbers (15).

We decided to investigate if populations of regulatory CD25⁺CD4⁺ T cells (16) could prevent the chaotic lymphocyte accumulation in IL-2R α ^{-/-} mice and control the expansion of peripheral naive CD4 T cells. We found that CD25⁺CD4⁺ T cells could indeed control peripheral T cell accumulation and composition in mouse chimeras reconstituted with BM cells from IL-2R α ^{-/-} mice and rescued these mice from death. Similarly, Rag2^{-/-} chimeras reconstituted with a mixture of BM cells from IL-2R α and IL-2 deficient donors remained healthy, and the number and distribution of CD25⁺ and CD25⁻ CD4 T cells was as in normal mice. To relate these effects to homeostatic control of the CD4 peripheral T cell pool we examined the selectivity and quantitative requirements ruling the expansion of naive CD45RB^{high}CD25⁻CD4⁺ and CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ T cells transferred into CD3 ϵ ^{-/-} T cell deficient host mice (17). We found that the two cell populations show different homeostatic plateaus and that CD25⁺CD4⁺ T cells can selectively inhibit the peripheral expansion of the naive CD4 T cells, but not CD8 T cells in a dose dependent manner.

Materials and Methods

Mice. C57Bl/6.Ly5.2 mice from Iffa-Credo (France), B6.CD3 $\epsilon^{-/-}$ (17), B6.IL-2R $\alpha^{-/-}$ (10), B6.TCR $\alpha^{-/-}$ (18) and C57Bl/6.Ly5.1 mice from the CDTA-CNRS (Orléans, France), B6.IL-10 $^{-/-}$ (19) from the Jackson Laboratories, and B6.IL-2 $^{-/-}$ (20) from our breeding facilities or from Dr. A. Schimpl were matched for age (6-12 weeks) and sex.

Cell sorting and cell transfers. LN cells from the Ly5.2 and Ly5.1 donor mice were first enriched for CD4⁺ T cells by negative selection using a Dynal MPC6 magnetic cell sorting. Briefly cells were incubated with a cocktail of rat antibodies directed to mouse B220 (RA3-6B2), Mac1 (CD11b) and CD8 α (53-6.7), all from Pharmingen (San Diego, CA, USA), followed by Sheep anti rat Ig coated Dynabeads (Dynal). After removing the positive fraction >90% of the remaining population was CD4⁺. These cells labeled with the appropriate combinations of anti-CD4 (L3T4/RM4-5), anti-CD45RB and anti-CD25 (784) antibodies were sorted on a FACStar^{Plus} (Becton Dickinson, San Jose, CA USA). The purity of the sorted CD45RB^{high}CD25⁻CD4⁺ and CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ populations varied from 96-99.9%.

Intact non-irradiated B6.CD3 $\epsilon^{-/-}$ (17) hosts were injected i.v. with the purified CD4 T cell populations alone or mixed at different cell ratios. By using mice differing by Ly5 allotypes we were able to discriminate the cells originating from the different donor mice. Host mice were sacrificed at different time intervals after cell transfer. Spleen, inguinal and mesenteric lymph nodes cell suspensions were prepared and the number and phenotype of the cells from each donor population evaluated. The total peripheral T cells showed in the results represent the number of cells recovered in the host's spleen added to twice the number of cells recovered from the host's inguinal and mesenteric LNs.

Labeling with CFSE. Cells were labeled with 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) as described (21). Briefly, sorted CD4⁺ T cells (10⁷/ml) were incubated for 10min. at 37°C with CFSE (10μM).

Bone Marrow chimeras. Host 8-week-old Rag2^{-/-}B6 mice were lethally irradiated (900rad) with a ¹³⁷Ce source and received intravenously two to 4x10⁶ T cell depleted BM cells from different donor mice, mixed at different ratios. T cell depletion (<0.1%) was done in a Dynal MPC6 magnetic sorter after incubating the BM cells with anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD3 biotinylated antibodies followed by Streptavidin coated Dynabeads. By using donor and host mice that differ according to Ly5 allotype markers, we were able to discriminate between the T cells originating from the different donors.

Flow cytometry analysis. The following monoclonal antibodies were used: anti-CD3ε (145-2C11), anti-CD4 (L3T4/RM4-5), anti-CD69 (H1.2F3), anti-CD25 (784), anti-CD45RB, anti-CD24/HSA (M1/69) and anti-TCRβ (H57) from Pharmingen (San Diego, CA, USA), and anti-CD44 (IM781), anti-CD62L (MEL14) from Caltag (San Francisco, CA, USA). Cell surface four color staining was preformed with the appropriate combinations of FITC, PE, TRI-Color, PerCP, Biotin and APC-coupled antibodies. Biotin-coupled antibodies were secondary labeled with APC-, TRI-Color- (Caltag, San Francisco, CA, USA) or PerCP-coupled (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) streptavidin. Dead cells were excluded during analysis according to their light-scattering characteristics. All acquisitions and data analysis was performed with a FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA USA) interfaced to the Macintosh CellQuest software.

Statistical analysis. Sample means were compared using the unpaired *t* test. In case the variances of the two samples were considerably different, the data were log-transformed to see if the variances become more similar. If so, the unpaired *t* test was

applied to the log-transformed data. Otherwise, Satterthwaite's approximation was applied. Sample means were considered significantly different at $p < 0.05$.

Results.

CD25⁺CD4⁺ T cells inhibit CD4 T cells from IL-2R α ^{-/-} mice and prevent death of chimeras reconstituted with BM cells from IL-2R α ^{-/-} mice. Mutant IL-2R α ^{-/-} mice develop massive lymphocyte accumulation and autoimmune disease (10). It was proposed that in the absence of negative signals mediated through IL-2R α T cells would undergo uncontrolled expansion suggesting that the IL-2R α ^{-/-} defect was cell autonomous (10). We asked if a population of normal T cells could control the chaotic accumulation of T cells in IL-2R α ^{-/-} mice. We examined whether mature CD25⁺CD4⁺ T cells could alter the number and state of activation of CD4 T cells in B6.Rag2^{-/-} chimeras reconstituted with 100% BM cells from B6.IL-2R α ^{-/-} donors. Using these BM chimeras rather than intact B6.IL-2R α ^{-/-} mice allowed us to increase the number of mice studied. We found that all chimeras injected exclusively with BM cells from B6.IL-2R α ^{-/-} donors died within 40-50 days (fig. 1A), with overt signs of runting, anemia and, in some mice, lymphoid hyperplasia (up to 300x10⁶ lymphocytes). In contrast, the BM chimeras that received 10⁵ CD25⁺CD4⁺ T cells from normal B6.Ly5.1 donors 2 weeks after BM reconstitution were all alive 6 months later (fig. 1A and not shown). The effects of the CD25⁺CD4⁺ T cells were time dependent since only 50% of the chimeras survived if we delayed their transfer to 4 weeks after BM injection (fig. 1A). These differences suggest that either control of T cell numbers is more efficient earlier when the number of peripheral IL-2R α ^{-/-} T cells is lower or it may require the continuous presence of “regulatory” T cells at the onset of T cell production. The surviving chimeras remained healthy, the hematocrit levels were normal (40-45%) and the total number of T cells was similar (47.1±7.7 and 81±9.7x10⁶ for the two groups of BM chimeras injected with CD25⁺CD4⁺ T cells respectively) to control mice (40-60x10⁶ CD4 T cells). The composition of the peripheral LN T cells was as in normal mice comprising 5-10% of CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ T cells, all of

B6.Ly5.1 origin, and 50-60% of non-activated CD45RB^{high}CD25⁻CD4⁺ T cells all from IL-2R α ^{-/-} origin (Fig. 1B). This is in contrast to donor IL-2R α ^{-/-} mice where most (>80%) T cells have an activated phenotype (10)(not shown). We should point out that the transfer of up to 2x10⁵ CD25⁻CD4⁺ T cells did not rescue the CD25^{-/-} BM chimeras (not shown).

To test if the production of “regulatory” T cells by the thymus could also control the chaotic peripheral accumulation of IL-2R α ^{-/-} T cells, lethally irradiated lymphopenic B6.Rag2^{-/-} mice were reconstituted with a mixture of T cell depleted BM cells. In brief, 50% of the injected BM cells were from B6.Ly5.2IL-2R α ^{-/-} donors and the remaining 50% from B6.Ly5.2.TCR α ^{-/-} (unable to generate T cells) and normal B6.Ly5.1 donors mixed at different ratios. By keeping the fraction of cells from IL-2R α ^{-/-} donors in the injected BM cohort at 50%, we fixed the rate of production of IL-2R α ^{-/-} T cells in all chimeras studied. Thus, the resulting chimeras should all have the same number of peripheral IL-2R α ^{-/-} T cells (1). By mixing BM cells from B6 normal and B6.TCR α ^{-/-} donors, we reduced the number of competent precursors available for thymus colonization and regeneration, as the normal competent precursor cells are diluted among incompetent precursors from the TCR α ^{-/-} mutant donors (1). With this strategy, we could evaluate the role of different numbers of normal T cells in the control of a fixed number of IL-2R α ^{-/-} T cells. We found that all the chimeras that could only generate IL-2R α ^{-/-} T cells, i.e. which received 50% BM cells from B6.IL-2R α ^{-/-} donors and 50% of BM cells from B6.TCR α ^{-/-} donors, died 40-50 days after reconstitution (fig. 2A). The presence of 5% cells from normal donors in the thymus of the chimeras was sufficient to rescue 80% of the mice (fig. 2A). The presence of 10 or 50% of normal cells rescued 100% of the chimeras. As expected at the periphery of the 50:50 B6.Ly5.2IL-2R α ^{-/-}/B6.Ly5.1 chimeras the representation of the two types of donor cells remained unchanged both in the thymus and in the peripheral T cell pools (not shown). In the surviving BM chimeras, containing a fraction of cells from

normal donors, the total number of peripheral T cells and the relative distribution of the CD25⁺ and CD25⁻ CD4 T cell subsets were as in normal mice (fig. 2B). Thus, a developing population of normal CD4 T cells controlled the accumulation and state of activation of the IL-2R α ^{-/-} T cells. These results show that the lethal accumulation of peripheral T cells in IL-2R α ^{-/-} mice is not cell autonomous, but due to the lack of a population of CD4⁺ T cells essential for peripheral T cell homeostasis. We demonstrated that expression of the IL-2R α chain is required for the generation of this population of regulatory CD4 T cells.

Control of T cell numbers in IL-2^{-/-}/IL-2R α ^{-/-} BM chimeras. With age, IL-2^{-/-} mice develop fatal IBD and lymphocyte proliferation (20). The peripheral T cell compartments of these mice show overt signs of T cell activation and lack a well-defined population of CD25⁺, which never exceeds 1-2% of the CD4⁺ T cells (14, 22). We investigated whether the CD25⁺CD4⁺ T cells from IL-2^{-/-} mice could rescue the defects of CD4 T cell homeostasis observed in IL-2R α ^{-/-} mice. We reconstituted lethally irradiated lymphopenic B6.Rag2^{-/-} mice with a 50:50 mixture of T cell depleted BM cells from B6.IL-2R α ^{-/-} and B6.IL-2^{-/-} donors. Control mice received BM cells from either B6.IL-2R α ^{-/-} or B6.IL-2^{-/-} mice equally mixed at 50:50 with BM cells from B6.TCR α ^{-/-} donors. The presence of 50% of BM cells from IL-2^{-/-} donors rescued the totality of the IL-2R α ^{-/-} BM chimeras (fig. 3A) and restored the CD4 T cell populations to normal. In the peripheral T cell pools of these chimeras, the number and the distribution of CD25⁺ and CD25⁻ CD4 T cells was as in normal mice (fig. 3B). Thus, in presence of IL-2 the hematopoietic precursors from IL-2 deficient donor mice generated a stable population of mature peripheral CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells able to control the homeostasis of the CD4 T cell compartment. Upon secondary transfer, this population of IL-2^{-/-}CD25⁺CD4⁺ cells was able to rescue B6.IL-2R α ^{-/-} chimeras (not shown). Chimeras injected with BM cells from B6.IL-2^{-/-} donors alone show a normal number of CD25⁺ and CD25⁻ CD4 T cells (not shown). This finding

indicates that in $Rag2^{-/-}$ hosts, resident non T cells can provide a source of endogenous IL-2 (23) sufficient to compensate for the lack of its production by the IL-2^{-/-} hematopoietic cells. Overall, these results demonstrate that IL-2 is required for the establishment of a stable population of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in the peripheral pools. In absence of this population control of CD4 T cell numbers is lost and the mice develop lymphoid hyperplasia and autoimmune diseases. In overall, these findings indicate that populations of CD25⁺ and CD25⁻ CD4 T cells may have different homeostatic properties and that they may regulate each other. We decided to investigate this possibility using a cell transfer strategy.

Fate of naïve CD4⁺ and CD25⁺CD4⁺ T cells transferred into T cell deficient hosts: different homeostatic plateaus. Peripheral T cells when transferred into T cell deficient hosts are capable of considerable expansion (5-7), but their number is controlled at a homeostatic plateau. To investigate the homeostasis of peripheral CD4⁺ T cell sub-populations, different numbers of purified CD4⁺ cells, that is CD45RB^{high}CD25⁻, CD45RB^{low}CD25⁻ and CD45RB^{low}CD25⁺ cells were intravenously transferred into syngeneic CD3ε^{-/-} T cell deficient hosts. In hosts receiving as few as 5×10^3 and as many as 10^5 cells CD45RB^{high}CD25⁻CD4⁺ T cells (from now on referred to as naïve CD4) expanded to reach stable equilibrium at about $1-2 \times 10^7$ cells, 10-12 weeks after transfer (fig 4). In mice injected with the same number of CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ T cells (from now on referred to as CD25⁺CD4⁺), these cells also expanded but reached equilibrium at ten fold lower values i.e. at $1-2 \times 10^6$ cells/hosts (fig. 4). Transfer of increasing numbers ($>10^5$) of cells did not modify the final cell recovery (not shown). These results indicate that naïve CD4⁺ and CD25⁺CD4⁺ T cells are both able to expand and accumulate at the periphery, but their final number is regulated at different homeostatic plateau levels. It should be noted that at later times after transfer mice injected with naïve CD4⁺ T cells developed a wasting autoimmune disease and eventually died (>15 weeks), while hosts of

CD25⁺CD4⁺ T cells remained healthy (not shown). Total non-separated LN CD4⁺ T cells containing 10% CD25⁺ cells expanded to a plateau of about $1-2 \times 10^7$ cells, but fail to develop signs of wasting disease (not shown). Activated CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ T cells expanded to similar plateaus as naïve CD4⁺ T cells (not shown).

Sequential and secondary cell transfers. Cellular competition and the presence or absence of resident T cell populations can alter the peripheral fate of newly arriving thymus emigrants (8, 9, 24). To truly establish the homeostasis of the transferred peripheral T cells we asked if the presence of a resident T cell population could interfere with the expansion of a second newly injected cell population or whether the injection of a new population could modify the fate of a resident population. We “parked” 5×10^4 Ly5.1 naïve CD4⁺ T cells in different hosts. Seven weeks later, each host received the same number of a second population of Ly5.2 naïve CD4⁺ or CD25⁺CD4⁺ T cells. Age matched control mice received either the first or the second population alone. We sacrificed the mice at 7 (before the 2nd injection) or 14 weeks after the first injection. After transfer, naïve T cells acquired a CD45RB^{low} activated/memory phenotype, but only a few (1-2%) became CD25^{low} (not shown). In mice injected sequentially with two populations of naïve CD4⁺ T cells, the expansion of both populations was limited through competition and they shared the peripheral compartment of the host (fig. 5A). The total T cell recovery was the same as in mice injected with either population alone (about 2×10^7). The transfer of 5×10^4 CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ cells into mice injected 7 weeks before with CD45RB^{high}CD25⁺CD4⁺ cells suppressed significantly ($p < 0.001$) further expansion of the established 5×10^6 CD45RB^{high}CD25⁺CD4⁺ derived T cell population (fig. 5B). The total T cell recovery diminishes accordingly. The number of cells recovered from the second population of CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ T cells did not change. These results show that a limited number (5×10^4) of newly transferred CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ T can suppress the expansion of an abundant (5×10^6) population of resident CD4⁺ T cells.

We also parked 5×10^4 Ly5.1 CD25⁺CD4⁺ T cells. Seven weeks later, each host received 5×10^4 Ly5.2 naïve CD4⁺ or CD25⁺CD4⁺ T cells. The transfer of a second population of CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ T cells did not significantly modify the number of the established cells. The resident cells were able to persist and the new cells were able to accumulate as in non-injected hosts (fig. 5C). In the mice hosting the first population of CD25⁺CD4⁺ T cells, newly transferred naïve CD4⁺ T cells expanded and induced a 3-4-fold increase ($p < 0.01$) in the number of resident CD4 T cells from CD25⁺CD4⁺ origin (fig. 5D). These results show that newly injected naïve CD4⁺ T cells helped the growth of the progeny of CD25⁺CD4⁺ T cells ($p < 0.01$). In contrast, the resident CD25⁺CD4⁺ T cell progeny do not significantly ($p = 0.5$) inhibit the growth of newly transferred naïve CD4⁺ T cells. In hosts that received CD25⁺CD4⁺ cells, only about 30% of the recovered T cells remained CD25⁺ (not shown). This could represent true phenotypic changes or the expansion of a few contaminant CD4 T cells in the injected CD25⁺ population. We investigated the suppressive capacities of the resident cells that express or not CD25. For this purpose CD25⁺CD4⁺ T cells were parked for 7 weeks in host mice. At the end of this time period CD25⁺CD4⁺ T cells and CD45RB^{low}CD25⁻CD4⁺ T cells derived from the parked population were injected alone or co-injected with naïve CD4⁺ T cells from different Ly5 donors into secondary CD3 ϵ ^{-/-} hosts. While the re-sorted CD25⁺ cells retained the capacity to suppress the growth of naïve CD4⁺ T cells ($p < 0.001$), the suppressive capacity of the re-sorted CD25⁻ cells was absent or reduced ($p = 0.21$) (fig. 6). These results suggest that the suppressor effects correlate with the surface expression of CD25.

CD25⁺CD4⁺ T cells inhibit peripheral expansion of naïve CD4 T cells. We showed that CD25⁺CD4⁺ T cells could control chaotic accumulation of IL-2R α ^{-/-} T cells. We decided to investigate whether they could also control the homeostatic plateau of naïve CD4 T cells transferred to T cell deficient hosts. We quantified both the numbers of cells involved and the selectivity of the interactions. We transferred

10^4 purified naïve Ly5.1 CD4⁺ T cells or CD8 T cells alone or co-injected with variable numbers of Ly5.2 CD25⁺CD4⁺ T cells, ranging from 3×10^3 to 10^5 , into CD3 $\epsilon^{-/-}$ hosts (fig. 7A-B). We found that the CD25⁺CD4⁺ T cells limited the accumulation of naïve CD4⁺ T cells (15) and that their suppressive effects were dose dependent (fig. 7A). Increasing numbers of CD25⁺CD4⁺ T cells progressively suppressed the expansion of the co-transferred naïve CD4⁺ T cells and at a 10:1 cell ratio we recovered 10 fold less T cells from naïve CD4⁺ origin ($p < 0.005$). Total T cell recovery diminished according to the level of suppression that is, overgrowth of the co-injected CD25⁺CD4⁺ T cells did not compensate for the lack of expansion of the naïve T cells (p -NS)(fig. 7B). We also found that CD25⁺CD4⁺ T cells did not affect the growth of co-injected total LN CD8 T cells ($p = 0.4$) (fig. 7C), indicating that their inhibitory effects are lineage specific. By varying either the number of T cells injected, or the ratio CD25⁺/CD25⁻ T cells we found that the number of T cells from naïve CD25⁻CD4⁺ origin recovered was not dependent on the number of cells transferred, but determined by the CD25⁺/CD25⁻ ratio present in the inoculum (fig. 7D). These results raised the possibility that the CD25⁺CD4⁺ T cells might have blocked division of the naïve CD4⁺ T cells. To test this possibility we compared the fate of CFSE labeled naïve T cells transferred alone (fig. 7E, top) or in the presence of an excess of CD25⁺ cells (fig. 7E, bottom). Three days after transfer (fig.7E), the patterns of dilution of the CFSE labeling were similar in both groups of mice and we recovered an identical number of cells in the two groups of host mice (not shown). At day 10, the majority of the transferred cells were CFSE⁻ indicating that these cells underwent several rounds of division. The fraction of CFSE⁻ cells was however higher and we recovered 27 fold more CD4 T cells in the mice injected with naïve T cells in absence of CD25⁺ cells (fig. 7E). The differences in total cell recovery could be due to either an increase in cell survival or to an increase in the rate of cell division of the CD4⁺CD25⁻ naïve T cells when transferred alone. Thus, the present results do not allow discriminating

between these two possibilities or if the increase of the number of cells corresponds to an increased fraction of cells that enter cell cycle or to a reduced cell cycle time. Studies on the Annexin V labeling of the transferred populations were not conclusive (not shown). On the whole these results indicate that the suppressive effects are not obtained through complete block of proliferation, but do not allow us to distinguish whether they affect the rate of cell expansion or the survival (accumulation) of the newly generated T cells. In contrast, we found that activated CD45RB^{low}CD25⁻CD4⁺ T cells did not control expansion of naïve CD4 T cells (not shown).

CD25⁺CD4⁺ T cells inhibit peripheral expansion of IL2R α ^{-/-} CD4 T cells.

Finally, we studied whether the same forms of interaction also applied to populations of CD4 T cells from IL-2R α ^{-/-} and IL-2^{-/-} mice. We found that CD25⁺CD4⁺ T cells from normal donors inhibited the expansion of the CD4⁺ T cells from IL-2R α ^{-/-} mice transferred into CD3 ϵ ^{-/-} hosts ($p < 0.05$) (fig. 8A). Similarly, naïve CD4⁺ T cells from IL-2^{-/-} origin expanded and were suppressed ($p < 0.01$) while CD25⁺CD4⁺ T cells from IL-2^{-/-} mice slightly suppressed the expansion of naïve CD4⁺ T cells from normal donors as well as CD25⁺CD4⁺ T cells from normal donors at a 1:1 cell ratio (fig. 8B). Altogether, these findings suggest that the control exerted by the CD25⁺CD4⁺ T cells on the accumulation of peripheral CD4 T cells in the IL-2R α ^{-/-} is due to their ability to regulate peripheral CD4 T cell homeostasis.

Discussion

Peripheral T cells, in absence of a thymus (4, 25) or when transferred to T cell deficient hosts (5, 7, 26) are capable of considerable expansion. The sequential transfer of a T cell population into successive hosts has shown that one T cell can generate up to 10^{15} cells (7). This indicates that in a normal mouse peripheral T cell division is limited by mechanisms that probably include resource competition and complex cell interactions (9). We studied the role of T cell interactions in the control of the number of peripheral $CD4^+$ T cells. In particular, we investigated if $CD25^+CD4^+$ T cells, which exert regulatory functions (27-32), could also govern peripheral $CD4^+$ T cell homeostasis.

$IL-2R\alpha^{-/-}$ mutant mice are reported as a paradigm for perturbed lymphocyte homeostasis (10). It was generally believed that the lack of the $IL-2R\alpha$ impaired activation-induced cell death (AICD) in vivo (10) modified the balance between clonal expansion and cell death and resulted in a deregulation of both the size and content of the peripheral lymphoid compartments. The primary uncontrolled T cell activation led subsequently to secondary polyclonal B cell activation and auto-antibody production. Recent findings have shown, however, that when placed in a normal environment TCR Tg $CD25^{-/-}$ T cells exhibited a significant reduction in Ag-induced expansion due to normal AICD (12). This observation was interpreted as indicating that the regulatory role of $IL-2R\alpha$ signals was mediated through the control of bystander T cell activation (12). We now demonstrate that, the chaotic lymphocyte accumulation developed in adult $IL-2R\alpha^{-/-}$ mice is not cell autonomous: it is due to the lack of a T cell population essential for the homeostasis of peripheral T cell numbers. Two main lines of evidence support this conclusion. First, the presence of a limited number of $CD25^+ CD4^+$ T cells rescues mouse chimeras reconstituted with BM from $IL-2R\alpha^{-/-}$ mice from chaotic lymphocyte accumulation, polyclonal B and T cell activation and death and restores the peripheral lymphoid compartment to

normal. Secondly, we show that CD25⁺CD4⁺ T cells inhibit peripheral expansion of CD4 T cells from IL-2R α ^{-/-} mice transferred into T cell deficient adoptive hosts. Moreover, by using IL-2 deficient mice, which also develop lymphoid hyperplasia and autoimmunity late in life (20), we show that IL-2 is required for the establishment of a stable and sizeable population of peripheral CD25⁺CD4⁺ regulatory cells. Thus, IL2-R α /IL-2 signals are not involved in control of bystander activation, but are instead required for the generation and peripheral expansion/survival of a population of regulatory CD4 T cells essential for peripheral CD4 T cell homeostasis.

We further dissected and quantified the type of cell interactions involved in peripheral homeostasis by following the fate of separated populations of CD4 T cells transferred into immune-deficient hosts (7). We found that after transfer into CD3 ϵ ^{-/-} T cell deficient hosts purified naïve CD4⁺ T cells expanded to reach a stable plateau at about 1-2x10⁷ cells, independently of the number of injected cells. When a second population of naïve CD4⁺ cells was transferred into the same hosts, the growth of each population was limited and the total T cell recovery was the same as in mice injected with only one population. We did not observe an overt advantage of either the tenant or the newcomer cells. These findings confirmed that cellular rivalry could alter the fate of T cells at the periphery (8, 9, 24) and attested that the expansion of the transferred naïve CD4⁺ T cells is under homeostatic control (7). We found that the accumulation of the CD25⁺CD4⁺ T cells in T cell deficient hosts is limited by a homeostatic plateau which singularly operates at values ten fold lower than for total CD4⁺ or naïve CD4⁺ T cells, i.e. at 1-2x10⁶ cells/host. We confirmed by the co-transfer of these two T cell populations that the presence of CD25⁺CD4⁺ T cells limited the expansion of the naïve CD4⁺ T cells (15). Total T cell recovery diminished accordingly to the levels of suppression thus, excluding the presence of competition between the two populations.

We expanded these observations and showed that the inhibitory effects were dose dependent and lineage specific, as they did not affect naïve CD8⁺ T cell expansion in vivo. However, lineage specificity seems dependent on the experimental conditions, as CD25⁺CD4⁺ T cells were shown to control memory but not naïve CD8⁺ T cells (33) and to suppress both CD4⁺ and CD8⁺ T cell activation in vitro (34, 35). Suppression of naïve CD4⁺ T cell growth was obvious when the number of CD25⁺CD4⁺ T cells exceeded the number of the naïve CD4⁺ T cells by a factor of ten, less noticeable and variable when the two populations were present at similar numbers. Thus, the physiological relevance of the CD25⁺CD4⁺ T cells could be arguable since in normal mice their number rarely exceeds 10% of the total CD4⁺ T cell pool. However, upon sequential cell transfers we found that the injection of a limited number (5×10^4) of CD25⁺CD4⁺ T cells arrests the growth of an expanding population of 5×10^6 resident naïve CD4⁺ derived T cells. More importantly, a limited number of CD25⁺CD4⁺ T cells rescues mice reconstituted with BM cells from IL-2R α ^{-/-} donors, controls the chaotic T cell accumulation and reestablishes a peripheral T cell pool with a normal sub-population composition. Thus, the suppressive effects mediated by the CD25⁺CD4⁺ T cells have physiological relevance since they were also obtained at physiological ratios of CD25⁺ to CD25⁻. The changes in effectiveness observed between the different experimental protocols and schedules of injection may be due to the different fraction/number of activated cells to be suppressed. Immediately following transfer, most naïve CD4 T cells are activated while later, near steady state equilibrium, only a fraction proliferates (7). Alternatively they could be due to the different capacity of the regulatory cells to suppress homeostatic proliferation, occurring in the cell transfer experiments, and natural T cell proliferation and reconstitution, occurring in the BM chimeras. Finally, the homing of the CD25⁺CD4⁺ T cells could also differ between the different experimental protocols used. In experiments where the CD25⁺CD4⁺ T cells were transferred at the same time

as the naïve CD4 T cells, differential homing abilities of the two populations could explain the apparently too high CD25⁺/CD25⁻ ratio needed in the co-transfer experiments. The homing of the CD25⁺CD4⁺ T cells could be favored by the presence of activated T cells in the periphery of the host mice as it could happen in the sequential transfer experiments.

How do the CD25⁺CD4⁺ T cells regulate homeostasis of naïve CD4⁺ T cells? In order to investigate the possible effects of CD25⁺CD4⁺ T cells in blocking the proliferation of CD25⁻ cells, we have transferred CFSE labelled CD25⁺CD4⁺ T cells alone or with an excess of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells (Fig 7E). The dilution of CFSE labelling observed in both situations is similar, but the accumulation of cells observed in the CFSE negative fraction of cells accounts for the differences in the number of cells recovered. Thus, homeostatic proliferation could be said to occur in both situations but its extent could be limited only when CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells are present. The possibility that CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells are capable of inhibiting the extent of homeostatic proliferation suggests the interesting possibility that the observed regulation of self-reactive responses is just a side effect of a broader function of these cells in the control of peripheral T cell numbers. If these cells control the magnitude of expansion of all naïve CD25⁻CD4⁺ T cells, this may also include expansion of self-reactive clones present within that population. However, the opposite can also be true and the control of self-reactive responses may result in the control of total cell numbers recovered. In this study, we show that the presence of Treg cells prevents the activation of CD4 T cells from CD25^{-/-} origin including self-reactive clones and allows the establishment of a normal size naïve peripheral T cell compartment; and that upon sequential cell transfer the CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells suppress the expansion of activated T cells engaged in homeostatic proliferation, reducing the number of cells recovered.

It has been shown that IL-10 mediates the regulatory functions of the CD25⁺CD4⁺ T cells (28, 36-39), but in vitro studies have excluded the role of IL-10 in CD25⁺ T cell mediated suppression (40). We examined the role of IL-10 in the suppression of T cell proliferation in vivo and in contrast to a previous report (15), we found that CD25⁺CD4⁺ T cells from IL-10^{-/-} mice inhibit the expansion of naive T cells as effectively as CD25⁺ cells from wild-type mice (not shown). This indicates that the effects of the CD25⁺CD4⁺ T cells on T cell expansion are IL-10 independent. We confirmed, however, that CD25⁺ cells from IL-10^{-/-} mice failed to protect against the wasting disease induced by the naive CD4⁺ T cells (not shown). TGFβ has also been implicated in IBD protection and recent claims suggest that it may play a role in T cell homeostasis (41-43). However, we found that both naive and activated CD4 T cells expressed similar levels of mRNAs for the three sub-forms of TGFβ (not shown). Moreover, CD25⁺ T cells from TGFβ-deficient mice are referred to be suppressors (44). We also found that CD25⁺CD4⁺ cells from TNFα^{-/-} and LTα^{-/-} mice inhibit expansion of naive T cells (not shown) excluding their role in this process. By using *lpr* and *gld* mutant mice, we excluded a possible role of Fas/FasL interactions in these processes (not shown). The possible involvement of CTLA-4 in T cell homeostasis is also unlikely, as it has also been shown that CD25⁺CD4⁺ T cells from CTLA-4-deficient mice exhibit suppressor activity (45). Recent results implicating the GITR (TNFRS18) in the regulatory activity of the CD25⁺ T cells (46, 47) are not conclusive (44). Other possibilities are under investigation.

The suppressive capacity of the CD25⁺CD4⁺ T cells while maximal upon injection was virtually lost when these cells were parked for two months in the hosts. It is possible that regulation of existing and newly transferred cells differs, and/or that “parked” cells may evolve functionally. Upon secondary transfer, we showed that the “parked” CD25⁺CD4⁺ T cell retained their suppressive abilities. Our in vivo observations contrast with recent in vitro data showing that T cells having lost CD25

expression suppress expansion of naïve CD4 T cells (48). This apparent discrepancy may simply reflect differences in the *in vitro* and *in vivo* behavior of the Treg cells. Other reports have shown that the CD25⁺ cells progeny of *in vivo* activated naïve CD4⁺ T cells were not able to confer effective protection of disease (49) or to control *in vitro* T cell proliferation (40). Moreover, CD25⁻CD4⁺ thymocytes when transferred to immune-deficient hosts cannot generate a Treg cell population and induce autoimmune disease (50). In addition, the autoimmune manifestations that occur in neonatal thymectomy mice (Day3) correlate with the absence of CD25⁺CD4⁺ T cells and the reintroduction of CD25⁺ cells generated in 3d old Tx mice was unable to prevent disease (40), which could be avoided by CD25⁺CD4⁺ T cells from normal donors (28). These observations indicate that the regulatory functions may be a property of a specific cell sub-population, but that inside this sub-population these functions correlate with the expression of the CD25 marker and may require continuous T cell stimulation (27, 32). The inhibitory effects may require direct T to T cell interactions (40) or act via a third party presenting cell. We found that the initial CD25⁺/CD25⁻ ratio strictly determined the final number of CD4 T cells, suggesting a direct relationship between the two populations. Inhibition does not seem to require antigen specificity or mutual cognate recognition by the interacting cells since *in vitro* the two populations do not need to recognize the same ligand (51). Maintenance of the antigen-specific regulatory cells seems to require, however, the continuous presence of the antigen (32).

To the question of whether the “regulatory” cells may represent a separate CD4⁺ T cell lineage (52) the answer is yes. The IL-2R α ^{-/-} mutant mice lack these cells. The transfer of a limited number of CD25⁺CD4⁺ T cells in mouse chimeras reconstituted with BM cells from IL-2R α ^{-/-} mice prevents lethal lymphocyte accumulation. Delayed transfer of the CD25⁺CD4⁺ cells was, however, less effective in protection, stressing the importance of regulatory/naïve cell ratios at the time of

the initial peripheral seeding. The presence of as few as 5% cells from a normal donor developing in the thymus of the chimeras suffices to reestablish full control of the number and state of activation of the peripheral CD4 IL-2R α ^{-/-} T cells. It has been shown that CD25⁺CD4⁺ T cells are generated in the thymus (38, 50, 53). Our findings support this claim. We also found that transferred CD25⁺CD4⁺ T cells can persist for prolonged periods in absence of the thymus, as observed in the IL-2R α ^{-/-} BM chimeras. Thus, these cells can be either long-lived or able of self-renewal at the periphery. Interestingly, in the different mixed IL-2R α ^{-/-}/normal BM chimeras, the number of peripheral CD25⁺CD4⁺ T cells was the same, independently of the fraction of normal cells present in the BM inoculum. IL-2 deficient mice lack a significant number of CD25⁺CD4⁺ cells at the periphery (38) and develop lymphoid hyperplasia and IBD (20). Recent studies suggested that disturbed peripheral homeostasis in IL-2 deficient mice resulted from either an IL-2 dependent AICD defect and/or the lack of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells (14). We found that IL-2^{-/-} derived cells rescues the IL-2R α ^{-/-} BM chimeras from death and that in these chimeras the number and the distribution of CD25⁺ and CD25⁻ CD4 T cells in the peripheral T cell compartments was as in normal mice. Thus, in presence of IL-2, the BM precursors from IL-2 deficient donor mice generated a well-defined population of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells capable to control the number of CD4 T cells in the peripheral compartments. These findings suggest that IL-2 is required for the peripheral survival and maintenance of the subset of the CD25⁺ regulatory cells produced by the thymus. Production of IL-2 by proliferating CD4 T cells may also contribute to the survival of the regulatory cells. Thus, we may envisage a feedback loop in which expanding naive CD4 T cells contribute to their own regulation. The role of IL-2/IL-2R interactions in T cell homeostasis is further supported by results showing that IL-2R β ^{-/-} T cells in mice reconstituted with a mixture of IL-2R β ^{-/-} T and IL-2R β ⁺ BM cells did not expand or develop into an abnormally activated stage (13). In this last study,

however, the cells responsible for the homeostatic control were believed to be CD8 T cells (13) and not the CD25⁺CD4⁺ T cells that we now identified as capable of controlling IL-2R α deficient T cells. It is possible that other cell populations contribute to regulate peripheral T cells pools.

In summary, we demonstrate the role of T cell interactions in the control of the size of the peripheral CD4⁺ T cell pool. We show that homeostasis of peripheral CD4⁺ T cells follows sub-population structure, CD25⁺CD4⁺ T cells limiting the accumulation of dividing naïve CD4⁺ T cells. We found that IL-2R α deficient mice lack a sub-population of regulatory cells essential for CD4 T cell homeostasis. Adoptive replacement of the CD25⁺CD4⁺ T cell population prevents the chaotic accumulation of lymphoid cells in the peripheral compartments of IL-2R α deficient mice. It also prevents the subsequent polyclonal T and B cell activation, autoimmune hemolytic anemia and IBD observed in IL-2R α ^{-/-} mice (10). We also show that IL-2 deficient mice also lack a sizeable population of CD25⁺CD4⁺ T cells that expands in presence of IL-2 to control autoimmunity and lymphoid hyperplasia in IL-2R α chimeras. To conclude, we show that the mechanism by which IL-2R α and IL-2 play an essential role on T cell homeostasis is by shaping a population of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells that control peripheral CD4 T cell numbers. We demonstrate that IL-2R α is an absolute requirement for the generation of the regulatory cells. These cells generate in the thymus in the absence of IL-2, but require IL-2 to establish a stable functional population in the peripheral compartments.

Acknowledgements:

We thank Drs. J. Borghans for help with the statistical analysis, B. Rocha and J. Di Santo for reviewing this manuscript, Dr. A. Schimpl for the IL-2^{-/-} mice, Dr. Ana Cumano for help with the flow cytometry Anne Louise for cell sorting and the Institute Pasteur, CNRS, ANRS, ARC, Ligue Contre le Cancer, Sidaction and MRT, FRANCE for funding. A. Almeida is supported by grant 13302/97 from the Fundação para a Ciência e Tecnologia, Praxis XXI, Portugal and by the American-Portuguese Biomedical Research Fund (APBRF).

References.

1. Almeida, A. R., J. A. Borghans, and A. A. Freitas. 2001. T cell homeostasis: thymus regeneration and peripheral T cell restoration in mice with a reduced fraction of competent precursors. *J Exp Med* 194:591.
2. Leuchars, E., V. J. Wallis, M. J. Doenhoff, A. J. Davies, and J. Kruger. 1978. Studies of hyperthymic mice. I. The influence of multiple thymus grafts on the size of the peripheral T cell pool and immunological performance. *Immunology* 35:801.
3. Berzins, S. P., R. L. Boyd, and J. F. Miller. 1998. The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. *Journal of Experimental Medicine* 187:1839.
4. Rocha, B., A. A. Freitas, and A. A. Coutinho. 1983. Population dynamics of T lymphocytes. Renewal rate and expansion in the peripheral lymphoid organs. *Journal of Immunology* 131:2158.
5. Freitas, A. A., B. Rocha, and A. A. Coutinho. 1986. Lymphocyte population kinetics in the mouse. *Immunol Rev* 91:5.
6. Stutman, O. 1986. Postthymic T-cell development. *Immunological Reviews* 91:159.
7. Rocha, B., N. Dautigny, and P. Pereira. 1989. Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *European Journal of Immunology* 19:905.
8. Freitas, A. A., F. Agenes, and G. C. Coutinho. 1996. Cellular competition modulates survival and selection of CD8⁺ T cells. *European Journal of Immunology* 26:2640.
9. Freitas, A. A., and B. Rocha. 2000. Lymphocyte Population Biology: the Flight for Survival. *Annual Reviews of Immunology* 18:83.

10. Willerford, D. M., J. Chen, J. A. Ferry, L. Davidson, A. Ma, and F. W. Alt. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3:521.
11. Van Parijs, L., A. Biuckians, A. Ibragimov, F. W. Alt, D. M. Willerford, and A. K. Abbas. 1997. Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. *J Immunol* 158:3738.
12. Leung, D. T., S. Morefield, and D. M. Willerford. 2000. Regulation of lymphoid homeostasis by IL-2 receptor signals in vivo. *J Immunol* 164:3527.
13. Suzuki, H., Y. W. Zhou, M. Kato, T. W. Mak, and I. Nakashima. 1999. Normal regulatory alpha/beta T cells effectively eliminate abnormally activated T cells lacking the interleukin 2 receptor beta in vivo. *J Exp Med* 190:1561.
14. Wolf, M., A. Schimpl, and T. Hunig. 2001. Control of T cell hyperactivation in IL-2-deficient mice by CD4(+)CD25(-) and CD4(+)CD25(+) T cells: evidence for two distinct regulatory mechanisms. *Eur J Immunol* 31:1637.
15. Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux, T. C. Barbosa, A. Cumano, and A. Bandeira. 2001. CD25(+) CD4(+) T Cells Regulate the Expansion of Peripheral CD4 T Cells Through the Production of IL-10. *J Immunol* 166:3008.
16. Groux, H., and F. Powrie. 1999. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunology Today* 20:442.
17. Malissen, M., A. Gillet, L. Ardouin, G. Bouvier, J. Trucy, P. Ferrier, E. Vivier, and B. Malissen. 1995. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J.* 14:4641.
18. Mombaerts, P., A. R. Clarke, M. A. Rudnicki, J. Iacomini, S. Itohara, J. J. Lafaille, L. Wang, Y. Ichikawa, R. Jaenisch, and M. L. Hooper. 1992. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* 360:225.

19. Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Muller. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis [see comments]. *Cell* 75:263.
20. Schorle, H., T. Holtschke, T. Hunig, A. Schimpl, and I. Horak. 1991. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 352:621.
21. Lyons, A. B., and C. R. Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 171:131.
22. Papiernik, M., M. do Carmo Leite-de-Moraes, C. Pontoux, A. M. Joret, B. Rocha, C. Penit, and M. Dy. 1997. T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL-10-producing T cell population with infectious capacity. *J Immunol* 158:4642.
23. Granucci, F., C. Vizzardelli, N. Pavelka, S. Feau, M. Persico, E. Virzi, M. Rescigno, G. Moro, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2:882.
24. Tanchot, C., and B. Rocha. 1995. The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8+ T cell pools. *European Journal of Immunology* 25:2127.
25. Piguet, P. F., C. Irle, E. Kollatte, and P. Vassalli. 1981. Post-thymic T lymphocyte maturation during ontogenesis. *J Exp Med* 154:581.
26. Miller, R. A., and O. Stutman. 1984. T cell repopulation from functionally restricted splenic progenitors: 10,000-fold expansion documented by using limiting dilution analyses. *J Immunol* 133:2925.
27. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology* 155:1151.

28. Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *Journal of Experimental Medicine* 184:387.
29. Powrie, F., R. Correa-Oliveira, S. Mauze, and R. L. Coffman. 1994. Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *Journal of Experimental Medicine* 179:589.
30. Powrie, F., M. W. Leach, S. Mauze, S. Menon, L. B. Caddle, and R. L. Coffman. 1994. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RB^{hi} CD4⁺ T cells. *Immunity* 1:553.
31. Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi. 1999. Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *Journal of Immunology* 163:5211.
32. Saoudi, A., B. Seddon, V. Heath, D. Fowell, and D. Mason. 1996. The physiological role of regulatory T cells in the prevention of autoimmunity: the function of the thymus in the generation of the regulatory T cell subset. *Immunol Rev* 149:195.
33. Murakami, M., A. Sakamoto, J. Bender, J. Kapler, and P. Murrack. 2002. CD25⁺CD4⁺ T cells contribute to the control of memory CD8⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 99:8832.
34. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International Immunology* 10:1969.
35. Piccirillo, C. A., and E. M. Shevach. 2001. Cutting edge: control of CD8⁺ T cell activation by CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory cells. *J Immunol* 167:1137.

36. Powrie, F., J. Carlino, M. W. Leach, S. Mauze, and R. L. Coffman. 1996. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* 183:2669.
37. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737.
38. Papiernik, M., M. L. de Moraes, C. Pontoux, F. Vasseur, and C. Penit. 1998. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *International Immunology* 10:371.
39. Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman, and F. Powrie. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 190:995.
40. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *Journal of Experimental Medicine* 188:287.
41. Gorelik, L., and R. A. Flavell. 2000. Abrogation of TGF Signaling in T Cells Leads to Spontaneous T Cell Differentiation and Autoimmune Disease. *Immunity* 12:171.
42. Lucas, P. J., S.-J. S. J. Kim, S. J. Melby, and R. E. Gress. 2000. Disruption of T Cell Homeostasis in Mice Expressing a T Cell-specific Dominant Negative Transforming Growth Factor β II Receptor. *J. Exp. Med.* 191:1187.
43. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194:629.
44. Shevach, E. M. 2002. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Rev. Immunol.* 2:389.

45. Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192:303.
46. Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 22:22.
47. McHugh, R. S., M. J. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. M. Shevach, M. Collins, and M. C. Byrne. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16:311.
48. Gavin, M. A., S. R. Clarke, E. Negrou, A. Gallegos, and A. Rudensky. 2002. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3:33.
49. Suri-Payer, E., A. Z. Amar, A. M. Thornton, and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *Journal of Immunology* 160:1212.
50. Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *Journal of Immunology* 162:5317.
51. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 2000. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *Journal of Immunology* 164:183.
52. Shevach, E. M. 2000. Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol* 18:423.

53. Saudi, A., B. Seddon, D. Fowell, and D. Mason. 1996. The thymus contains a high frequency of cells that prevent autoimmune diabetes on transfer into prediabetic recipients. *Journal of Experimental Medicine* 184:2393.

Figure Legends:

Figure 1 – A) Lethally irradiated B6.Rag2^{-/-} mice were reconstituted with 4x10⁶ BM cells from B6.Ly5.2IL-2Rα^{-/-} and were left alone (10 mice) or received 10⁵ CD25⁺CD4⁺ T cells from normal B6.Ly5.1 donors 2 (9 mice) or 4 weeks (8 mice) after BM reconstitution. Results show the time of survival of the chimeras reconstituted with BM cells from B6.Ly5.2IL-2Rα^{-/-} alone (●), injected with CD25⁺CD4⁺ T cells from normal B6.Ly5.1 donors 2 weeks (■) or 4 weeks (▲) later. **B)** Phenotypic characterization of the peripheral LN CD4 T cells in a chimera reconstituted with BM cells from B6.Ly5.2IL-2Rα^{-/-} that received 10⁵ CD25⁺CD4⁺ T cells from normal B6.Ly5.1 donors 2 weeks later. Chimeras were sacrificed for FACS analysis 16-20 weeks after BM transfer. Similar results were obtained in the remaining 8 mice from the same group.

Figure 2 – A) Lethally irradiated B6.Rag2^{-/-} mice were reconstituted with 4x10⁶ cells from a mixture of 50% BM cells from B6.Ly5.2IL-2Rα^{-/-} and 50% of BM cells from B6.Ly5.2.TCRα^{-/-} and normal B6.Ly5.1 donors the latter mixed at different ratios. Results show the time of survival of the chimeras reconstituted with 50% BM cells from B6.Ly5.2IL-2Rα^{-/-} and 50% of BM cells from B6.Ly5.2.TCRα^{-/-} (●), 50% BM from B6.Ly5.2IL-2Rα^{-/-}, 45% BM from B6.Ly5.2.TCRα^{-/-} and 5% BM from normal B6.Ly5.1 (▲), 50% BM from B6.Ly5.2IL-2Rα^{-/-}, 40% BM from B6.Ly5.2.TCRα^{-/-} and 10% BM from normal B6.Ly5.1 (✕), 50% BM from B6.Ly5.2IL-2Rα^{-/-} and 50% BM from normal B6.Ly5.1 (■). Number of mice/group: 9. **B)** Dot plot shows the frequency of CD25⁺CD4⁺ T cells in the lymph nodes of chimeras reconstituted with 50% BM from B6.Ly5.2IL-2Rα^{-/-} and 50% BM from normal B6.Ly5.1. Similar results were obtained in the other chimeras.

Figure 3 – Lethally irradiated B6.Rag2^{-/-} mice were reconstituted with ~1x10⁶ cells from a mixture of 50% BM cells from B6.Ly5.2IL-2Rα^{-/-} and 50% of BM cells from B6.Ly5.2.TCRα^{-/-}. Control chimeras received a mixture of 50% BM cells from B6.Ly5.2IL-2Rα^{-/-} or

B6.II-2^{-/-} and 50% of BM cells from B6.Ly5.2.TCR α ^{-/-}. **A)** Results show the time of survival of the chimeras reconstituted with 50% BM cells from B6.II-2R α ^{-/-} and 50% of BM cells from B6.II-2^{-/-} (■), 50% BM cells from B6.II-2R α ^{-/-} and 50% of BM cells from B6.TCR α ^{-/-} (●), 50% BM cells from B6.II-2^{-/-} and 50% of BM cells from B6.TCR α ^{-/-} (not shown). Note that the transfer of lower numbers of precursor cells delayed lymphoid reconstitution and death (compare to fig. 2A) of the host mice injected with BM cells from B6.II-2R α ^{-/-} and from B6.TCR α ^{-/-} donors. Number of mice/group: 9. **B)** Phenotypic characterization of the peripheral LN CD4 T cells in a chimera reconstituted with BM cells from B6.II-2R α ^{-/-} and B6.II-2^{-/-} donors. Similar results were obtained in the remaining mice from the same group.

Figure 4 - Expansion capacity of CD4 T cell populations of C57BL/6 mice. Different numbers of purified naïve CD4⁺ and CD25⁺CD4⁺ T cells (1000-100000) were transferred into CD3 ϵ ^{-/-} mice. The results show the number of CD4 T cells recovered 10-11 weeks after transfer in the spleen and LN of each individual host (the mean value is also shown).

Figure 5 - Sequential cell transfers. **A)** T cell deficient mice were injected with 5x10⁴ naïve CD4⁺ and 7 weeks later they received 5x10⁴ naïve CD4⁺ T cells which differ in the Ly5 allotype. All mice were sacrificed 14 weeks after the first injection. Control mice received either the first (left column in each quadrant) or the second (right column in each quadrant) population alone and were killed 7 weeks after transfer. Note that the hosts were age matched, i.e. recipients were injected with the first population at 7 weeks of age and received the second population at 14 weeks of age, a difference which may explain the greater growth of the second cell population when transferred alone. **B)** As for A), except that the mice were injected first with 5x10⁴ naïve CD4⁺ and seven weeks later they received 5x10⁴ CD25⁺CD4⁺ T cells. Differences between CD25⁻ derived cells at 14 weeks in absence or in presence of V cells were highly significant ($p < 0.001$). **C)** As for A), except that the mice were

injected first with 5×10^4 $CD25^+CD4^+$ and later $CD25^+CD4^+$ T cells. Results show the mean+sem (4-5 mice/group) of the number of cells recovered from the first (open bars) or the second (full bars) injected population. **D)** As for A), except that the mice were injected first with 5×10^4 $CD25^+CD4^+$ and later 5×10^4 naïve $CD4^+$ T cells. The use of Ly5 different T cells allows the easy identification of T cells from each donor population.

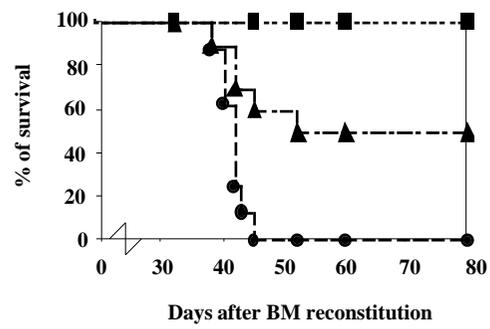
Figure 6 – Secondary cell transfers: 10^4 naïve $CD4^+$ Ly5.2 T cells were transferred alone or co-injected with 5×10^4 of either $CD25^+$ and $CD25^-$ Ly5.1 T cells recovered from mice injected 7 weeks before with 3×10^4 $CD25^+CD4^+$ Ly5.1 T cells. Control mice were injected with $CD25^+$ and $CD25^-$ Ly5.1 T cells alone. **A)** Results show the total number of $CD4^+$ T cells from naïve $CD4^+Ly5.2$ origin. The mean value is also shown. **B)** Shows the total number of Ly5.1 T cells recovered in mice injected with $CD25^+$ (●) and $CD25^-$ (▲) cells recovered from mice injected 7 weeks before with 10^4 $CD25^+CD4^+$ Ly5.1 T cells alone or co-injected with naïve $CD4^+Ly5.2$ (see A). The mean value is also shown.

Figure 7 - A) A population of 10000 naïve $CD4^+$ cells was transferred alone or mixed with increasing numbers of $CD25^+CD4^+$ cells from different Ly5 allotype congenic donors into $CD3\epsilon^{-/-}$ hosts. Results show the number of $CD4^+$ T cells from naïve $CD4^+$ origin recovered 8 weeks after transfer in the spleen and LN of each individual host (the mean value is also shown). **B)** Shows the total number of $CD4^+$ T cells from $CD25^+CD4^+$ origin recovered in the same hosts. **C)** A population of 15000 purified $CD8^+$ LN cells was transferred alone or mixed 150000 $CD25^+CD4^+$ cells from different Ly5 allotype congenic donors into $CD3\epsilon^{-/-}$ hosts. Results show the number of $CD8^+$ T cells recovered 8 weeks after transfer in the spleen and LN of each individual host (the mean value is also shown). **D)** Different numbers of purified naïve $CD4^+$ were co-transferred with $CD25^+CD4^+$ T cells at different cell ratios. The results show the number of $CD4^+$ T cells from naïve $CD4^+$ origin recovered 8-9 weeks

after transfer in the spleen and LN of each individual host (the mean value is also shown). **E)** 2×10^5 CFSE labeled $CD45RB^{high}CD25^{-}CD4^{+}$ T cells from B6.Ly5.1 donors were transferred alone (top) or in the presence (bottom) of 1×10^6 $CD45RB^{low}CD25^{+}CD4^{+}$ Ly5.2 T cells into irradiated (400 rads) $CD3\epsilon^{-/-}$ hosts. At days 3, 6 and 10 post-transfer mice were sacrificed and the expression of CFSE analyzed in gated $Ly5.1^{+}CD4^{+}$ T cells. Shown are the relative fraction (%) of cells have divided more than 8 or in the first 3 rounds of division as well as the total number of CFSE- and CFSE⁺ cells at day 10.

Figure 8 - A) $CD4^{+}$ ($CD25^{-}$) T cells (7500) from $IL-2R\alpha^{-/-}$ or normal B6 donors were transferred alone or co-injected with 75000 $CD25^{+}CD4^{+}$ from normal mice. The results show the number of $CD4$ T cells recovered 7-8 weeks after transfer in the spleen and LN of each individual host (the mean value is also shown). **B)** Naïve $CD4^{+}$ ($CD25^{-}$) T cells (10000) from $IL-2^{-/-}$ mice were transferred alone or co-injected with 10000 $CD25^{+}CD4^{+}$ from B6.Ly5.1 mice and naïve $CD4^{+}$ ($CD25^{-}$) T cells (10000) from normal B6.Ly5.1 donors were transferred alone or co-injected with 10000 $CD25^{+}CD4^{+}$ from normal B6.Ly5.2 or $IL-2^{-/-}$ mice. The results show the number of $CD4$ T cells from $CD25^{-}$ origin recovered 7-8 weeks after transfer in the spleen and LN of each individual host (the mean value is also shown). Note that cells from $IL-2^{-/-}$ mice inhibit expansion of naïve T cells from normal donors and that the $CD25^{+}CD4^{+}$ T cells from normal B6 donors inhibited the expansion of the cells from $IL-2^{-/-}$ mice.

A)



B)

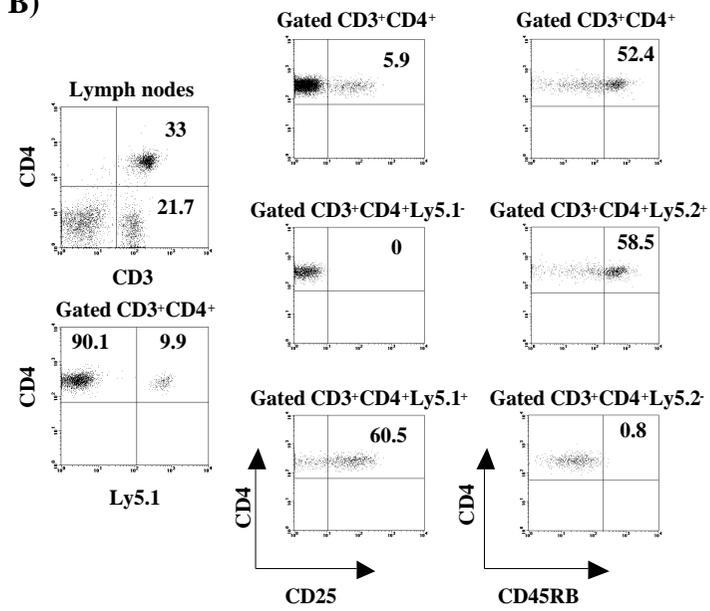
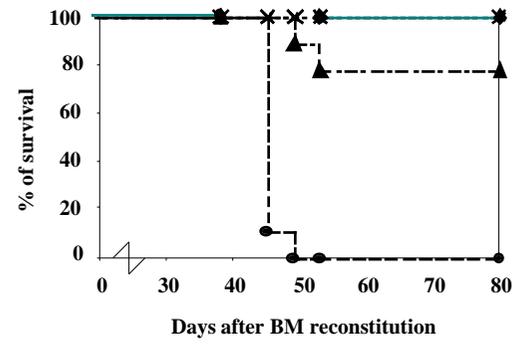


Fig.1

A)



B)

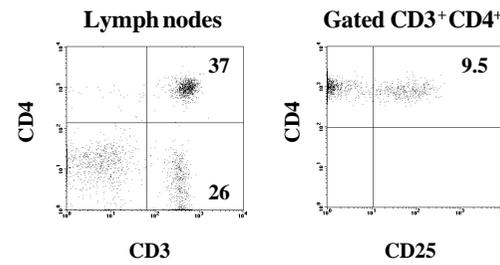
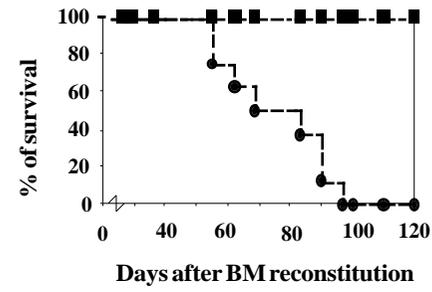


Fig.2

A)



B)

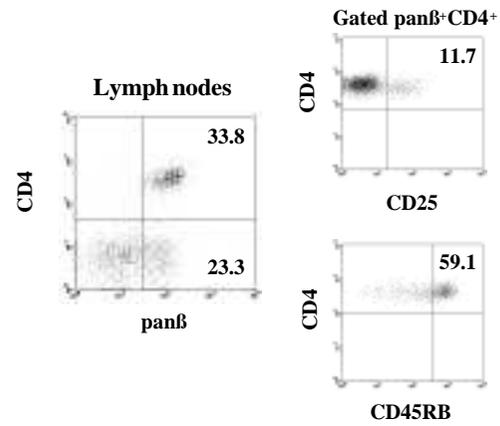


Fig.3

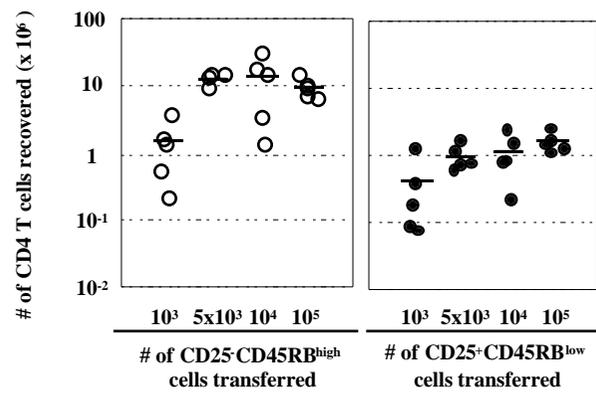


Fig.4

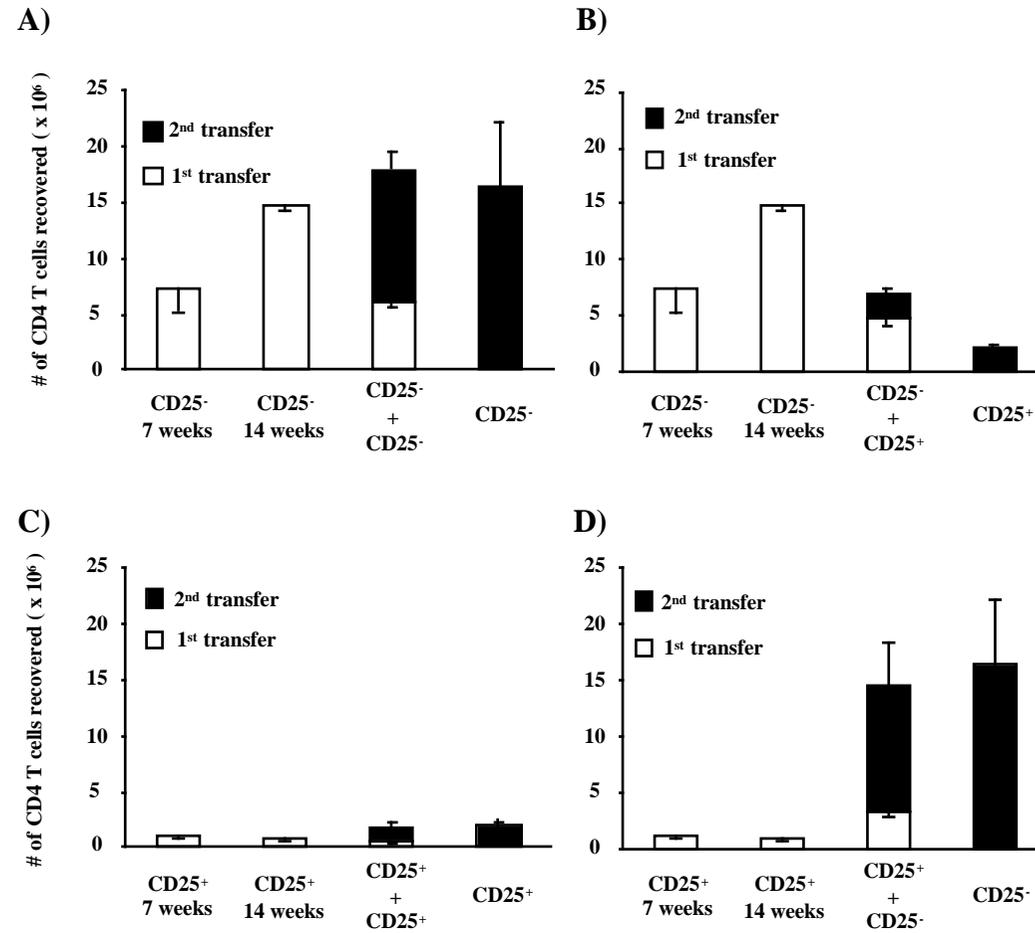


Fig.5

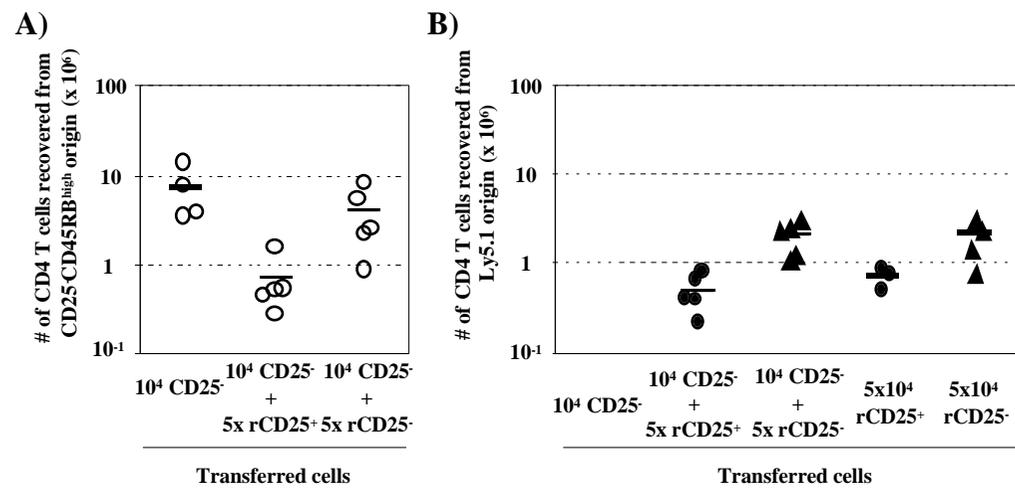


Fig.6

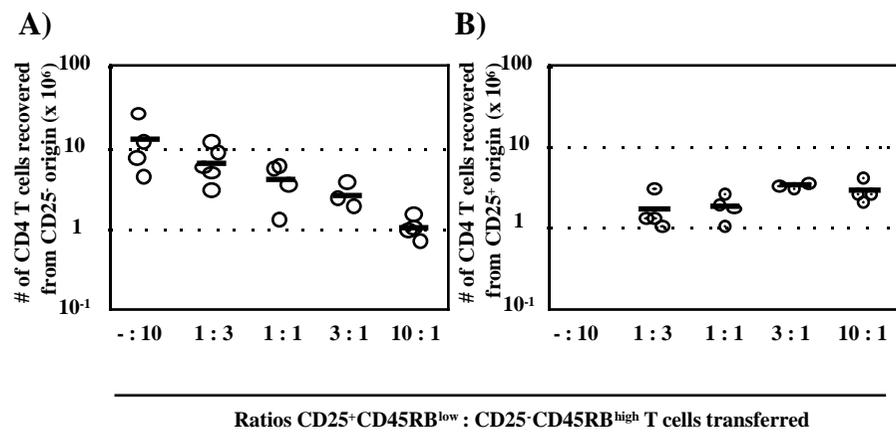


Fig.7A/B

E)

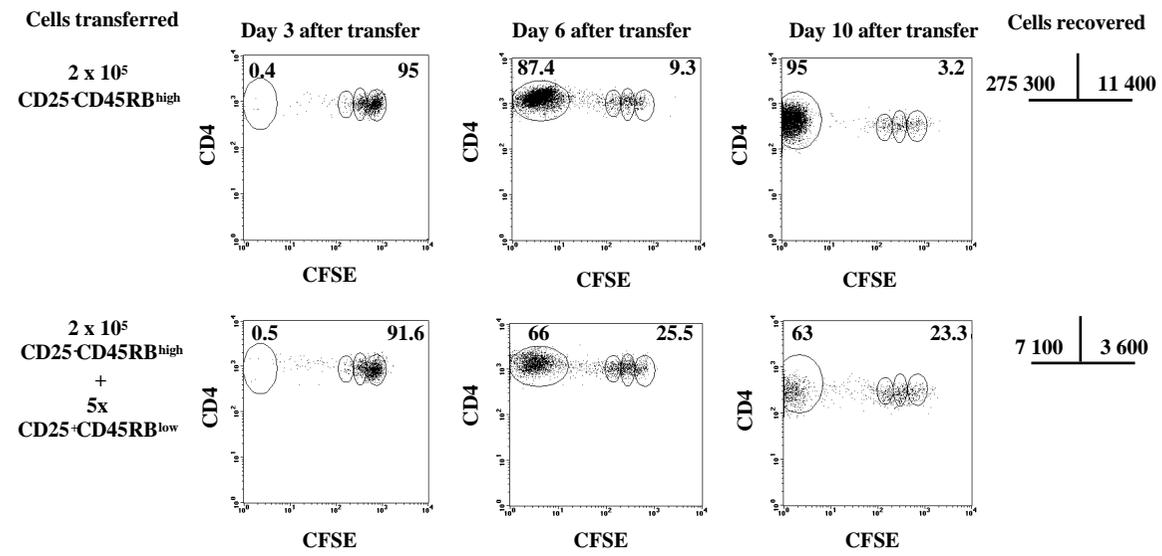


Fig.7E

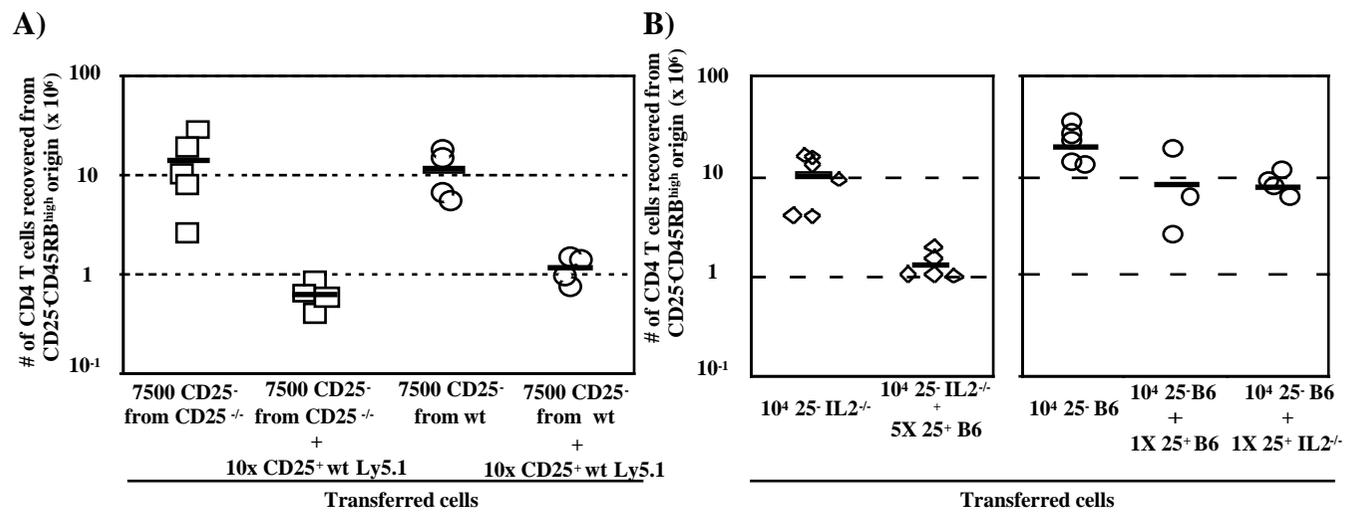


Fig.8

Résumé

La composition des compartiments lymphocytaires T est soumise à de constantes modifications, sous l'effet conjugué de la production de nouvelles spécificités, de la sélection lors d'une rencontre avec un antigène et de la mort cellulaire. Face à ces flux de cellules entre les différents compartiments centraux et périphériques, les mécanismes de la régulation homéostatique assurent le fait que le système immunitaire se maintienne à l'équilibre. A l'image d'un écosystème, on peut alors observer que les lymphocytes T entrent en compétition les uns avec les autres pour des niches de sélection et des ressources en quantité limitée. Durant ce travail de thèse, réalisé chez la souris, nous avons analysé le comportement des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ face à un bouleversement de leur environnement, et nous avons travaillé sur les molécules de classe I du CMH comme modèle de ressource nécessaire à la survie des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺.

Dans un premier temps, nous avons étudié la sélection centrale et périphérique de cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ exprimant deux transgènes codant respectivement pour le TCR aHY, spécifique de l'antigène mâle H-Y, et le TCR P14, spécifique du peptide gp33-41 issu du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV). Ce modèle reproduit un phénomène courant dans le système immunitaire, puisqu'on trouve chez l'homme et la souris jusqu'à 30% de cellules exprimant deux TCR différents à leur surface. Nos résultats montrent que l'expression de deux TCR par les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ leur permet d'échapper partiellement à la sélection négative dans le thymus, et de résister à la délétion clonale à la périphérie. Dans un second temps, nous avons étudié l'établissement d'une infection chronique par le LCMV dans des souris n'ayant pour lymphocytes que des cellules T exprimant le TCR P14 (souris MoP14). Nous avons pu observer que cette infection passe par la sélection de variants viraux spécifiquement mutés au niveau de l'épitope gp33-41, mais également par la modification du comportement des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ des animaux. L'ensemble de ces données plaide pour un modèle d'adaptation des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ à leurs conditions environnementales.

Enfin, nous avons étendu ce travail à l'étude de l'influence des molécules de classe I du CMH sur la survie et la prolifération homéostatique des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺, en utilisant une gamme de souris transgéniques pour le TCR. Nos résultats montrent une variété de comportements en relation avec la réactivité croisée supposée des différents TCR utilisés.