



**HAL**  
open science

# Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des différentes populations de Lymphocytes T CD4 Folliculaires Mémoires

Assia Asrir

► **To cite this version:**

Assia Asrir. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des différentes populations de Lymphocytes T CD4 Folliculaires Mémoires. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30084 . tel-01297856

**HAL Id: tel-01297856**

**<https://theses.hal.science/tel-01297856>**

Submitted on 5 Apr 2016

**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.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Assia ASRIR**

**le** mercredi 15 juillet 2015

**Titre :**

Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des différentes populations  
de Lymphocytes T CD4 Folliculaires Mémoires

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Immunologie

**Unité de recherche :**

UMR 1043 - Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Dr Nicolas Fazilleau

**Jury :**

Pr Roland Liblau	Président
Dr Thierry Defrance	Rapporteur
Dr Hélène Dumortier	Rapporteur
Dr Arnaud Moris	Rapporteur
Dr Abdelhadi Saoudi	Examineur
Dr Nicolas Fazilleau	Directeur

A mes Parents : mon père mon Roi, ma mère ma Reine.  
Vous êtes ce que j'ai de plus précieux sur Terre, un trésor dans mes yeux,  
un bijou dans mon cœur..  
Vous aimer c'est aussi vous rendre fière.

A ma famille, mes frères et sœurs, à mon Mari et mon enfant.  
Je vous aime tous très fort.

A toute ma Famille partout dans le Monde.

A mes amies qui m'ont toujours soutenues.

## Mes Remerciements

Mon Patron « Mr le Dr Nicolas Fazilleau » un chocolat noir à 99,99 %, du pur cacao, un caractère bien trempé, une personnalité forte et respectable. De la Science sans sucre ajouté, un vrai plaisir à partager avec modération.

« Dr » enlevé pour plus de proximité tout de même mais j'ai gardé « Mr » Fazilleau et je l'appelle « Nicolas » entre collègues de boulot mais « jamais » devant lui.. Pourquoi ? Impossible à expliquer. Un jour le tutoyer, l'appeler par son prénom? je vous dirai « je ne sais pas » quelle étrange attitude vous me direz ! Mais SI, je sais, c'est ma façon de lui exprimer à mon niveau un profond respect. Si je l'appelais par son prénom, je trouverai cela bizarre, des « Nicolas » j'en connais d'autres mais comme lui il y en a pas deux..

Mr Fazilleau je vous remercie de m'avoir fait confiance, d'avoir cru en moi. Vous avez été patient et compréhensible souvent lorsque parfois je me sentais dépassée par des événements de ma vie. Dans votre laboratoire je suis arrivée en M2R avec beaucoup d'ambition, je me rappelle de notre premier entretien. Je me souviens aussi de la première manip ou je vous regardais faire, comment broyer une rate comment faire des marquages.. Vous m'avez appris à manipuler les souris, et quand je n'y arrivais pas vous trouviez toujours les mots pour me rassurer. Les manip lorsque je me trompais sans panique vous me disiez que ce n'était pas grave, c'est des choses qui arrivent.. Au facs, lorsque je terminais tard vous passiez me voir avant de partir pour me souhaiter bon courage. Un encadrant attentionné, j'ai connu. Et puis vous comme moi on a vu des années passer, j'ai pris mon envolé et pris du plaisir à être autonome et vous, probablement parce-que vous saviez de quoi j'étais capable, vous m'avez poussé à dépasser mes limites.. Merci pour tous ce que vous avez fait pour moi.

Enfin je garderai toujours en mémoire ce coup de fil à l'autre bout du monde, lorsque vous m'avez conseillé de revenir pour faire mon doctorat, devenir docteur un jour, ce jour est arrivé et je vous dois toute ma gratitude. Merci Infiniment.

Mylene ma mymelène, un sucre blond, une petite douceur fourrée à la noisette et au beurre salé ☺ on s'y attache vite, une sensibilité bien cachée, une fragilité enrobée d'une force capable de déplacer des montagnes.. Merci Mylène, je suis très contente d'avoir fait ta connaissance. Tu es forte et douce, tu es attentionnée et intelligente... Tu connais probablement toutes les facettes de ma personnalité. Tu as su m'écouter dans mes moments de doutes, lorsque je me sentais complètement perdue et que je ne savais plus trop ce que je voulais faire de ma vie..

Mylène je veux te dire que j'ai une grande estime pour toi et tu le sais! Tu ne mérites pas AI mais je te vois plutôt chef d'équipe, une équipe dans laquelle on a qu'à bien se tenir sinon ça va barder ☺ Merci pour tout Mylène, continue d'être fidèle à toi même, ne changes rien ! Tu mérites beaucoup de bonheur et de réussite dans ta vie future.

Corine halala une pâtisserie raffinée, Corine une grande Dame, Femme de Pharaon, Corine tu m'inspires la force, le courage. Un exemple de maman dévouée, de Femme respectable, de collègue de travail rigoureuse et toujours prête à aider et à rendre service. Tu mérites toute ma gratitude et si ça ne tenez que de moi je te donnerai

toutes les primes du monde entier pour t'élever au plus haut grade. Tu es si gentille et tu m'as bien souvent fait comprendre que la gentillesse est un ingrédient qu'il faut bien doser, ni trop salée, ni trop sucrée.. Je te souhaite en tout cas la crème des crèmes, de déguster, de savourer le bonheur à toutes les sauces car vraiment tu le mérites.

Ahhhh Meryem, une crème glacée nappage chocolat et caramel, une crème qui ne fond jamais ! Meryem je crois qu'il me faudrait t'écrire un roman pour te dire les choses. J'ai découvert une sœur, j'ai appris qu'avant d'arriver à Toulouse elle a vécu à Paris, une jeune femme forte, courageuse, persévérante. Ton parcours m'impressionne tellement.. tu es un exemple pour moi. Tu as affronté des difficultés avec force et courage. Dans ton histoire je me retrouve parfois. Tu es probablement celle qui peut comprendre ce que je ressens, parfois mieux que personne. Tes conseils sont si précieux pour moi. Avec un double langage on jongle toi et moi, entre discussion sérieuse et éclats de rire, non il n'y a entre nous aucune frontière. D'une seconde à l'autre on pouvait changer de sujet, partager nos idées, on pouvait rire d'une bêtise, d'une situation désespérée.

Meryem une maman forte, une mère exemplaire, une organisation d'acier. Je te souhaite un beau bébé, une vie heureuse avec ta petite famille. Avec toi j'ai appris encore plus que jamais le sens du destin, de la patience dans la vie. Quand je t'entend parler de Science, de Recherche je vois une personne épanouit dans son métier ! Tu mérites la réussite professionnelle. Je te garderai sans doute toujours en mémoire, tu peux compter sur moi.

Antoine un gars très sympas, un petit prince dans un sachet individuel ☺ très cool un collègue de bureau très agréable à vivre. A la fois réservé et très ouvert pour discuter de tout et de rien. Tu as la qualité de toujours relativiser dans la vie. Disponible pour répondre à une question, pour donner un conseil, pour rendre service. Merci pour tous et bonne continuation pour la suite.

Sveti une bière dont personne ne connaît la marque, au parfum de la Bulgarie ☺ Sayez tu es parti et j'ai pris ta place de bureau mais quel vide tu nous a laissé.. Tu étais le chouchou du patron et c'est sure je ne pourrais jamais te remplacer. Je me rappelle de tes éclats de rire, de tes blagues à profusion, de ta bonne humeur contagieuse. J'ai passé de très bon moment en ta compagnie et je te souhaite ce qu'il y a de meilleure dans ta vie.

Sylvie une épice entre le salé et le sucré, une saveur qui relève les plats chauds et les rend gouteux, Sylvie une grande personnalité. Une femme qui s'est imposée dans son métier, qui dirige au milieu d'hommes, qui mérite tout le respect. Sylvie tu m'as fait pleuré, rire et tu m'as appris tant de choses.. Grace à toi je me suis efforcée à adopter la rigueur, à justifier mes propos, à n'utiliser que les termes adaptés, bien placés, à savoir parler Science, Expliquer Science sans raconter des Histoires.. Merci pour ton écoute Sylvie, pour ta disponibilité et pour tes précieux conseils.

A toute l'équipe SG, plus particulièrement Karim, Delphine, Laurent et Martine je voudrais vous remercier profondément. Karim un vrai Tiramissou au multiples saveurs oscillant entre le chocolat et le café. Karim chaque jour tu nous laisses découvrir une de tes personnalités à la fois riches et tellement mystérieuses. Un mystère que tu aimes cultiver, tu es un homme à la fois battant, un guerrier et à la fois si doux et attentionné. Je te souhaite de t'épanouir dans ta vie personnelle et pour ton métier, je te le dis et redis, retourne en politique, ils ont besoin de gens comme toi ☺. Ahh Delphine une meringue saveur vanille, une meringue douce et fragile, sur une île flottante tu aimes t'évader. J'ai découvert en toi un univers, une personnalité unique. Un visage d'ange, une voix douce et une innocence rare. J'ai beaucoup apprécié échanger avec toi, c'était à chaque fois dans la joie et la bonne humeur, je garde de jolis souvenirs de moments passés avec toi. Je te souhaite une bonne continuation pour ta thèse. Laurent un bonbon sous forme de grand nounours, enrobé chocolat, sensible et à la fois protecteur. Laurent je te dois beaucoup, tu as toujours été disponible pour moi, tu as toujours pris le temps de m'écouter, de me conseiller. Tu es quelqu'un de très sympa, très intelligent et j'ai appris beaucoup de choses en ta compagnie. Je te souhaite de t'épanouir dans ta nouvelle vie à Lyon, de trouver tes repères au sein de ta nouvelle équipe, je te souhaite de réussir dans ta vie. Martine une tisane miel-verveine, une pause douceur, une agréable compagnie. Martine j'ai gardé nos conversations en mémoire dans lesquelles j'ai souvent voyagé. Je te souhaite une très bonne retraite, bien méritée avec massage et jacousie à volonté, prends bien soin de toi.

Merci à tous ce que j'ai croisé durant ma Thèse, Jennifer, Sarah, Edi, plus récemment Nelly, Maeva et Alba. Ahhhh Alba je fais une petite pause sur toi Alba. Alba tu es cette recette espagnole que j'ai eu du mal à déchiffrer au départ, mais lorsque j'ai saisi l'accent j'ai compris l'ingrédient principale : le soleil. Qu'est-ce que j'ai aimé faire ta connaissance ! tu es une fille unique, avec une gentillesse débordante, une sensibilité sans pareil. Je te souhaite Alba beaucoup de bonheur et de réussite, tu le mérites pleinement.

A tous ce que je n'ai pas cité, avec qui j'ai partagé une discussion, un rire, une gourmandise sachez qu'après avoir travaillé autant d'année sur des cellules mémoires, l'avantage c'est que mes neurones se rappellent ..



<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....</b>	<b>14</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>19</b>
<b>I-Acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans les réponses B-T dépendantes.....</b>	<b>20</b>
<b>1- Introduction sur la Vaccination et réponses B-T dépendantes</b>	
1.1- La vaccination	
1.2- Les réponses B T-dépendantes	
<b>2- Structure des organes lymphoïdes primaires et secondaires</b>	
2.1- Les organes lymphoïdes primaires	
2.2- Les organes lymphoïdes secondaires	
2.2.1- Structure anatomique des NL	
2.2.2- Structure anatomique de la Rate	
<b>3- Les acteurs moléculaires de la reconnaissance spécifique de l'Ag</b>	
3.1- Construction et Organisation des gènes du TCR $\alpha\beta$	
3.2- Locus TCR $\beta$ et TCR $\alpha$	
3.3- Mécanisme de réarrangements V(D)J : La diversité Combinatoire	
3.4- Ajout et délétion de nucléotides : La diversité Jonctionnelle	
3.5- Le complexe TCR	
<b>4- Circulation des LT à l'état basal et lors de l'Inflammation</b>	
4.1- Rôle des chimiokines dans le trafic des Lymphocytes	
4.2- Entrée et Sortie des Lymphocytes à travers les OLII	
4.2.1- Entrée des lymphocytes par les HEV	
4.2.2- L'implication de la S1P dans la sortie des lymphocytes	
<b>5- La rencontre avec les DCs: rôle pivot et lien entre immunité Innée et Adaptative</b>	
5.1- La DC : Charnière entre Immunité Innée et Adaptative	
5.2- Ontogénie des DCs	
5.3- Maturation et Migration des DCs	
<b>II-Activation et polarisation des cellules T CD4.....</b>	<b>36</b>
<b>1- Les 3 signaux nécessaires à l'activation des LT</b>	
<b>2- La différenciation des LT CD4</b>	
2.1- Les cellules T <sub>H1</sub>	
2.2- Les cellules T <sub>H2</sub>	
2.3- Les cellules T <sub>H17</sub>	
2.4- Les cellules iTreg	
2.5- Les cellules T <sub>H9</sub>	
2.6- Les cellules T <sub>H22</sub>	
<b>3- Les LT CD4 folliculaires ou T<sub>FH</sub></b>	
3.1- Découverte des LT CD4 folliculaires	

### 3.2- Différenciation et Caractérisation des LT CD4 folliculaires

#### 3.2.1- Facteurs impliqués dans la différenciation des T<sub>FH</sub>

3.2.1.1- Le facteur de Transcription Bcl-6

3.2.1.2- Les autres facteurs de Transcription

3.2.1.3- Rôle des Cytokines dans la différenciation des LT<sub>FH</sub>

3.2.1.4- Rôle de l'Ag et de la force du signal via le TCR

#### 3.2.2- Facteurs impliqués dans la fonction des T<sub>FH</sub>

### 3.3- La plasticité entre T<sub>FH</sub> et autres lignages effecteurs

## III- La réponse B-T dépendante.....53

### 1- L'activation Ag spécifique des LB

#### 2- Contact entre les pré-T<sub>FH</sub> et les LB : réponse extra-folliculaire vs réaction du centre germinatif

2.1- Paramètres impliqués dans l'induction d'une réponse extra-folliculaire

2.2- L'interaction T<sub>FH</sub>-B-CDF : la réaction du CG

2.2.1- Réaction du CG

2.2.2- Facteurs important pour le développement de T<sub>FH</sub> et des LB du CG

2.2.3- Pendant et après la réaction du CG : le devenir des T<sub>FH</sub> du CG

#### 3- Les T<sub>FH</sub> dans certaines pathologies humaines

3.1- Les T<sub>FH</sub> dans l'Infection au VIH

3.2- Les T<sub>FH</sub> dans l'Auto-immunité et le Cancer

## IV- La Mémoire Immunologique.....61

### 1- Génération et Caractéristiques des LT mémoires

1.1- Les Trois phases de la réponse immunitaire T-dépendante

1.2- Les caractéristiques des LT mémoires

1.3- Paramètres qui influencent la mise en place de la mémoire T

1.3.1- La Fréquence des précurseurs de LT CD4 naïfs

1.3.2- La signalisation via le TCR : avidité du TCR, durée et intensité régulent la génération des LT CD4 mémoires

1.3.3- Rôle des molécules de costimulation CD40L et CD28

1.3.4- Rôle de l'IL-2 et IL-2r

1.3.5- Base épigénétique de la mémoire des LT CD4

1.3.6- Rôle de la phase de contraction

1.3.7- La conservation de l'engagement dans le lignage spécifique de départ : du LT effecteur au LT mémoire

1.4- Les modèles de différenciation des LT mémoires

1.4.1- Le modèle de différenciation linéaire

1.4.2- Le modèle progressif de différenciation

1.4.3- Le modèle de différenciation divergent

### 2- Paramètres de maintien et d'homéostasie de la mémoire des LT

#### 3- Diversité des populations de LT Mémoires : T<sub>CM</sub>, T<sub>EM</sub> et T<sub>RM</sub>

3.1- La découverte des T<sub>EM</sub> et T<sub>CM</sub> chez l'Homme

3.2- La découverte des T<sub>EM</sub> et T<sub>CM</sub> chez la souris

### 3.3- Les LT mémoires résidents $T_{RM}$

## 4- Les $T_{FH}$ mémoires : découverte, phénotypes et fonction

### 4.1- Découverte, phénotype et fonction des $T_{FH}$ mémoires

### 4.2- Hétérogénéité au sein des $T_{FH}$ mémoires

#### 4.2.1- Les $T_{FH}$ mémoires locales au niveau des OL

#### 4.2.2- Les $T_{FH}$ mémoires circulantes

#### 4.2.3- Les $T_{FH}$ mémoires de la Moelle Osseuse

### 4.3- Développement et précurseurs des $T_{FH}$ mémoires

## 5- Les lymphocytes B mémoires

### 5.1- Génération des sous-populations de LB mémoires

#### 5.1.1- Les LB mémoires T-indépendants

#### 5.1.2- Les LB mémoires T-dépendant mais indépendants du CG

#### 5.1.3- Les LB mémoires dépendants du CG

### 5.2- Hétérogénéité au sein des LB mémoires T-dépendants

## 6- La réponse Ac secondaire : Dialogue avec les LB et rôle des $T_{FH}$ mémoires

### 6.1- Pré-existence d'un CG, induction d'une réponse secondaire de haute affinité

### 6.2- Rediversification de la réponse Ac au cours du temps

## 7- Maintien et/ou Survie des $T_{FH}$ et LB mémoires

### 7.1- Les voies de signalisations impliquées dans la survie des LT CD4 mémoires

### 7.2- Les voies de signalisation impliquées dans la survie des LB mémoires

## V- Objectifs Poursuivis.....96

## RÉSULTATS.....97

### I- Les $T_{FH}$ mémoires locales (NL drainants) vs circulantes (rate) .....100

### II- Les $T_{FH}$ mémoires de la MO.....144

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....150

### 1- La Classification des $T_{FH}$ mémoires spécifiques à l'Ag

### 2- Les paramètres impliqués dans la RETENTION des $T_{FH}$ mémoires

#### 2.1- L'interaction CD69-S1Pr

#### 2.2- Rôle de l'Ag lors de la génération et du maintien des $T_{FH}$

##### 2.2.1- L'Ag dans la génération et le maintien des $T_{FH}$ effecteurs

##### 2.2.2- Le rôle de l'Ag et de l'affinité du TCR lors de la génération et du maintien des $T_{FH}$ mémoires

### 3- Fonctionnalités et destins des couples $T_{FH}$ -LB mémoires

### 4- Compétition et compartimentalisation des $T_{FH}$ mémoires locales des NL drainants vs circulantes de la rate

**5- Les T<sub>FH</sub> mémoires résidentes périphériques au niveau de la MO**

**6- Les T<sub>FH</sub> mémoires : des bio-marqueurs dans notre sang.**

**RÉFÉRENCES.....166**

## RÉSUMÉ

Les LT CD4 folliculaires ( $T_{FH}$ ) forment un lignage distinct de LT contrôlant spécifiquement les lymphocytes B (LB) et la mise en place de la mémoire B. Alors que ces cellules étaient considérées comme des cellules effectrices uniquement, récemment il a été identifié, chez l'Homme et la souris, l'existence de  $T_{FH}$  mémoires. Les  $T_{FH}$  mémoires en tant que LT CD4 mémoires sont nécessaires, en cas de nouvelle rencontre avec l'antigène (Ag), à la mise en place d'une réponse Anticorps (Ac) rapide, efficace et de forte affinité. En effet, leur présence est corrélée à la génération et le maintien à long terme d'Ac de forte affinité lors d'infections virales. De plus, des études récentes montrent que l'analyse des  $T_{FH}$  mémoires dans le sang périphérique peut fournir des indices pour comprendre le mode d'action des vaccins ainsi que la pathogenèse de maladies auto-immunes. Par ailleurs, dans le contexte de nombreuses maladies, de récents travaux suggèrent que l'évaluation de la fréquence et du phénotype des  $T_{FH}$  mémoires dans le sang périphérique pourrait servir de bio-marqueur à l'établissement de diagnostic. Tout comme les cellules B mémoires qui sont subdivisées en différentes sous-populations en fonction de leur localisation et de la nature de leur Ac, différentes populations de  $T_{FH}$  mémoires ont été récemment identifiées. Certaines se situent dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) drainants le site d'immunisation, de vaccination ou d'infection, ou circulantes dans les OLS non-drainants ou à proximité des plasmocytes à longue durée de vie dans la MO. Ces observations soulèvent donc la question majeure de leurs phénotypes, différences fonctionnelles et interactions face aux différentes populations de cellules B mémoires.

L'objectif de mes travaux de Thèse a consisté à étudier l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle présente entre ces différentes populations de  $T_{FH}$  mémoires aux localisations diverses. De plus au vu de l'hétérogénéité existante au sein des LB mémoires (nœuds lymphatiques ou rate) et plasmocytes à longue durée de vie (MO), nous avons aussi évalué l'interaction cellulaire et fonctionnelle qui a lieu entre ces populations mémoires. Dans ce contexte, nous avons développé un modèle expérimental unique de vaccination protéique chez la souris sauvage non modifiée. Plus précisément, après immunisation, nous avons évalué le développement des  $T_{FH}$  mémoires et cellule B spécifiques du même Ag dans les OLS drainants, la rate et la MO.

Nous avons montré qu'en phase mémoire, les  $T_{FH}$  mémoires *locaux* (résidents au niveau de l'OLS drainant le site de vaccination) présentent un phénotype « plus polarisé » que les  $T_{FH}$  mémoires *circulants* (présents dans les OLS non drainants). Plus précisément, ces cellules expriment plus de Bcl-6, facteur de transcription régulant le programme génique des  $T_{FH}$ , mais aussi des molécules de co-stimulation comme ICOS et PD-1. De plus, bien que surprenant pour des cellules quiescentes, les  $T_{FH}$  mémoires *locaux* expriment le marqueur précoce d'activation CD69 alors que leurs homologues *circulants* au niveau de la rate, ne l'expriment pas. Parallèlement à ces observations phénotypiques, nous avons également mis en évidence que les  $T_{FH}$  mémoires *locaux*, majoritairement CD69<sup>+</sup>, portent des TCR d'affinité élevée. Cette observation corrèle avec l'expression de complexes peptide-CMHII (p:CMHII) retrouvés uniquement dans les OLS drainants et, plus précisément, à la surface des LB mémoires *locaux*. De façon intéressante, le blocage des interactions entre le TCR-p-MHCII induit la libération et la circulation des  $T_{FH}$  mémoires *locaux* ainsi que leur accumulation en périphérie. Par ailleurs nous avons montré qu'au niveau fonctionnel, après restimulation, les deux sous-populations de  $T_{FH}$  mémoires promeuvent la différenciation des LB en plasmocytes. Cependant, nous avons

montré que dans les phases précoces après restimulation, seuls les T<sub>FH</sub> mémoires *locaux* favorisent également la commutation isotypique des Ac ainsi que la sécrétion d'Ac de haute affinité. En parallèle et de façon cohérente à nos observations, nous avons montré que les LB mémoires *locaux* forment une population homogène programmée à se différencier en cellules effectrices alors que les cellules B *circulantes* constituent une population hétérogène avec une capacité de re-diversification de leurs Ac.

En conclusion, cette étude révèle que l'anatomie des sous-populations de T<sub>FH</sub> mémoires est fortement liée à celle des cellules B mémoires. Ce travail met également en avant que les T<sub>FH</sub> et LB mémoires, qui représentent les deux acteurs majeurs de la mémoire humorale, ont une action complémentaire permettant d'adapter, en fonction de leur localisation et de leur capacité fonctionnelle, la nature de la réponse Ac. Cette découverte pourrait à terme avoir une grande incidence notamment dans la conception des vaccins.

## ABSTRACT

T Helper Follicular ( $T_{FH}$ ) cells form a distinct lineage of helper T cells and they specifically control B cells and memory B cell generation. While these cells were considered as effector cells, recently it was identified in Human and in mouse, the existence of memory  $T_{FH}$  cells. Memory  $T_{FH}$  cells, as CD4 memory T cells, are necessary in case of antigen (Ag) rechallenge to establish a fast, efficient and high affinity Antibody (Ab) response. Indeed, their presence is correlated with the generation and the long-term maintenance of high affinity Ac during viral infections. Moreover, recent studies have shown that analysis of memory  $T_{FH}$  cells in the blood may provide clues to understanding the mode of action of vaccines and the pathogenesis of autoimmune diseases. In addition, in the context of many diseases, recent works have also suggested that the frequency and phenotype of memory  $T_{FH}$  cells in the blood could serve as a biomarker for diagnosis. Likewise to memory B cells that are subdivided into different cell populations based on their location and the nature of their Ab, different populations of memory  $T_{FH}$  cells have recently been identified. Some are in secondary lymphoid organs (SLO) draining the site of immunization, vaccination or infection, or circulating in the non-draining SLO or near the long-lived plasma cells (PC) in bone marrow (BM). These observations raise the question of their phenotypes, functional differences and interactions with the different subsets of memory B cells.

The aim of my thesis was to study the phenotypic and functional heterogeneity between the different subsets of memory  $T_{FH}$  cells. Due to the heterogeneity of memory B cells (draining lymph nodes or non-draining spleen) and long-lived PCs (BM), we also evaluated the cellular and functional interaction that occurs between these different memories populations. In this context, we have developed a unique experimental model of protein vaccination in unmodified wild-type mice. Specifically, after immunization, we evaluated the development of memory  $T_{FH}$  cells and memory B cells specific for the same Ag in the draining SLO and circulating in the spleen and BM.

We demonstrated that *local* memory  $T_{FH}$  cells (that reside in the draining SLO) exhibit a more polarized phenotype than their *circulating* counterparts (present in non-draining SLO). Specifically, these cells expressed higher level of Bcl-6, the transcription factor that regulates the  $T_{FH}$  lineage, but also co-stimulatory molecules such as ICOS and PD-1. In addition, although surprising to quiescent cells, *local* memory  $T_{FH}$  cells expressed the early activation marker CD69 while their *circulating* counterparts in the spleen did not. Along with these phenotypic observations, we also showed that *local* memory  $T_{FH}$  cells bore high-affinity TCR. This observation correlated with peptide-MHCII (pMHCII) complex found only in the draining SLO and, more precisely, at the surface of *local* memory B cells. Interestingly, blocking TCR/pMHCII interactions induced the release and circulation of *local* memory  $T_{FH}$  cells and their accumulation in the periphery. Furthermore, we showed after re-stimulation, the two subpopulations of memories  $T_{FH}$  cells promoted the differentiation of B cells into PCs. However, we also demonstrated that only local memory  $T_{FH}$  cells promoted isotype switch as well as the secretion of high affinity Ab in the early phase after Ag restimulation. In parallel and consistent with our observations, we found that *local* memory B cells formed a homogenous population programmed to differentiate into effector cells while circulating B cells were a heterogeneous population with a capacity to rediversify their Ab.

In conclusion, this study shows that the anatomy of memory  $T_{FH}$  cell subsets is strongly intertwined to that of memory B cells. This work also highlights that memory  $T_{FH}$  cells and memory B cells, which represent the two major players of the humoral memory, have a complementary action to adapt, depending on their location and their functional capacity, the nature of the Ab response. This discovery could ultimately have a significant impact in particular in the design of vaccines.

**LISTE DES ABBRÉVIATIONS**

<b>Ac</b>	Anticorps
<b>Ag</b>	Antigène
<b>APC</b>	Cellule Présentatrice d'Antigène
<b>BCR</b>	Recepteur à l'antigène des lymphocytes B (« B Cell Receptor »)
<b>CDR3</b>	complementary determining region
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>CSH</b>	Cellule Souche Hématopoïétique
<b>DC</b>	Cellule Dendritique
<b>CDF</b>	Cellule Dendritique folliculaire
<b>FT</b>	Facteur de transcription
<b>CG</b>	Centre Germinatif
<b>HEV</b>	« High Endothelial Venule »
<b>HMS</b>	Hypermutation somatique
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IFA</b>	Adjuvant incomplet de Freund
<b>IFN</b>	Interféron
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IL-r</b>	Recepteur à l'Interleukine
<b>LB</b>	Lymphocyte B
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LT</b>	Lymphocyte T
<b>MALT</b>	Tissu Lymphoïde associé aux muqueuses
<b>MO</b>	Moelle osseuse
<b>NL</b>	Nœud Lymphatique
<b>NP</b>	4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl
<b>OL</b>	Organe Lymphoïde
<b>OLI</b>	Organe Lymphoïde Primaire
<b>OLII</b>	Organe Lymphoïde Secondaire
<b>OVA</b>	Ovalbumine
<b>PCC</b>	Cytochrome C de pigeon
<b>pDC</b>	Cellule Dendritique Plasmacytoïde

---

<b>p : CMH</b>	complexe peptide : CMH
<b>S1P</b>	Sphingosine 1 Phosphate
<b>SIDA</b>	Syndrome d'immunodéficience acquise
<b>TCR</b>	Récepteur à l'antigène des LT (« T Cell Receptor »)
<b>T<sub>FH</sub></b>	Lymphocytes T CD4+ Folliculaire
<b>TdT</b>	Terminal deoxynucleotide Transferase
<b>TLR</b>	« Toll-Like Receptor »
<b>Th</b>	LT CD4+ auxiliaire
<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficience humaine

## *Avant-propos*

## Un Rappel sur notre Mémoire Immunologique

En 1781, une épidémie de rougeole survint dans les îles Féroé. Aucun autre cas ne fut observé pendant les soixante-cinq années qui suivirent. Puis un second épisode survint, qui affecta 75 % à 79 % de la population. Ludwig Panum, médecin danois, fit alors une observation très importante : « *Parmi les personnes âgées qui habitaient les îles Féroé et qui avaient eu la rougeole en 1781, aucune n'avait contracté la maladie une seconde fois.* » Le docteur Panum constata aussi que « *les gens âgés, non infectés en 1781, devenaient malades quand ils étaient exposés à l'infection* ». Ce travail pionnier mit en évidence deux points : premièrement, l'immunité contre la rougeole était de longue durée et, deuxièmement, une exposition répétée au virus n'était pas nécessaire au maintien de la protection immunitaire à long terme. Par ailleurs, l'historien grec Thucydide, en décrivant la peste à Athènes en 430 avant J.-C., avait déjà observé que « *la même personne n'était jamais atteinte deux fois* ». C'est le deuxième point, disant que la protection immunitaire pouvait être maintenue en l'absence de réexposition au virus, qui a donné une nouvelle dimension à la mémoire immunologique (Ahmed and Gray, 1996). Ces rappels de l'Histoire nous soulignent l'enjeu de la mémoire immunologique dans le débat actuel car la génération de vaccins efficaces est dépendante d'une bonne mémoire immunologique. Revenons un peu au contexte Historique qui accompagna la découverte des premiers vaccins.

Appelé aussi petite vérole, la variole est connue depuis l'Antiquité. Elle a été à l'origine au XVIIIème siècle d'épidémie qui toucha des milliers de victimes. Le premier procédé de prévention de la variole a été la «variolisation», c'est à dire que l'on inoculait à des sujets sains du pus provenant de lésions d'un malade atteint de variole. A cette période partout dans le monde différentes techniques sont utilisées. En Chine, on dépose du pus variolique sur la muqueuse nasale des enfants. En Perse, dans le Caucase ou dans certaines régions d'Afrique, on administre en sous-cutané un exsudat de plaie prélevé chez des patients présentant une forme bénigne de la variole. Dans l'Empire Ottoman ou encore en Europe, on faisait une inoculation intra-dermique de pus variolique desséché. Toutes ces techniques ont un objectif commun, celui de provoquer une infection bénigne chez l'individu inoculé afin de lui procurer une protection à vie grâce à la génération d'une mémoire immunitaire spécifique.

Le 14 mai 1796, Edward Jenner, médecin de la campagne anglaise, inocula pour la première fois le « cowpox » de vaches du Gloucester au petit James Phipps, âgé de 7 ans. A ce moment bien précis Jenner ne se doutait pas que son geste allait être répété un nombre de

fois incalculable et allait mettre fin à un fléau de l'humanité, la variole. Si la technique n'est pas neuve, le principe est fondamental : Jenner énonce le principe de l'atténuation des germes par passage d'une espèce animale à une autre. La vaccination est née. Cette définition évoluera avec de nouvelles découvertes notamment celle de Pasteur au 19<sup>ème</sup> siècle qui créera un vaccin atténué « artificiel ». En 1881, Pasteur avait constaté qu'une vieille culture de germe de cholera de poules protégeait l'animal contre l'injection d'une culture virulente. Il eu l'idée de préparer des vaccins en atténuant la virulence des germes par chauffage, dessiccation. Il prépara le vaccin contre le charbon du mouton et contre la rage. Pasteur énonce alors le principe de la vaccination « des virus affaiblis ayant le caractère de ne jamais tuer, de donner une maladie bénigne qui préserve de la maladie mortelle ».

Au début du 20<sup>ème</sup> siècle (1918), le monde a connu la « grippe espagnole » qui fit plus de morts que la première guerre mondiale. De plus, pendant les trois derniers décennies nous avons été confrontés à un autre virus mortel le VIH (virus de l'immunodéficiences humaine) qui est à l'origine du SIDA et qui fait environ 2 millions de morts chaque année. Le défi reste donc majeur. D'énormes progrès ont été réalisés dans le champ de l'Immunologie depuis le temps de Jenner. La vaccination fournit une des préventions médicales la plus rentable contre les maladies infectieuses.

La mise en place d'une mémoire immunitaire durable et efficace est l'objectif majeur de tout vaccin. Cependant pour générer une bonne mémoire immunitaire, il est nécessaire de mieux comprendre la biologie de ces cellules. Le cœur de mon travail est centré sur la mémoire immunitaire à médiation humorale qui tient une place essentielle dans la protection à long terme contre de multiples infections.

Lors de cette introduction nous passerons en revue l'architecture de nos organes lymphoïdes, le trafic des lymphocytes T (LT) ainsi que la structure de leurs immuno-récepteurs. Enfin nous arriverons au thème principal de mon travail qui est la mémoire immunitaire. Nous discuterons de la classification actuelle des cellules mémoires. Nous parlerons des débats actuels et des polémiques sur les mécanismes par lequel l'immunité protectrice est maintenue. Enfin nous passerons en revue notre compréhension actuelle des bases cellulaires de la mémoire immunologique ainsi que de la contribution majeure des principaux acteurs de mon projet de Thèse : les LT CD4 folliculaires ( $T_{FH}$ ) mémoires et les lymphocytes B (LB) mémoires qui constituent les piliers du maintien d'une réponse anticorps (Ac) à long terme.

# *INTRODUCTION*

## **I/ Acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans les réponses B-T dépendantes**

### **1/ Introduction sur la Vaccination et réponse B-T dépendantes**

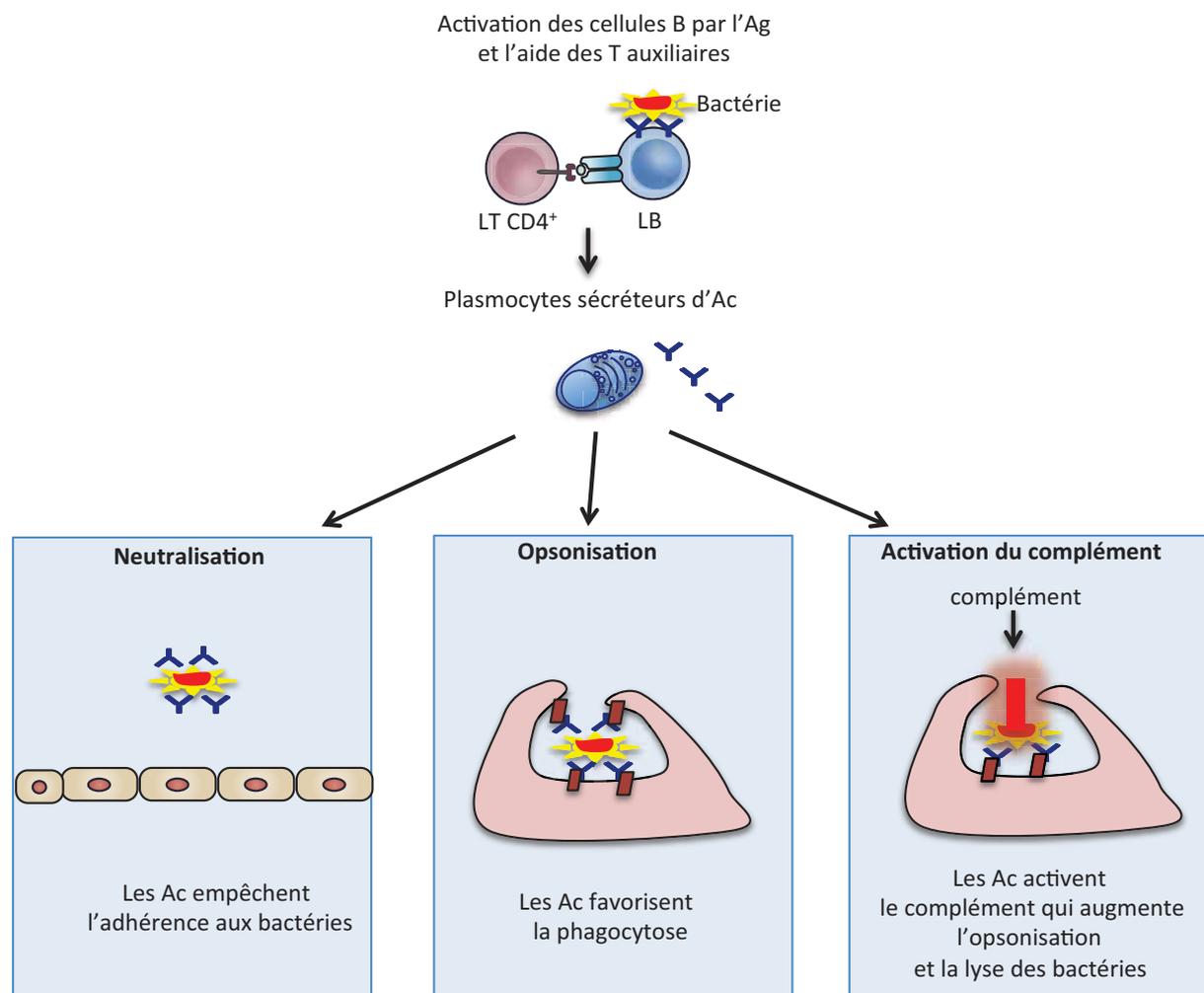
#### **1.1/ La vaccination**

L'efficacité des vaccins repose fortement sur la capacité de notre organisme à générer une mémoire immunitaire constituée de cellules B et T mémoires spécifiques du pathogène d'intérêt. La génération de cellules B mémoires, spécifiques du pathogène d'intérêt, nécessite que ces cellules subissent certains processus fondamentaux : la maturation d'affinité ainsi que la commutation isotypique qui permettent de générer des cellules B mémoires efficaces par la nature adaptée de leur Immunoglobulines (Ig) qui présentent une forte affinité pour l'antigène (Ag) issu du pathogène. Ces événements immunologiques sont dépendants principalement de l'aide et du soutien fournis par une population spécialisée de LT CD4 auxiliaires appelés les LT CD4 folliculaires ou  $T_{FH}$ . Enfin, la plupart des vaccins confèrent une protection en générant une immunité Ac ou humorale spécifique. Une réponse peut être conférée par une variété de vaccin incluant les vaccins vivants atténués, les protéines recombinantes ou encore les conjuguées.

#### **1.2/ Les réponses B-Tdépendantes**

Le rôle principal de la réponse immunitaire humorale est de conduire à la destruction des micro-organismes présents dans le compartiment extra-cellulaire et de prévenir ainsi la dissémination des infections. Cette propriété est réalisée par les Ac produits par les LB. Il existe trois voies principales permettant aux Ac de protéger l'individu. Les virus et les bactéries intracellulaires diffusent de cellule en cellule en se fixant sur des récepteurs spécifiques présents à la surface cellulaire. Les Ac peuvent prévenir ce phénomène en se fixant sur le micro-organisme. Cette réaction de neutralisation peut toucher la bactérie ou les toxines qu'elle produit. Certaines bactéries se multiplient dans le compartiment extracellulaire. A ce niveau, les Ac peuvent aussi se fixer sur le pathogène et faciliter sa prise en charge par les cellules phagocytaires spécialisées dans la destruction des bactéries. Ce mécanisme est appelé opsonisation. Les Ac fixés à la surface du pathogène peuvent activer les fractions du complément. Ces protéines, fixées à la surface bactérienne, peuvent interagir avec

des récepteurs spécifiques présents sur le phagocyte et favoriser la phagocytose. D'autres composants du complément doués des propriétés anaphylatoxines recrutent les cellules phagocytaires au site de l'infection. Enfin, le complexe d'attaque membranaire, stade ultime de l'activation du complément, peut lyser directement certains pathogènes par un phénomène de cytotoxicité qui comporte la formation de pores dans la membrane de la bactérie. Le mécanisme effecteur par lequel la bactérie sera éliminée dépend de l'isotype des Ac spécifiques produit à son encontre. L'activation de la cellule B et sa différenciation en cellule productrice d'Ac est induit par l'Ag et nécessite généralement la coopération des  $T_{FH}$  dont nous parlerons plus en détails ultérieurement (Figure 1).



**Figure 1 : Coopération B-T et production d'Ac**

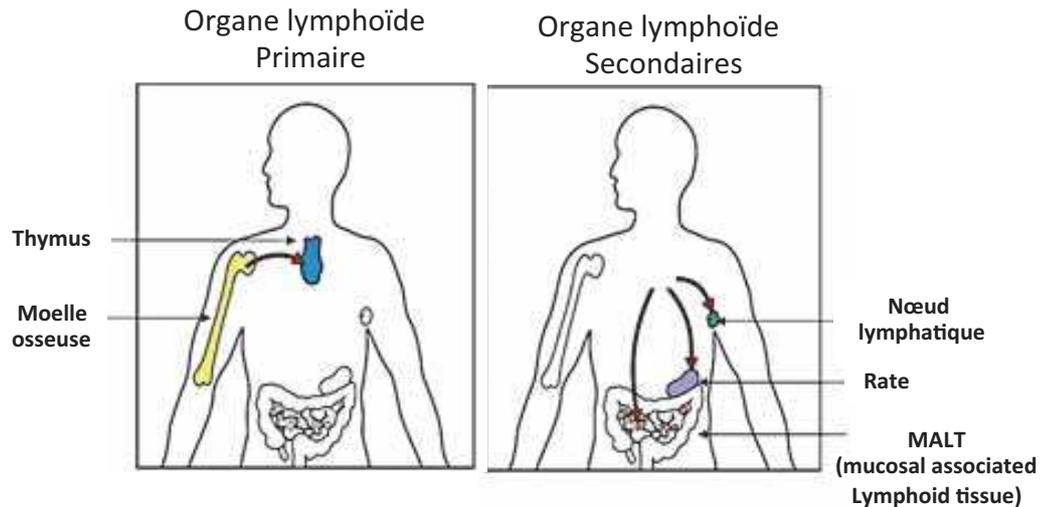
## **2/ Structure des organes lymphoïdes primaires et secondaires.**

### **2.1/ Les organes lymphoïdes primaires**

Les organes lymphoïdes primaires (OLI) sont la moelle osseuse (MO) et le thymus. Ce sont les organes de maturation des lymphocytes. Initialement les précurseurs hématopoïétiques sont générés dans la MO. Pour les LB, l'intégralité de leur maturation se fait dans la MO alors que les LT sortent de la MO sous forme de progéniteurs T immatures qui vont rejoindre le thymus. Le thymus, situé dans le médiastin antérieur supérieur, représente le site de maturation et d'éducation (processus de sélection) des LT. Les LT et LB vont acquérir durant leur développement des récepteurs TCR (T cell receptor) ou BCR (B cell receptor) respectivement qui leur confèrent leur spécificité antigénique (voir plus loin un descriptif de ces récepteurs). Après cette étape initiale de maturation, les LT et LB quittent les OLI, sous forme de cellules naïves, pour aller à la rencontre de l'Ag au sein des organes lymphoïdes secondaires (OLII).

### **2.2/ Les organes lymphoïdes secondaires**

Les OLII sont des organes anatomiquement distincts qui piègent et permettent de concentrer des Ag étrangers afin d'initier les réponses immunitaires adaptatives. Parmi les OLII on trouve les nœuds lymphatique (NL), la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses appelés plaques de Peyer, les amygdales ainsi que les tissus lymphoïdes associés aux voies respiratoires (MALT). Les OLII forment un système complexe et divers qui soutient l'interaction entre une cellule présentatrice d'Ag (APC) présentant l'Ag et les rares LT spécifiques de l'Ag. Cette interaction spécifique permettra l'induction d'une immunité protectrice et à long terme. Les NL forment un réseau protecteur qui détecte les Ag interstitiels. La rate détecte et protège contre les pathogènes transmissibles par le sang. Enfin les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses fournissent une protection importante des surfaces mucosales telles que celles des poumons, du tractus gastro-intestinale et reproductif en collectant les Ag directement de l'environnement local. Pour la suite nous nous intéresserons aux NL et la rate qui représentent les principaux OLII (Figure 2).



Modifié de Janeway's Immunobiology, 8th edition Garland Science

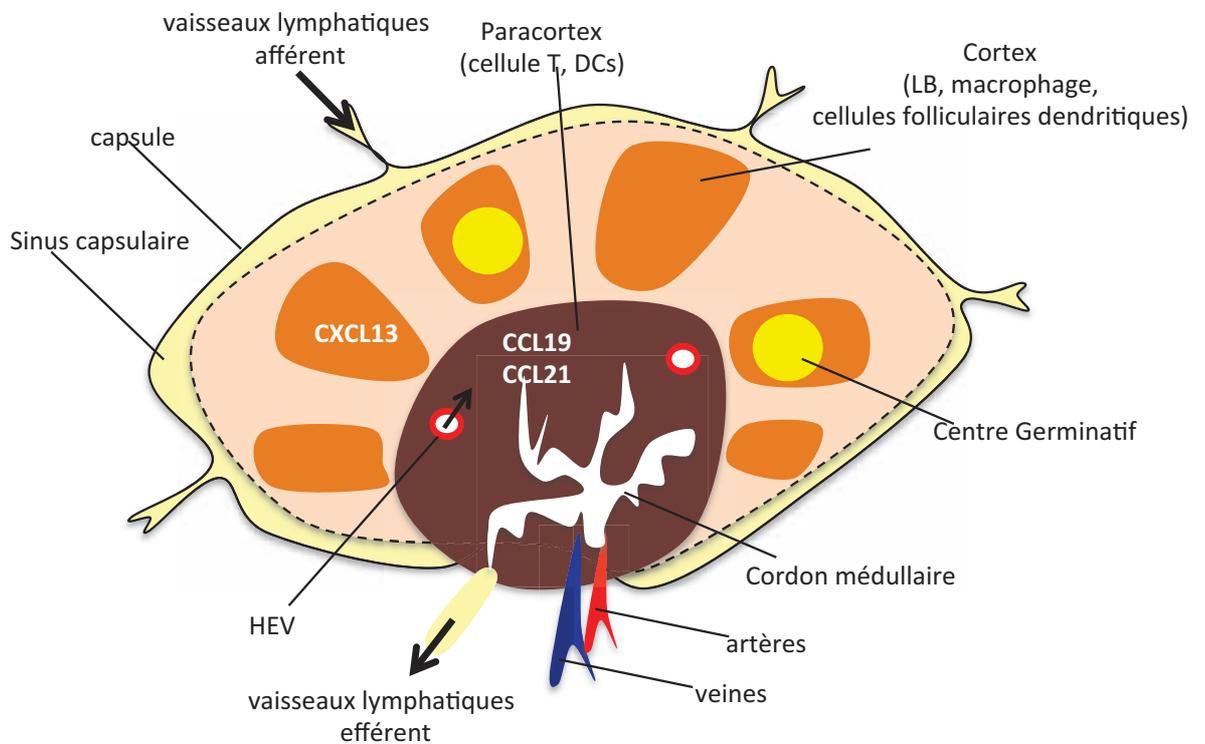
**Figure 2 : Distribution des OL Primaires et Secondaires.** La distribution des tissus lymphoïdes dans le corps. Les lymphocytes proviennent des cellules souche de la moelle osseuse. Les LB se différencient dans la moelle osseuse alors que les LT terminent leur maturation au niveau du Thymus. La moelle osseuse et le thymus sont des lieux de génération des lymphocytes. Ils sont appelés organes lymphoïdes primaires. Une fois mature les lymphocytes circulent du sang vers les organes lymphoïdes secondaires parmi lesquelles on trouve : les nœuds lymphatiques, la rate et le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (les plaques de Peyer et l'appendice).

### 2.2.1/ Structure anatomique des NL

Les NL forment anatomiquement des chaînes ganglionnaires dispersées dans tout l'organisme pour permettre la surveillance de nombreux territoires. Ils jouent le rôle de véritable filtre, ils drainent la lymphe émanant du liquide interstitiel qui baigne tous les tissus. Ceci permet, au niveau des NL, une concentration des Ag et chimiokines afin d'optimiser les rencontres entre les cellules devant collaborer à la réponse immunitaire. Les NL sont des structures encapsulées, sous forme d'haricot, contenant des lymphocytes. De plus, on y retrouve des APC ainsi qu'un réseau spécialisé de cellules et de fibres réticulaires. Plus précisément, les NL sont organisés en trois parties distinctes définies par l'expression de chimiokines spécifiques : une zone corticale, para-corticale et médullaire. Au sein de la zone corticale ou Zone B, on trouve des follicules lymphoïdes, riches en LB. La zone para-corticale ou zone T contient essentiellement des LT. Au centre, les sinus médullaires sont très lâches et sont le site des contacts cellulaires avec les Ag amenés par la lymphe. Les lymphocytes entrent dans les NL par extravasation à travers les Veinules Endothéliales Hautes (HEV). Les

Ag solubles et les cellules dendritiques (DC) entrent par les vaisseaux lymphatiques afférents présents à de multiples sites à travers la capsule. Enfin la lymphe filtrée et les cellules quittent les NL via un unique vaisseau lymphatique efférent. L'ensemble est ensuite collecté par le canal thoracique qui se déverse par la suite dans la veine sous-clavière. Les LN représentent des carrefours de la circulation hémolymphatique.

En conclusion, cette organisation singulière, avec une circulation et une recirculation hémolymphatique, facilite les échanges entre tous les partenaires cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire (Figure 3).



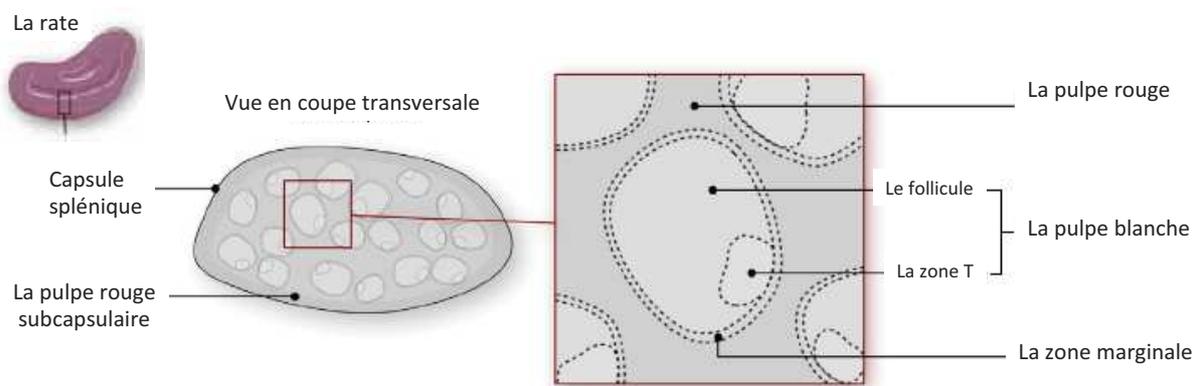
**Figure 3 : Structure anatomique des NL**

### 2.2.2/ Structure anatomique de la Rate

La rate est l'OLII le plus volumineux, de forme ovale, elle est située dans l'hypochondre gauche. Au cours de la vie embryonnaire, la rate est d'abord hématopoïétique, comme le foie foetal. Après la naissance, elle comprend une pulpe rouge (99% de son

volume) riche en macrophage qui sert surtout à la dégradation des hématies, et une pulpe blanche (1% de la masse splénique) localisée autour des artérioles. La pulpe blanche est organisée autour d'artérioles et comporte du centre vers la périphérie : Une zone T qui comme le para-cortex ganglionnaire contient un réseau associant les fibres réticulaires et les DC. Enfin, la rate contient aussi des follicules lymphoïdes contenant des LB, et en périphérie, une zone marginale qui abrite notamment des macrophages de la zone marginale et des LB  $IgM^{hi}IgD^{lo}CD21^{hi}CD23^{lo}$  qui sont considérés comme le pont entre l'immunité innée et adaptative, qui secrètent de forte quantité d'IgM et expriment fortement le Toll-Like Receptor 9 (TLR9). L'organisation de la rate est très similaire à celle des NL. Cependant la différence majeure est l'absence de connexion directe avec le système lymphatique. En effet les Ag et les lymphocytes pénètrent et quittent la rate par la circulation sanguine.

En conclusion, la rate est un OLII très vascularisé qui assure l'immuno-surveillance des Ag qui ont réussi à parvenir dans le sang. C'est donc un « organe filtre » du sang (Figure 4).



Modifiée de «The Spleen in Local and systemic regulation of Immunity», Reina et al, Immunity Review 2013

**Figure 4 : Structure anatomique de la Rate**

### 3/ Les acteurs moléculaires de la reconnaissance spécifique de l'Ag

#### 3.1/ Construction et Organisation des gènes du TCR $\alpha\beta$

Le TCR est la clef de l'activité des cellules T dans leur action contre les pathogènes. En effet, cette molécule permet aux LT de reconnaître des Ag 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 LB. Nous allons maintenant examiner les mécanismes génétiques qui permettent à l'organisme de générer le TCR $\alpha\beta$  propre à chaque LT.

Dans leur action contre une multitude de pathogènes, les LT 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. La diversité du répertoire qui peut être construit n'est pas due à un grand nombre de gènes codant chacun pour un TCR donné, mais à la combinaison d'un nombre limité d'éléments.

#### 3.2/ Locus TCR $\beta$ et TCR $\alpha$

La chaîne  $\alpha$  du TCR est formée en associant les uns aux autres un segment  $V\alpha$ , un segment  $J\alpha$  et le segment commun  $C\alpha$ . Comparativement aux loci codant pour les chaînes lourdes (H) et légères (k, l) des Ig, et qui affichent respectivement 6 segments JH, 5 Jk et 3 Jl, on observe que le locus TCR $\alpha$  est riche en segments J. Ceci débouche sur une influence accrue des segments  $J\alpha$  dans la génération de la diversité des chaînes  $\alpha$  du TCR. Globalement, la structure du locus TCR $\beta$  est similaire à celle du locus TCR $\alpha$ , à quelques différences près. On retrouve les trois types de segments  $V\beta$ ,  $J\beta$  et  $C\beta$  mais également des segments de diversité  $D\beta$ . On compte environ une vingtaine de segments  $V\beta$  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 $\alpha$ , du fait de la présence de deux groupes 1D $\beta$ -6J $\beta$ -1C $\beta$  en tandem. Chez la souris, les deux segments  $C\beta$  sont identiques alors que les 12 segments  $J\beta$  (6 par groupe) présentent peu d'homologie entre eux (Gascoigne and Alam, 1999). La séquence d'association des segments pour former la chaîne  $\beta$  du TCR est  $V\beta$ - $D\beta$ - $J\beta$ - $C\beta$ .

### 3.3/ Mécanisme de réarrangements V(D)J : La diversité Combinatoire

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  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR (Chien et al., 1984) ; (Kavaler et al., 1984) (Figure 4).

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., 1992) ou de RAG-2 (Shinkai et al., 1992) chez lesquelles le développement des LT et LB est totalement bloqué précocement. 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).

### 3.4/ Ajout et délétion de nucléotides : La diversité Jonctionnelle

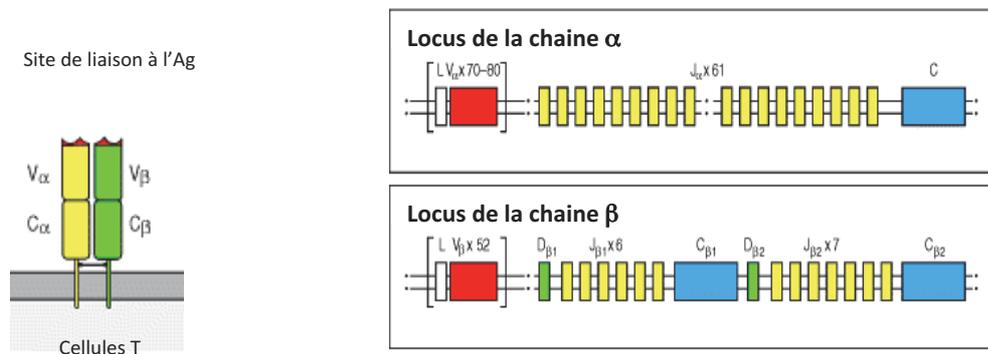
Comme nous l'avons déjà dit, le premier degré de contribution à la diversité du répertoire des cellules T est fourni par la combinatoire d'association potentielle entre les segments de gène V, D et J. De plus, l'appariement entre les chaînes  $\beta$  et les chaînes  $\alpha$  du TCR contribue également à la diversité combinatoire. 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. Ainsi, le processus de recombinaison est lui-même générateur de diversité car les étapes de jonction  $V\alpha$ - $J\alpha$ ,  $D\beta$ - $J\beta$  et  $V\beta$ - $DJ\beta$  sont relativement lâches quant à la position exacte de la jonction de recombinaison, ce qui induit des glissements dans la séquence (nucléotides P) ainsi que des délétions de nucléotides. 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 déficientes pour la TdT, Cabaniols et al. estiment que la TdT contribue à hauteur de 90% à la diversité du répertoire TCR $\alpha\beta$  (Cabaniols et al., 2001).

### 3.5/ Le complexe TCR

Le domaine variable de chacune des chaînes du TCR $\alpha\beta$  contient 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 le TCR et le complexe formé par les peptides antigéniques et les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) (Garboczi et al., 1996).

Les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  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. Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR sont globalement extracellulaires, mise à part une courte portion transmembranaire et intracellulaire de leur domaine constant. 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.



**Figure 4 : Structure des Immuno-récepteurs**

#### 4/ Circulation des LT à l'état basal et lors de l'Inflammation

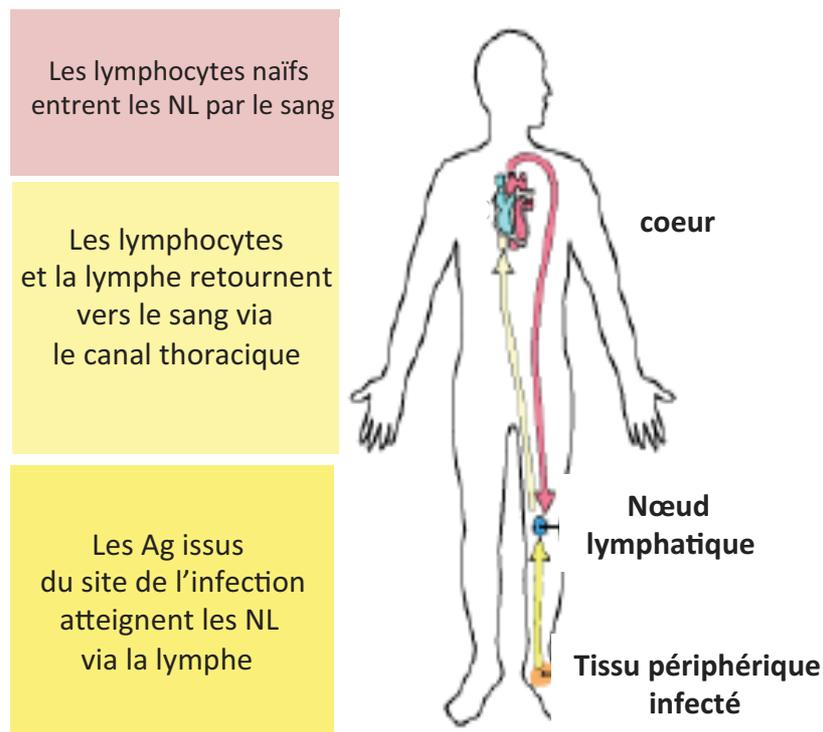
La recirculation des LT est un processus dynamique qui est régulé durant toute les phases des réponses immunes. Les vertébrés ont une multitude de NL. Une souris en compte 22 et un être humain en compte 500 (Bajenoff et al., 2007). Ceci explique la nécessité pour les lymphocytes de circuler en permanence de NL à NL pour scanner tous le corps. Pour ce faire, ils utilisent la vascularisation. A l'état basal, en l'absence d'inflammation, les LT matures et naïfs patrouillent l'organisme et circulent continuellement du sang, à travers les OLII au sein des vaisseaux lymphatiques pour retourner ensuite dans la circulation sanguine (Figure 6).

##### 4.1/ Rôle des chimiokines dans le trafic des Lymphocytes.

Les chimiokines sont les régulateurs clés du trafic des lymphocytes. Bien que la plupart des chimiokines soient induites durant une infection ou une inflammation, certaines dites « chimiokines lymphoïdes homéostatiques » sont constitutivement exprimées et contrôlent les mouvements cellulaires durant l'homéostasie. L'expression de ces chimiokines est compartimentalisée et joue un rôle dans le recrutement ainsi que le positionnement des DC et lymphocytes au sein des NL. La famille des chimiokines lymphoïdes inclut trois ligands : CCL19, CCL21 et CXCL13 ainsi que deux récepteurs CCR7 et CXCR5. CCL19 et CCL21 sont constitutivement exprimées par les cellules stromales de zone T et partagent le récepteur aux chimiokines CCR7 qui orchestre entre autres la migration des cellules T naïves au niveau des compartiments T. La chimiokine CXCL13 est constitutivement exprimée par les cellules

dendritiques folliculaires (CDF) et est requise pour le recrutement des LB et des  $T_{FH}$  qui expriment le récepteur aux chimiokines CXCR5.

En conclusion, les cellules T et B naïves expriment CCR7 et se dirigent dans les NL en réponse au gradient de chimiokines CCL19 et CCL21. Les LB en exprimant CXCR5 qui reconnaît la chimiokine CXCL13 vont se positionner dans les follicules B une fois arrivés dans les NL (Figure 6).



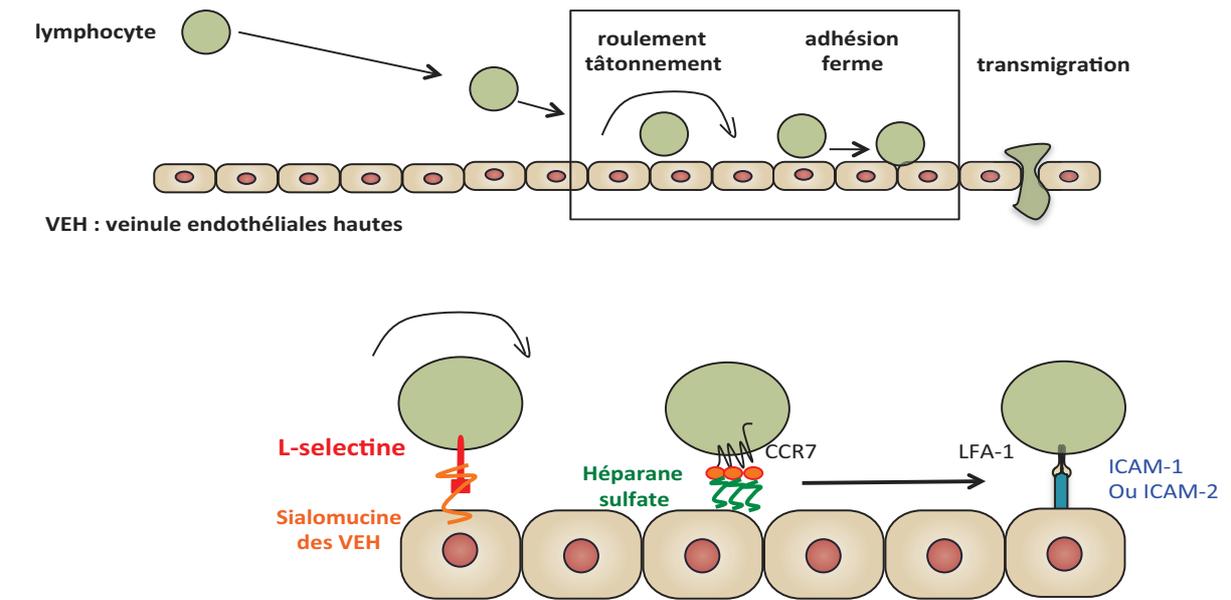
**Figure 6 : Vue Globale de la recirculation des Lymphocytes**

#### 4.2/ Entrée et Sortie des Lymphocytes à travers les OLII

##### 4.2.1/ Entrée des lymphocytes par les HEV.

L'entrée des lymphocytes dans les NL se fait à travers des vaisseaux spécialisés appelés HEV. Cette entrée des cellules est initiée par les récepteurs d'adhésion la L-selectine (CD62L) ainsi que CCR7 à la surface des lymphocytes, tout deux trouvant leur ligand à la

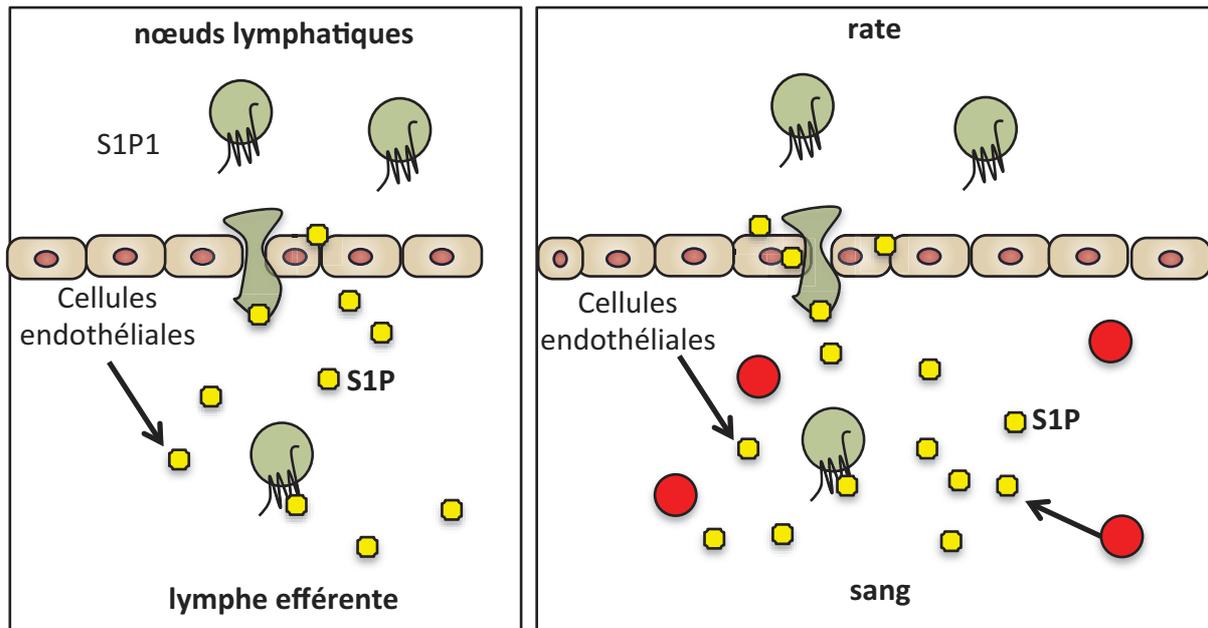
surface des cellules endothéliales des HEV. Ceci permettra aux cellules de suivre l'étape de roulement et de tâtonnement. Enfin l'intégrine LFA-1 (CD11a-CD18) se lie à son ligand de la famille des ICAM (CD54) permettant une adhésion ferme avant de transmigrer à travers pour se retrouver dans NL (Forster et al., 2008) (Figure 7).



**Figure 7 : Entrée des lymphocytes dans les NL à travers les VEH : une cascade d'adhésion.**

#### 4.2.2/ L'implication de S1P dans la sortie des lymphocytes

Quitter les OLII est un processus actif. Le signal majeur qui contrôle la sortie, des lymphocytes, des NL et de la rate est la Sphingosine 1 phosphate (S1P) qui active le récepteur couplé aux protéines G (RCPG) le S1PR. Le S1P est abondant dans les vaisseaux où il est produit par les cellules endothéliales, les globules rouges et les plaquettes (Schwab and Cyster, 2007) (Figure 8).



**Figure 8 : Sortie des lymphocytes des OLII.** Les lymphocytes (cercle vert) expriment le récepteur S1P (S1P1). Lorsqu'ils sont dans le tissu lymphoïde, le S1P (petit rond jaune) est maintenu à concentration faible. Dans l'organe lymphoïde, le signal passant par le S1P1 au sein des lymphocytes est nécessaire pour que les lymphocytes quittent les tissus lymphoïdes pour rejoindre la lymphe et le sang où le S1P est abondamment apporté par les cellules endothéliales et les globules rouges

## 5/ La rencontre avec les DCs: rôle pivot et lien entre immunité Innée et Adaptative.

### 5.1/ La DC : Charnière entre Immunité Innée et Adaptative

Le système immunitaire des mammifères est constitué d'une composante innée et adaptative. Les cellules de l'immunité innée, comme les DC, les macrophages, NK, neutrophiles et autres polynucléaires, possèdent des récepteurs capables de reconnaître des structures invariantes, typiques de certaines familles de microbes. La réponse adaptative assurée par les LB et LT est plus efficace car elle est spécifique de l'Ag, mais demande une phase de latence pour permettre l'expansion clonale et la différenciation des LT en effecteurs. Cependant, le caractère aléatoire de la génération des récepteurs des lymphocytes ne leur permet pas de différencier les Ag du soi et du non-soi, ce qui requiert une éducation à laquelle participe le système inné. Cette coopération entre immunité innée et adaptative permet à la

fois au système immunitaire de déterminer la provenance des Ag et d'établir une réponse ciblée efficace. Une question se pose alors ; quelles cellules garantissent le lien entre l'immunité innée et adaptative ? Comment les LB et LT qui résident principalement dans les OL sont-ils activés par les Ag dérivés des pathogènes qui envahissent les tissus en périphérie. Il est maintenant connu que ce lien est assuré par les DC qui migrent de la périphérie où elles résident et capturent les Ag pour les présenter dans les NL drainants où les réponses immunes sont initiées. Une fois activés par les DC, les LT migrent vers les sites infectieux où ils jouent leurs rôles effecteurs. Les cellules B eux se différencient en plasmocytes qui sécrètent les Ac spécifiques.

### **5.2/ Ontogénie des DCs.**

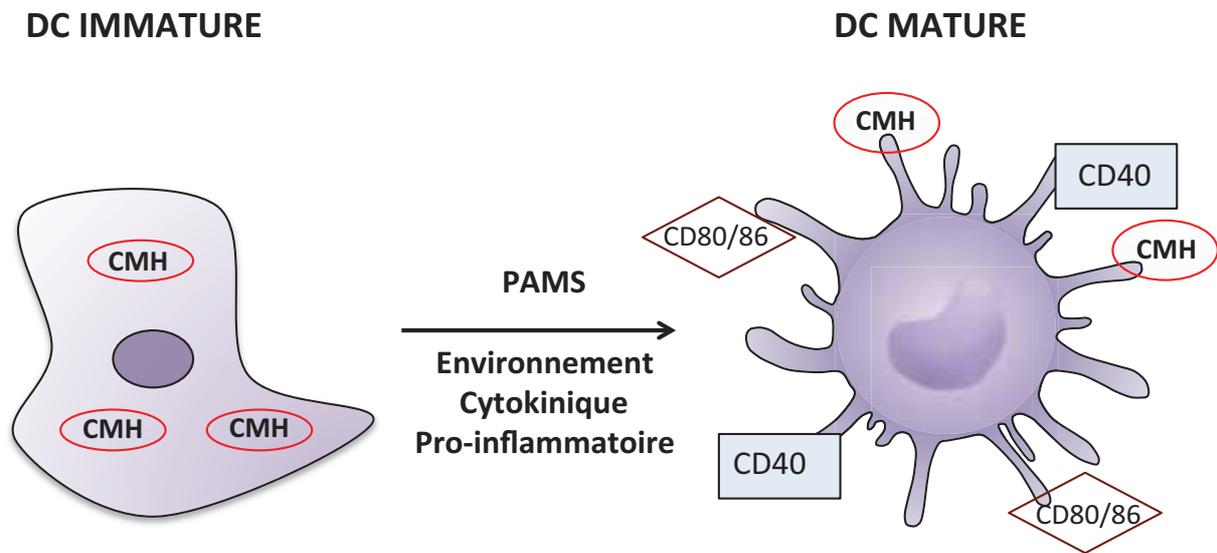
Les DC se différencient à partir de cellules souches hématopoïétiques en précurseurs lymphoïdes ou myéloïdes. De la lignée myéloïde  $CD34^+$  dérive les monocytes qui donneront naissance aux macrophages et aux cellules de Langerhans que l'on retrouve dans la peau et les DC interstitielles qui migrent dans les NL suite à leur activation (Banchereau et al., 2009). Les précurseurs myéloïdes peuvent également donner naissance aux monocytes précurseurs des DC qui se différencient en macrophages ou en DC en fonction de l'environnement cytokinique. En outre, les précurseurs lymphoïdes donnent naissance aux DC plasmacytoïdes (pDC) qui circulent dans le sang et pénètrent dans les OL. Elles se caractérisent par la sécrétion d'IFN de type I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) en réponse aux pathogènes, n'expriment pas d'IL-12 et peuvent induire les LT helper 2 ( $T_{H2}$ ) (Liu and Nussenzweig, 2010).

### **5.3/ Maturation et Migration des DCs.**

Les DC, définies comme Cellules Présentatrices d'Ag (APC) professionnelles, sont considérées comme des régulateurs cruciaux des réponses immunes adaptatives (Schraml and Reis e Sousa, 2015). Par leur localisation stratégique dans les tissus périphériques tels que la peau ou les muqueuses, les DC sont considérées comme de véritables sentinelles de l'organisme capables de rapidement capturer les pathogènes qui ont pénétrés dans l'organisme. La capture antigénique est la caractéristique des DCs immatures. Elle se fait au moyen de multiples mécanismes impliquant ou non des récepteurs, et notamment par phagocytose, endocytose ou encore macropinocytose. Le pathogène rencontré peut être de nature diverse, une bactérie intra ou extracellulaire mais aussi un virus ou un parasite. Après

son internalisation, le pathogène est apprêté pour être ensuite associé sous forme de peptides antigéniques sur les molécules du CMH. Suite à la capture et l'apprêtement antigénique, les DCs vont subir une maturation phénotypique et fonctionnelle tout en migrant vers les OLII où elles vont se spécialiser dans la présentation antigénique aux LT et leur activation (Schraml and Reis e Sousa, 2015).

La maturation des DCs initiée par différents signaux de danger s'accompagne de changements phénotypiques et fonctionnels. Elle permet la transformation d'une cellule capturant l'Ag en une cellule présentant un peptide antigénique à un LT induisant l'activation de ce dernier (Hackstein and Thomson, 2004). La maturation des DC est intimement liée à leur migration vers OLII (la rate et NL). Différents facteurs peuvent induire la maturation des DC et notamment certaines molécules associées aux pathogènes (ex : Lipopolysaccharide (LPS), ADN bactérien), des cytokines pro-inflammatoires libérées dans le microenvironnement (ex. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), des signaux délivrés par les LT (Munz C, et al, J Exp Med 2005) ou encore des cellules nécrotiques (Basu S et al, Int Immunol 2000). La maturation s'accompagne d'une diminution importante de la capacité des DC à capturer l'Ag mais également d'une augmentation considérable de l'expression membranaire des complexes représentés par le CMH associé au peptide (p:CMH), des molécules de costimulation (ex. CD40, CD80, CD86), des molécules d'adhésion telles que LFA-3 et DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-integrin), et un ensemble de paramètres nécessaires à l'activation des LT (Coquerelle and Moser, 2010). La maturation des DC s'accompagne également d'une modification dans l'expression de petites molécules chimio-attractantes appelées chimiokines et de leurs récepteurs (McColl SR et al, Immunol Cell Biol 2002). Il y a une perte de l'expression des récepteurs aux chimiokines inflammatoires (ex. CCR1, CCR5) au profit des récepteurs CCR7 et CXCR4. L'expression du récepteur CCR7 à la surface des DC matures permet la migration de ces dernières vers les OLII (Sozzani, 2005). De plus, les DC matures produisent des cytokines proinflammatoires telles que l'IL-12 (DC myéloïdes) ou des IFN de type I (pDC). Les changements fonctionnels observés au cours de la maturation s'accompagnent également de changements morphologiques incluant une réorganisation du cytosquelette permettant une plus grande mobilité et favorisant ainsi la migration, mais également la formation de synapses immunologiques. La migration des DC vers OLII est un processus concomitant du processus de maturation (Figure 9).



**Figure 9 : La Maturation des DC.** Les DC présentent un phénotype immature ou mature. Immatures, les DC ont une grande capacité à capturer les Ag. Suite à la capture antigénique, la reconnaissance de signaux de dangers (PAMPs pathogen-associated-molecular patterns) et selon l'environnement cytokinique pro-inflammatoire, les DC entament un processus de maturation, expriment les peptides antigéniques à leur surface associés aux CMH ainsi que des molécules de co-stimulation : CD80 et CD86.

## **II/ Activation et polarisation des cellules T CD4.**

### **1/ Les 3 signaux nécessaires à l'activation des LT.**

Les LT naïfs nécessitent trois signaux (Figure 10) délivrés par les DC matures pour pouvoir s'activer et initier une réponse effectrice. Le premier signal se traduit par la reconnaissance par le TCR du complexe : peptide associé au molécule de CMH (p:CMH) dont il est spécifique. La reconnaissance est influencée par l'intensité du signal TCR. Celle-ci dépend de l'affinité/avidité du TCR pour l'Ag présenté et du nombre de complexes p:CMH présents à la surface de la DC. La densité de l'Ag à la surface d'une DC est conditionnée par l'efficacité de l'apprêtement de l'Ag dans les voies de présentation antigénique et enfin de la stabilité du complexe CMH-peptide à la surface de l'APC. La durée de contact des lymphocytes avec l'Ag est également un facteur déterminant dans l'activation des LT (Melief, 2003).

Le second signal est la co-stimulation. L'expression par les DC des molécules de costimulation telles que CD80 et CD86 permet l'engagement de la molécule CD28 à la surface des LT. La co-stimulation est une condition sine qua non à l'activation des LT sur laquelle se base les modèles instructifs du système adaptatif par l'immunité innée (Matzinger, 1998) (Matzinger, 2002). Sans ce signal, les LT ayant reçu le premier signal sont inactivés par anergie ou délétion conduisant à la tolérance de l'Ag présenté. Seul, un signal TCR ne permet pas une activation productive des LT. Il induit une activation caractérisée par une courte phase de prolifération et un développement sous-optimal de leur fonction d'effecteur entraînant soit à la délétion ou l'anergie. L'anergie étant un état caractérisé par une incapacité des LT à répondre à une nouvelle stimulation antigénique (Kearney et al., 1994). Enfin un second signal est nécessaire pour la survie des cellules et la prolifération productive. L'engagement du récepteur CD28 induit une augmentation de l'expression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-xL et permet la survie des lymphocytes activés (Boise LH et al, 1995). De plus, les signaux 1 et 2 agissent en synergie pour induire de façon stable les fonctions effectrices des lymphocytes. La reconnaissance des molécules de co-stimulation favorise la sortie des LT hors des OLII, vers les tissus périphériques où ils pourront participer à l'élimination des Ag (Sallusto et al., 1999a).

Enfin, le signal 3 désigne les cytokines secrétées par la DC permettant d'orienter la réponse T effectrice. Actuellement plusieurs sous-populations de LT effecteurs et régulateurs ont été décrites et définies comme des lignages distincts, avec des phénotypes et des fonctions spécifiques. Parmi les LT, on retrouve les LT régulateurs et les LT de type 1, 2, 9, 17, 22, ainsi que les  $T_{FH}$ , populations que nous détaillerons plus précisément ultérieurement (Figure 11).

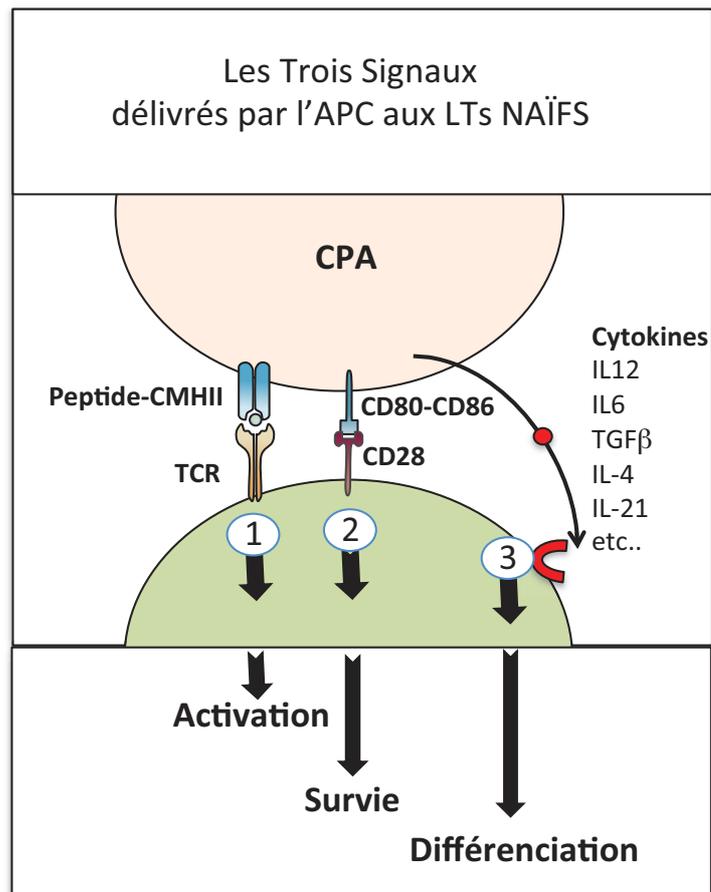


Figure 10 : Les trois signaux pour l'activation des Lymphocytes

## 2/ La différenciation des LT CD4.

Le système immunitaire est constamment confronté à des menaces provenant de sources divergentes. Virus, bactéries, protozoaires et métazoaires, parasites, champignons ainsi que nos cellules modifiées de notre propre corps. En réponse, notre système immunitaire adaptatif est composé de plusieurs branches avec chacune des fonctions effectrices spécialisées afin de contrer toute sorte de menaces pour notre organisme. La famille des LT

CD4 est très hétérogène (Figure 11). Durant l'invasion par un pathogène et en fonction de la nature du pathogène les LT CD4 effecteurs induits par l'interaction spécifique avec les DC, mettent en place une réponse adaptée faisant intervenir un panel de cytokines qui vont permettre l'élimination du pathogène. Une réponse immunitaire incorrecte et limitée peut être notamment à l'origine d'infection chronique. Nous allons à présent résumer les caractéristiques de ces différentes populations que l'on peut subdiviser en 2 groupes : effecteurs ( $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ ,  $T_{H9}$ ,  $T_{H17}$ ,  $T_{H22}$ ) et régulateurs ( $iTreg$ ,  $Tr1$ ,  $T_{H3}$  et  $iT35$ ).

## 2.1/ Les cellules $T_{H1}$

Les  $LT_{H1}$  sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription (FT) T-bet (T-box transcription factor) et leur capacité à sécréter de forte quantité d'IFN- $\gamma$ . Ces cellules effectrices expriment les récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR3 et orchestrent une réponse immunitaire à médiation cellulaire dirigée contre les pathogènes intracellulaires tels que les virus, les bactéries ou les Ag tumoraux (Del Prete, 1992) ; (Mosmann and Coffman, 1989) ; (Paul and Seder, 1994).

En effet, l'IFN- $\gamma$  sécrété par les cellules  $T_{H1}$  va permettre l'activation d'autres cellules de l'immunité innée comme les Natural Killer (NK), les macrophages qui à leur tour vont produire des médiateurs solubles permettant l'élimination du pathogène. L'IFN- $\gamma$  a un effet antiviral en activant les LT CD8 cytotoxiques (CTL). La réponse Ac induite dans ces conditions est dominée par la sécrétion d'Ac de type IgG2a qui à leur tour vont opsoniser et neutraliser le pathogène infectieux.

L'IFN- $\gamma$  et l'IL-12 initient la différenciation des  $T_{H1}$  (Trichieri et al, 2003). La sécrétion d'IL-12 par les DC activées va engendrer la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK. L'IFN- $\gamma$  va à son tour se fixer sur son récepteur à la surface du LT, activer STAT1 et induire l'expression du FT T-bet qui va à son tour induire la transcription d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12 (Lighvani et al., 2001). Enfin T-bet agit aussi en réprimant des gènes associés à d'autres lignages telles que l'IL-4 (Djuretic et al., 2007), GATA3 (GATA-binding protein) le FT des  $T_{H2}$  (Hwang et al., 2005).

## 2.2/ Les cellules T<sub>H2</sub>

Les T<sub>H2</sub> sont des cellules effectrices caractérisées par l'expression du FT GATA3 et de la production de cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 essentiellement, ainsi que de faible quantité d'IL-9, d'IL-10 et d'IL-25 (Luckheeram et al., 2012), (Zheng and Flavell, 1997). Les T<sub>H2</sub> expriment à leur surface le récepteur de chimiokine CCR4 et la prostaglandine D2 (CD294). La réponse adaptatrice de type T<sub>H2</sub> est centrale dans la protection contre les pathogènes extracellulaires (bactéries, toxines et parasites).

L'IL-4 et l'IL-13 sont des cytokines qui permettent la commutation isotypique et la production d'IgG1 et d'IgE par les LB. Les IgE sont à leur tour capable de se lier au récepteur FcεRI à la surface des basophiles et mastocytes ce qui a pour conséquence leur dégranulation et la sécrétion de médiateurs solubles (l'histamine, la sérotonine) (Steinke and Borish, 2001). Les T<sub>H2</sub> sont également connus pour l'induction et la persistance de maladies allergiques telles que l'asthme (Del Prete, 1992) (Sokol et al., 2009). En effet par leur sécrétion d'IL-5 et d'IL-9, les T<sub>H2</sub> vont favoriser le recrutement d'éosinophiles et de mastocytes respectivement (Li et al., 2011).

L'IL-4 et l'IL-2 initient la différenciation en T<sub>H2</sub>. En effet l'IL-4 va entraîner une cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation de STAT6. STAT6 phosphorylé va à son tour induire la transcription du gène codant pour le FT GATA3 qui va réguler la différenciation en T<sub>H2</sub>. (Zhu et al., 2006). GATA3 va être responsable de la transcription d'IL-5 et d'IL-13 et renforce aussi celle de l'IL-4. Enfin GATA3 va avoir un rôle répresseur de la différenciation T<sub>H1</sub> notamment en réprimant STAT4 et la transcription consécutive d'IFN-γ (Usui et al., 2003).

## 2.3/ Les cellules T<sub>H17</sub>

Le paradigme T<sub>H1</sub>/ T<sub>H2</sub> datant d'une trentaine d'année maintenant, a été élargi depuis la découverte des T<sub>H17</sub>. Les cellules T<sub>H17</sub> sont caractérisées par le FT Rorγt et la sécrétion de cytokines IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22 (Ivanov et al., 2006). Les T<sub>H17</sub> expriment aussi à leur surface les récepteurs de chimiokines CCR6 et CCR4. Les T<sub>H17</sub> sont impliquées dans les défenses vis-à-vis des bactéries extra-cellulaires et des champignons (Puel et al., 2011). Le rôle principal des T<sub>H17</sub> dans la réponse anti-fongique résulte de la sécrétion de l'IL-17A. Cette cytokine est impliquée dans la production de CXCL8 notamment par les macrophages

permettant le recrutement de neutrophiles, qui expriment CXCR1 et CXCR2, au niveau du site de l'infection.

La présence concomitante de l'IL-6 et du TGF- $\beta$  est essentielle pour induire la différenciation en T<sub>H17</sub> (Veldhoen et al., 2006). Le signal inflammatoire induit par l'IL-6 induit alors une sécrétion autocrine d'IL-21 par les LT engagés à devenir des T<sub>H17</sub>. L'IL-21 produite favorise l'amplification, ainsi que l'expression du récepteur de l'IL-23 et du FT Ror $\gamma$ t. (Ivanov et al., 2006) (Zhou et al., 2007). Enfin Ror $\gamma$ t via d'autres FT STAT3 permet la synthèse de l'IL-17A et IL-17F (Yang et al., 2007).

## 2.4/ Les cellules iTreg

Les iTreg (les Treg inductible) sont des cellules T régulatrices immunosuppressives induite en périphérie (Baecher-Allan et al., 2001). Ces cellules se distinguent des Treg dites naturelles qui présentent une différenciation achevée à la sortie du Thymus et qui exprime la neuropiline 1 (Weiss et al., 2012). Les iTreg sont des cellules régulatrices caractérisées par l'expression du FT Foxp3 (Forkhead box P3), par l'expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25) ainsi que du récepteur de chimiokine CCR4. Les Treg expriment des cytokines suppressives telles que le TGF- $\beta$ , IL-10 et l'IL-35. Ces populations régulatrices ont pour rôle majeur de maintenir l'homéostasie et la tolérance immunitaire. En effet, dans un contexte infectieux par exemple, lorsque le pathogène est éliminé, les Treg vont intervenir en inhibant les réponses immunitaires afin d'éviter un emballement pouvant aboutir à des maladies auto-immunes (Fujio et al., 2010) (Sakaguchi et al., 2006). Cette action immunosuppressive passe notamment par l'IL-10 qui inhibe l'activité des T<sub>H1</sub>, des NK et des macrophages limitant ainsi les dommages tissulaires occasionnés durant l'inflammation (Ouyang et al., 2011).

D'autres populations de LT régulateurs ont aussi été identifiées : les T<sub>H3</sub>, Tr1 et plus récemment les iT35. Les cellules T<sub>H3</sub> sont générées dans l'intestin et sont impliquées dans la tolérance orale. Elles produisent des quantités importantes de TGF- $\beta$ , un peu d'IL-10 mais ne sécrètent ni IL-4 ni IFN- $\gamma$  et peuvent ainsi bloquer les réponses de type T<sub>H1</sub> et T<sub>H2</sub> (Weiner et al., 2011). Concernant les Tr1, ces populations exercent leur potentiel suppresseur en sécrétant fortement l'IL-10 (ainsi que de faible quantité d'IFN- $\gamma$ , de TGF- $\beta$  et d'IL-2 mais pas d'IL-4) pouvant induire ainsi l'anergie des autres populations T (Groux 2003). Enfin les iT35 constituent une sous-population de cellules immunosuppressives n'exprimant pas Foxp3 ni

l'IL-10, elles exercent leur fonction en sécrétant de l'IL-35 (Collison et al., 2010) ; (Collison et al., 2007) ; (Collison et al., 2012).

En réponse au TGF- $\beta$  et d'IL-2 dans l'environnement cellulaire, les LT naïfs vont se différencier en iTreg. Par l'action du TGF- $\beta$  les iTreg vont exprimer le FT Foxp3 assurant à la fois le développement et la fonction immunosuppressive des iTreg (Chen et al., 2003). Les iTreg vont alors se mettre à produire du TGF- $\beta$  et par une boucle autocrine soutenir ainsi leur expansion. L'IL-2 provoque la phosphorylation de STAT5 qui induit à son tour la transcription de Foxp3.

## 2.5/ Les cellules T<sub>H9</sub>

Les T<sub>H9</sub> représentent une population qui sécrète essentiellement de l'IL-9 ainsi que de l'IL-21 et de l'IL-10 (chez la souris). L'IL-9, initialement associée au lignage T<sub>H2</sub>, est une cytokine impliquée dans la sécrétion de mucus chez les patients atteints d'asthme. Les T<sub>H9</sub> sont principalement connues pour leur capacité à induire de fortes réponses pro-inflammatoires *in vivo*. En effet, un transfert adoptif de ces cellules dans des hôtes déficients pour l'enzyme RAG induit des maladies auto-immunes comme la colite chez la souris (Dardalhon et al., 2008). Les T<sub>H9</sub> sont aussi impliquées dans d'autres maladies auto-immunes telles que l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) chez la souris (Jager et al., 2009) et la sclérose en plaque chez l'Homme (Stassen et al., 2012).

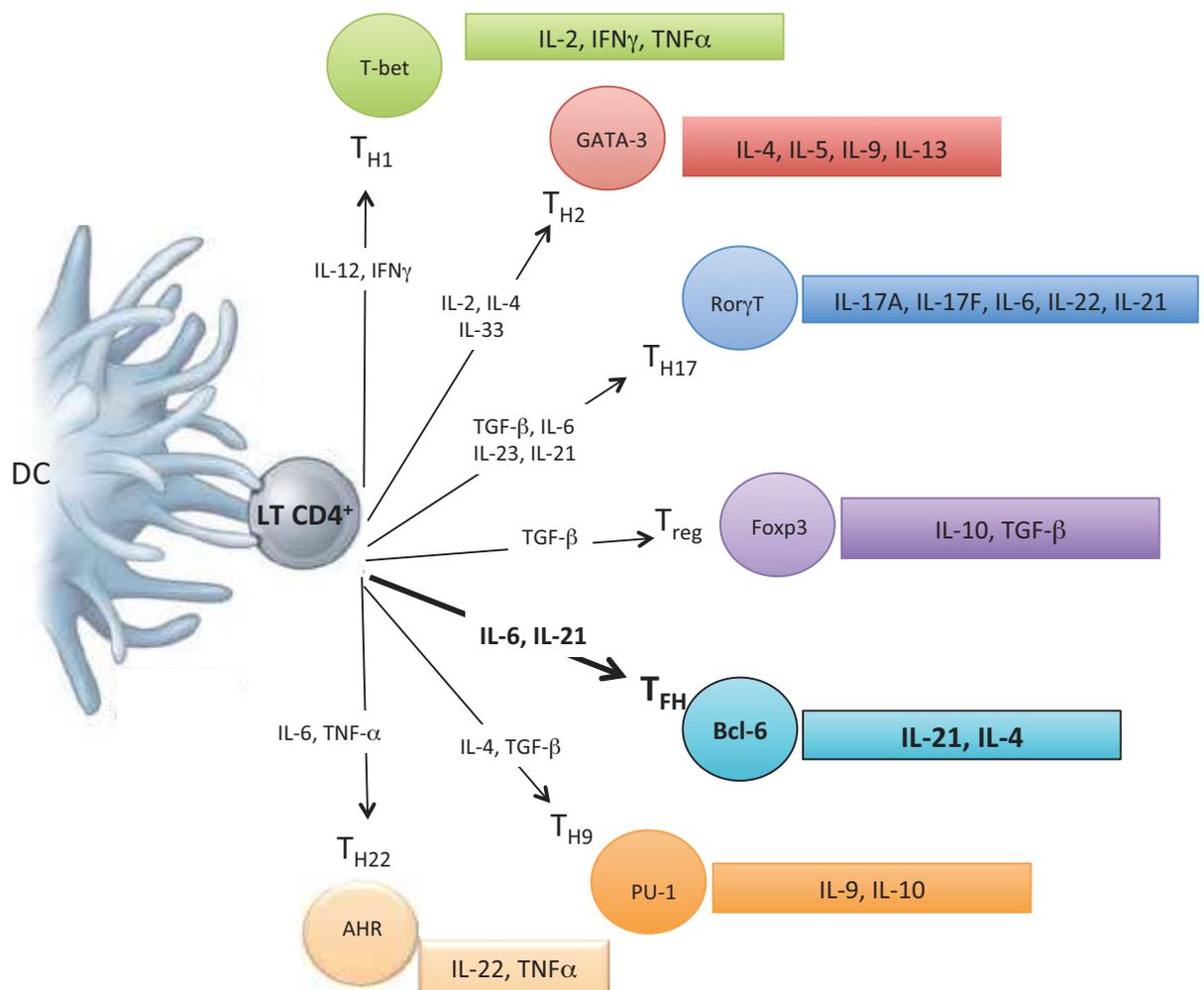
Les T<sub>H9</sub> sont induites en présence de TGF- $\beta$  et d'IL-4 mais peuvent aussi être générées par une reprogrammation des T<sub>H2</sub> en présence de TGF- $\beta$  (Dardalhon et al, 2008). Les signalisations induites par l'IL-4 et le TGF $\beta$  induisent respectivement l'expression des facteurs de transcription IRF4 et PU.1.

## 2.6/ Les cellules T<sub>H22</sub>

Les cellules productrices d'IL-22 étaient considérées comme des T<sub>H17</sub> jusqu'en 2009 mais une étude a mis en évidence l'existence de T<sub>H22</sub> (Acosta-Rodriguez et al., 2007). Ces cellules sécrètent en plus de l'IL-22, de l'IL-13, l'IL-26 et le TNF $\alpha$  mais pas d'IL-17, ni d'IFN- $\gamma$  ce qui les distingue des populations T<sub>H17</sub> et T<sub>H1</sub>. Les T<sub>H22</sub> ont été identifiés lors de l'inflammation au niveau de la peau et l'IL-22 est une cytokine connue pour ses propriétés

cicatrisantes. De plus, les  $T_{H22}$  expriment les récepteurs de chimiokines CCR4 et CCR10 impliqués dans la migration vers la peau (Duhén et al., 2009)

Les cellules de Langerhans et les pDC retrouvées dans le derme stimulent la différenciation des  $T_{H22}$ . Leur différenciation est induite en présence d'IL-6 et de  $TNF\alpha$ . Cependant les mécanismes moléculaires impliqués dans cette polarisation restent encore peu connus. Néanmoins Le FT AhR (Aryl hydrocarbon receptor) semble indispensable à l'initiation de leur différenciation (Ouyang et al., 2011)



**Figure 11 : Principales populations de  $LT\ CD4$  effecteurs.**

### 3/ Les LT CD4 folliculaires ou T<sub>FH</sub>

La biologie des LT CD4 révèle une capacité majeure à s'adapter à une variété de conditions environnementales, de localisation et de besoin. Le concept de l'induction d'une population bien spécifique de LT effecteurs en fonction de la nature du pathogène n'est pas tout à fait vrai pour la sous-population de T<sub>FH</sub>. Les T<sub>FH</sub> sont des cellules essentielles à l'induction d'une réponse Ac mémoire. Or les réponses Ac sont destinées pour presque tous les pathogènes indépendamment de leurs origines virale, bactérienne, fongique ou parasitaire. Par conséquent, il est essentiel que le système immunitaire puisse induire la génération de T<sub>FH</sub> indépendamment de la nature du pathogène détecté.

#### 3.1/ Découverte des LT CD4 folliculaires

La nécessité d'une aide fournie par des LT pour l'induction d'une réponse humorale a été pour la première fois décrite en 1960 (Miller and Mitchell, 1968). Les LT CD4 sont d'abord décrits comme indispensables dans le développement de centre germinatif (CG). Des études *in vitro*, réalisées en 1980 et utilisant principalement des clones de LT CD4 ainsi que des cytokines recombinantes, montrent que les T<sub>H2</sub> représentent la sous-population majeure engagée dans l'aide des LB par leur sécrétion d'IL-4 et IL-10 (Banchereau et al., 1994); (Mosmann and Coffman, 1989). Chez la souris, les cellules T<sub>H1</sub> contribuent aussi à la régulation des réponses Acs en induisant la commutation isotypique en IgG2a. Cependant, il n'était pas clair comment les T<sub>H1</sub> et les T<sub>H2</sub> qui aident les LB dans les CG étaient biologiquement différents de ceux qui quittent les OL et migrent dans les tissus périphériques. L'idée d'une population spécialisée dans l'aide aux LB commença alors à s'imposer dans le débat.

En 1993, le récepteur aux chimiokines CXCR5 est découvert (qui reconnaît la chimiokine CXCL13) et décrit comme un récepteur couplé aux protéines G exprimé par les LB (Dobner et al., 1992). En 1996, CXCR5 fut décrit comme un récepteur aux chimiokines important dans la migration des cellules B au sein des follicules des OL chez la souris (Forster et al., 1996). Il a fallu attendre 1999 pour qu'une population de LT CD4 activés exprimant CXCR5 soit décrite dans les OL de la souris suite à une immunisation. Le rôle de CXCR5 dans la migration vers les follicules est ainsi établi (Ansel et al., 1999). Dans les années 2000 une étude chez l'Homme au sein d'amygdales met en évidence que des LT CD4 CXCR5<sup>+</sup> qui,

contrairement au LT CD4 CXCR5<sup>-</sup>, ont *in vitro* une capacité à induire une production d'AcS par des LB. Sur la base de leurs localisations et de leurs fonctions, les LT CD4 CXCR5<sup>+</sup> portent alors le nom de LT CD4 folliculaires (Breitfeld et al., 2000) (Schaerli et al., 2000) (Kim et al., 2001). Une population similaire fut décrite au sein de NL chez la souris (Campbell et al., 2001a). Aujourd'hui les T<sub>FH</sub> se définissent clairement comme « la population spécialisée dans l'aide et le soutien des LB » (Crotty, 2011b).

### 3.2/ Différenciation et Caractérisation des LT CD4 folliculaires

En 2009, l'expression du facteur de transcription Bcl-6 a été identifiée chez la souris comme essentielle à la différenciation des CD4 naïfs en T<sub>FH</sub> (Nurieva et al., 2009) (Yu et al., 2009). La différenciation des T<sub>FH</sub> est un processus qui implique une succession d'interactions spatio-temporelles avec différentes populations d'APC. Dans la zone T des OLII, la présentation de l'Ag par les DC aux LT CD4 naïfs, concomitante à l'engagement de la molécule de co-stimulation ICOS (Inducible T cell COStimulator), induit l'expression du FT Bcl-6 et consécutivement celle de CXCR5.

#### 3.2.1/ Facteurs impliqués dans la différenciation des T<sub>FH</sub>

##### 3.2.1.1/ Le facteur de Transcription Bcl-6

La différenciation des T<sub>FH</sub> est un processus complexe nécessitant plusieurs étapes contrairement aux autres populations de LT CD4 effecteurs. En effet, si l'on prend l'exemple des T<sub>H1</sub>, leur différenciation peut directement être induite par l'ajout d'IL-12 *in vivo* et *in vitro* alors que pour les T<sub>FH</sub> il n'y a pas d'évènement unique permettant leur complète différenciation.

Bcl-6 est essentiel pour la différenciation des T<sub>FH</sub> et est souvent désigné comme le facteur de transcription clé dans ce processus (Nurieva et al., 2009) ; (Yu et al., 2009) ; (Johnston et al., 2009b). En l'absence de Bcl-6, chez les souris Bcl-6<sup>-/-</sup>, la différenciation des T<sub>FH</sub> n'a pas lieu *in vivo* alors que celle des autres populations T<sub>H</sub> effectrices n'est pas affectée. De plus, une expression constitutive de Bcl-6 entraîne *in vivo* la différenciation des LT CD4 en T<sub>FH</sub>. Bcl-6 promeut l'expression transcriptionnelle de CXCR5 possiblement par la surexpression de micro-RNA incluant la famille des mir17-19 qui cible le locus CXCR5 (Yu

et al., 2009). Enfin, une surexpression de Bcl-6 au sein de LT chez l'Homme entraîne une augmentation de l'expression de CXCR5, PD-1, SAP, ICOS et CD40L en 5 jours. Ceci montre bien que Bcl-6 programme toutes les molécules fonctionnelles caractéristiques du lignage T<sub>FH</sub>. L'augmentation de l'expression de Bcl-6 est favorisée par les cytokines IL-6 et l'IL-12 (chez l'Homme) (Ma et al., 2009). Le signallement passant par ICOS est requis pour le développement des T<sub>FH</sub> et la formation des CG (Choi et al., 2011). Les cellules déficientes pour ICOS ne se développent pas en cellules Bcl-6<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>. La co-stimulation par ICOS est connue pour spécialement induire Bcl-6 bien qu'une évidence directe du fonctionnement n'a pas encore été mise en évidence. De plus, l'absence d'ICOSL à la surface des LB entraîne une réduction du nombre de T<sub>FH</sub>. Enfin, l'interaction ICOS-ICOSL induit une migration directionnelle des T<sub>FH</sub> vers la zone inter-folliculaire (Bauquet et al., 2009) (Hutloff et al., 1999).

### 3.2.1.2/ Les autres facteurs de Transcription

Cependant il est maintenant établi que la nécessité d'un seul et unique FT pour la différenciation des lymphocytes est un concept très simplifié de la biologie des lymphocytes. En effet plus d'un FT est nécessaire pour générer un programme de différenciation des LT CD4. Il a été montré que la plupart des types cellulaires peuvent être distingués par l'expression différentielle de 4 à 6 FT (Ciofani et al., 2012; Ravasi et al., 2010) et que ce concept pouvait être appliqué pour la différenciation des LT CD4 (Ciofani et al., 2012). En ce qui concerne les T<sub>FH</sub> plusieurs FT sont requis en plus de Bcl-6. Ceux-ci incluent Maf, IRF4 (interferon regulator factor 4), AP-1 (activator protéine), la famille des FT « basic leucine zipper » Baft, les STATs et les protéines E (Nurieva et al., 2009). Par ailleurs, récemment, un FT appelé Ascl2 (Achaete-Scute homologue 2) a été montré comme se liant directement au locus de CXCR5 ciblant l'augmentation d'expression de CXCR5 et initiant le développement des T<sub>FH</sub> (Liu et al., 2014). Enfin, certaines protéines activatrices de la transduction des signaux, les protéines STAT (signal transducers and activators of transcription) favorisent la différenciation des LT CD4 en T<sub>FH</sub>. En effet STAT3 est la plus importante pour induire la différenciation des T<sub>FH</sub>, dans le modèle murin, en favorisant l'expression de l'IL-21 par les LT CD4 murins (Suto et al., 2008). Chez l'Homme STAT3 et STAT4 sont importants pour la différenciation des T<sub>FH</sub> Humains (Schmitt et al., 2014) (Ma et al., 2012). Au contraire, STAT5 réprime la différenciation en T<sub>FH</sub> (Johnston et al., 2012).

### 3.2.1.3/ Rôle des cytokines dans la différenciation des T<sub>FH</sub>

A travers l'IL-6r, l'IL-6 induit de façon transitoire l'expression de Bcl-6 par les LT CD4 nouvellement activés. Bcl-6 étant ensuite nécessaire pour une expression précoce de CXCR5. En effet, il a été montré que l'ajout d'IL-6 et d'IL-21 augmente l'expression de Bcl-6 lors de l'activation des LT CD4 *in vitro*. L'importance de l'IL-6 combinée à l'IL-21 dans le développement du lignage T<sub>FH</sub> a été également démontré *in vivo* (Nurieva et al., 2008; Vogelzang et al., 2008). En l'absence d'IL-6, un défaut précoce dans la différenciation en T<sub>FH</sub> est observé (Eddahri et al., 2009) (Eto et al., 2011).

L'IL-2 est un régulateur majeur de la différenciation des T<sub>FH</sub>. En effet, l'IL-2 est un puissant inhibiteur de la différenciation en T<sub>FH</sub> et peut agir très précocement durant l'activation des cellules T. Récemment, il a été montré, dans le modèle murin, que l'axe IL-2/STAT5 coopère avec le FT Blimp-1 (un antagoniste de Bcl-6) pour inhiber la différenciation en T<sub>FH</sub> (Ballesteros-Tato et al., 2012). La molécule de signalisation STAT au sein des Treg et T<sub>H2</sub> (activé par IL-2) inhibe la différenciation des T<sub>FH</sub> en supprimant l'expression de CXCR5, Bcl-6, cMaf, Baft et l'IL-21 en régulant le positionnement de Blimp-1 (Nurieva et al., 2012). Enfin, il a aussi été montré que l'IL-27 peut favoriser la formation et le maintien des cellules T<sub>FH</sub> en augmentant la sécrétion d'IL-21 (Batten et al., 2010).

### 3.2.1.4/ Rôle de l'Ag et de la force du signal via le TCR

Les T<sub>FH</sub> sont caractérisés par un TCR de haute affinité pour l'Ag. En effet, les LT CD4 possédant un TCR de forte affinité se différencient préférentiellement en T<sub>FH</sub> dans un modèle de souris immunisées au cytochrome c de pigeon (Fazilleau et al., 2009b). De plus, une étude souligne la nécessité, pour les LT CD4, d'une forte stimulation des voies de signalisation en aval de leur TCR pour s'engager à devenir une cellule T<sub>FH</sub> (Tubo et al., 2013). Une fois formées les T<sub>FH</sub> ont besoin d'une exposition continue avec l'Ag pour leur maintien. Enfin une étude montre que la dose initiale d'Ag détermine la taille et la durée de la réponse T<sub>FH</sub> (Baumjohann et al., 2013). Par ailleurs, une étude a montré que c'est la présentation antigénique par les LB du CG qui permet de maintenir le phénotype des T<sub>FH</sub> car celle-ci est dépassée en utilisant des fortes doses d'Ag (Deenick et al., 2010).

En conclusion, la qualité de l'engagement spécifique du TCR avec l'Ag présenté par les DC et/ou les LB a une influence majeure dans le choix d'un LT CD4, au départ naïf, à devenir une cellule T<sub>FH</sub> et à maintenir son phénotype.

### 3.2.2/ Facteurs impliqués dans la fonction des LT CD4 folliculaires

Ces modifications moléculaires permettent la différenciation des LT CD4 en T<sub>FH</sub> et la migration de ceux-ci au niveau de la bordure T-B des OL. Au niveau de cette bordure, l'interaction Ag spécifique avec les LB, toujours dépendante de l'engagement d'ICOS (Choi et al., 2011) permet le maintien de l'expression de Bcl-6 au sein des T<sub>FH</sub> appelés pré-CG T<sub>FH</sub>, et l'acquisition par ces cellules de caractéristiques phénotypiques spécifiques des effecteurs T<sub>FH</sub> dans les CG. La différenciation terminale des T<sub>FH</sub> conduirait alors à la formation de CG où s'opère la maturation des LB par commutation de classe et hyper-mutations somatiques. Au sein des CG, les T<sub>FH</sub> effecteurs vont permettre le développement de plasmocytes à longue durée de vie et de haute affinité, et la génération de LB mémoires (Cannons et al., 2010). Nous verrons par la suite plus en détails, la coopération qui s'opère entre les T<sub>FH</sub> et les LB pour aboutir à l'établissement d'une réponse humorale composée de cellules effectrices et mémoires.

Le discernement du rôle fonctionnel des T<sub>FH</sub> requiert la compréhension de l'intégration collaborative des diverses voies de signalisation mise en jeu au cours de ces interactions T-B, impliquant les facteurs solubles (IL-21, IL-4 et CXCL13), les protéines de surface (CD40L, PD-1, ICOS, SAP et CXCR5) et le FT Bcl-6.

- CD40L-CD40 :

CD40L est l'unique ligand de CD40. Chez l'Homme, la liaison CD40L/CD40 conduit à une diminution rapide de l'expression de CD40L à la surface des T<sub>FH</sub> de manière concomitante à son internalisation. Ce mécanisme contribuerait à la modulation de l'activation des LB (Yellin et al., 1994). La régulation de son expression complexifie la détermination de son rôle dans les interactions LT-LB chez l'Homme. Cependant, chez la souris, la perturbation des interactions CD40L/CD40 par l'administration d'un Ac monoclonal anti-CD40L se traduit par l'absence de CG, ceci démontre son implication dans le dialogue T<sub>FH</sub>/LB (Foy et al., 1994). L'analyse du profil transcriptionnel des LB des CG montre que ces cellules sont caractérisées par l'expression de gènes pro-apoptotiques (Klein et al., 2003). Des signaux de survie sont donc indispensables pour assurer le maintien des LB du CG. L'engagement CD40L/CD40 est critique dans le processus séquentiel permettant la survie des LB du CG. En effet, pour les LB, l'engagement CD40L/CD40 conditionne à la fois

l'expression de Bclx, molécule anti-apoptotique, et celle de Fas, molécule pro-apoptotique. A un stade précoce, la liaison de CD40 à CD40L induit l'augmentation de Bclx, rendant ainsi les LB résistant à l'apoptose lié aux interactions Fas/FasL entre LB et T<sub>FH</sub>. Par la suite, l'absence concomitante de reconnaissance appropriée de l'Ag par les LB activés conduit à une diminution du niveau de Bclx et à la mort des LB par susceptibilité Fas/FasL (Zhang et al., 1996).

- IL-21 :

La cytokine IL-21 produite par les T<sub>FH</sub> est déterminante pour la différenciation des LB en plasmocytes mais son rôle est complexe. La fixation de l'IL-21 sur son récepteur à la surface des LB induit la phosphorylation de STAT3, ce qui active l'expression du FT Blimp-1 (Martins and Calame, 2008). Chez l'Homme, la présence de mutations abolissant l'expression de STAT3, empêche l'induction de Blimp-1 et donc la différenciation des LB en plasmocytes, et ce malgré une supplémentation *in vitro* en IL-21 (Avery et al., 2010). Mais, l'IL-21 sécrétée par les T<sub>FH</sub> permet également d'augmenter l'expression du FT Bcl-6. Cette dernière propriété conférerait à l'IL-21 un rôle dans la prolifération des LB par l'intermédiaire de STAT5, permettant le maintien et/ou l'induction de Bcl-6 (Scheeren et al., 2005). L'IL-21 par ce mécanisme agirait de concert avec CD40L. Par ailleurs, IL-4 pourrait circonvenir aux fonctions de l'IL-21, démontrant l'interconnexion entre les différentes voies de signalisation engagées par les interactions T<sub>FH</sub>-LB du CG. Chez la souris, le déficit conjoint en IL-21R et IL-4R semble être plus lourd de conséquences que l'inactivation de l'IL-21R seul, confirmant l'importance de voies alternes dans la médiation de signaux (Ozaki et al., 2002).

- PD-1/PDL-1 :

PD-1 est fortement exprimé à la surface des T<sub>FH</sub> du CG. Un tel niveau d'expression peut refléter en partie les interactions de nature Ag spécifique qui se produisent de manière répétée entre LB et LT au sein des CG et qui conduisent à une stimulation chronique du TCR. L'expression de PD-1 par les LT soumis à une stimulation antigénique constante en rapport avec une infection chronique, a en effet été décrite (Day et al., 2006). Cependant, l'expression intense de PD-1 peut également refléter l'implication des T<sub>FH</sub> dans des mécanismes de contrôle du développement de la réponse humorale. Le niveau d'expression de PD-1 permet en effet de discriminer les T<sub>FH</sub> des autres populations T « helper », mais également de déterminer le stade de différenciation des T<sub>FH</sub> en corrélation avec l'expression de CCR7. Chez l'Homme, Wang et al., en utilisant une méthode de tri par billes magnétiques basées sur le

niveau d'expression de PD-1, ont pu isoler à partir d'un OLI, les amygdales, trois populations de LT CD4 avec des intensités de PD-1 différentes soit les  $CD4^+PD-1^+$ ,  $CD4^+PD-1^{++}$  ou  $CD4^+PD-1^{+++}$  (Wang et al., 2011). Ils ont démontré que seules les cellules  $CD4^+PD-1^{+++}$  étaient capables d'une part, de produire de l'IL-21 et du CXCL13, et d'autre part, d'induire la production d'Ac par les LB isolés de ces mêmes tissus. Néanmoins, dans cette même étude, l'activation de PD-1 par l'addition de PDL-2 *in vitro* conduisait à la réduction notable de la sécrétion d'Ac suggérant que PD-1 pourrait jouer un rôle modulateur de la réponse humorale (Wang et al., 2011).

La mise en évidence d'une population de  $T_{FH}$  régulateurs (TFR) :  $CXCR5^+Bcl-6^+FoxP3^+$  chez l'Homme et la souris (Chung et al., 2011) (Linterman et al., 2011) a conduit à la révision du rôle de PD-1 dans la réponse humorale. L'existence de telles cellules chez l'Homme avait été suggérée par le fait que chez les sujets atteints de syndrome Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, autoimmune Enteropathy, X-linked (IPEX), syndrome lié à des mutations inactivatrices du gène FoxP3, une réponse humorale incontrôlée est observée. Par ailleurs, en l'absence de détection de LT  $CXCR5^+Bcl-6^+FoxP3^+$  (TFR) dans le thymus de souris, Chung et al. avaient émis l'hypothèse que ces cellules pourraient dériver de précurseurs Treg naturels  $CXCR5^-$  provenant de la périphérie (Chung et al., 2011). Dans cette même étude, des expériences de transfert adoptif réalisées dans des souris  $TCR\beta^{-/-}$  ont permis de démontrer la capacité des LT CD4 TFR à contrôler la réponse humorale. En effet, le transfert de LT CD4 naïfs de souris sauvage en présence de Treg issus de souris déficientes pour le gène Bcl-6 ou de souris sauvages, dans des hôtes  $TCR\beta^{-/-}$ , suivi d'une immunisation avec la protéine KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) conduisait à une augmentation remarquable du pourcentage de plasmocytes et du titre d'Ac spécifiques de cette protéine, uniquement lorsque les Treg provenaient des donneurs  $Bcl6^{-/-}$  (Chung et al., 2011). Enfin, une étude a montré que l'interaction PD-1/PDL-1 affectait plus spécifiquement les TFR, en diminuant leur nombre. L'engagement de PD-1 par son ligand permettrait donc le contrôle de l'inhibition des  $T_{FH}$  par les TFR qui tendent normalement à limiter leur différenciation et leur fonction (Hams et al., 2011).

- SAP et ICOS :

Les interactions ICOS/ICOSL affectent plus la différenciation des  $T_{FH}$  que leur fonction stricto sensu. La signalisation conduite par SAP, quant à elle, contribue à stabiliser les contacts des  $T_{FH}$  avec les LB du CG, contacts nécessaires à leur différenciation en plasmocytes et/ou en LB mémoires (Cannons et al., 2010). Cependant, SAP peut également

être impliqué dans les mécanismes moléculaires conduisant à la production par les T<sub>FH</sub> d'IL-4 (Yusuf et al., 2010), ce qui aurait pour rôle, tout comme l'IL-21, de promouvoir la survie des LB du CG (Ozaki et al., 2002).

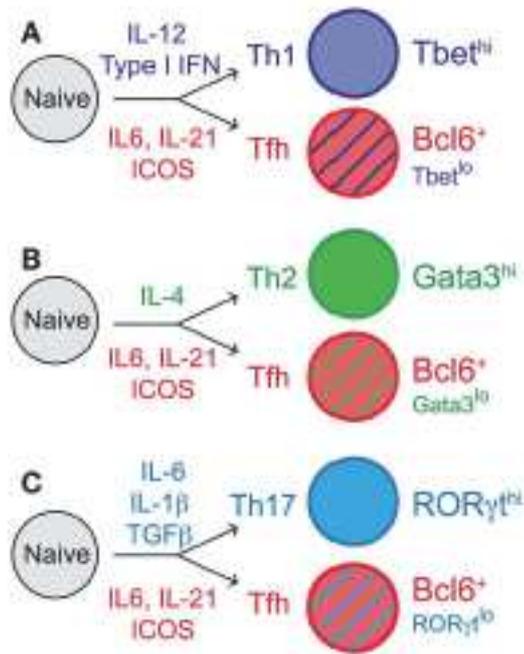
- CXCR5/CXCL13 :

L'expression du récepteur CXCR5 par les T<sub>FH</sub> est acquise au cours des stades précoces de différenciation des LT CD4 naïfs en T<sub>FH</sub>. Le rôle de ce récepteur est essentiel à la migration des T<sub>FH</sub> vers les follicules des OLI riches en CXCL13 qui est un ligand sécrété par les LB du CG, les CDF et les T<sub>FH</sub> (chez l'Homme). L'expression de CXCL13 constitue une caractéristique singulière des T<sub>FH</sub> humains mais son rôle reste à définir. La sécrétion de CXCL13 par les T<sub>FH</sub> pourrait conditionner le recrutement des LB vers les follicules et la migration intra-folliculaire des LB du CG vers les zones claires des follicules riches en T<sub>FH</sub> et en CDF. Parallèlement, au sein des CG, la liaison de CXCL13 à CXCR5 à la surface des LB du CG pourrait induire l'expression de LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2, lymphotoxine dont l'engagement avec son récepteur à la surface des cellules non hématopoïétiques du stroma est impliqué dans la maturation des CDF (Ansel et al., 2000). CXCL13 de manière générale est primordiale pour définir l'architecture fonctionnelle des CG. Les T<sub>FH</sub> qui constituent une source importante de CXCL13 au sein des CG (Gu-Trantien et al., 2013), participent par ce biais au maintien actif de ces structures.

### 3.3/ La plasticité entre T<sub>FH</sub> et autres lignages effecteurs

Les T<sub>H2</sub> et les Treg murins peuvent devenir des T<sub>FH</sub> *in vivo* (Glatman Zaretsky et al., 2009) ; (Liu et al., 2012a). De plus, récemment plusieurs modèles de souris rapporteurs ont permis de montrer *in vivo* la capacité des T<sub>H1</sub> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ou T<sub>H2</sub> IL-4<sup>+</sup> à devenir des T<sub>FH</sub> après transfert (Reinhardt et al., 2009) (Liu et al., 2012a). Par ailleurs, il a été proposé que dans les plaques de Peyer les T<sub>FH</sub> proviennent des Treg et des T<sub>H17</sub> (Tsuji et al., 2009). En effet, le transfert de Treg Foxp3<sup>+</sup> au sein de souris déficientes pour les LT permet la formation de CG dans les plaques de Peyer plus efficacement que le transfert de LT CD4 total. La différenciation des Treg en T<sub>FH</sub> s'accompagne de la diminution d'expression de Foxp3 et de l'augmentation de Bcl-6, CXCR5 et de l'IL-21. En conclusion, les autres lignages T effecteurs peuvent acquérir en fonction de l'environnement inflammatoire les phénotypes et la fonction des cellules T<sub>FH</sub>. Cependant les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu dans cette plasticité sont toujours inconnus.

Des études approfondies ont démontré que les cellules  $T_{FH}$  partagent certaines similitudes avec les cellules  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$  et  $T_{H17}$ , ces cellules ont des propriétés développementales, phénotypiques et de migration uniques ainsi que des capacités fonctionnelles distinctes comparées à d'autres lignées de cellules T auxiliaires ( $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ ,  $T_{H17}$ , Treg) (Crotty, 2011b). Toutefois, selon le type d'infection (virale, helminthes, fongique, etc.) ou la vaccination et l'environnement inflammatoire généré, les cellules  $T_{FH}$  peuvent exprimer des niveaux faibles voir intermédiaires de FT spécifiques des autres lignages tels que T-bet, GATA3 ou ROR $\gamma$ t (Figure 12) (Yusuf et al., 2010) (Morita et al., 2011) (Hale et al., 2013b). Cette expression de FT par les  $T_{FH}$  en fonction du contexte se traduit par une variété de sous-ensembles de cellules  $T_{FH}$  qui peuvent exprimer de faibles niveaux de cytokines spécifiques qui pourront à leur tour contrôler la commutation isotypique des Ac (Yusuf et al., 2010)(Reinhardt et al., 2009) (Mitsdoerffer et al., 2010). Enfin, l'étude des relations complexes entre les  $T_{FH}$  et leurs homologues non- $T_{FH}$  est un domaine qui nécessite d'autres investigations afin de mieux comprendre le rôle d'une telle flexibilité des  $T_{FH}$  dans différents contextes de la réponse immune (Figure 12).



**Figure 12 : Différenciation des T<sub>FH</sub> et hétérogénéité dépendante du contexte inflammatoire.** Après activation des LT CD4 naïfs, ces derniers prolifèrent et adoptent un lignage spécifique en fonction des facteurs de différenciations et des cytokines polarisantes présentés dans l'environnement. La différenciation des cellules T CD4 en T<sub>FH</sub> est influencée par l'IL-6 et IL-21, et dépend de la signalisation passant par ICOS pour l'expression du FT Bcl6. Certaines cytokines comprenant l'IL-12, l'IL-4 et l'IL-1β, et beaucoup d'autres permettent la différenciation en T<sub>H1</sub> (A), T<sub>H2</sub> (B) et T<sub>H17</sub> (C) respectivement. Le contexte dépendant de l'environnement cytokine influence également sur la différenciation cellulaire des T<sub>FH</sub>. Ainsi, les T<sub>FH</sub> effecteurs peuvent exprimer des niveaux faibles voire intermédiaires de FT tels que Tbet, GATA3, et RORγt, qui sont associés aux lignées T<sub>H1</sub>(A), T<sub>H2</sub> (B) et T<sub>H17</sub> (C) respectivement.

### III/ La réponse B-T dépendante.

Les deux acteurs d'une réponse B-T dépendante sont d'une part les LB et d'autre part les  $T_{FH}$ , tous deux spécifiques du même Ag d'intérêt. Ces deux acteurs vont interagir à différentes étapes de la réponse immune avec plusieurs objectifs à la clef. D'une part, l'objectif des  $T_{FH}$  est de terminer leur différenciation, passant d'un état « intermédiaire » de « pré- $T_{FH}$  » à des  $T_{FH}$  du CG. Pour les LB il s'agit de recevoir des signaux de survie pour pouvoir se différencier en plasmocytes à courte durée de vie (lors d'une réponse extra-folliculaire) ou bien participer à la réaction du CG et devenir ainsi des LB du CG. Au sein du CG, les  $T_{FH}$  participent à la sélection des LB qui vont générer les cellules mémoires (LB mémoires et plasmocytes à longue durée de vie) qui auront la capacité de produire des Ac de haute affinité.

Après infection ou immunisation et parallèlement aux étapes précoces de différenciation des LT CD4 naïfs en  $T_{FH}$  (décrit précédemment), les LB naïfs qui reconnaissent par leur BCR l'Ag d'intérêt vont le capturer et le présenter à la surface de leurs molécules de CMHII. Cette activation des LB spécifiques à l'Ag s'accompagne d'une augmentation de l'expression de CCR7 qui en plus de CXCR5 va permettre à ces LB de migrer jusqu'à la zone B-T où ils vont pouvoir interagir de manière Ag-spécifique avec des pré- $T_{FH}$ . D'autre part, la migration des pré- $T_{FH}$  vers la zone B-T est une étape essentielle pour rencontrer les LB. Les cellules pré- $T_{FH}$  migrent en réponse au CXCL13. En absence de CXCR5, la fréquence des  $T_{FH}$  est réduite *in vivo*. PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) peut se lier aux ligand de CCR7, CCL19 et CCL21, et peut affecter la migration des cellules T en permettant une orientation vers les sites inflammatoires via les molécules d'adhésion E et P-selectine (Lukacs, 2000) (Hirata et al., 2000). En conclusion, les pré- $T_{FH}$  et les LB pré-activés interagissent spécifiquement au niveau de la bordure B-T. Ils expriment tous deux CXCR5. De plus, les cellules B servent d'APC mais aussi de source d'ICOS-L.

Voyons tout d'abord plus en détails l'activation des LB spécifiques à l'Ag. Ensuite nous décrirons les multiples interactions entre les LB et les pré- $T_{FH}$  puis entre les LB du CG et les  $T_{FH}$  du CG. Toutes ces étapes sont nécessaires à la mise en place de la réponse Ac B-T dépendante.

## 1/ L'activation Ag spécifique des LB

La première étape est l'activation des LB naïfs par un Ag exogène au sein des follicules (Batista and Harwood, 2009). Ces LB rencontrés dans les follicules B des OLII sont principalement des LB naïfs  $IgM^+IgD^+$ . Lors d'une infection ou immunisation, l'Ag capturé de façon spécifique par les LB naïfs peut avoir de multiple provenance. En effet, l'Ag peut soit diffuser à travers la capsule des OLS et entrer dans les follicules B (Pape et al., 2007), soit être transporté par la lymphe (Roozendaal et al., 2009) ou capturé à la surface des DC (Qi et al., 2006). La population de macrophages sous capsulaire est aussi capable, sous forme de complexes immuns, de présenter l'Ag aux LB. La reconnaissance de l'Ag par le LB peut se faire soit via le récepteur au complément à sa surface, c'est alors que les LB transportent l'Ag jusqu'au CDF dans les follicules. Cependant, si l'Ag est reconnu spécifiquement par le BCR, il s'ensuit une internalisation des complexes immuns et une migration de ces LB vers la zone T-B où ils interagissent avec des cellules pré- $T_{FH}$  de même spécificité antigénique, il s'en suit une action positive sur leur survie et leur prolifération.

## 2/ Contact entre les pré- $T_{FH}$ et les LB : réponse extra-folliculaire vs réaction du centre germinatif.

### 2.1/ Paramètres impliqués dans l'induction d'une réponse extra-folliculaire.

Le premier contact entre le LB pré-activé et la pré- $T_{FH}$  au niveau de la zone T-B va guider la voie de différenciation empruntée par les LB. Si l'interaction entre les deux types cellulaires est de courte durée ceci favorise la mise en place d'une réponse extra-folliculaire ce qui se traduit par la génération de plasmocytes à courte durée de vie (Qi H et al, Nature 2008). Dans ce cas, au sein des LB, une voie de signalisation ERK se met en place activant le FT Blimp-1 dont la présence est nécessaire au développement des plasmocytes (Yasuda et al., 2011). De plus, des études ont montré que d'autres facteurs tels que EB12 (Epstein-Barr virus-induced G protein-coupled receptor) sont importants dans le positionnement des LB activés dans les zones extra-folliculaires et dans la différenciation des plasmocytes à courte durée de vie (Gatto et al., 2009) (Pereira et al., 2009).

Un autre paramètre pouvant influencer le choix de différenciation des LB est l'affinité du BCR. En effet, à ce sujet plusieurs études semblent apporter des conclusions différentes.

Une étude montre que les LB exprimant un BCR de faible affinité pour l'Ag sont incapables de former des CG à cause d'une compétition qui s'opère entre les LB qui présentent un BCR de haute affinité pour l'Ag qui vont interagir préférentiellement avec les pré-T<sub>FH</sub> (Shih et al., 2002). D'autres travaux montrent l'inverse avec l'idée que ce sont les LB qui ont un BCR de faible affinité pour l'Ag qui vont préférentiellement former un CG pour subir la maturation d'affinité et ainsi augmenter la qualité de leur BCR et donc des Ac qu'ils produisent. Les LB ayant un BCR de forte affinité vont plutôt se différencier en plasmocytes à courte durée de vie (Paus et al., 2006). Par ailleurs, une étude a montré récemment que l'affinité du BCR pour son Ag n'est pas un paramètre qui influence l'accès à l'Ag mais plutôt la capacité à présenter l'Ag aux pré-T<sub>FH</sub>. Ainsi, suivant cette logique, les LB qui ont un BCR de forte affinité pour l'Ag présentent à leur surface une densité plus élevée de complexes p:CMHII et par conséquent reçoivent l'aide nécessaire pour former un CG (Schwickert et al., 2011). Cependant, à ce jour le rôle définitif de l'affinité du BCR dans le choix de différenciation n'est toujours pas résolu.

Indépendamment du choix de différenciation des LB (plasmocyte à courte durée de vie ou LB du CG), le contact entre les LB pré-activés et les pré-T<sub>FH</sub> de même spécificité antigénique va aboutir au sein du LB au déclenchement d'un processus appelé commutation isotypique. Ce mécanisme correspond à un réarrangement irréversible de l'ADN, et ceci par excision des séquences d'ADN situé entre le gène J et le gène codant pour la chaîne lourde voulue. Par conséquent, au niveau protéique un changement de la région constante (Fc) du BCR s'opère, permettant de transformer un IgM en un autre isotype d'Ac IgG, IgA ou E par exemple. (Stavnezer et al., 2008).

En conclusion lors de l'interaction précoce entre la pré-T<sub>FH</sub> et le LB, les signaux délivrés par les pré-T<sub>FH</sub> vont induire au sein du LB la commutation isotypique, sa prolifération. Suite à cela, le LB aura la possibilité de devenir un plasmocyte à courte durée de vie ou bien de former un CG.

Après leurs interactions avec les pré-T<sub>FH</sub>, une des possibilités est la mise en place d'une réponse extra-folliculaire. Une partie du compartiment de LB spécifiques à l'Ag migrent vers des zones spécialisées des NL appelées cordon médullaire. A ce niveau, les LB se différencient en plasmablastes de courte durée de vie qui sécrètent des Ac de faible affinité pour l'Ag. il a été suggéré que la différenciation en plasmocyte à courte durée de vie peut se faire indépendamment de cellules T. Cependant l'expression de Bcl-6 ainsi que de l'IL-21 au

sein des cellules T est importante pour maintenir leur capacité de production d'Ac (Lee et al., 2011). Certaines évidences expérimentales suggèrent qu'une partie des LB sélectionnés par les pré-T<sub>FH</sub> se différencient en cellules B mémoire IgM<sup>+</sup> qui n'ont pas subi de commutation isotypique sans passer par les CG (Kaji et al., 2012) (Taylor et al., 2012).

## 2.2/ L'interaction T<sub>FH</sub>-B-CDF : la réaction du CG

Le CG est une structure transitoire qui se forme au sein des OL périphériques en réponse à un Ag T-dépendant (MacLennan, 1994). Le CG est composé de T<sub>FH</sub>, de LB, de CDF, de macrophages. Au sein du CG se développe des LB qui expriment des Ac de haute affinité qui vont par la suite se différencier en plasmocytes à longue durée de vie ou en LB mémoires qui maintiennent une protection contre l'invasion des pathogènes.

### 2.2.1/ Réaction du CG

La majorité des T<sub>FH</sub> du CG possède un programme de différenciation canonique et présente le phénotype suivant : CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup>Bcl-6<sup>hi</sup>. Les T<sub>FH</sub> du CG peuvent donc être identifiés chez la souris, l'Homme et les Primates non Humains comme des cellules exprimant un niveau plus élevé de CXCR5, et PD-1 par rapport aux pré-T<sub>FH</sub>.

Au sein des CG les LB circulent à travers deux régions : la région claire et la région sombre. Dans la région claire, les LB se lient à l'Ag et le présentent sous forme de complexe p:CMHII aux T<sub>FH</sub> qui en retour fournissent des signaux d'aide aux LB, signaux indispensables à leur prolifération et à leur survie. Les LB qui reçoivent des signaux de survie migrent dans la zone sombre où ils vont proliférer. Les cellules B en prolifération dans le CG, appelé centroblastes, peuvent subir la commutation isotypique, comme vu précédemment, mais aussi un processus appelé hypermutation somatique (HMS). L'HMS est un processus dans lequel des mutations ponctuelles et aléatoires sont générées dans les régions variables CDR3 (Complementary determining region 3) des gènes de l'Ig. Par conséquent, l'HMS agit en diversifiant les récepteurs à l'Ag pour permettre une sélection clonale des LB sur la base de l'affinité de leur BCR. Plusieurs études ont révélé le rôle majeur des T<sub>FH</sub> dans la régulation du CG (Crotty, 2011b) (Victoria and Nussenzweig, 2012). Les T<sub>FH</sub> régulent la taille du CG (Johnston et al., 2009b) et sélectionnent les LB avec un BCR de haute affinité pour l'Ag (Good-Jacobson et al., 2010).

Les LB qui ont modifié leur affinité pour l'Ag arrêtent de proliférer et deviennent des centrocytes. Les centrocytes sont sélectionnés selon leur capacité à lier les complexes d'Ag sur les CDF pour recevoir l'aide des  $T_{FH}$ . Les CDF expriment des niveaux élevés de récepteur de complément 1 ou 2 (CR1 ou CR2) qui sont essentiels au maintien de l'Ag. Il est établi qu'en l'absence de ces récepteurs aux compléments, les CDF sont incapables de retenir l'Ag et la génération des CG est compromise (Fischer et al., 1998). En outre, les CDF ont la capacité unique de conserver l'Ag intacte pendant des périodes prolongées. En effet, cela est nécessaire pour l'entretien du CG, pour l'HMS ainsi que pour la génération de cellules mémoires qui persistent à long terme. Afin de préserver l'Ag durant de longues périodes, les complexes immuns capturés par les CDF sont piégés dans des compartiments endosomaux de recyclage permettant de protéger l'Ag contre la dégradation (Heesters et al., 2013). Cette observation suggère un mécanisme par lequel les CDF peuvent contrôler la disponibilité de l'Ag et réguler la réponse immunitaire humorale. Enfin, après sélection par les CDF, les cellules B peuvent réintégrer le CG ou, avec l'aide des  $T_{FH}$  peuvent sortir du CG et générer des cellules B mémoires et des plasmocytes à longue durée de vie.

## 2.2.2/ Facteurs importants pour le développement de $T_{FH}$ et des LB du CG

### . *SAP*

*SAP* (comme vu précédemment) est une protéine adaptatrice qui contient un domaine SH2 et qui se lie à la queue cytoplasmique des récepteurs de la famille des SLAM (Cannons et al., 2011). *SAP* est spécifiquement surexprimée au sein des  $T_{FH}$  du CG. *SAP* est essentielle pour le développement des  $T_{FH}$  du CG, pour le développement du CG, et pour la majorité des cellules B mémoires et des plasmocytes à longue durée de vie. En l'absence de *SAP*, les  $T_{FH}$  ont une adhésion déficiente avec les LB ce qui a pour conséquence une aide insuffisante fournie par les  $T_{FH}$  aux LB (Qi et al., 2008)

### . Cytokines

L'IL-4 est requis pour la commutation isotypique en IgE et IgG1. L'IFN- $\gamma$  régule l'expression des IgG2a alors que le TGF- $\beta$  induit la production d'IgA et IgG2b. De plus, La déficience en IL-21 n'a pas d'impact sur la formation des LB mémoires mais affecte profondément la maturation d'affinité et réduit le nombre de cellules B IgG1<sup>+</sup> due à un manque d'expression de Bcl-6. L'IL-21 régule la différenciation et la prolifération des

cellules B du CG par un mécanisme intrinsèque aux cellules B. L'IL-21 supporte aussi la survie des plasmocytes et la production d'Ac dans les OLII (Zotos et al., 2010).

### **2.2.3/ Pendant et après la réaction du CG : le devenir des T<sub>FH</sub> du CG**

Les LB sont strictement confinés à un seul CG. De plus, la majorité des LB au sein d'un CG représente un clone oligoclonal de LB spécifique à l'Ag qui subit l'HMS et la sélection par les T<sub>FH</sub>. Par ailleurs, une fois que les T<sub>FH</sub> ont fourni l'aide nécessaire aux LB du CG, ces cellules ne restent pas confinées aux CG et peuvent quitter ces structures. En effet, plusieurs possibilités ont été décrites. Soit ces cellules quittent le CG et résident temporairement dans le follicule B adjacent avant de rentrer de nouveau dans le même CG. Une autre possibilité est que les T<sub>FH</sub> transitent à travers un follicule voisin et entre dans un CG différent (Shulman et al., 2013). Enfin la troisième possibilité est de quitter le CG, de réduire l'expression de Bcl-6 et de se développer en cellules mémoires (Kitano et al., 2011) ; (Shulman et al., 2013).

### **3/ Les T<sub>FH</sub> dans certaines pathologies humaines.**

Les T<sub>FH</sub> sont indispensables à la mise en place d'une réponse Ac T-dépendante aboutissant à la génération d'Ac adapté et spécifique à l'Ag d'intérêt. Cependant, dans certaines conditions pathologiques (infections ou maladies auto-immunes par exemple) les T<sub>FH</sub> peuvent aussi être dérégulés et être impliqués dans la production d'Ac inefficaces ou encore d'Ac auto-immuns. Voyons leur rôle dans certaines pathologies humaines.

Comme l'accès aux tissus lymphoïdes humains est limité, de nombreux travaux ont exploité le fait que les T<sub>FH</sub> comprennent un sous-ensemble de lymphocytes périphériques dans la circulation sanguine. Ainsi de nombreuses études ont montré que les T<sub>FH</sub> dans le sang peuvent être considérés comme un marqueur pronostique pour un bon nombre de maladies. En effet, selon les études et le contexte pathologique une diminution ou une augmentation du nombre de T<sub>FH</sub> est corrélée avec l'évolution de la maladie. Voyons un exemple de certaines de ces maladies où les T<sub>FH</sub> sont dérégulés.

### 3.1/ Les T<sub>FH</sub> dans l'Infection au VIH

Le virus du VIH infecte les cellules T CD4 ce qui induit leur déclin progressive et qui a pour conséquence de rendre les patients sensibles aux infections opportunistes. Le VIH a développé de nombreux mécanismes d'échappement au système immunitaire de l'hôte incluant des altérations dans les réponses humorales se traduisant par l'incapacité des LB à générer des Ac neutralisants pour éliminer le virus. Toutefois, les personnes infectées par le VIH développent une hyper-gammaglobulinémie. De même, suite à une vaccination chez ces patients, un défaut de production d'Ac efficace contre le VIH ou une protéine du VIH est retrouvé (Moir and Fauci, 2009). Récemment des études ont montré que dans ce contexte, malgré la baisse progressive de LT CD4 au cours de l'infection par le VIH, une augmentation des cellules T<sub>FH</sub> (définie comme des LT CD4 CXCR5<sup>hi</sup> CD45RA<sup>-</sup>, CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Bcl-6<sup>+</sup> ou CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> dans les NL ou des LT CD4<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> dans le sang périphérique chez l'Homme) a été observée chez les individus infectés par le VIH (Legac et al., 1992) (Lindqvist et al., 2012) (Cubas et al., 2013) (Perreau et al., 2013). Il n'est pas clair si cette expansion est entraînée par le VIH. Cependant, certaines études ont observé une corrélation positive entre les T<sub>FH</sub> et la virémie qui se traduit par une diminution des T<sub>FH</sub> suite à un traitement. Par ailleurs, la population de T<sub>FH</sub> du CG se révèle être le compartiment principal pour l'infection et la réplication du virus (Cubas et al., 2013) (Perreau et al., 2013). Ces résultats suggèrent que les cellules T<sub>FH</sub> seraient impliquées dans l'aggravation de la maladie du SIDA.

### 3.2/ Les T<sub>FH</sub> dans l'Auto-immunité et le Cancer

En plus du contexte d'infection par le VIH, l'étude des cellules T<sub>FH</sub> s'est révélée d'un intérêt majeur dans de nombreuses autres maladies telles que les maladies auto-immunes ou encore le cancer. Les maladies auto-immunes (lupus érythémateux, arthrite rhumatoïde, myasthénie grave, le syndrome Sjogrens, dermatomyositis juvénile, maladie auto-immune de la thyroïde) sont caractérisées par la génération d'auto-Ac dirigés contre des Ag du soi. Il existe des évidences prouvant qu'une réponse aberrante des T<sub>FH</sub> serait impliquée dans les phénomènes pathologiques. Plus précisément, une augmentation des cellules T<sub>FH</sub> dans le sang chez ces patients corrèle positivement avec des titres d'auto-Ac dans le sérum de ces patients ainsi que l'activité et/ou la gravité de la maladie (Simpson et al., 2010) (He et al., 2013) (Le Coz et al., 2013).

Dans le contexte tumoral, les T<sub>FH</sub> vont avoir soit un rôle délétère (lymphomes folliculaires) ou associé à une augmentation de la survie des patients (tumeur non lymphoïdes). Dans un contexte de lymphomes folliculaires, les T<sub>FH</sub> infiltrant les tumeurs provoquent la sécrétion, par les cellules tumorales, de chimiokines CCL17 et CCL22, qui attirent des T<sub>reg</sub> et T<sub>H2</sub> impliqués dans l'aggravation de la maladie (Pangault et al., 2010) (Rawal et al., 2013). En outre, la cellule T<sub>FH</sub> peut elle-même être maligne notamment dans un contexte de lymphome angioimmunoblastique associé aux LTs (AITL). En effet, des études ont montré des similitudes entre les cellules T<sub>FH</sub> et les cellules malignes impliquées dans l'AITL suggérant que ces cellules sont à l'origine du lymphome (Iqbal et al., 2010) (de Leval et al., 2010).

A l'opposé, dans les tumeurs malignes non lymphoïdes, les cellules T<sub>FH</sub> peuvent être présentes dans l'infiltrat inflammatoire du cancer du sein, et leur présence est associée à une meilleure survie des patients (Gu-Trantien et al., 2013). Plus précisément, des structures lymphoïdes tertiaires avec des CG et des T<sub>FH</sub> produisant du CXCL13 ont été mis en évidence. Ces résultats suggèrent que les T<sub>FH</sub>, en vertu de leur capacité à sécréter du CXCL13, permettent la mise en place de structure lymphoïdes ectopiques qui pourraient être importants dans la coordination du recrutement de cellules immunitaires qui interviennent dans la réponse anti-tumorale.

## IV/ la Mémoire Immunologique

Afin d'apporter une définition complète de ce qu'est la mémoire immunologique, nous examinerons tout d'abord les trois phases de la réponse primaire T-dépendante aboutissant à la génération et au maintien des LT CD4 mémoires. Puis nous passerons en revue les caractéristiques des LT mémoires comparés aux LT naïfs. Nous verrons les différents modèles permettant la différenciation des LT CD4 mémoires. Enfin, nous nous intéresserons aux variabilités fonctionnelles et migratoires qui existent au sein des LT mémoires: la mémoire classique centrale ( $T_{CM}$ ), les effecteurs mémoires ( $T_{EM}$ ), et la mémoire résidente dans les tissus qui a été plus récemment caractérisée ( $T_{RM}$ ).

### 1/ Génération et Caractéristiques des LT mémoires.

#### 1.1/ Les Trois phases de la réponse immunitaire T-dépendante

Suite à une infection ou une immunisation, la cinétique d'une réponse primaire peut être décomposée en trois phases bien distinctes : l'activation et l'expansion clonale des LT, la mort cellulaire ou phase de contraction, et la mémoire immunitaire.

La première phase commence lorsque les LT CD4 naïfs matures sont activés par la reconnaissance de l'Ag dans le contexte de signaux de co-stimulations appropriés. Cette phase dure environ une semaine. Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation des LT est suivie d'une phase d'expansion clonale. Dans plusieurs systèmes viraux, a lieu une expansion de 100 à 5000 fois des LT CD8 spécifiques du virus (Oehen et al., 1992) (Lau et al., 1994). Une forte expansion des LT CD4 a également été signalée dans plusieurs système antigénique (Kearney et al., 1994). De plus, une étude a montré une expansion de LT CD4 spécifique du cytochrome c de pigeon (PCC) jusqu'à 1200 fois (McHeyzer-Williams and Davis, 1995). L'expansion clonale est ensuite suivie d'une étape de différenciation en LT effecteurs fonctionnels. Lors de cette phase, les LT CD4 effecteurs modifient l'expression de molécules à leur surface. Chez les souris, par exemple, cela comprend l'induction de façon permanente de l'expression du marqueur d'activation CD44, la régulation négative de l'expression d'autres molécules d'adhésion telles que CD62L et CCR7. De plus, les LT CD4 effecteurs vont fortement exprimer des molécules telles que CD62E et CXCR5 pour faciliter l'accès à des

sites périphériques ou à des zones lympho-folliculaires qui leur étaient auparavant restreintes et où elles pourront exercer leurs fonctions.

Une période de mort cellulaire s'ensuit au cours de laquelle la plupart des cellules T activées subissent une apoptose. Cette contraction de la réponse des LT est aussi dramatique que l'expansion, et dans la plupart des cas, environ 95% des LT spécifiques à l'Ag disparaissent. Ce phénomène, appelé la mort cellulaire induite par activation (AICD), sert de mécanisme de régulation cellulaire et de maintien de l'homéostasie. (E.S. Razvi et al, *Adv Virus Res*, 1995 ; Y Liu *J. Exp Med* 1990). L'apoptose due aux interactions Fas (CD95)-FasL est impliquée dans l'AICD (activation-induced cytidine deaminase).

La troisième phase de la réponse des LT est caractérisée par la survie d'un compartiment de cellules mémoires stables pouvant persister pendant de nombreuses années. Lors d'une réponse secondaire, ces trois phases sont répétées lors d'une nouvelle rencontre avec l'Ag induisant des cellules mémoires à subir une seconde phase d'expansion qui est remarquablement plus rapide que l'expansion primaire et qui donne des cellules effectrices secondaires avec une fonctionnalité le plus souvent améliorée. Si l'expansion secondaire contrôle la menace plus rapidement, elle est à nouveau suivie d'une phase de contraction ainsi que d'une augmentation de la taille du compartiment mémoire secondaire et de sa capacité de réponses ultérieures (Ahmed and Gray, 1996).

## **1.2/ Les Caractéristiques des LT mémoires**

Le compartiment de cellules mémoires formé est apte à réagir très vigoureusement, plus rapidement et plus efficacement que les LT naïfs, à une rencontre ultérieure (réponse secondaire) avec le même Ag étranger. Mais d'où provient cette remarquable efficacité, comparée à celle des LT naïfs ? En fait les cellules mémoires ont des propriétés très particulières bien distinctes des cellules naïves.

° Tous d'abord, les LT mémoires spécifiques à l'Ag sont retrouvés à un nombre relatif plus important que leurs précurseurs naïfs spécifique de l'Ag. Ceci permet aux LT mémoires de s'imposer en nombre et d'être plus compétitif pour l'engagement avec l'Ag.

° Deuxièmement, les cellules mémoires sont beaucoup moins restreintes en terme de localisation. En effet, alors que les cellules naïves circulent dans le sang et peuvent être retrouvés dans les OLII (rate, NL), les cellules mémoires peuvent en plus circuler et résider au niveau des tissus périphérique non-lymphoïdes. Nous verrons ultérieurement plus en détails ces différences de localisations.

° Troisièmement, les cellules mémoires réalisent des changements au niveau de leur programme génétique intrinsèque leur permettant de mobiliser rapidement leurs fonctions effectrices telles qu'une rapide sécrétion de cytokines effectrices, de chimiokines ainsi que de molécules cytotoxiques.

° Enfin, comme nous l'avons évoqué précédemment, les cellules mémoires ont la caractéristique majeure, d'où leur nom, d'avoir une durée de vie plus longue notamment grâce à leur capacité à proliférer de façon homéostatique en l'absence d'Ag (Sallusto et al., 2010).

À juste titre, ces cellules mémoires qui nous protègent ont été dénommées «... *la conséquence biologique la plus importante du développement de l'immunité adaptative ...*» (Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. 8th ed. xix. Garland Science; New York: 2012. p. 868.)

En conclusion, la mise en place d'une mémoire T est un processus complexe et finement régulé. Voyons plus en détails les paramètres qui influencent la génération des LT mémoires.

### **1.3/ Paramètres qui influencent la mise en place de la mémoire T.**

#### **1.3.1/ La Fréquence des précurseurs de LT CD4 naïfs**

La taille du compartiment de précurseur de LT CD4 naïfs affecte directement la magnitude de la réponse primaire et, finalement, la taille du compartiment de cellules mémoires (Kwok et al., 2012). Le nombre physiologique de LT CD4 naïfs spécifique de l'Ag peut varier considérablement selon le pathogène ou l'Ag (Geiger et al., 2009). Chez les souris et les êtres humains, le nombre des LT CD4 naïfs spécifiques d'un épitope donné se situe généralement dans une gamme de 1 à 100 par million de cellules T CD4 naïfs. Toutefois, le

nombre peut varier considérablement en fonction de l'épitope et de l'allèle de CMHII et peut aller de 100 à 3000 cellules par souris. Les cellules naïves individuelles qui appartiennent à un même compartiment spécifique du peptide ont chacun un TCR unique suggérant une différence dans l'intensité et la durée du signal durant la réponse primaire (Tubo et al., 2013). La signalisation en aval du TCR joue un rôle important dans l'établissement des différents lignages ainsi que dans la génération de cellules mémoires. La diversité du TCR et la fréquence de précurseur peuvent altérer le phénotype des effecteurs, l'ampleur de la réponse, et la prédisposition ultérieure à développer une mémoire immunitaire (Moon et al., 2007).

### **1.3.2/ La signalisation via le TCR : avidité du TCR, durée et intensité régulent la génération des LT CD4 mémoire.**

De nombreuses études ont démontré que la signalisation via l'interaction entre le TCR et le complexe p:MHCII est un des facteurs important qui influe sur la génération des LT CD4 mémoires (Fazilleau et al., 2007) (Fazilleau et al., 2009b) (Marshall et al., 2011) (Kim et al., 2013). De plus, des travaux montrent qu'une interaction optimale entre le TCR et le p:MHCII se poursuit pendant plusieurs jours et peut se poursuivre tout au long de la phase d'expansion clonale lorsque les Ag et les APC ne sont pas des facteurs limitant (Obst et al., 2005). Un modèle murin permettant de suivre des LT CD4 polyclonaux spécifiques du PCC a démontré que les cellules qui avaient un TCR qui se liaient plus fortement aux complexes p:MHCII allaient se différencier préférentiellement en cellules T<sub>FH</sub> (Fazilleau et al., 2009b). Par ailleurs il a aussi été montré que les LT CD4 naïfs qui ont un TCR transgénique peuvent se différencier en de multiples effecteurs et cellules mémoires alors qu'elles ont toute une même affinité et capacité de liaison avec le complexes p:CMH. Ces résultats montrent que d'autres paramètres interviennent probablement pour expliquer l'engagement des cellules (Pepper et al., 2011). En effet, de nombreuses évidences montrent qu'une exposition avec des doses élevées et prolongées d'Ag favorise la différenciation des LT CD4 en T<sub>FH</sub> (Deenick et al., 2010) (Baumjohann et al., 2013) (Fahey et al., 2011). Il est plausible que la décision de devenir un T<sub>FH</sub> effecteur ou mémoire va être dépendante de l'interaction entre le TCR et le complexe p:CMH.

Plusieurs clones avec des TCR spécifiques de l'Ag sont recrutés au cours de l'activation. De plus, des travaux utilisant des infections virales aiguës indiquent que seul un sous-ensemble de clones TCR spécifiques de l'Ag est recruté pendant la réponse primaire puis

maintenu dans la phase mémoire. Par conséquent, il est essentiel de comprendre comment et pourquoi les clones sont sélectionnés (Williams et al., 2008). Certaines études démontrent que la survie des précurseurs de cellules mémoire est principalement influencée par l'avidité fonctionnelle avec laquelle le TCR lie le complexe p:MHCII, de manière à ce que les clones de plus forte avidité reçoivent un avantage de survie (Malherbe et al., 2004) (Lanzavecchia and Sallusto, 2002). Dans ce contexte, il a été également démontré qu'une restimulation antigénique résulte d'une augmentation des clones de LT CD4 de haute avidité au sein du compartiment mémoire (Williams et al., 2008). Par conséquent, dans ce modèle, les LT CD4 activés portant un TCR avec une moindre avidité fonctionnelle étaient moins susceptibles de persister dans la mémoire à long terme. De plus, Weber et al. ont comparé la réponse générée par deux populations de cellules  $T_{H1}$  portant un TCR transgénique spécifiques pour deux peptides étroitement apparentés d'une protéine de *Listeria monocytogenes* (LLO). Alors que l'une induisait de façon préférentielle une réponse effectrice primaire robuste au détriment d'une réponse secondaire modeste, l'autre population  $T_{H1}$  montrait l'effet inverse, une réponse primaire modeste et une réponse secondaires plus robuste (Weber et al., 2012c). Cette observation suggère que certains sous-ensembles de cellules effectrices répondent préférentiellement à la mise en place d'une mémoire, sans monter une réponse primaire maximale, et que cela constitue une preuve de l'existence de sous-ensembles de LT mémoires spécialisés.

### 1.3.3/ Rôle des molécules de costimulation CD40L et CD28

Le signal, passant par l'interaction entre le complexe TCR-p:MHCII, est nécessaire mais pas suffisant pour conférer une pleine activation des LT CD4. En effet, la signalisation du TCR doit être renforcée par la signalisation via les molécules de costimulation à la surface des APC, ainsi que par des cytokines dans l'environnement local. Les interactions les mieux caractérisées impliquant les molécules de costimulation sont celles entre le CD40-CD40L et B7-CD28. CD40 sur les APC se lie au CD40L (CD154) sur les LT, cette interaction est essentielle pour les réponses des LT CD4. En l'absence de signalisation CD40L, l'expansion clonale des cellules T CD4 spécifiques de l'Ag *in vivo* est sévèrement impactée (Grewal et al., 1995). Alors que les cellules T CD4 naïfs expriment CD40L *de novo* pendant l'activation, de nouvelles preuves indiquent que les LT CD4 effectrices ainsi que les cellules mémoires stockent en elles du CD40L préformé qui peut être rapidement mobilisé (Koguchi et al., 2012). Ceci peut expliquer l'efficacité accrue avec laquelle les LT CD4 mémoires mettent en

place la réponse secondaire. Inversement, le blocage de la signalisation CD40-CD40L peut réduire de 90% la magnitude des réponses primaires des LT CD4 dans des modèles murins d'infection aiguë par le LCMV (*Lymphocytic Choriomeningitis Virus*) (Whitmire et al., 2000) (MacLeod et al., 2006).

En ce qui concerne le CD28, son activation est requise pour une expansion clonale maximale des LT CD4 activés ainsi que pour la génération des LT CD4 mémoires (Pagan et al., 2012). Les LT CD4 sont plus sensibles aux complexes p:MHCII lorsque l'APC est activée et exprime le ligand de CD28, CD80/CD86. En effet, ceci permet d'abaisser le seuil de sensibilité pour la signalisation entre le TCR-p:MHCII (Jenkins et al., 2001) (Lanzavecchia et al., 1999). En plus de l'abaissement du seuil d'activation, la signalisation passant par CD28 augmente fortement la transcription d'IL-2 et les inhibiteurs de l'apoptose, ce qui augmente la capacité de prolifération et de la probabilité de survie des cellules durant la phase de contraction (Boise et al., 1995) (Parry et al., 2003).

#### 1.3.4/ Rôle de l'IL-2 et IL-2r

Une étude menée par Choi et al. indique que la signalisation différentielle par l'IL-2 et ICOS peut réguler la différenciation des T<sub>FH</sub> ainsi que la génération des T<sub>FH</sub> mémoires (Choi et al., 2011). Les auteurs ont rapporté qu'une faible expression de l'IL-2R $\alpha$  (CD25) associée à une forte signalisation via ICOS durant la phase d'activation et d'expansion peut conduire au développement préférentiel des cellules T<sub>FH</sub>.

De plus, les souris déficientes pour l'IL-2R $\alpha$  infectées par la bactérie *Listeria monocytogenes* présentent une altération des T<sub>H1</sub> mémoires. Cependant, dans la même expérience, la déficience en CD25 n'a pas inhibée la production d'un ensemble intéressant de précurseurs putatifs de cellules mémoires définie comme CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup> (Pepper et al., 2011) (Pepper and Jenkins, 2011). Les LT mémoires étant hétérogènes, cette étude montre que la dépendance de l'IL-2 dans la génération des LT mémoires n'est pas la même pour toute les populations de LT mémoires

### 1.3.5/ Base épigénétique de la mémoire des LT CD4

L'une des caractéristiques des cellules mémoires est que leur quiescence fonctionnelle et métabolique est liée au maintien d'un état transcriptionnel qui permet en cas de réactivation de mettre en place rapidement des fonctions prolifératives et effectrices. Les mécanismes sous-jacents de cet état transcriptionnel sont portés sur les modifications épigénétiques se produisant pendant l'activation et l'engagement du lignage. Au sein des LT CD4 mémoires, et en fonction de la lignée, il est probable que de nombreuses modifications épigénétiques clés fonctionnent pour assurer la fidélité de la lignée, pour empêcher l'expression de gènes nuisibles, ou pour faciliter l'expression de gènes précédemment supprimée. Les modifications épigénétiques étudiées, y compris l'état de méthylation de l'ADN, de modifications des histones, et l'expression de microARN, jouent chacun un rôle important dans la mémoire immunologique (Liu et al., 2013) (Podshivalova and Salomon, 2013). Une étude approfondie par Wei et al. a examiné le statut suppresseur ou facilitateur de la méthylation des histones à travers une gamme de gènes exprimée par les LT CD4, y compris les gènes d'activation et de différenciation associés aux différents lignages.: IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, ROR $\gamma$ t, et Foxp3 (Wei et al., 2009). Les cellules exprimant des gènes associés à un lignage spécifique ont tendance à présenter sur ces gènes une conformation épigénétique « ouverte ». Toutefois, ces mêmes cellules ne présentent pas toujours une conformation « fermée » de gènes de signatures typiquement exprimées par d'autres lignées. Ils ont rapporté que la méthylation du locus suppresseur de l'IFN- $\gamma$  a empêché l'expression de l'IFN- $\gamma$  chez les cellules qui n'expriment pas d'IFN- $\gamma$ . Cependant, l'expression du gène pour l'IL-4 a été inhibée de façon épigénétique seulement dans les cellules T<sub>H1</sub> et T<sub>H17</sub>, mais pas dans les cellules Treg. Enfin, une étude par Hale et al. a récemment démontré que la modification épigénétique différentielle du locus granzyme B (GZMB) dans les cellules T<sub>H1</sub> et T<sub>FH</sub> au cours de la réponse primaire à LCMV a été maintenue dans les cellules mémoires (Hale et al., 2013b). Cette déméthylation du GZMB du T<sub>H1</sub>, a permis de maintenir la fidélité de la lignée lors de la réponse secondaire et facilité la ré-expression rapide des GZMB dans les cellules T<sub>H1</sub> tout en supprimant l'expression de GZMB au sein des cellules T<sub>FH</sub>. Tous ces résultats suggèrent un mécanisme de plasticité phénotypique au sein des effecteurs secondaires.

### 1.3.6 / Rôle de la phase de contraction

Dans les modèles d'infection aiguë, la clairance des agents pathogènes limite la réponse des cellules T effectrices CD4 primaires et déclenche le passage du pic de la phase d'expansion clonale à la phase de contraction. La longueur de la phase de contraction des LT CD4 varie de 1 à 2 semaines (Pepper and Jenkins, 2011) ou jusqu'à 4 semaines (Whitmire JK, J Immunol. 2009). L'ampleur globale de l'expansion des LT CD4 et la contraction sont significativement plus faible que pour les LT CD8, et dans certaines études la perte de cellules T CD4 se fait même de façon continue durant la phase mémoire (Homann et al., 2001) (Whitmire et al., 2009) (Kamperschroer and Quinn, 1999).

Les mécanismes intervenant dans la contraction des LT CD4 n'ont pas été complètement élucidés (McKinstry et al., 2010). Cependant, une convergence de voie de mort cellulaire apoptotique et non apoptotique a été fortement suggérée. Des études récentes utilisant des cellules T transgénique SMARTA indiquent que l'expression accrue du facteur pro-apoptotique Bim, par rapport à un facteur anti-apoptotique Bcl-2, contribue à la disparition rapide des cellules T<sub>H1</sub> de faible affinité suite à une infection aiguë avec Lm-gp61 chez la souris. Ces résultats confirment un rôle de l'apoptose pour empêcher certaines cellules de faible affinité d'atteindre la phase mémoire (Jay et al., 2013). Une autre étude réalisée *in vivo* chez la souris suggèrent que l'expression différentielle de CD47 pourrait jouer un rôle important dans la perte (non-apoptotique) des LT CD4 au cours de la contraction (Van et al., 2012). Dans cette étude, les cellules T CD4 nouvellement activées diminuent transitoirement l'expression de CD47 les rendant sensibles à la mort par les cellules phagocytaires sauf si l'expression de CD47 est rétablie par la signalisation induite par l'IL-2. Par la suite il en résulte que le compartiment de LT mémoires exprime fortement CD47. Ces résultats suggèrent donc que les mécanismes qui restaurent l'expression de CD47 facilitent également la survie des cellules mémoires (Van et al., 2012).

### 1.3.7/ La conservation de l'engagement dans le lignage spécifique de départ : du LT effecteur au LT mémoire

Malgré la grande diversité qui existe au sein des populations de LT CD4 mémoires, certaines cellules T mémoires conservent leur engagement dans le lignage de départ. En effet l'existence de cellules T CD4 mémoires engagés dans le lignage T<sub>H1</sub> a été montré dans des

souris transgénique BAC qui utilisent un rapporteur pour indiquer la transcription du gène codant pour l'IFN- $\gamma$ . Dans cette étude, Harrington et al ont démontré que ces cellules mémoires étaient dérivées des effecteurs T<sub>H1</sub> qui retrouvent rapidement une forte expression d'IFN- $\gamma$  après restimulation (Harrington et al., 2008). De nombreuses autres études ont montré que des populations de LT CD4 mémoires spécifiques au LCMV ou de *Listeria* avec des phénotypes distincts restent engagés, après une restimulation antigénique et secrètent de nouveau de l'IFN- $\gamma$  ainsi que d'autres molécules effectrices de type T<sub>H1</sub> (Hale et al., 2013b) (Marshall et al., 2011). D'autre part, une étude qui utilise des souris reportrices IL4-IRES-EGFP a démontré que les cellules T<sub>H2</sub> effectrice (EGFP<sup>+</sup>) générées suite à une infection par *N. Brasiliensis* peuvent fournir une protection immunitaire anti-parasite après un transfert adoptif dans des hôtes immunocompétents et peuvent survivre 30 jours avant restimulation par le parasite (Mohrs et al., 2001). En outre, une étude a montré, en utilisant des souris rapporteuses IFN- $\gamma$ , que les LT CD4 naïfs endogènes spécifiques pour LCMV et LM-OVA ont généré des cellules effectrices T<sub>H1</sub> qui ont ensuite persistées sous forme de cellules mémoires et conservées leur phénotype après restimulation (Marshall et al., 2011).

Ces études permettent de mettre en évidence que les LT CD4 mémoires T<sub>H1</sub> ou T<sub>H2</sub> ont la capacité de conserver les caractéristiques et le programme génétique associés à leur lignage favorisant ainsi en cas de restimulation la conservation des fonctions effectrices de départ en mettant en place des réponses effectrices spécifiques et efficaces pour éliminer le pathogène.

#### **1.4/ Les modèles de différenciation des LT mémoires**

Une des questions importantes porte sur le modèle de différenciation des LT mémoires. Est-ce que ces cellules T mémoires sont générées directement à partir de LT effecteurs ou bien y'a t-il une autre voie passant par des précurseurs intermédiaires ? Les différents travaux réalisés dans ce domaine indiquent que de multiples mécanismes de génération de LT CD4 mémoires peuvent intervenir de façon différentielle en fonction de la lignée effectrice impliquée et de l'environnement inflammatoire. La partie qui suit traite des modèles de différenciation linéaires et le modèle divergent.

### 1.4.1/ Le modèle de différenciation linéaire

Le modèle traditionnel de différenciation linéaire du développement des LT postule que, lors de la stimulation par l'Ag, les LT CD4 naïfs deviennent activés et prolifèrent en cellules effectrices, qui survivent alors à la phase de contraction et persistent sous forme de LT mémoire quiescents (Ahmed and Gray, 1996) (Kaech et al., 2002).

Ce modèle emprunte le modèle de différenciation des LT CD8, avec le passage de l'effecteur à la mémoire se produisant pendant et après la phase de contraction suivant l'élimination des agents pathogènes. Ce concept de modèle affirme également qu'il existe une fidélité du lignage cellulaire (comme nous l'avons évoqué précédemment) entre les effecteurs primaires et secondaires. Plusieurs groupes ont en effet démontré que les cellules mémoires de type  $T_{HI}$  émergent directement à partir du groupe initial de cellules effectrices  $T_{HI}$  générées au cours de la réponse primaire (Topham and Doherty, 1998) (Marshall et al., 2011) (Pepper and Jenkins, 2011) (Pepper et al., 2010) (Harrington et al., 2008).

### 1.4.2/ Le modèle progressif de différenciation

Le modèle progressif de différenciation suggère que, dans le cadre de la différenciation linéaire, les cellules T effectrices primaires deviennent progressivement de plus en plus différenciées et ceci dépend de la force et de la durée de la signalisation par le TCR ainsi que de la costimulation (Lanzavecchia and Sallusto, 2002) (Kaech et al., 2002). Une étude sur les LT CD4 a porté sur la variante du modèle de différenciation progressive, qui peut également tenir compte de la production différentielle des compartiments de LT mémoires centrales ( $T_{CM}$ ) et mémoires effectrices ( $T_{EM}$ ) que nous décrirons ultérieurement. Les résultats suggèrent que seules les cellules de différenciation intermédiaire sont capable de répondre aux signaux de survie et ainsi devenir mémoires contrairement aux cellules effectrices différenciées qui ne sont pas maintenues en mémoires (Lanzavecchia and Sallusto, 2002). Une autre variation sur ce modèle, proposé par Moulton et al, suggère que plus la durée d'exposition à l'Ag est courte et plus la génération de précurseurs moins différenciés (cellules  $T_{CM}$   $CD62L^{hi}$ ) est observée. Inversement, une durée croissante de l'exposition à l'Ag favorise la génération de cellules  $T_{EM}$   $CD62L^{lo}$ . Bien que ce modèle soit dénommé un modèle divergent, il suit de plus près les paradigmes de différenciation linéaire que la différenciation divergent discuté par la suite (Moulton et al., 2006).

### 1.4.3/ Le modèle de différenciation divergent

Selon le modèle de différenciation divergent, la prolifération des cellules donne naissance à des descendances hétérogènes qui ont la capacité de se différencier en cellules effecteurs ou mémoires. Dans ce modèle, la cellule nouvellement activée se divise et distribue de façon différentielle les facteurs aux cellules filles, seule l'une d'elles reçoit des facteurs qui permettent préférentiellement la survie et la génération de cellules mémoires. De cette manière, un sous-ensemble de cellules répondant à un Ag est créé au cours de la réaction initiale et a un avantage compétitif pour générer des cellules mémoires. Cet événement se produit sans tenir compte de la durée d'exposition à l'Ag et est indépendant de l'élimination de l'Ag. Un nombre croissant de preuves soutient ce modèle. La preuve la plus convaincante est dérivée d'étude portant sur la division cellulaire asymétrique dans lequel les facteurs associés à la mise en place de la mémoire et du lignage au sein des cellules mères sont inégalement distribués aux cellules filles. Chang et al. ont cherché à savoir si les LT CD4 nouvellement activés répartissent de manière égale leurs récepteurs aux cellules filles, après la première division (Chang, 2012). En utilisant des LT CD4 avec des TCR transgéniques spécifiques de *Leishmania*, ils ont démontré que la distribution des récepteurs d'activation est asymétrique *in vivo* et que l'écart dans la distribution des récepteurs était évident au cours des premières divisions de la phase d'expansion. Ces connaissances ont révélé un mécanisme potentiel par lequel plusieurs phénotypes pourraient résulter de l'activation d'une cellule T CD4 unique spécifique d'un Ag. De ce fait, il a aussi été suggéré que la division cellulaire asymétrique pourrait contribuer à la diversité des LT CD4 effecteurs et mémoires (Choi et al., 2011) ;

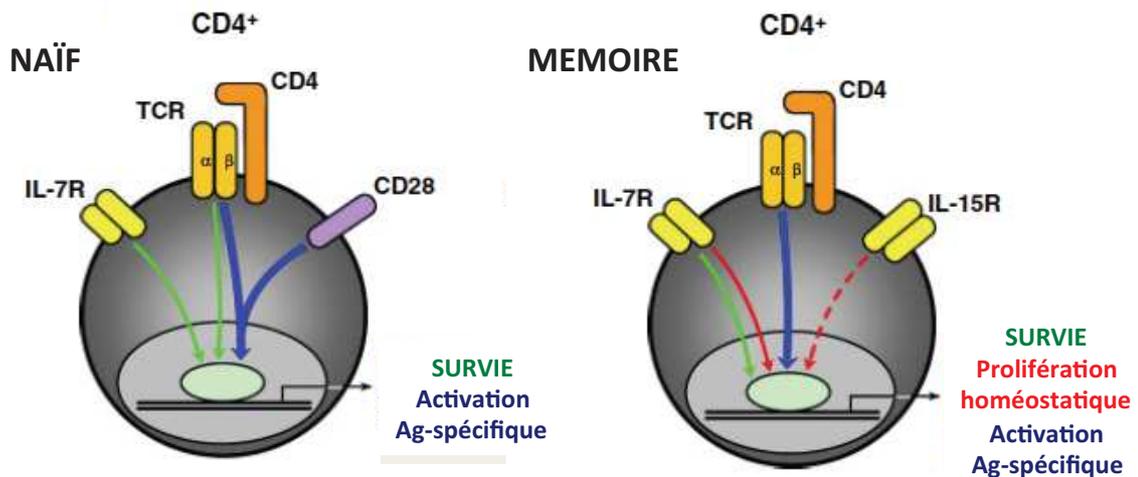
## 2/ Paramètres de maintien et d'homéostasie de la mémoire des LT

Les LT mémoires sont des acteurs de l'immunité adaptative remarquablement puissants qui représentent aussi le fondement essentiel de l'immunité induite par le vaccin. Les cellules T mémoires forment un groupe hétérogène de cellules à longue durée de vie qui sont caractérisées par des niveaux d'expression élevés de récepteurs aux cytokines homéostatiques telles que l'IL-7 importante dans le maintien des LT mémoires.

Le récepteur à l'IL-7 (IL-7r ou CD127) est un hétérodimère composé d'une chaîne IL-7ra et d'une chaîne commune  $\gamma$ . La signalisation via l'IL-7r est essentielle pour la survie prolongée des cellules T naïves et mémoires. L'IL-7r est normalement exprimé à des niveaux

élevés à la surface des cellules T au repos, et l'IL-7ra est rapidement régulé à la baisse par activation des LT et ré-exprimé par une petite fraction des cellules T effectrices destinées à survivre en tant que cellules mémoires (Kaech et al., 2003). Pour les LT CD4, la signalisation passant par l'IL-7ra semble être essentielle pour le développement des LT CD4 mémoires. En effet, une étude montre que les LT CD4 mémoires ne se développent pas dans des hôtes déficients pour l'IL-7r ou bien lorsque les LT CD4 expriment une forme mutante de l'IL7r (Kondrack et al., 2003) (Osborne et al., 2007).

Alors que la plupart des chercheurs conviennent que la signalisation d'une combinaison de l'IL-7 et IL-15, mais pas du CMH-I, régule l'homéostasie des LT CD8 mémoires, les facteurs contrôlant l'homéostasie du compartiment de LT CD4 mémoires sont plus controversés (Surh and Sprent, 2008). En effet, le rôle de l'Ag durant la phase mémoire est un sujet très controversé à l'heure actuelle. Initialement une des caractéristiques de la mémoire immunitaire est de survivre en l'absence d'Ag. Beaucoup de données récentes semblent apporter une réponse originale à l'une des controverses les plus vives qui soit dans ce domaine, à savoir, la nécessité ou non, de stimulations régulières de la cellule mémoire par l'Ag pour qu'elle conserve ses capacités. Nous aborderons à la fin du chapitre le rôle de l'Ag dans le maintien des cellules mémoires générées lors de la réponse Ac T-dépendante.



Adapté de Onur Boyman et al., Eur. J. Immunol. 2009.

### Figure 14 : LT naïfs vs mémoires : Les voies impliquées dans la survie de ces cellules.

Pour les LT CD4 et CD8, l'activation Ag spécifique (en bleu) de ces cellules nécessite une forte stimulation via le TCR et les molécules de co-stimulation telles que CD28. Inversement, la survie (en vert) des cellules T naïves repose sur la stimulation faible du TCR et de l'IL-7r. Une stimulation antigénique secondaire spécifique (en bleu) des LT CD4 et CD8 mémoires dépend d'une stimulation forte via le TCR sans engagement de CD28. La survie (en vert) des LT CD4 et CD8 nécessite des signaux via l'IL-7 tandis que l'IL-15 pourrait contribuer également à la survie des LT CD8 mémoires. Inversement, la prolifération homéostatique (en rouge) des cellules T mémoires CD8 dépend principalement de l'IL-15, alors que les LT CD4 mémoires déclenchent la prolifération homéostatique en réponse à deux signaux de l'IL-7 et IL-15.

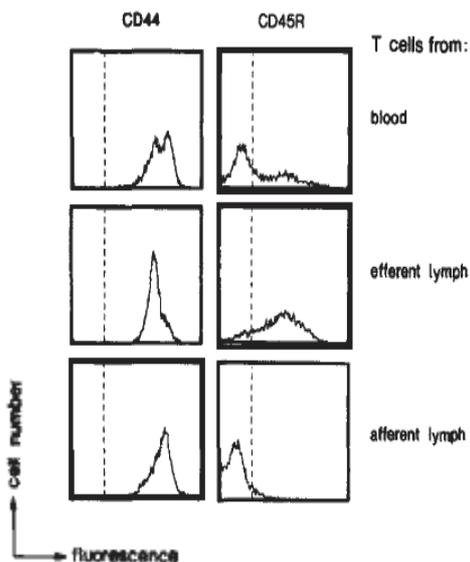
### 3/ Diversité des populations de LT Mémoires : $T_{CM}$ , $T_{EM}$ et $T_{RM}$

Toutes les études présentées préalablement montrent que la génération des LT mémoires dépend de plusieurs paramètres durant la phase initiale de différenciation. A présent, nous allons concentrer notre analyse sur les LT CD4 mémoires. Avant de décrire l'hétérogénéité existante au sein du compartiment de LT CD4 mémoires, nous allons passer en revue les premières expériences impliquées dans la découverte des LT mémoires.

#### 3.1/ La découverte des $T_{EM}$ et $T_{CM}$ chez l'Homme.

En 1990, Charles R. MACKAY et al, montrent que les cellules T mémoires et naïves se distinguent par leur phénotype ainsi que leur compartimentalisation (Mackay et al., 1990).

Ils analysent l'état des cellules T (naïfs ou mémoires) de la lymphe afférente ou efférente du NL poplitéen d'une jeune brebis (Figure 15). Ils montrent que la lymphe efférente (d'où 90% entre au sein des NL via les HEV) est riche en LT naïfs de phénotype  $CD44^{lo}CD45R^{+}$  alors que la lymphe afférente (cellules T du sang qui rejoignent les tissus) sont tous de phénotype mémoire  $CD44^{hi} CD45R^{-}$ . Au vu de cette différence de compartimentalisation, les auteurs concluent que les cellules mémoires sont destinées à circuler du sang vers les tissus périphériques drainant les NL via la lymphe afférente, alors que les cellules T naïves circulent du sang vers le NL via les HEV. Les mécanismes responsables de cette différence de compartimentalisation entre les cellules T naïves et mémoires étaient à cette période non élucidés. Cependant, les auteurs proposent l'implication probable d'une différence d'expression de récepteurs d'adhésion et de migration tissulaire. (Figure 15).



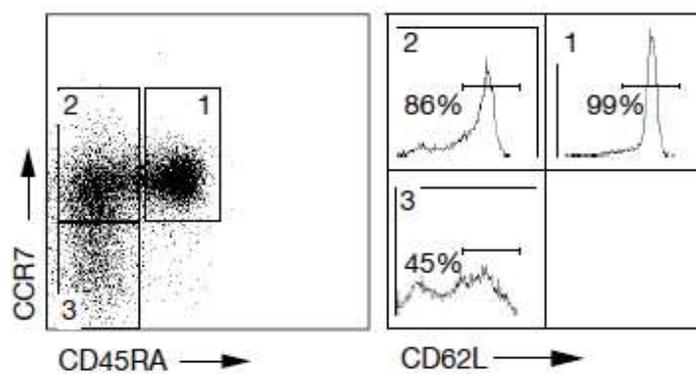
**Figure 15 : Compartimentalisation des LT mémoires vs naïves.** Expression de CD44 et CD45R au sein des cellules T de différents compartiments : le sang, la lymphe efferente et la lymphe afferente.

Charles R. MACKAY et al, *J. Exp. Med* 1990

Une décennie plus tard, des études ont pu identifier les ligands de CCR7, 6CK/SLC (CCL21) et MIP-3b (CCL19). Dans un modèle de souris déficiente pour CCR7, une étude montre le rôle majeur de ce récepteur au chimiokine CCR7 dans l'entrée et le positionnement des cellules T au niveau des NL (Campbell and Butcher, 2000) (Forster et al., 1999).

Il a fallu attendre une dizaine d'année pour qu'enfin, l'implication de molécules d'adhésion et de migration, soit clairement mise en évidence dans la compartimentalisation

des LT naïfs et mémoires. En 1999, Sallusto et al ont été les premiers à distinguer dans le sang périphérique chez l'Homme, différentes populations de cellules T mémoires en se basant sur l'expression de CCR7 et CD62L (Sallusto et al., 1999b) (Figure 16). CCR7 et CD62L sont des molécules essentielles pour la migration des lymphocytes vers les NL. Les chercheurs ont pu mettre en évidence une population de LT mémoires qui co-expriment CCR7 et CD62L et qui peuvent donc entrer dans les NL et d'une population qui n'exprime pas CCR7 et qui présente une expression hétérogène de CD62L. CCR7 semble ainsi être un bon marqueur pour distinguer deux sous-classes de LT mémoires.



**Figure 16 : : CCR7 et CD62L : apparition de deux populations de LT CD4<sup>+</sup> mémoire circulant.** Cette figure illustre un dot plot des LT CD4<sup>+</sup> du sang périphérique marqués avec un anti-CD45RA et un anti-CCR7 permettant d'identifier trois populations distinctes CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (1) CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (2) CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>. La deuxième figure représente les histogrammes relevant le niveau d'expression de CD62L au sein des trois populations.

Frederica S. et al, letters to nature, 1999

Les trois populations de LT CD4 ont ensuite été purifiées et testées pour leur capacité à produire des cytokines et à augmenter l'expression de CD40L suite à une stimulation polyclonale. Ils montrent ainsi que les LT mémoires CCR7<sup>+</sup> tout comme les LT naïfs produisent uniquement de l'IL-2 alors que les LT mémoires CCR7<sup>-</sup> produisent des niveaux élevés d'IL-4, IL-5 et IFN- $\gamma$ . De plus, suite à l'activation, le niveau d'expression de CD40L est le même pour les deux populations de LT mémoires et plus important que celui des LT naïfs. Par ailleurs, dans cette même étude les auteurs mettent en évidence des seuils d'activation différents. En effet, les cellules T mémoires comparées aux T naïves présentent une forte sensibilité à la stimulation par un Ac anti-CD3 en présence ou en l'absence de co-stimulation. Enfin, les auteurs ont aussi testé la capacité à induire la production d'IL-12 par

les DCs. Les LT mémoires CCR7<sup>+</sup> ou LT naïfs ont été co-cultivés avec des DC chargées avec différentes doses du super-Ag (sAg) bactérien TSST. Les résultats montrent que les LT mémoires CCR7<sup>+</sup> stimulent efficacement la production d'IL-12 par les DC à de forte et de faible dose de sAg contrairement aux LT naïfs (Sallusto et al., 1999b).

Grâce à cette étude, Sallusto *et al* ont été les premiers à montrer, chez l'Homme, que la mémoire immunologique est composée de différentes sous-populations de LT. En effet, une population de LT mémoire CCR7<sup>+</sup> se localise préférentiellement au niveau de NL et n'a pas de fonction inflammatoire ou cytotoxique : cette population a été appelée CENTRAL MEMOIRE (T<sub>CM</sub>). D'autre part, les LT mémoires CCR7<sup>-</sup> se localisent préférentiellement dans les tissus et sont doués de fonctions effectrices variables : cette population a été appelée EFFECTEURS MEMOIRE (T<sub>EM</sub>). En conclusion, les T<sub>EM</sub> représentent un compartiment de cellules ayant rencontré l'Ag (expérimentées) qui peuvent entrer dans les tissus périphériques pour médier des réactions inflammatoires afin de contenir rapidement l'infection. De l'autre côté, les T<sub>CM</sub> représentent une population expérimentée qui migre à travers les OLII. Suite à une restimulation antigénique, ces T<sub>CM</sub> peuvent efficacement stimuler des DC, des LB et générer une nouvelle vague de LT effecteurs.

D'autre part, la proportion de T<sub>EM</sub> et T<sub>CM</sub> dans le sang humain varie au sein des compartiments de LT CD4 et CD8. En effet, l'étude de James J Campbell et al, a montré que les T<sub>CM</sub> sont enrichis en LT CD4 alors que les T<sub>EM</sub> le sont en LT CD8. La distribution des T<sub>CM</sub> et T<sub>EM</sub> est aussi dépendante du tissu. En effet, les auteurs ont montré que les amygdales et les NL sont enrichis en T<sub>CM</sub> alors que des organes tels que le poumon, le foie et l'intestin contiennent une plus forte proportion de T<sub>EM</sub> (Campbell et al., 2001b).

### 3.2/ La découverte des T<sub>EM</sub> et T<sub>CM</sub> chez la souris

L'existence des sous-populations de T<sub>EM</sub> et T<sub>CM</sub> au sein des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes a été également mis en évidence chez la souris. En effet en 2001, David Masopust et al, ont montré dans un modèle d'infection virale et bactérienne, la persistance de LT mémoires CD8<sup>+</sup> au niveau de tissus périphériques et de la rate. Les auteurs ont montré que suite à une infection, les LT CD8 spécifiques à l'Ag migrent au niveau des tissus non-lymphoïdes et y résident pour devenir des cellules mémoires à longue durée de vie. De plus, ils montrent qu'elles présentent *ex-vivo* une capacité lytique nettement plus importante que des LT CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> de la rate (Masopust et al., 2001). Par ailleurs, l'équipe de M. Jenkins en 2001 a aussi montré l'existence de différentes populations de LT CD4 mémoires qui ont des

capacités fonctionnelles distinctes. Dans un modèle de transfert adoptif de cellules transgéniques, les auteurs montrent que 60 jours après immunisation, des LT CD4 mémoires sont retrouvés au niveau de la rate, des NL et des poumons. Après stimulation antigénique *in vivo* les auteurs mettent en évidence une prédominance des populations IFN- $\gamma^+$  nettement plus importante au niveau des tissus périphériques telles que les poumons ou encore le foie comparé à la rate (Reinhardt et al., 2001).

### 3.3/ Les LT mémoires résidents $T_{RM}$

Plus récemment, des études ont établi chez la souris l'existence d'une nouvelle population de LT mémoires dites résidentes dans les tissus ( $T_{RM}$ ). Ces cellules ne circulent pas et résident dans des sites au sein de tissus périphériques et, dans certains cas, suscitent une réponse protectrice rapide *in situ*. Les LT CD4  $T_{RM}$  peuvent être générés dans les poumons suite à un transfert adoptif de LT CD4 effecteurs activés ou suite à une infection par un virus respiratoire (Campbell et al., 2001b). Les  $T_{RM}$  se distinguent, des LT mémoires retrouvés au niveau de la rate et dans la circulation, par l'expression du marqueur d'activation précoce CD69, leur maintien tissu-spécifiques dans des niches au niveau des poumons (Turner et al., 2014) et leur capacité à médier une protection contre l'infection par le virus de la grippe par rapport aux T CD4 mémoires circulants (Teijaro et al., 2009). De façon intéressante, une population analogue de LT CD4 non circulant  $T_{RM}$  réside dans la MO suite à une infection virale systémique. Ces populations présentent des capacités d'aide après re-stimulation antigénique nettement supérieur à leur homologue circulant de la rate (Herndler-Brandstetter et al., 2011).

Des études réalisées chez l'Homme suggèrent que les  $T_{RM}$  CD69<sup>+</sup> représentent la population majeure au sein des muqueuses humaines et des tissus périphériques de façon similaire à leurs homologues chez la souris. Cependant, contrairement aux LT mémoires chez la souris, une grande proportion de cellules  $T_{EM}$  chez l'Homme est retrouvée au niveau des NL et la rate et exprime aussi CD69 (Sathaliyawala et al., 2013). Ces résultats suggèrent que ces populations appelées  $T_{RM}$  pourraient également être présentes au sein des tissus lymphoïdes. Cependant les voies et les mécanismes responsables de la génération des  $T_{RM}$  restent à nos jours inconnus.

Les sous-populations de LT mémoires		
sous-population	Phénotype	Localisation
$T_{CM}$	$CD44^{hi}, CD62L^+, CCR7^+$ $IL7r^+, CD69^-, CD103^-$	NL rate (pulpe blanche > pulpe rouge) sang et moelle osseuse
$T_{EM}$	$CD44^{hi}, CD62L^-, CCR7^-$ $IL7r^+, CD69^-, CD103^-$	rate (pulpe rouge > pulpe blanche) un peu dans les NL, sang, poumons, tractus intestinale, rein, tissus adipeux, cœur.
$T_{RM}$	$CD44^{hi}, CD62L^-, CCR7^-$ $CD69^+, CD103^+$	CD8 : épithélium de la peau, intestin et vagin, Glandes salivaires CD4 : parenchyme pulmonaire

**Figure 17 : Sous-populations de LT mémoires, Phénotypes et Localisations**

#### 4/Les $T_{FH}$ mémoires : découverte, phénotype et fonction

Les études chez l'Homme et la souris montrent que les LT mémoires en plus de se distinguer par leur hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle, présentent des localisations bien spécifiques nécessaires à l'exercice de leur fonction lors d'une restimulation antigénique. A présent nous allons nous focaliser plus particulièrement sur une sous-population de LT CD4 mémoires nommées les LT CD4 mémoires folliculaires qui sont impliqués dans les réponses Ac-T dépendant et sont au cœur de mon sujet de Thèse.

##### 4.1/ Découverte, phénotype et fonction des $T_{FH}$ mémoires

Durant l'année 2000, Dagmar Breitfeld et ses collègues ont montré l'existence au niveau des amygdales chez l'Homme, d'une population de LT effecteurs  $CD4^+CD45RO^+$   $CXCR5^+$  au niveau des follicules B. Au vu de la forte expression de CD95 à la surface de ces cellules, qui pourraient les rendre sensibles à l'apoptose, et prenant en compte que les CG

disparaissent généralement au bout de quelques semaines, ils en ont déduit que ces cellules mourraient et ne survivaient pas à long terme (Breitfeld et al., 2000). Ce n'est que récemment, que de nombreux travaux ont apporté des connaissances supplémentaires sur l'existence, le phénotype et la fonction des  $T_{FH}$  mémoires.

D'abord nous verrons les évidences montrant l'existence des  $T_{FH}$  mémoires. De plus, compte tenu de la flexibilité et plasticité qui existe au sein de la population de  $T_{FH}$  effecteurs, la question de l'engagement des  $T_{FH}$  mémoires dans leur lignage de départ et la conservation de leur fonction après restimulation fait partie des questions essentielles encore en suspens.

### ° Est-ce que les $T_{FH}$ effecteurs peuvent survivre et devenir des cellules mémoires ?

Fazilleau et al ont été les premiers à mettre en évidence expérimentalement dans un modèle murin l'existence de  $T_{FH}$  mémoires. En effet dans leurs travaux, ces auteurs montrent la persistance jusqu'à 200 jours après vaccination avec du PCC en adjuvant, d'une population  $CXCR5^+ ICOS^+$  au niveau des NL drainants (NLd). Comparés aux  $T_{FH}$  effecteurs à J7 post-immunisation, les cellules T spécifiques du PCC présentent une expression diminuée des molécules de costimulation ICOS et OX40. Les auteurs reportent qu'il s'agit d'une population de  $T_{FH}$  mémoires et démontrent une capacité de ces cellules à répondre plus rapidement et efficacement lors d'une restimulation antigénique 6 à 8 semaines après le priming (Fazilleau et al., 2007).

Quelques années plus tard, une étude menée par MacLeod et al fournit une preuve supplémentaire pour confirmer l'existence de cellules T CD4 mémoires avec une fonction effectrices de type  $T_{FH}$  accélérée après restimulation antigénique. Leur étude a démontré que les cellules T CD4 mémoires spécifique à l'Ag (par rapport à leurs homologues naïfs Ag spécifiques) induisent après restimulation une réponse B accélérée avec une commutation de classe des Ac. Les auteurs montrent que cette fonction accélérée de la réponse B est l'œuvre de LT CD4 mémoires  $CXCR5^+$ . De plus, les auteurs ont montré que lorsque ces populations de LT CD4 mémoires  $CXCR5^+$  sont transférées dans des hôtes suivie d'une immunisation, cela résulte d'une hausse des titres d'Ac IgG1<sup>+</sup> ovalbumine (OVA) spécifiques (MacLeod et al., 2011).

° **Est- ce que les cellules T mémoires dérivées des T<sub>FH</sub> effecteurs conservent leur engagement / leur programmation afin de se différencier en T<sub>FH</sub> ?**

Dans l'étude de MacLeod et al, les auteurs n'adressent pas la question de la provenance de ces T<sub>FH</sub> mémoires puisqu'ils transfèrent dans l'hôte directement des T<sub>FH</sub> mémoires. Pour savoir si les T<sub>FH</sub> effecteurs peuvent survivre et se différencier en T<sub>FH</sub> mémoires, Weber et al. immunisent des souris avec l'OVA dans de l'adjuvant complet de Freund (CFA), puis les LT CD4 CXCR5<sup>-</sup> ou CXCR5<sup>+</sup> effecteurs spécifiques à l'OVA sont purifiés et injectés à des hôtes naïfs. Quatorze jours après transfert adoptif des T<sub>FH</sub> effecteurs CXCR5<sup>+</sup>, ces cellules effectrices avaient réduit l'expression de CXCR5. Plusieurs semaines après le transfert et 2,5 jours après restimulation, la majorité des T<sub>FH</sub> transférés se différencient rapidement en T<sub>FH</sub> effecteurs exprimant des niveaux plus élevés de PD-1, Bcl-6, CXCR5, et d'IL-21 comparés à des T<sub>FH</sub> effecteurs primaires (générés lors de la réponse primaire) et à des non-T<sub>FH</sub> (Weber et al., 2012b). Cette étude suggère donc fortement que les T<sub>FH</sub> effecteurs peuvent se différencier en T<sub>FH</sub> mémoires en l'absence d'Ag et en cas de restimulation antigénique conservent la capacité de générer des T<sub>FH</sub> effecteurs avec une efficacité supérieure. D'autres études ont confirmé ces résultats dans un modèle d'infection par le LCMV (Choi et al., 2013b). De plus, une étude utilisant une souris rapporteuse Bcl6-RFP montre que les T<sub>FH</sub> effecteurs CXCR5<sup>+</sup>RFP<sup>+</sup> OTII induite par immunisation avec l'OVA en CFA, peuvent persister 20j après leur transfert adoptif et se différencient préférentiellement en T<sub>FH</sub> effecteurs dans les NL drainants le site d'immunisation. Les auteurs montrent aussi que seul les cellules T RFP<sup>+</sup> ont la capacité d'aider aux LB (Liu et al., 2012a). Enfin une autre étude utilisant un modèle d'infection aiguë avec le LCMV suivi d'un transfert de LT CD4 transgéniques SMARTA, montre qu'après clairance du pathogène, des T<sub>FH</sub> mémoires SMARTA spécifique à l'Ag persistent 60 à 150 jours après infection. Ces T<sub>FH</sub> mémoires CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>-</sup>ICOS<sup>-</sup>Ly6C<sup>lo</sup> partagent de nombreuses similitudes au niveau de l'expression génique avec les T<sub>FH</sub> effecteurs CXCR5<sup>+</sup>Ly6C<sup>lo</sup>, suggérant une relation étroite entre le lignage de ces deux types cellulaires. Enfin, le transfert adoptif des populations mémoires SMARTA CXCR5<sup>+</sup> suivi d'une infection avec le LCMV induit des T<sub>FH</sub> effecteurs secondaires avec une capacité à répondre rapidement et à promouvoir la génération de LB du CG (Hale et al., 2013b).

Cependant bien que ces nombreuses études font état de l'existence de T<sub>FH</sub> mémoires capables en cas de restimulation de se différencier rapidement et préférentiellement en T<sub>FH</sub>

effecteurs secondaires, certaines études semblent montrer des résultats opposés. En effet, une étude montre que les LT CD4 CXCR5<sup>+</sup> mémoires spécifiques au *L. monocytogenes* (ciblé par un tétramère pMHII) sont pluripotents après restimulation et peuvent générer des cellules T<sub>FH</sub> et T<sub>HI</sub> (Pepper et al., 2011). De plus, une autre étude dans laquelle les auteurs infectent avec le virus influenza des souris reproductrices IL-21-GFP montre que le transfert adoptif de LT effecteurs CD4 CXCR5<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> présentent une plasticité telle que ces cellules T mémoires sont capables de générer après restimulation différentes populations de LT effecteurs secondaires de type T<sub>FH</sub> et non T<sub>FH</sub> (Luthje et al., 2012).

Ces divergences dans les résultats de ces études peuvent s'expliquer par les modèles expérimentaux (infection ou vaccination) utilisés. Alors que certaines études utilisent un modèle transgénique où tous les LT CD4 portent le même TCR spécifique d'un peptide donné, d'autres privilégient un système polyclonal conservant ainsi toute la diversité du répertoire des LT CD4. Sachant que l'intensité du signal TCR est un paramètre qui influence la différenciation des T<sub>FH</sub> ainsi que celle des LT CD4 mémoires, il est préférable de favoriser l'utilisation de modèles polyclonaux pour suivre et étudier les T<sub>FH</sub> mémoires spécifiques d'un Ag donné.

En conclusion, ces études démontrent clairement que tous les T<sub>FH</sub> effecteurs ne sont pas voués à mourir, une partie se différencie en T<sub>FH</sub> mémoires qui sont majoritairement engagés dans un lignage T<sub>FH</sub> tout en présentant des caractéristiques similaires aux T<sub>FH</sub> effecteurs.

#### 4.2/ Hétérogénéité au sein des T<sub>FH</sub> mémoires

Tout comme pour la classification en deux grands groupes T<sub>EM</sub> et T<sub>CM</sub> vu précédemment, les cellules T<sub>FH</sub> mémoires peuvent être subdivisées en deux grandes sous-populations en se basant sur leur localisation caractéristique : les T<sub>FH</sub> mémoires que nous nommerons «locales» qui se localisent au niveau des OL drainant (le site inflammatoire) et les T<sub>FH</sub> mémoires circulantes que l'on retrouve en dehors des OL drainants, notamment dans la circulation sanguine.

#### 4.2.1/ Les T<sub>FH</sub> mémoires locales au niveau des OL

La première observation qui a permis de mettre en évidence l'existence des T<sub>FH</sub> mémoires au niveau des tissus lymphoïdes provient de travaux utilisant des souris reportrices permettant de suivre l'expression du FT clé pour la différenciation et les fonctions des T<sub>FH</sub> : Bcl-6 (Johnston et al., 2009b) (Nurieva et al., 2009) (Yu et al., 2009). Plusieurs semaines après immunisations avec l'Ag immunodominant de la protéine OVA, l'expression de Bcl-6 au sein des T<sub>FH</sub> CXCR5<sup>hi</sup> PD1<sup>hi</sup> qui ont un TCR transgénique, diminue graduellement. La génération et la maintenance des cellules T<sub>FH</sub> sont dépendantes de stimulation antigénique soutenue, il est assez attendu de voir une diminution de l'expression de Bcl-6 parallèlement à une disparition de l'Ag dans le temps (Deenick et al., 2010) (Baumjohann et al., 2013).

L'étude de Kitano M et al, a montré que les T<sub>FH</sub> Bcl6<sup>lo</sup> sont des cellules quiescentes et présentent un phénotype proche des T<sub>CM</sub> notamment par l'expression de CCR7 et de l'IL7r. Ces travaux suggèrent que ces cellules T<sub>FH</sub> mémoires Bcl6<sup>lo</sup> pourraient être les précurseurs des T<sub>FH</sub> mémoires dérivées elles-même des T<sub>FH</sub> effecteurs (Kitano et al., 2011). Par ailleurs, une autre étude réalisée par Fazilleau et al, utilise cette fois un modèle polyclonal pour suivre des populations spécifiques du PCC (Fazilleau et al., 2007). Cette étude montre l'existence de T<sub>FH</sub> mémoires qui persistent chez la souris plus de 200 jours après immunisation. De plus, cette étude met en évidence la persistance d'Ag sous forme de complexes p:CMHII au niveau des NL drainant le site d'immunisation. Il est suggéré que ces « dépôts antigéniques » seraient requis pour une rétention des T<sub>FH</sub> mémoires localement au niveau des NL drainants. Lorsqu'on regarde de plus près le phénotype de ces T<sub>FH</sub> mémoires de cette étude, on s'aperçoit qu'il diffère de celui observé dans le système transgénique des études précédemment citées. En effet, ces populations expriment plutôt un phénotype de type T<sub>EM</sub> avec une absence d'expression de CD62L alors même que leurs homologues CXCR5<sup>-</sup> présentent une expression hétérogène de CD62L caractéristiques des T<sub>CM</sub> (Fazilleau et al., 2007). Ceci souligne encore une fois l'importance du modèle expérimental utilisé pour caractériser les T<sub>FH</sub> mémoires. Enfin, cette notion de rétention des T<sub>FH</sub> mémoires au sein des OL est d'autant plus renforcé que récemment une étude a démontré la rétention, durant plusieurs semaines, de LT CD4 mémoires CD62L<sup>lo</sup>CD69<sup>+</sup> (parmi lesquels sont retrouvés les T<sub>FH</sub>) au niveau des NL et des Plaques de Peyer après immunisation protéique (Ugur et al., 2014).

#### 4.2.2 / Les T<sub>FH</sub> mémoires circulantes

La présence de cellules T CD4<sup>+</sup> exprimant le récepteur de chimiokine CXCR5 dans le sang périphérique chez l'Homme a été signalée pour la première fois en 1994 (Forster et al., 1994). Ces cellules ont été qualifiées de cellules T récemment activées, mais l'accumulation de preuves scientifiques indique maintenant que cet sous-ensemble de LT CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> dans le sang contient en fait des cellules T mémoires qui partagent des propriétés fonctionnelles avec les T<sub>FH</sub> effecteurs (Rivino et al., 2004) (Morita et al., 2011) (Locci et al., 2013a). La relation entre les LT CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> et les cellules T<sub>FH</sub> effectrices a été mise en évidence dans les études réalisées sur des échantillons provenant de patients atteints d'immunodéficience primaire ou des études sur des souris génétiquement mutantes. Ainsi, ces études ont montré que le développement des LT CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> est dépendant du FT Bcl-6, inductible par la molécule de costimulation ICOS mais indépendant des molécules SAP. Ceci suggère que ces cellules mémoires sont principalement générées à partir de cellules engagées dans le lignage T<sub>FH</sub> mais ne provenant pas des T<sub>FH</sub> du CG (Bossaller et al., 2006) (He et al., 2013) (Tsai and Yu, 2014).

Les caractéristiques phénotypiques des T<sub>FH</sub> mémoires circulantes varient en fonction des études. Ainsi, bien que certaines études ont défini les T<sub>FH</sub> mémoires circulantes comme des cellules qui expriment CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>, d'autres études ont ciblé un sous-ensemble de cellules T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>, comme des CXCR5<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup>, CXCR5<sup>+</sup> ICOS<sup>hi</sup>, CXCR5<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup>, CXCR5<sup>+</sup> PD1<sup>hi</sup>, CXCR5<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup>, CXCR5<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> et CXCR5<sup>+</sup> IL-21<sup>+</sup> (Chevalier et al., 2011a) (Rasheed et al., 2006) (Bossaller et al., 2006) (Ma and Deenick, 2014) alors même que certains travaux n'utilisent même plus CXCR5 pour définir les T<sub>FH</sub> circulantes mais plutôt des marqueurs de substitution des T<sub>FH</sub> résidentes dans les tissus, comme l'expression d'ICOS ou IL-21.

A l'heure actuelle, il n'existe pas d'étude qui isole et compare les caractéristiques des T<sub>FH</sub> mémoires en utilisant tout les critères qui définissent le lignage T<sub>FH</sub>. Quoiqu'il en soit, il est probable que le sang périphérique est composé de populations hétérogènes de cellules T<sub>FH</sub>. Une étude récente le montre bien, en se basant sur les récepteurs aux chimiokines CCR6 et CXCR3 pour définir différentes populations de T<sub>FH</sub> circulantes chez l'Homme: les T<sub>FH</sub>1 (CXCR3<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup>), T<sub>FH</sub>2 (CXCR3<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup>) et T<sub>FH</sub>17 (CXCR3<sup>-</sup> CCR6<sup>+</sup>) au sein de la population de T<sub>FH</sub> circulantes CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>. En plus de produire de l'IL-21, les T<sub>FH</sub>1, T<sub>FH</sub>2 et les cellules T<sub>FH</sub>17 expriment également le FT et les cytokines caractéristiques : T-bet et IFN-

$\gamma$  ( $T_{FH1}$ ), GATA3, IL-4, IL-5 et IL-13 ( $T_{FH2}$ ) et RORC, IL-17A et IL-22 ( $T_{FH17}$ ). L'étude a aussi pu montrer *in vitro* que ces populations n'avaient pas les mêmes capacités à induire la différenciation des LB. En effet, ils montrent que les cellules  $T_{FH2}$  et  $T_{FH17}$  sont capables *in vitro* de sécréter plus d'IL-21, et de façon ICOS-dépendant elles favorisent la différenciation des LB en plasmocytes (Morita et al., 2011).

En outre, de nombreuses études ont récemment montré l'implication des  $T_{FH}$  mémoires circulantes dans divers contextes physiopathologiques. Une étude démontre, dans un contexte de vaccination contre Influenza, que la génération des  $T_{FH}$  mémoires, circulantes dans le sang et de phénotype  $CXCR5^+ICOS^+CXCR3^+$ , corrèle avec une réponse Ac protectrice (Bentebibel et al., 2013). De plus, dans un contexte d'infection par le VIH, une étude a pu montrer, dans le sang humain, que les  $T_{FH}$  mémoires  $PD-1^{lo}CXCR3^-$  ont de fortes capacités d'aide envers les LB et corrèlent avec la génération d'Ac neutralisants dirigés contre le VIH (Locci et al., 2013a). Enfin, les  $T_{FH}$  mémoires circulantes ont aussi été impliqués récemment dans de nombreuses maladies autoimmunes telles que par exemple le psoriasis, la dermatomyosite juvénile, le lupus ou encore le diabète de type I. En effet, une dérégulation de la distribution des sous-ensembles de  $T_{FH}$  circulantes ( $T_{FH1} > T_{FH2}$ ,  $T_{FH17}$  ou  $T_{FH2} > T_{FH1}$ ) (Morita et al., 2011) (Le Coz et al., 2013) ou encore une augmentation de la fréquence des  $T_{FH}$  circulantes (Niu et al., 2015) (Ferreira et al., 2015) corrèle avec un mauvais pronostic de la maladie ainsi qu'une dérégulation des réponses B et la présence dans le sang des patients d'auto-Ac.

#### 4.2.3/ Les $T_{FH}$ mémoires de la MO

En utilisant un modèle de transfert adoptif de cellules transgéniques exprimant un TCR spécifique du virus LCMV, l'existence de «  $T_{FH}$  mémoires » résidentes dans des niches au sein de la MO a été démontrée. Ces populations spécifiques à l'Ag ont une meilleure capacité fonctionnelle, comparé à leurs homologues au niveau de la rate, à induire la différenciation et la commutation isotypique de LB. Cependant, peu d'éléments concernant cette population sont connus hormis que ces cellules expriment Ly6C et CD69 et qu'elles se situent à proximité de cellules stromales productrices d'IL-7 nécessaire à leur survie (Tokoyoda et al., 2009) (Shinoda et al., 2012). Des LT  $CD4^+$  mémoires ont également été récemment identifiés dans la MO chez l'Homme, mais leur rôle dans l'aide aux LB n'a pas été étudié (Herndler-Brandstetter et al., 2011).

### 4.3/ Développement et précurseurs des T<sub>FH</sub> mémoires

Bien que la définition des cellules T<sub>FH</sub> est en grande partie tributaire de la localisation anatomique de ces cellules retrouvés essentiellement dans les OLII, des études plus récentes ont révélé l'existence de cellules T<sub>FH</sub> dans la circulation sanguine ainsi que dans la MO chez l'Homme et la souris. Au vu de l'hétérogénéité qui existe au sein de la population de T<sub>FH</sub> mémoires, une des questions qui émerge concerne les précurseurs de ces cellules. En effet, est-ce que ces différentes populations ont un précurseur commun capable de donner naissance aux T<sub>FH</sub> mémoires résidentes localement dans les NL drainants et leurs homologues circulantes. Une autre possibilité serait l'existence de précurseurs différents qui pourraient émerger avec une cinétique différente lors de la réponse immune primaire.

Une étude s'est intéressée à la formation des T<sub>FH</sub> mémoires circulantes en l'absence de la protéine SAP, vu précédemment impliquée dans les interactions T-B, cette protéine est essentielle pour la différenciation terminale des T<sub>FH</sub> effectrices (Cannons et al., 2011). Cependant, SAP n'est pas nécessaire dans les phases précoces de l'engagement des T<sub>FH</sub> (Deenick et al., 2010) (Qi et al., 2008). Une étude a utilisé des souris SAP déficiente, dans lesquelles la génération de T<sub>FH</sub> du CG est compromise, pour examiner si les cellules T<sub>FH</sub> mémoires sont générées avant ou après la différenciation terminale des T<sub>FH</sub> effectrices. Les auteurs montrent que les LT CD4 SAP déficients, tout comme les LT CD4 sauvages, présentent une capacité comparable à se différencier en T<sub>FH</sub> mémoires circulantes fournissant ainsi la preuve que les T<sub>FH</sub> mémoires circulantes sont principalement générées avant de devenir des T<sub>FH</sub> effectrices pleinement matures. Enfin, en analysant des cellules T CD4 transgéniques dans le sang, après immunisation avec la protéique OVA, les auteurs montrent qu'une semaine après immunisation, des cellules CCR7<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> apparaissent et déclinent suivant la clairance de l'Ag. Cette population CXCR5<sup>+</sup> dans le sang augmente graduellement l'expression de CCR7 et diminue PD-1. Deux semaines après immunisation, les T<sub>FH</sub> mémoires circulantes sont CXCR5<sup>+</sup> CCR7<sup>int</sup> PD-1<sup>int</sup> et en trois semaines, ils sont pour la plupart CCR7<sup>+</sup> PD-1<sup>-</sup>. Une étude plus récente vient confirmer l'existence d'un précurseur, indépendant du CG, et qui pourrait donner naissance aux T<sub>FH</sub> mémoires circulantes (He et al., 2013).

## 5/ Les LB mémoires

Au niveau fonctionnel, l'aide apporté par les  $T_{FH}$  est essentielle à chaque étape de la génération de la mémoire B: activation des LB, formation du CG, la sélection et le développement des plasmocytes à longue durée de vie, des LB mémoires et enfin la réponse des LB mémoires lors d'une réexposition avec l'Ag. Parallèlement à ces différentes populations de  $T_{FH}$  mémoires, on retrouve au sein de la famille des LB mémoires une population très hétérogène. Au sein des OL on retrouve des LB mémoires qui peuvent être de type IgM ou IgG par exemple et d'affinités de BCR différentes et au sein de la MO des plasmocytes à longue durée de vie y séjournent là où une population de  $T_{FH}$  mémoires a été identifiés. Par la suite, nous parlerons des LB mémoires dont la génération et la fonction ont été largement étudiées (McHeyzer-Williams et al., 2012).

La production d'Ac neutralisant est d'une importance centrale à la protection immunitaire de l'hôte, en particulier contre les virus cytopathiques aigus tels que les virus vésiculaires de la stomatite ou virus de la grippe ou encore dans le cas d'infection au VIH. Le succès de la mémoire humorale dépend d'au moins deux lignes de défense. En effet, parallèlement aux deux grandes populations de  $T_{FH}$  mémoires (locales et circulantes), pour les populations de LB mémoires on retrouve aussi deux grandes lignes de défenses. D'une part les plasmocytes à longue durée de vie fonctionnent comme une première ligne de défense. Ces populations sécrètent de façon continue des Ac protecteurs de hautes affinités qui vont pouvoir agir rapidement en cas de réinfection. Ils constituent une mémoire humorale constitutive. D'autre part, si la mémoire constitutive n'est pas suffisante, une deuxième ligne de défense représentée par les LB mémoires se met en place. Les LB mémoires sont réactivés rapidement et produisent des Ac, ils représentent la mémoire réactive. Par rapport à la réponse primaire, les réponses induites par les LB mémoires sont plus rapides, de plus grande ampleur et se composent d'Ac qui ont commuté et de plus forte affinité (Ahmed and Gray, 1996).

Les LB mémoires représentent une grande famille hétérogène qu'on pourrait subdiviser d'abord en deux classes: dépendante ou non des LT. Puis, au sein des populations T-dépendante on peut encore décomposer la sous-population en deux sous-types en fonction de leur dépendance ou non à la mise en place d'un CG. Dans l'ordre nous verrons les particularités de chaque population et leur rôle protecteur dans la réponse secondaire.

## **5.1/ Génération des sous-populations de LB mémoires**

### **5.1.1/ Les LB mémoires T-indépendants**

Il a été depuis longtemps supposé que les LB mémoires ne se forment qu'au cours des réponses immunitaires cellulaires T-dépendantes, généralement en réponse à des Ag protéiques. Les LB mémoires T-dépendants sont appelés classiquement les cellules B2 et ont été longtemps considérées comme les participants exclusifs des LB mémoires. Toutefois, des données récentes montrent clairement que des cellules appelées B1 peuvent également se différencier en cellules B mémoires au cours d'une réponse immunitaire T-indépendante (Alugupalli et al., 2004) (Obukhanych and Nussenzweig, 2006). Les cellules B1 sont les cellules B les plus abondantes dans la cavité péritonéale, un faible nombre de ces cellules peut être détecté au niveau de la rate. De plus, une étude montre qu'après réexposition avec l'Ag, la stimulation avec un agoniste de TLR4 est nécessaire pour leur différenciation en plasmocytes (Yang et al., 2012).

Bien que des LB mémoires T-indépendants peuvent être générés comme décrit ci-dessus, il semble que leur réponse de rappel est quantitative plutôt que qualitative. Ainsi, en dehors de la fréquence accrue des cellules B spécifiques de l'Ag, il est difficile de savoir si ces cellules B mémoires T-indépendantes ont un avantage intrinsèque à répondre plus rapidement et de façon plus robuste à l'Ag par rapport à leurs homologues naïfs comme on le voit pour les LB mémoires dépendants des cellules T.

### **5.1.2/ Les LB mémoires T-dépendant mais indépendant du CG**

Des données récentes ont montré l'existence de LB mémoires qui se développent indépendamment du CG: les LB mémoires IgM<sup>+</sup> (Klein et al., 1997) (Dogan et al., 2009) (Pape et al., 2011). De nombreuses questions se posent quant au rôle de ces cellules lors d'une réponse Ac secondaire. Qu'est ce qui va faire qu'un LB activé et en prolifération va prendre la décision de devenir un LB mémoire indépendamment ou non de la formation du CG? Les mécanismes qui influent sur cette décision ont été fournis récemment par des études d'imageries dynamiques des LB. En utilisant des LB qui ont des affinités différentes (forte ou faible) pour l'haptène NP (4-hydroxy-3-nitrophénylacétyl), une étude a montré que les LB de haute affinité présentaient à leur surface une densité plus importante de complexe p:CMH (de même origine) aux T<sub>FH</sub> et ceci à la frontière T-B au sein des NL ou de la rate. Par une plus

forte expression antigénique, les LB porteurs d'Ac de haute affinité pour l'Ag pouvaient former des contacts durables avec les  $T_{FH}$  et recevoir plus d'aide de ces cellules ce qu'ils leur permettaient de se différencier en LB du CG (Schwickert et al., 2011). Ces données indiquent que cette sélection parmi les LB se fait au niveau de la frontière T-B lorsque les LB interagissent et reçoivent l'aide des  $T_{FH}$ . La nécessité pour les LB de former des conjugués durables avec les  $T_{FH}$  précédant l'entrée dans la réaction de CG a également été montrée chez des souris déficientes pour des protéines associées à des molécules de la voie de signalisation impliquées dans l'activation des lymphocytes: SAP. Une déficience en SAP raccourcit la durée de la formation des conjugués  $T_{FH}$ -B au cours des 2 premiers jours après l'exposition à l'Ag diminuant ainsi le nombre de CG (Qi et al., 2008).

En conclusion, compte tenu de ces données ainsi que des données d'imagerie, on peut suggérer que la formation de conjugués durables  $T_{FH}$ -B permet au  $T_{FH}$  de fournir une aide adéquate aux LB qui se différencient préférentiellement en LB du CG. Cependant, si la durée de la formation du conjugué est assez courte, les cellules B sont plus susceptibles de rejoindre le pool de cellules B mémoire indépendant du CG.

### **5.1.3/ Les LB mémoires dépendant du CG.**

Des études récentes ont révélé la dynamique durant la réaction du CG. Cependant, le mécanisme précis qui intervient dans la sélection des LB du CG en LB mémoires n'est pas encore totalement élucidé. Malgré une analyse approfondie des profils d'expression génique, l'hypothèse d'un FT unique qui permettrait aux LB du CG de devenir un LB mémoire n'a pas été validée. Toutefois, l'hypothèse d'une différenciation stochastique en LB mémoire a été suggérée. En effet, il serait possible qu'un avantage de survie favorise les LB du CG à se différencier en LB mémoires. À l'appui de cette hypothèse, des études ont montré qu'une expression forcée de Bcl-2, un facteur qui favorise la survie, ou la suppression des facteurs pro-apoptotiques médiateurs de la mort cellulaire conduisent à une augmentation de la taille du compartiment des LB mémoires IgG1<sup>+</sup> (Fischer et al., 2007) (Clybourn et al., 2011).

## **5.2/ Hétérogénéité au sein des LB mémoires T-dépendants**

Comme mentionné précédemment, au cours de la réponse immunitaire primaire, plusieurs types de cellules B mémoires sont générés : les LB mémoires qui peuvent être retrouvés dans les OLII et les plasmocytes à longue durée qui se nichent dans la MO. Parmi

les LB mémoires il existe une hétérogénéité à plusieurs niveaux qui a été amplement décrite ces dernières années.

Il y a deux décennies, l'hypothèse qu'il existe deux types distincts de LB mémoires  $IgM^+$  et  $IgG^+$  qui sont activés et qui exercent des fonctions différentes après réinfection a été émise (Berek, 1992). Deux groupes ont récemment abordé cette question et ont eu des conclusions similaires. Ces travaux ont pu montrer qu'après une restimulation antigénique, les LB mémoires  $IgG^+$  se différencient préférentiellement en plasmoblastes, tandis que les LB mémoires  $IgM^+$  prolifèrent et entrent dans la réaction du CG (Dogan et al., 2009) (Pape et al., 2011). Cependant, il semble que ce soit plus complexe au point qu'il y ait une hétérogénéité fonctionnelle au sein même des différentes populations de LB mémoires  $IgM^+$  ou  $IgG^+$ . En effet, il ne peut être exclu que les LB mémoires  $IgG^+$  puissent réintégrer des CG ou que les LB mémoires  $IgM^+$  puissent générer des plasmablastes. Une étude plus récente a pu montrer que des molécules de costimulation tels que CD80 et PDL-2 permettent de caractériser des sous-populations au sein des LB mémoires. En effet, cette étude met en évidence qu'au sein d'une catégorie de LB mémoires  $IgG^+$  ou  $IgM^+$ , les LB mémoires double négatif  $CD80^+PDL-1^-$  participent préférentiellement à la réaction du CG alors que les cellules simple positif  $PDL-1^+$  ou  $CD80^+$  ainsi que les doubles positives  $CD80^+PDL-1^+$  se différencient rapidement en plasmablastes après restimulation antigénique (Zuccarino-Catania et al., 2014).

Après restimulation antigénique, les LB mémoires ont la caractéristique d'être bi-fonctionnels. En effet, ils ont le pouvoir à la fois de se différencier en cellules effectrices, les plasmablastes, mais aussi de régénérer des LB mémoires qui permettent de maintenir et remplacer le compartiment initial de cellules. Ce processus d'auto-renouvellement rappelle les propriétés des cellules souches. En effet, comme les LB mémoires  $IgG^+$  semblent avoir une plus grande capacité à se différencier en cellules plasmocytaires que les LB mémoires  $IgM^+$ , il est suggéré que le compartiment de LB mémoires  $IgM^+$  contient plus de cellules analogues aux cellules souches alors que les LB mémoires qui ont fait la commutation isotypique tels que les  $IgG^+$  pourraient correspondre à des cellules plus différenciées. De plus, les LB mémoires  $IgM^+$  rappellent aussi les propriétés des cellules « centrales mémoires » qui sont des cellules moins différenciées et pour lesquelles la notion de cellule souche a été aussi évoquée. En effet, une étude récente a établi des preuves substantielles de ce mécanisme basé sur les cellules souches pour les  $T_{CM} CD8$  (Graef et al., 2014). Pour les LB mémoires, il y a nécessité d'une étude approfondie pour confirmer cette hypothèse.

## 6/ La réponse Ac secondaire : Dialogue avec les LB et rôle des T<sub>FH</sub> mémoires

Les T<sub>FH</sub> mémoires maintiennent un niveau d'expression de CXCR5 qui a pour conséquence que les T<sub>FH</sub> mémoires au niveau de la rate ou des NL vont préférentiellement avoir une localisation à la frontière T-B mais aussi au niveau de la zone B (MacLeod et al., 2011) (Ise et al., 2014). Une étude récente montre que les T<sub>FH</sub> CXCR5<sup>+</sup> se localisent près des follicules B et présentent une capacité supérieure à soutenir l'activation des LB mémoires. De plus, les auteurs montrent que, lors d'une réponse secondaire, les T<sub>FH</sub> mémoires ré-expriment rapidement un niveau élevé de Bcl-6, et que ceci est principalement induit par la fonction APC des LB mémoires. En conclusion, cette étude confirme l'importance des interactions apparentées entre les T<sub>FH</sub> mémoires et les LB mémoires au cours des réponses Ac secondaires (Ise et al., 2014). De plus, cela renforce d'avantage l'importance d'une proximité entre ces deux types cellulaires (T<sub>FH</sub> mémoires et LB mémoires de même spécificité antigénique) au niveau des OL. D'autre part, plusieurs études ont mis en évidence un rôle majeur de la fonction de présentation de l'Ag des LB mémoires. En effet, des travaux ont montré qu'une déficience des molécules de CMH-II à la surface des LB mémoires abolit complètement la réponse Ac secondaire (Shimoda et al., 2006) (Aiba et al., 2010) ce qui met en évidence une fois de plus l'importance d'un dialogue entre les T<sub>FH</sub> mémoires et les LB mémoires pour induire une réponse humorale secondaire rapide et de bonne qualité.

### 6.1 / Pré-existence d'un CG, induction d'une réponse secondaire de haute affinité et Re-diversification

Comme nous l'avons vu précédemment, les LB mémoires IgM<sup>+</sup> sont les plus susceptibles à la mise en place d'une réaction du CG lors d'une réponse secondaire (Weill et al., 2013). D'autre part, la persistance du CG est dépendante de la nature de l'Ag lors de la réponse primaire. En effet, des études ont montré que les Ag particuliers (tels que des globules rouges de moutons) sont plus susceptibles de favoriser la survie des CG. De plus, d'autres facteurs tels que des agonistes de TLR7 et TLR9 améliorent le maintien des CG. En effet, une étude montre que l'immunisation de souris avec des nanoparticules synthétiques contenant des Ag en présence de ligands de TLR4 et TLR7 favorise entre autre la persistance de CG (d'une durée supérieure à 1 an et demi) au sein des NL drainants (Kasturi et al., 2011). Un CG pré-existant lors de l'induction d'une réponse secondaire permettrait sa ré-

utilisation par les LB et T<sub>FH</sub> mémoires nouvellement activés ainsi que la re-diversification des LB mémoires qui ont un BCR de haute-affinité à travers le recrutement des LB activés.

Cependant compte tenu de la capacité relativement limitée des LB mémoires IgG<sup>+</sup> à induire une réaction du CG lors d'une réponse secondaire, la question se pose de savoir comment des Ac IgG de haute-affinité peuvent être générés *de novo* ?

Deux possibilités peuvent être envisageables. Nous pouvons d'abord suggérer que lors d'une réponse secondaire, les T<sub>FH</sub> mémoires activées vont sélectionner par compétition les LB mémoires IgG<sup>+</sup> qui ont un BCR de plus forte affinité ce qui pourrait aboutir rapidement à une réponse extra-folliculaire de haute-affinité. Par ailleurs, les LB mémoires IgM<sup>+</sup> qui sont plus susceptibles d'induire un CG vont par les processus de commutation isotypique et de maturation d'affinité générer des Ac IgG de haute affinité pour l'Ag. Par ailleurs, nous pouvons suggérer que les deux voies précédemment citées pourraient être complémentaires. En effet, nous pouvons proposer que les LB mémoires IgG<sup>+</sup> et IgM<sup>+</sup> participent tout deux après activation à la génération d'Ac de type IgG de haute-affinité mais de façon distincte dans le temps, plus précocement pour les LB mémoires IgG<sup>+</sup> et plus tardivement pour les LB mémoires IgM<sup>+</sup>. Ce système multicouche complémentaire aurait pour avantage de couvrir efficacement toute la réponse immunitaire secondaire.

## 6.2/ Re-diversification de la réponse Ac au cours du temps

Au cours d'une réponse secondaire, on peut se poser la question de l'avantage apporté par les LB mémoires comparativement aux plasmocytes à longue durée de vie qui sécrètent déjà de façon continue des Ac de haute affinité ?

Lors d'une ré-infection par exemple, si la nature de la particule virale est absolument la même que durant la réponse primaire, les LB mémoires activés sembleraient agir comme un support supplémentaire pour contenir efficacement l'infection. Toutefois, dans ce contexte la localisation des LB mémoires aux niveaux des OLII ainsi que leur longévité représentent des atouts majeurs. Par ailleurs, lors d'une ré-infection avec un variant du virus en question, dans ce cas, les LB mémoires sont au premier plan. Récemment une étude a montré que les LB mémoires, et non les plasmocytes à longue durée de vie, possèdent des spécificités pour le mutant d'échappement de l'Ag viral. En effet, dans un contexte d'infection par le virus Nil

occidental chez la souris, les auteurs ont démontrés que les plasmocytes à longue durée de vie étaient spécifiques d'un seul épitope dominant neutralisant. En revanche, une fraction importante de LB mémoires est au contraire capable de produire des Ac qui reconnaissent à la fois des épitopes viraux de type sauvage et mutant (Purtha et al., 2011). De façon similaire, les LB mémoires qui ont été isolés chez l'Homme, avant la pandémie de grippe H1N1 en 2009, contenaient des clones capables de sécréter des Ac neutralisants à large spectre, qui ont fournis une protection contre une telle souche pandémique de la grippe virale (Wrammert et al., 2011).

En conclusion, ces études renforcent l'idée que, comparativement au plasmocytes à longue durée de vie, les LB mémoires grâce à leur plus large répertoire de spécificité antigénique pourraient fournir un avantage considérable lors d'une infection avec une variant de l'agent pathogène, qui n'a pas encore été rencontré. De nombreuses question restent néanmoins en suspens. Cependant, au vu de l'existence des LB mémoires  $IgM^+$ , se pose la question de leur contribution dans la production d'Ac neutralisant de haute affinité? Des études supplémentaires sont nécessaires pour compléter nos connaissances sur le sujet.

## **7/ Maintien et/ou Survie des $T_{FH}$ et LB mémoires**

Comme nous l'avons vu précédemment, le LB mémoires et le  $T_{FH}$  mémoires représentent un couple essentiel au bon fonctionnement et au maintien de la mémoire immunitaire humorale. Les mécanismes qui permettent la survie prolongée de ces deux types cellulaires sont néanmoins encore imparfaitement compris.

Pour les  $T_{FH}$  mémoires, à l'heure actuelle, aucune étude ne permet d'expliquer les mécanismes de leur maintien et/ou survie. Cependant, les données existantes sur la survie des LT mémoires de façon générale pourraient nous orienter sur les paramètres impliqués dans le processus de survie des  $T_{FH}$  mémoires. De nombreuses études renforcent l'idée que tout comme les cellules naïves, la survie des cellules T mémoires n'est pas un processus passif mais plutôt actif nécessitant une stimulation continue des LT. Cependant, les études sur le sujet opposent des conclusions divergentes. En effet, des données suggèrent que les LT mémoires (LT CD4 et LT CD8) peuvent survivre en l'absence de molécules du CMH et que leur survie ne dépend pas d'une stimulation par le TCR (Murali-Krishna et al., 1999) (Swain

et al., 1999). Cependant et plus précisément pour les LT CD4, cette question est très controversée car certaines études maintiennent que la survie des LT CD4 mémoires nécessite le contact avec l'Ag résiduel persistant (van Essen et al., 2000).

### **7.1/ Les voies de signalisations impliquées dans la survie des LT CD4 mémoires**

La nécessité d'une signalisation répétitive à travers le TCR et l'exposition à l'Ag est en effet controversée (Halwani et al., 2006) (Champagne et al., 2001). Bien que des études suggèrent que la signalisation par le TCR a un rôle important dans le maintien des LT mémoires (Seddon et al., 2003), d'autres observations indiquent que les interactions entre le TCR et le CMH-II ne sont pas essentielles à la survie des LT CD4 mémoires, mais plutôt au maintien de leur fonction immunologique (Kassiotis et al., 2002). En effet, une étude effectuée chez la souris, indique que les LT CD4 mémoires privés de l'interaction TCR-CMH-II présentent des fonctions perturbées (Kassiotis et al., 2002) et que l'analyse de l'expression des gènes de ces cellules isolées, à partir d'hôtes déficientes pour le CMH-II, révèle une expression inférieure de gènes apparentés à l'activation des cellules T, le métabolisme et la survie (y compris Bcl-2, Akt 1, Stat5 et IL-2) (De Riva et al., 2007).

Bien que le rôle exact joué par les interactions TCR-CMH-II est encore en débat, l'implication de certaines cytokines dans la régulation de la prolifération homéostatique basale et la survie des cellules T mémoires spécifiques de l'Ag est quant à lui bien décrit (van Leeuwen et al., 2009). En effet, l'IL-7 est essentielle pour la survie et la prolifération homéostatique basale des LT CD4 mémoires alors que l'IL-15 est souvent considérée comme accessoire dans ce processus (Kondrack et al., 2003) (Lenz et al., 2004) (Purton et al., 2007). La signalisation en aval du récepteur à l'IL-7 a pour finalité l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Riou et al., 2007) (Chetoui et al., 2010). Bcl-2 exerce sa fonction anti-apoptotique en séquestrant un certain nombre de membres de la famille pro-apoptotiques. En effet, l'expression de Bcl-2 est nécessaire pour protéger les LT mémoire de l'apoptose médiée par le facteur pro-apoptotique Bim (Wojciechowski et al., 2006).

Toutefois toutes ces études reposent sur une analyse globale des LT CD4 mémoires. La critique majeure repose sur le fait de ne pas prendre en compte la grande hétérogénéité qui existe au sein des LT CD4 mémoires. En effet des T<sub>FH</sub> mémoires qui ont pour partenaire les LB mémoires, et qui présentent des localisations et des fonctions bien particulières pourraient nécessiter des mécanismes de maintien et de survie qui leur sont bien spécifiques. En effet,

des études récentes montrent notamment la possibilité dans un contexte de vaccination avec un Ag particulière, d'induire en phase mémoire la persistance de CG dans lequel l'Ag pourrait persister. En outre, le rôle de l'Ag pour les T<sub>FH</sub> est particulièrement important dans le maintien de leur phénotype (Dogan et al., 2009) (Baumjohann et al., 2013).

## 7.2/ Les voies de signalisation impliquées dans la survie des LB mémoires

Concernant les LB mémoires, plusieurs mécanismes impliqués dans le maintien de cette population ont été évoqués, cependant tout comme pour les LT CD4 mémoires, les études sont souvent divergentes. Notamment sur le rôle de l'Ag dans le maintien des LB mémoires, il a d'abord été proposé que ce maintien est dépendant de la persistance de l'Ag après l'événement immunisant. Il a été montré qu'après immunisation protéique chez la souris, des LB mémoires et un contingent de T<sub>FH</sub> mémoires spécifiques du même Ag vaccinal sont tout deux retrouvés dans les NL drainants, avec des complexes formés par des molécules CMH-II et des peptide spécifiques, suggérant la présence de l'Ag vaccinal à la phase mémoire de la réponse (Fazilleau et al., 2007). De plus, il est bien établi que les CDF sont capables de retenir et présenter des Ag entiers pendant de longues périodes, et peuvent donc contribuer à la persistance de l'Ag (Allen et al., 2007). Expérimentalement, il avait été observé que des LB mémoires, issus d'une réponse humorale primaire, transférés (avec des LT) à une souris hôte naïve, avaient une durée de vie limitée en l'absence de l'Ag immunisant. La présence de l'Ag chez l'animal receveur au moment du transfert permettait le maintien à long terme du contingent B mémoire ainsi que le développement de réponses secondaires de rappel (Gray and Skarvall, 1988) (Gray et al., 1984).

Cependant, d'autres études présentent des conclusions différentes. Maruyama et al, ont mis au point un modèle murin dans lequel la spécificité pour l'Ag des LB mémoire produits lors d'une réponse primaire, peut être modifiée par recombinaison génétique conditionnelle, de façon à tester leur dépendance vis-à-vis du premier Ag immunisant pour leur survie et le développement de réponses secondaires. A l'opposé des résultats précédemment cités, dans ce modèle, les LB mémoires se maintiennent en l'absence du nouvel Ag, ne prolifèrent pas et sont capables d'initier des réponses secondaires (Maruyama et al., 2000). De plus, Anderson et al ont montré que des souris transgéniques incapables de sécréter des Ig et donc de former des complexes immuns pouvant être présentés à la surface des CDF, avaient la capacité de développer et de maintenir des LB mémoires tout comme les souris contrôles (Anderson et

al., 2006).

Par ailleurs, deux études soulignent aussi le rôle du BCR dans le maintien des LB mémoires. Pour déterminer les types de cellules et de molécules qui sont nécessaires pour la survie des LB mémoires, des études antérieures ont ciblés des LB mémoires IgG<sup>+</sup>. Les LB mémoire IgG<sup>+</sup> peuvent persister en l'absence de cellules T ou de l'entrée de cellules précurseurs, mais des expériences utilisant des souris avec des CDF, dans lequel le gène codant pour le récepteur du complément 2 (CR2) a été supprimé, suggère que les CDF sont nécessaires au maintien des LB mémoires IgG<sup>+</sup> (Barrington et al., 2002). Chez ces souris, la réponse primaire de type IgG n'a pas été affectée. Cependant, la réponse Ac secondaire a été significativement diminuée. Une réduction de la fréquence de LB mémoires spécifique à l'Ag a aussi été observée. En conclusion de cette étude, le CR2 à la surface des CDF favorise directement ou indirectement la survie des LB mémoires IgG<sup>+</sup>. On peut suggérer que cela passe par la persistance d'un dépôt sous forme de complexes Ag-Ac-complément. Le rôle de la persistance de l'Ag dans les réponses mémoires reste encore largement débattu (Roozendaal and Carroll, 2007). De plus, en utilisant un modèle murin de délétion conditionnelle de la phospholipase C $\gamma$ 2, un composant essentiel de la signalisation du BCR, nécessaire au développement et au maintien des LB mémoires, les souris invalidées avaient une réduction très importante des CG et du nombre des LB mémoires, avec une franche altération des réponses humorales secondaires (Hikida et al., 2009).

Ainsi le rôle respectif de l'Ag, du BCR, des récepteurs au complément, des CDF dans le maintien des LB mémoires reste un sujet ouvert, qui nécessite des investigations supplémentaires.

## **V/ Objectifs poursuivis**

Cet exposé introductif souligne l'importance de la mémoire immunologique et plus précisément des cellules T<sub>FH</sub> et LB mémoires dans le contrôle des réponses immunes secondaires. Cette synthèse de données bibliographiques révèle aussi les lacunes des connaissances dans le domaine des T<sub>FH</sub> mémoires et dans leur relation avec les LB mémoires.

Nos travaux de recherche se situent dans la continuité des données actuelles sur l'identification et la caractérisation des populations de T<sub>FH</sub> mémoires. De plus, notre étude a permis de comprendre la relation entre les différentes populations de T<sub>FH</sub> mémoires, entre les T<sub>FH</sub> mémoires et les LB mémoires qui se situent à proximité les uns des autres et enfin de comprendre comment l'organisation établie entre ces deux partenaires cellulaires s'articule *in vivo* en cas de restimulation antigénique. En suivant, vous trouverez les Résultats qui détailleront les différentes questions posées et les réponses apportées par notre étude.

## *RÉSULTATS*

Au cours des dernières années, un effort important a été réalisé concernant l'identification des populations de LT CD4 mémoires ayant une capacité d'aide aux LB. Cet effort a débouché en la description de 3 sous-populations différentes de  $T_{FH}$  mémoires chez l'Homme et la souris (Locci et al., 2013a) (MacLeod et al., 2011) (Morita et al., 2011) (Tokoyoda et al., 2009). Ces trois populations ont des localisations distinctes (OL drainants, OL non drainants/rate/sang et MO) mais ont en commun, d'où leur lignage  $T_{FH}$ , une capacité fonctionnelle d'aide, *in vivo et/ou in vitro*, aux LB en cas de restimulation antigénique contrairement à leurs homologues non  $T_{FH}$ . Un des enjeux majeur consiste à comprendre le lien développemental qui existe entre ces populations. De plus, au vu de l'existence de différentes populations de cellules B mémoires (LB mémoire  $IgG^+$  ou  $IgM^+$  ou encore plasmocytes à longue durée de vie), les différentes populations de  $T_{FH}$  mémoires pourraient se localiser à proximité de différentes populations de LB mémoires et/ou avoir des capacités fonctionnelles intrinsèques différentes, *in vivo* après restimulation? Les réponses à ces questions furent au cœur de mes travaux de Thèse.

Il est difficilement envisageable, au vu des données publiées à l'heure actuelle sur le sujet, de synthétiser et relier les différentes études entre elles car chacune portent sur une des populations de  $T_{FH}$  mémoires en particulier et utilisent un modèle (Homme ou souris) et des conditions expérimentales qui leur sont propres. Dans ces études, aucune ne décrit la coexistence de ces trois populations de  $T_{FH}$  mémoires et les comparent entre elles en utilisant un unique modèle expérimental. L'objectif global de mes travaux de Thèse a consisté à caractériser et suivre l'apparition des populations Ag spécifiques de  $T_{FH}$  mémoires résidentes (NL drainants et MO) et circulantes (rate) utilisant un unique modèle expérimentale. De plus, mes travaux ont, en plus de confirmer la coexistence de ces différentes populations, permis d'établir les caractéristiques phénotypiques de ces populations, de les comparer entre elles au niveau fonctionnel ainsi que de mettre en lumière les interactions cellulaires et fonctionnelles qu'elles entretiennent potentiellement avec leur partenaires, les LB mémoires de même spécificité antigénique.

Mes travaux de Thèse ont ainsi pu répondre à plusieurs objectifs de recherche que l'on peut subdiviser en 4 axes centraux :

- ⇒ **Axe 1** : Cinétique d'apparition et Caractérisation phénotypique des  $T_{FH}$  mémoires locaux (OLS drainants) et circulants (OLS non drainants) spécifiques du même Ag.
- ⇒ **Axe 2** : Identification des LB mémoires retrouvés dans les OLS drainants et non drainants.
- ⇒ **Axe 3** : Interaction fonctionnelle entre les  $T_{FH}$  mémoires et les LB mémoires spécifiques du même Ag.
- ⇒ **Axe 4** : Mécanismes sous-jacents l'architecture et la dynamique des  $T_{FH}$  mémoires.

L'étude principale, qui fait l'objet d'une publication présentée par la suite, a porté essentiellement sur les cellules  $T_{FH}$  mémoires dites locales ou résidentes au niveau des NL drainants *vs* les circulantes retrouvées au niveau de la rate suite à une immunisation protéique sous cutanée (sc). (partie I). Parallèlement au laboratoire des travaux sont en cours et ont permis d'aboutir à des résultats préliminaires qui affirment l'identification d'une troisième population résidente au niveau de la MO. Cette population présente un phénotype très proche des  $T_{FH}$  mémoires résidentes au niveau des NL drainants, nous choisissons alors de les nommer « les  $T_{FH}$  mémoires de la MO ». Ces cellules font l'objet d'analyses plus approfondies notamment au niveau fonctionnel pour mesurer leur capacité d'aide envers les LB en cas de restimulation antigénique.

## I / Les T<sub>FH</sub> mémoires locales (NL drainants) vs circulantes (rate)

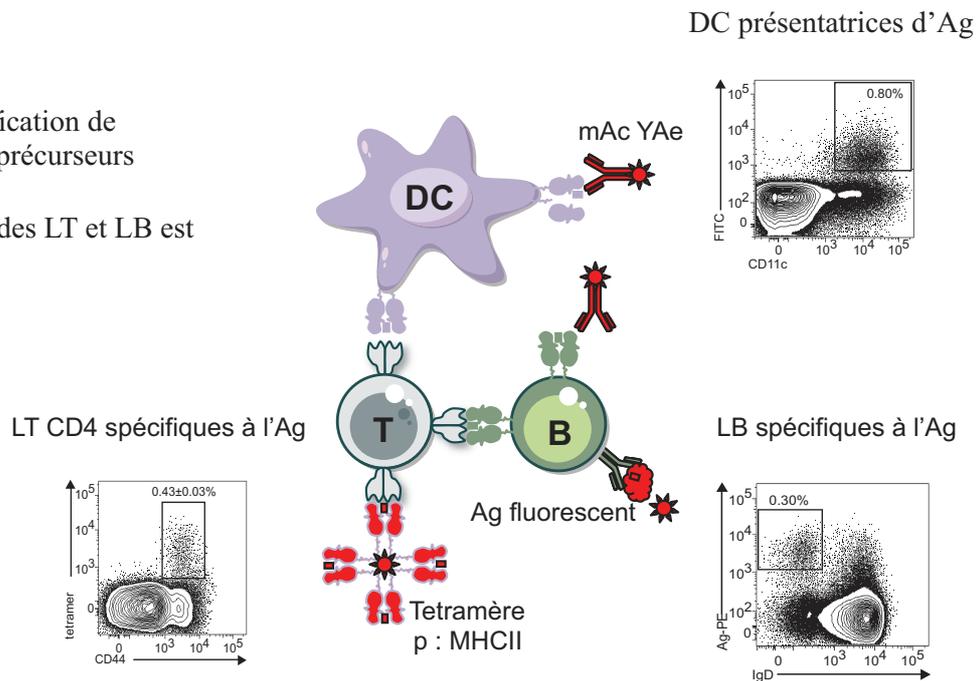
Les modèles de souris transgéniques pour les récepteurs aux Ag (TCR et Ac) sont largement utilisés et sont nécessaires à la compréhension de nombreux mécanismes moléculaires. Cependant, dans le contexte des réponses lymphocytaires T, et comme nous l'avons vu en introduction, une fréquence de précurseurs plus élevée de cellules portant le même TCR oligoclonal peut dévier les dynamiques de la sélection clonale et altérer le développement des LT mémoires *in vivo* en déséquilibrant la balance et/ou l'affinité des populations lymphocytaires. Un outil de recherche mal adapté pour cette étude peut donc impacter le destin des populations cibles et pourrait être à l'origine de divergences de résultats comme retrouvés dans la littérature.

Afin de réaliser une cinétique d'apparition et une caractérisation phénotypique des T<sub>FH</sub> mémoires, nous avons privilégié un modèle expérimental pour lequel nous avons accès directement *in vivo* aux APC, aux cellules T et aux cellules B spécifiques de l'Ag chez des souris sauvages non transgéniques immunisées avec un Ag d'origine protéique. Plus précisément, des souris sauvages non modifiées de fond génétique C57Bl/6 ont été immunisées en sc avec une protéine chimérique l'E $\alpha$ -OVA permettant à la fois de suivre les LT CD4 spécifique de l'Ag E $\alpha$  (ou 1W1K) avec le tétramère 1W1K-I-A<sub>b</sub> p:CMHII, ainsi que les LB spécifiques à l'Ag OVA en marquant *ex-vivo* les cellules avec l'OVA couplé à un fluorochrome. De plus, pour mesurer la présentation antigénique, un marquage des cellules *ex-vivo*, avec l'Ac monoclonal YAc qui reconnaît spécifiquement le complexe pE $\alpha$ -CMHII, est utilisé (Figure 18).

## Figure 18 : Etude *in vivo* des réponses immunes Ag spécifiques

### Souris sauvage

- Pas de modification de la fréquence des précurseurs
- Le répertoire des LT et LB est polyclonal



*Chakarov S., Sacquin A., Asrir A., Kagan J., Gador M., Aloulou M., Péral S.*

Pour l'immunisation sc la protéine chimère est émulsifiée avec l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) associée à l'agoniste du TLR9, le CpG. L'équipe a démontré récemment à travers un brevet et une publication (Chakarov et al, 2014) que ces conditions d'immunisation associant l'IFA avec du CpG favorisent une augmentation importante et durable des populations de LB mémoires spécifiques de l'Ag et de plasmocytes à longue durée de vie dans la MO et ceux jusqu'à 60 jours après immunisation.

En utilisant ce modèle expérimental nous avons pu montrer, dans l'ensemble, la coexistence de différentes sous-populations de  $T_{FH}$  mémoires spécifiques du même Ag aux localisations diverses. Tous d'abord la cinétique d'apparition de ces populations nous montre que l'apparition des  $T_{FH}$  mémoires locales suit une cinétique classique avec une phase de contraction puis une phase latente qui débute à partir de j30 après immunisation. Toutefois pour les  $T_{FH}$  mémoires dites circulantes ces cellules voient leur fréquence augmenter dans la rate au fur et à mesure du temps jusqu'à atteindre un plateau à partir de j30 post-immunisation. Nous avons montré que ces populations de  $T_{FH}$  mémoires sont bien quiescentes, non prolifératives avec un phénotype distinct par rapport aux cellules  $T_{FH}$  effectrices à j7 post-immunisation. Au niveau phénotypique, nous avons évalué l'expression

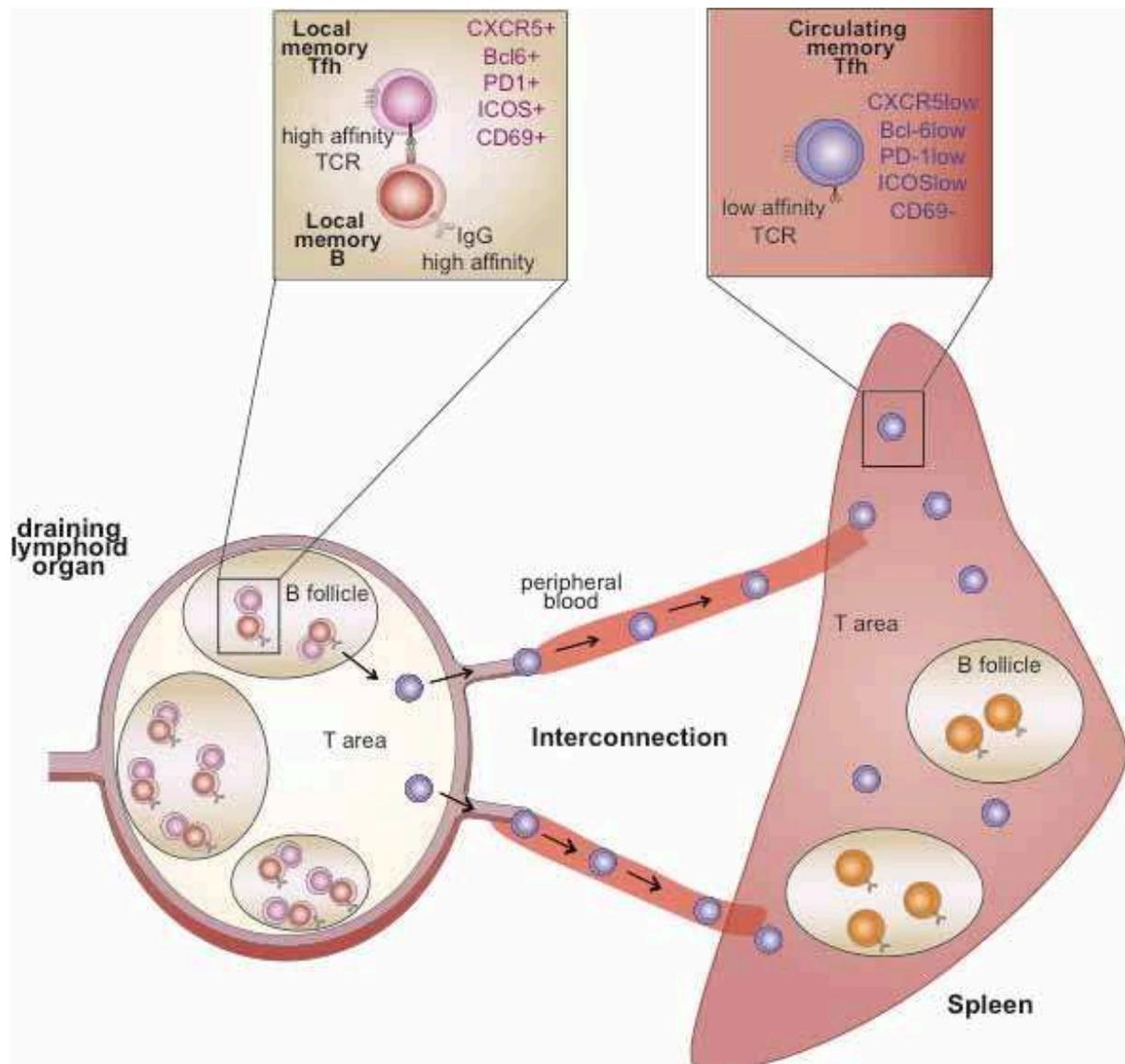
de nombreuses molécules exprimées fortement et caractéristiques des T<sub>FH</sub> effectrices. Nous avons alors montré que les T<sub>FH</sub> mémoires qui résident localement au niveau des NL drainants ont un phénotype plus « polarisé » se traduisant notamment par une plus forte expression de Bcl-6 et PD-1 en comparaison aux T<sub>FH</sub> mémoires circulantes de la rate. Toujours au niveau phénotypique et de façon intéressante nous avons montré que les T<sub>FH</sub> mémoires portent à leur surface des TCR de plus forte affinité pour l'Ag que les T<sub>FH</sub> mémoires circulantes de la rate. En outre, nous avons montré que cette affinité importante pour l'Ag corrèle pour les T<sub>FH</sub> mémoires locales avec une expression du marqueur d'activation précoce CD69. Ces résultats au niveau phénotypique s'accompagnent de l'observation que *in situ* ces populations de T<sub>FH</sub> mémoires ont des localisations totalement distinctes. En effet, les circulantes par une plus forte expression de CCR7 ainsi qu'une faible expression de CXCR5 se localisent préférentiellement en dehors des follicules B alors que les T<sub>FH</sub> mémoires locales expriment fortement CXCR5 et faiblement CCR7 et se situent majoritairement au niveau des follicules B. Cette différence de phénotype et de localisation pourrait s'expliquer par une compétition, entre les T<sub>FH</sub> mémoires, pour l'Ag porté par les LB mémoires au niveau des follicules B au sein des NL drainants. Suivant cette hypothèse, les T<sub>FH</sub> mémoires locales ayant un TCR de plus forte affinité pour l'Ag resteraient en contact avec les LB mémoires alors que leur homologues portant un TCR de plus faible affinité pour l'Ag quitteraient les NL drainants pour rejoindre la circulation et s'accumulent dans la rate. Cette hypothèse a été renforcée par des évidences expérimentales montrant l'existence « d'un réservoir antigénique » sous la forme de complexes p:CMHII portés uniquement à la surface de LB mémoires locaux au niveau des NL drainants. De plus, nous avons mis en évidence que la rétention des T<sub>FH</sub> mémoires locales au niveau des NL drainants est dépendante de l'engagement du TCR avec les complexes p:CMHII car bloquer cette interaction *in vivo* suite à un traitement avec l'Ac YAc a pour conséquence la libération et la recirculation des T<sub>FH</sub> mémoires locaux qui s'accumulent au niveau de la rate.

Par ailleurs, nous avons aussi constaté étonnement que les populations de LB mémoires résidant au niveau des NL drainants (LB mémoires locaux), ou bien ceux retrouvés au niveau de la rate (LB mémoires circulants) sont totalement hétérogènes. Au niveau des NL drainants les LB mémoires sont majoritairement des LB de type IgG<sup>+</sup> (avec potentiellement un BCR de haute affinité pour l'Ag) et présentent un phénotype associé à une capacité à se différencier en plasmocytes en cas de restimulation antigénique. Cependant, au niveau de la rate, les LB mémoires Ag spécifique sont essentiellement de type IgM (avec potentiellement

des BCR de plus faible affinité pour l'Ag) et un phénotype favorable à l'induction de CG lors d'une réponse secondaire.

C'est après avoir établi « un état des lieux phénotypique » des couples cellulaires «T<sub>FH</sub> mémoires – LB mémoires » existant au niveau des NL drainants et la rate, que s'est imposé à nous la volonté d'évaluer au niveau fonctionnel leurs capacités à participer à la réponse immune secondaire en cas de restimulation antigénique. *In vivo* nous avons pu montrer qu'en phase précoce (5jr) après restimulation antigénique et indépendamment de la nature des LB mémoires locaux ou circulantes, les T<sub>FH</sub> mémoires locales restimulées ont une fonctionnalité supérieure à induire la différenciation des LB en plasmocytes, la commutation isotypique ainsi que la sécrétion d'Ac de plus forte affinité pour l'Ag. Toutefois, les T<sub>FH</sub> mémoires circulantes présentent des capacités sécrétoires d'IL-21 et d'IFN- $\gamma$  nettement plus importante que leurs homologues locaux. L'IL-21 est une cytokine importante dans la mise en place de CG ce qui suggère que les T<sub>FH</sub> mémoires circulantes pourraient contribuer à la mise en place de CG dont les effets pourraient s'observer à des temps plus tardifs de la réponse immune secondaire.

## Résumé GRAPHIQUE



## **Interconnected subsets of memory Follicular Helper T cells have different effector functions**

### **Short title**

Interconnected layers of memory Tfh cells

Assia Asrir<sup>1,2,3,4</sup>, Meryem Aloulou<sup>1,2,3,4</sup>, Mylène Gador<sup>1,2,3,4</sup>, Corine Pérals<sup>1,2,3,4</sup> and Nicolas Fazilleau<sup>1,2,3,4</sup>

### **Affiliations:**

<sup>1</sup>Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, F-31300, France.

<sup>2</sup>INSERM, U1043, Toulouse, F-31300, France.

<sup>3</sup>CNRS, UMR5282, Toulouse, F-31300, France.

<sup>4</sup>Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, F-31300, France.

### **Contact information**

Nicolas Fazilleau, Phone: +33562744519, Fax: +33562744558, email address: nicolas.fazilleau@inserm.fr

**Abstract**

Follicular T Helper (Tfh) cells regulate high-affinity antibody production. Memory Tfh cells can be classified as local in draining lymphoid organ and circulating in the blood, but the underlying phenotypic and functional mechanisms of this subdivision remain unresolved. Here, we showed that both memory Tfh subsets sustained B cell responses after reactivation but local cells promoted more class-switch recombination. In parallel, local memory B cells formed a homogeneous population programmed to become effector while circulating memory B cells formed a heterogeneous population with cells capable of rediversification. Further, local memory Tfh cells bore TCR of higher affinity, which correlated with expression of pMHCII at the surface of local memory B cells only. Strikingly, blocking TCR-pMHCII interactions induced the release of local memory Tfh cells in the circulating compartment. Our studies reveal that memory Tfh anatomy is highly intertwined with memory B cells a finding that may, ultimately, have high impact for vaccine design.

## Introduction

Most effective vaccines in use currently rely on the long-term protection of high-affinity memory B cells and long-lived plasma cells (PC). Particularly, B cell responses to protein antigens (Ag) develop under the guidance of Follicular Helper T (Tfh) cells. Effector Tfh cells develop locally in lymphoid organs draining the site of immunization (Fazilleau et al., 2007). They regulate the outcome of humoral responses through a combination of specific TCR-peptide-MHCII (pMHCII) interactions, engagement of co-stimulatory molecules and cytokine delivery (Crotty, 2014; Fazilleau et al., 2009a). These events result in class-switch recombination and somatic diversification of the BCR in the germinal center (CG) and, ultimately, the selection of high-affinity B cell variants into the plasma cell and memory B cell compartment. The transcriptional regulator Bcl-6 drives the differentiation of this specific helper T cell (Th) lineage (Crotty, 2011a). Bcl-6 induces the expression of the chemokine receptor CXCR5, a hallmark of Tfh cells, which promotes their migration in CXCL13-rich areas such as B follicles. Furthermore, ICOS-ICOS-L engagement induces differentiation and maintenance of Tfh cells and ICOS expression by Tfh cells is mandatory for CG formation (Nurieva et al., 2008). Another distinguishing feature of Tfh cells is expression of programmed cell death gene-1 (PD-1), an inhibitory receptor highly expressed by CG Tfh cells (Haynes et al., 2007). Finally, effector Tfh cells produce large amount of IL-21, the most potent cytokine known to drive PC differentiation (Bryant et al., 2007; Kuchen et al., 2007) and optimal Bcl-6 expression in CG B cells (Linterman et al., 2010; Zotos et al., 2010). Effector Tfh cells can also secrete other cytokines such as IL-4 (Reinhardt et al., 2009), IL-17 (Hsu et al., 2008) or IFN- $\gamma$  (Johnston et al., 2009a) that, in this context, control class-switch recombination.

Until recently, Tfh cells were considered as fully differentiated effector cells prone to apoptosis while the CG reaction resolved (Linterman et al., 2009; Rasheed et al., 2006).

However, we reported memory CXCR5<sup>+</sup> Th cells after protein vaccination in draining lymphoid tissue (Fazilleau et al., 2007). The existence of memory Tfh cells has now been demonstrated in both mice (Hale et al., 2013a; Luthje et al., 2012; Weber et al., 2012a) and humans (Bentebibel et al., 2013; Chevalier et al., 2011b; Locci et al., 2013b; Morita et al., 2011). By using cell transfer experiment, Liu and colleagues demonstrated that memory Bcl-6<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> Th cells are the most likely to become effector Tfh cells upon reactivation, thus defining memory Tfh cells (Liu et al., 2012b). The latter are resting cells that can be long-lived (Hale et al., 2013a). Their emergence is still not totally understood, but differentiation of a memory Tfh cell does not appear to require participation in the CG response (He et al., 2013), and interestingly, Bcl-6 expression in memory Tfh cells is decreased as compared to effector Tfh cells (Choi et al., 2013b; Kitano et al., 2011; Liu et al., 2012b). Consequently, memory Tfh cells are committed to the Tfh lineage but with a less polarized phenotype than their effector counterparts (Hale et al., 2013a; Iyer et al., 2013; Yusuf et al., 2010).

One important attribute of memory Tfh cells is their localization. We have shown that memory Tfh cells are present predominantly in draining lymph nodes (dLN) where they form a local pool (Fazilleau et al., 2007). This localization likely results from the fact that retention of memory Th cells in dLN correlates with a prolonged exposure of Ag (Ugur et al., 2014), that depots of peptide-MHC II complexes (pMHCII) persist in the dLN after immunization (Fazilleau et al., 2007) and that persistent Ag is crucial to sustain the Tfh lineage (Baumjohann et al., 2013). In contrast, circulating memory Tfh cells can also be found in the blood of mice (Hale et al., 2013a) and humans (Chevalier et al., 2011b; Forster et al., 1994; Morita et al., 2011). Similarly, multiple layers of memory B cells exist and colonize different localizations, for example the long-lived PC niche in the bone marrow and memory B cells spread in second lymphoid organs. In addition, the existence of two memory B cell subsets with distinct functional capacities was recently described (Dogan et al., 2009; McHeyzer-

Williams et al., 2015; Pape et al., 2011; Zuccarino-Catania et al., 2014). Upon Ag recall, some memory B cells enter in CG to rediversify their BCR while the other memory B cells differentiate into Ab-secreting plasma cells. Interestingly, memory B cells after Ag reactivation induce rapid effector function by memory Tfh cells establishing the close relationship between memory B cells and memory Tfh cells (Ise et al., 2014).

While the phenotype and function of memory B cells are well described, whether local and circulating memory Tfh cells are distinct phenotypically and functionally as well as whether these cell subsets are inter-connected remained unknown. Here, we have used different Ag models in which we can track Ag-specific T and B cells in C57BL/6 mice, and we show that local memory Tfh cells exhibit a more Tfh-polarized phenotype than the circulating memory Tfh cells. Local memory Tfh cells express high-affinity TCR and localize preferentially in B follicle at proximity of memory B cells. In parallel, local memory B cells form a homogeneous population programmed to become PC after Ag recall while circulating memory B cells form a heterogeneous population with cells capable of participating to CG. Notably, both memory Tfh cell subsets promote B cell response after Ag re-challenge. Interestingly, long-term pMHCII expression is observed at the surface of local memory B cells only. *In vivo* blocking of TCR-pMHCII interactions induces the release of local memory Tfh cells into the circulating compartment. Thus, this study reveals that memory Tfh cell anatomy is highly intertwined with memory B cells a finding that may, ultimately, have high impact for vaccine design.

## Résultats

### *Local memory Tfh cells have a more Tfh-polarized phenotype than their circulating counterparts*

Subcutaneous (sc) immunization with the peptide variant (EAWGALANKAVDKA, called hereafter 1W1K) of the I-E alpha chain immunodominant peptide 52-68 (Ea52-68) in incomplete Freund's adjuvant (IFA) together with the TLR9 agonist CpG favors robust Tfh-dependent B cell immunity (Chakarov and Fazilleau, 2014a). 1W1K-I-A<sup>b</sup> pMHCII tetramer staining together with cell surface expression of CD44 provided direct access to Ag-specific Th cells in both dLN and spleen of immunized C57BL/6 mice (Fig 1A). While Ag-driven cell expansion reached peak levels by day 7 post-immunization in the dLN (data not shown), there was a rapid contraction in the next three weeks followed by a stabilization phase that typically followed the resolution of the primary response (Fig 1A). In the spleen, the kinetics of the Th cell response was different with a higher proportion of 1W1K-specific Th cells at day 30 that stabilized over time. To assess the kinetics of the Tfh response, we analyzed the Th cells that were CD62L<sup>lo</sup> CXCR5<sup>+</sup> as a broad indicator of activated Th cells relocating to the T/B border (Fazilleau et al., 2009a). We found CXCR5<sup>+</sup> Th cells only in the dLN but not in the spleen at day 7 after immunization (Fig 1A). However, as previously described in the blood (He et al., 2013), CXCR5<sup>+</sup> Th cells circulated in the spleen of C57BL/6 mice from day 10 post-immunization (Fig 1A). Strikingly, by day 30 post-immunization, two stabilized populations of CXCR5<sup>+</sup> Th cells were found local in the dLN and circulating in the spleen (Fig 1A). Low levels of Ki-67 expression demonstrated that these cells were non-proliferating in contrast to their effector counterparts at day 7 in the dLN (Fig 1B). These results were confirmed by BrdU staining (Fig 1C). Overall, sc immunization allows the development of memory Tfh cells, with some cells remaining local in the dLN and some cells circulating in the spleen.

How these two memory CXCR5<sup>+</sup> Th cell subsets relate to specialized Tfh cells was not clear since their detection was based on CD62L down-regulation and CXCR5 expression. Therefore, we monitored intra-cellular expression of Bcl-6 as well as surface expression of molecules expressed by effector Tfh cells such as ICOS, PD-1 and CD69 (Crotty, 2011a, 2014). We found that dLN and spleen memory CXCR5<sup>+</sup> Th cells expressed higher levels of Bcl-6 than their CXCR5<sup>-</sup> Th cell counterparts (data not shown). However, expression levels of Bcl-6 were significantly lower in these memory CXCR5<sup>+</sup> Th cells as compared to effector Tfh cells (Fig 1D). This decrease was even more pronounced for spleen memory cells (Fig 1D). Further, Tfh cells in the dLN expressed higher level of ICOS than spleen memory Tfh cells, irrespective of whether they were effector or memory cells (Fig 1E). In addition, both dLN and spleen memory Tfh cell populations expressed CXCR5 and PD-1 but to a lower level than effector Tfh cells (data not shown and Fig 1G). Strikingly, as observed for Bcl-6, spleen memory Tfh cells expressed CXCR5 and PD-1 to a lower level than dLN memory Tfh cells (Fig 1F-G). Interestingly, these higher CXCR5 and PD-1 expression levels were also demonstrated for local memory Tfh cells in the spleen following intraperitoneal (ip) injection as compared to circulating memory Tfh cells in the spleen after sc immunization (Fig S1). Thus, the difference between dLN and spleen memory Tfh cells after sc immunization was not due to the lymphoid tissue itself but rather to the site of Ag entry. Finally, we monitored CD69 expression at the surface of the memory Tfh cells subsets. CD69 is rapidly up-regulated after activation and late CD69 expression can be seen at the surface of effector Tfh cells (Fazilleau et al., 2009b). Moreover, CD69 expression distinguishes tissue-resident memory T cells from circulating memory T cells in humans (Sathaliyawala et al., 2013). Here, we found that CD69 expression also persisted in the memory phase on the majority of memory Tfh cells in the dLN (Fig 1H). In contrast, almost no memory Tfh cells in the spleen were CD69<sup>+</sup>. Overall, local memory Tfh cells are CXCR5<sup>+</sup>Bcl-6<sup>+</sup>ICOS<sup>hi</sup>PD-1<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> while circulating

memory Tfh cells are CXCR5<sup>lo</sup>Bcl-6<sup>lo</sup>ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>lo</sup>CD69<sup>-</sup>. Notably, the memory Tfh cell subdivision was also observed after transfer of monoclonal TCR transgenic cells (Fig S2) and after intranasal infection using PR8 strain of influenza (Fig S3A-D). Thus, over a Tfh-dependent B cell responses, memory Tfh cells persist long-term *in vivo*. These memory Tfh cells can be subdivided in local memory cells in the draining lymphoid organ with a more Tfh-polarized phenotype than their circulating memory Tfh cell counterparts.

#### *Local memory Tfh cells are preferentially of high affinity*

To better decipher the subdivision of the memory Tfh cells, we first focused on the TCR repertoire of these cells. We found that spleen memory Tfh cells had a lower binding to pMHCII tetramer than their dLN counterparts (Fig 2A). This difference was not due to a decrease in TCR expression level as measured by the TCR $\beta$  gMFI (Fig 2A). Strikingly, this observation was also found after ip immunization in the draining spleen (Fig S1C) and in the draining mediastinal LN after intranasal influenza infection (Fig S3E). Thus, the TCR borne by local memory Tfh cells have greater capacities to bind their cognate ligand than the circulating memory Tfh cells.

We then quantified the dynamics of pMHCII tetramer staining as an assessment of TCR avidity. We first estimated the association of pMHCII tetramer to TCR at the surface of the different memory Tfh cells. Using optimal concentration of pMHCII tetramer, we varied the time of staining. While the pMHCII staining at the surface of spleen memory Tfh cells reached a gMFI superior or equal to 3930 after a labeling time of 23.8 minutes  $\pm$  3.5, dLN memory Tfh cells reached this same level with a statistically lower time (11.33 minutes  $\pm$  1.5; Fig 2B). Thus, TCR borne by local memory Tfh cells have faster binding to pMHCII. Further, we estimated the dissociation of pMHCII tetramer complexed with TCR at the surface of the different memory Tfh cell subsets (Fig 2C). Cells were stained as usual with PE-labeled

pMHCII tetramer and put in presence of APC-labeled pMHCII tetramer as a competitor for TCR complexing. No decay of the PE-labeled pMHCII labeling was observed for dLN memory Tfh cells while the decay was around 40%, thus greater, for the spleen memory Tfh cells (Fig 2C). Hence, TCR used by local memory Tfh cells have longer binding to pMHCII.

To assess the potential differences in TCR diversity, we studied the TCR repertoire of 1W1K-specific memory Tfh cells at the molecular level. We found that the V $\beta$ 14 gene segment was highly represented in both dLN and spleen memory Tfh cells at the message level by quantitative RT-PCR (Fig 2D) and at the protein level by flow cytometry (Fig 2E). Strikingly, the V $\beta$ 14 gene segment was more dominant in dLN than in spleen memory Tfh cells ( $51.56 \pm 2.60\%$  and  $16.38 \pm 3.04\%$  respectively;  $P > 0.01$ , Fig 2E). CDR3 $\beta$  length distribution for the V $\beta$ 14 gene segment was then estimated. While a bell-shaped curve characteristic of polyclonal repertoire was found in Th cells from a naïve mouse, an expansion of the V $\beta$ 14-J $\beta$ 1.6 rearrangement corresponding to a CDR3 of 8 amino-acids (aa) was observed in both dLN and spleen memory Tfh cells (Fig 2F). CDR3 $\beta$  sequencing was performed and showed that the majority of the clonal expansion corresponded to 3 different aa sequences (SDNYNSPL, RDRGDSPL, RVNYNSPL; Fig 2G). It is worth noticing that these aa sequences were encoded by different nucleotidic sequences, indicating the assortment for these rearrangements during the clonal selection. Other CDR3 $\beta$  sequences were also found but to a lower frequency and only in one of the memory Tfh cell subset. Overall, the dominant and public TCR repertoire borne by memory Tfh cells is similar between local and circulating cells. Anyhow, the public TCR repertoire is more abundant in the local pool, which results in higher avidity of the local memory Tfh cells as compared to the circulating memory Tfh cells.

*Local but not circulating memory Tfh cells are in proximity to B cells*

We next assessed chemokine receptor expression at the surface of the memory Tfh cells. As described above, we found that 1W1K-specific memory Tfh cells in the dLN expressed higher levels of CXCR5 than spleen memory Tfh cells (Fig 1E). In contrast, we found that spleen memory Tfh cells expressed higher levels of CCR7, the receptor of CCL19 and CCL21 (Fig 3A). We also monitored the expression of CXCR3 and CCR6, two chemokine receptors expressed by Tfh cells that generally associate with human Th1 and Th17 respectively (Morita et al., 2011). We found that neither dLN nor spleen memory Tfh cells expressed CCR6 (data not shown) but expressed CXCR3 with lower level for dLN cells (Fig 3B). Using OVA-specific TCR transgenic OT-II cell transfer, we detected by confocal microscopy 30 days after sc immunization the localization of local and circulating memory OT-II cells in the dLN and in the spleen respectively (Fig 3C). CD4<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> OT-II cell distribution in the different areas was quantified and demonstrated that memory OT-II cells were in great majority in the B follicle in the dLN and outside the B follicle in the spleen (Fig 3D). Altogether, our data suggest that local memory Tfh cells express chemokine receptors that allow their localization in B follicle at proximity of B cells while circulating memory Tfh cells remain mainly outside of the B follicle.

*Local memory B cells are preferentially of high-affinity and isotype-switched*

The interdependency between Tfh and B cells in the effector phase has been described in many reports, but this phenomenon in the memory phase remains unappreciated. We took advantage of the 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP)-OVA conjugated protein with which we can track Ag-specific B cells from immunized C57BL/6 mice by flow cytometry (Chakarov and Fazilleau, 2014a). We could detect NP-specific B220<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> cells in the dLN and in the spleen at day 30 after sc immunization (Fig 4A). These cells were memory cells

since they were CD38<sup>+</sup> (data not shown). Moreover, looking at the kinetics of the B cell response, we found GL-7<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> CG B cells in the dLN but not in the spleen thus the CG reaction occurred only locally in the dLN after sc immunization (Fig 4B). Strikingly, the CG reaction was ended by day 30 post-immunization since no GL-7<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> CG B cells were detected at this later time point (Fig 4B). Using gMFI of Ag binding at optimal labeling concentrations, we found that memory B cells in the dLN had a higher binding than their spleen counterparts (Fig 4C). Thus, BCR borne by local memory B cells have greater capacities to bind their cognate ligand than the circulating memory B cells.

Recent studies pointed to the existence of two dedicated memory B cell subsets with distinct functional capacities (Dogan et al., 2009; McHeyzer-Williams et al., 2015; Pape et al., 2011; Zuccarino-Catania et al., 2014). After re-exposure to Ag, the first cell subset enters predominantly in CG while the second one differentiates into effector cells. However, the surrogate markers of these two subtypes are still debated. They can either be distinguished by their pattern of immunoglobulin (Ig) isotype expression or by their expression of CD80 and PD-L2. IgM<sup>+</sup> and CD80<sup>-</sup> PD-L2<sup>-</sup> memory B cells remain plastic and rediversify in CG while isotype-switched and CD80<sup>+</sup> memory B cells become Ab-secreting effector PC. We thus investigated whether this heterogeneity could also be found between the local and circulating memory B cells. We observed that around 80% of the memory B cells in the dLN were mainly IgG2a/b<sup>+</sup>, reflecting the polarization due to IFA+CpG immunization (Fig 4D). In contrast, most of the memory B cells in the spleen were IgM<sup>+</sup> (Fig 4D). Moreover, the great majority of memory B cells in the dLN was CD80<sup>+</sup> while among memory B cells in the spleen around 30% were CD80<sup>-</sup> (Fig 4E) and PD-L2<sup>-</sup> (Fig 4F). Thus, based on their phenotype, local memory B cells form a homogenous population programmed to become PC after Ag boost while circulating memory B cells are more heterogeneous with some cells likely to rediversify in CG.

*Local memory Tfh cells promote early class-switch recombination after Ag boost*

To assess the functional consequences of the subdivision of the memory Tfh cells, we studied the cytokine production of these cells after activation. We immunized C57BL/6 mice with OVA in which naïve OT-II cells were transferred the day before. 30 days after sc immunization, dLN and spleen CD44<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> OT-II cells were purified and re-stimulated *in vitro*. As shown in Fig 5A, no differences were found between the two memory Tfh cell subsets for IL-2 and IL-4 RNA expression level. In contrast, spleen memory OT-II cells after activation expressed higher level of IFN- $\gamma$  and IL-21 mRNA than their dLN counterparts (Fig 5A). Since cytokine production is key for sustaining B cell response, we next estimated the B cell helper capacities of the two memory Tfh subsets. First, naïve B cells were stimulated with anti-IgM and loaded with OVA peptide. Stimulated B cells were co-cultured with purified dLN or spleen memory CD44<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> OT-II cells. We found that both subsets of memory OT-II cells induced similar secretion of IgM by the B cells (Fig 5B). However, Ig isotype-switch was only detected when dLN CXCR5<sup>+</sup> OT-II cells were present (Fig 5B). Thus, both local and circulating memory Tfh cells sustain IgM production *in vitro*. However, only the local memory Tfh cells allow early Ig class-switch recombination.

We further analyzed the *in vivo* helper capacities of these two subsets of memory Tfh cells. As described above, we purified dLN and spleen memory CD44<sup>+</sup> OT-II cells either CXCR5<sup>-</sup> or CXCR5<sup>+</sup> from day 30 sc immunized mice that we transferred into naïve C57BL/6 mice. The day after, recipient mice were ip immunized with NP-OVA and the NP-specific B cell response was monitored 5 days after. We found that both dLN and spleen memory CXCR5<sup>+</sup> OT-II cells promoted more NP-specific PC and more IgM secretion than their CXCR5<sup>-</sup> counterparts (Fig 5C). Thus, CXCR5 is a reliable marker to discriminate Tfh and non-Tfh cells even in the memory phase. Strikingly, the NP-specific PC response and the IgM

secretion were similar in mice transferred with dLN or spleen memory CXCR5<sup>+</sup> OT-II cells (Fig 5C). However, the frequency of isotype-switched (IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>) PC was far more important in mice receiving CD44<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> OT-II cells from dLN than from spleen (Fig 5D). Thus, local and circulating memory Tfh cells sustain the differentiation of naïve B cells into PC to the same level, but local memory Tfh cells promote more Ig class-switch recombination than their circulating counterparts *in vivo*.

One important question that has never been addressed is the functional outcome of memory Tfh/memory B cell interaction *in vivo* after Ag re-challenge. To address this point, we immunized C57BL/6 mice with NP-KLH to generate spleen NP-specific memory B cells either local or circulating after ip immunization or sc immunization respectively (Fig S4). These animals were then used as recipient mice in which, 30 days after immunization, dLN or spleen memory CXCR5<sup>+</sup> OT-II cells from day 30 sc immunized mice were transferred. The day after, NP-OVA was injected ip (Fig S4). We found that the frequencies of NP-specific B cells and PC were similar when local memory B cells were interacting with dLN or spleen memory CXCR5<sup>+</sup> OT-II cells (Fig 5E). Thus, local and circulating memory Tfh cells sustain the early B cell response of local memory B cells to the same extent. However, the quantity of high-affinity IgG was greater when memory CXCR5<sup>+</sup> OT-II cells were transferred from the dLN than from the spleen (Fig 5E). Thus, local memory Tfh cells sustain better the production of high-affinity IgG by local memory B cells. In contrast, the frequency of the NP-specific response was decreased when CXCR5<sup>+</sup>OT-II cells were transferred from the dLN in mice in which spleen NP-specific memory B cells were circulating (Fig 5F). Anyhow, the frequency of PC in NP-specific B cells and the production of high-affinity IgG were significantly greater in presence of dLN CXCR5<sup>+</sup> OT-II cells (Fig 5F). Thus, local memory Tfh cells sustain to a lower extent the early response of circulating memory B cells than circulating memory Tfh cells. However, local memory Tfh cells induce greater production of

high-affinity IgG. Overall, this series of experiment demonstrates that, *in vivo*, local and circulating memory Tfh cells sustain the early B cell response of naïve or memory B cells but with different end products. Moreover, local memory Tfh cells induce more Ig class-switch recombination and higher production of high-affinity IgG by memory B cells than the circulating memory Tfh cells.

#### *Circulating memory Tfh cells emerge from the pool of local memory Tfh cells*

To better understand whether local memory Tfh cells can exit or are all retained in the dLN, we treated immunized mice in the memory phase with FTY720, a Sphingosine 1-phosphate receptor (S1PR) agonist that inhibits migration of lymphocytes (Wei et al., 2005)(Fig 6A). After 7 days of treatment, there were substantially more memory Th cells in the dLN (Fig 6B). These memory Ag-specific Th cells expressed more CXCR5 (Fig 6C). Thus, there is an active release of cells from the pool of local memory cells that can be blocked after S1PR agonist treatment. Because local memory Tfh cells express CD69, bear high-affinity TCR and are preferentially localized in the B follicle, we reasoned that retention of memory Tfh cells in the dLN could result from a cognate interaction with memory B cells. To address this issue, we took advantage of Y-Ae, a mAb that specifically recognizes the pMHCII complex I-A<sup>b</sup>-E $\alpha$ 52-68 in C57BL/6 (Murphy et al., 1989). First, we found that only Ag-specific memory B cells from the dLN were Y-Ae<sup>+</sup> indicating that they were the only pMHCII<sup>+</sup> Ag-presenting cells in the memory phase (data not shown). Strikingly, this was observed only for dLN memory B cells that expressed surface IgG2a/b but not for dLN IgG2a/b<sup>-</sup> memory B cells or for spleen memory B cells (Fig 6D). Next, we treated E $\alpha$ 52-68-primed mice with Y-Ae and tested whether it impacted the localization of the different memory Tfh cells (Fig 6E and Fig S5). Y-Ae treatment led to a decrease of memory Tfh cells in the dLN that correlated with an increase of spleen memory Tfh cells. Thus, local memory

---

Tfh cells are retained in the dLN through a cognate interaction with pMHCII<sup>+</sup> memory B cells in the B follicle. Over time, some of the local memory Tfh cells are eventually released participating to the compartment of circulating memory Tfh cells such as the ones detected in the spleen.

## Discussion

In this study, we have collected evidence that the Ag-specific memory Tfh cell compartment can be subdivided in two distinct populations based on their localization. More precisely, some memory Tfh cells are found retained in the draining lymphoid organs in the B follicle at proximity of memory B cells. In contrast, other memory Tfh cells circulate in non-draining lymphoid organs such as the spleen after sc immunization and localize outside the B follicle. Furthermore, local memory Tfh cells have a more pronounced Tfh phenotype than their circulating counterparts while both memory cells are quiescent. A similar subdivision also exists in the memory B cell compartment. Local memory B cells form a homogeneous pool ready to become Ab-secreting effector PC after Ag-rechallenge while circulating memory B cells exhibit a phenotype indicating that they are more plastic and can rediversify in CG during a secondary response. Interestingly, we found that both local and circulating memory Tfh cell subsets sustain early B cell response after reactivation *in vivo* but exhibit different functions. Strikingly, long-term expression of pMHCII is detected at the surface of Ag-specific memory B cells but only in the draining lymphoid organs. Strikingly, if cognate TCR/pMHCII interactions are abrogated, the local memory Tfh pool shrinks while the circulating compartment expands. Overall, this study demonstrates how memory Tfh cells and memory B cells are intimately intertwined. It also reveals new depths in the systemic organization and maintenance of the memory B and T cell compartment with potentially high impact for vaccine design.

It is not unusual to divide immune memory based on the migration properties. Indeed, it has already been proposed that memory T cells can be categorized into central (TCM) and effector (TEM) memory subsets (Sallusto et al., 2004; Sallusto et al., 1999c). CD62L<sup>hi</sup> CCR7<sup>+</sup> TCM cells retain the capacity to re-circulate throughout lymphoid tissue while CD62L<sup>lo</sup> CCR7<sup>-</sup> TEM cells migrate to non-lymphoid sites and are programmed to induce inflammatory

responses *in situ* upon Ag re-exposure. Somehow surprising, we have shown that local memory Tfh cells express mainly the CD62L<sup>lo</sup> CCR7<sup>-</sup> TEM phenotype while they remain in lymphoid tissues, thus a localization associated to TCM. Despite this phenotypic difference, we propose that local memory Tfh cells could be categorized as TEM because they remain preferentially *in situ* in CXCL13-rich areas where they deliver their function. In contrast, circulating memory Tfh cells express higher levels of CCR7 and re-circulate in lymphoid organs so they could be categorized as TCM. It was originally proposed that the TCM/TEM division was established by differential strength of TCR-pMHCII interactions upon recruitment of T cells into the immune response (Lanzavecchia and Sallusto, 2001). In the context of Tfh cell biology, we previously described that naïve Th cells that express high-affinity TCR become preferentially effector Tfh cells (Fazilleau et al., 2009b). Here, despite very similar public TCR repertoire, we have demonstrated that local memory Tfh cells express TCR with higher affinity than the circulating memory Tfh cells. As such, our findings parallel other studies that also showed these differences in TCR affinity when comparing resident vs circulating effector Th cells or memory Th cells (Fazilleau et al., 2007; Ugur et al., 2014). Notably, this subdivision in localization and higher binding of the Ag-receptor to its cognate ligand was also observed for memory B cells.

The subdivision of memory Th cells relies on their localization, but whether it has biological consequences remained unknown. We have been able to show that the phenotype of both memory Tfh subsets is different. More precisely, local memory Tfh cells exhibit a more polarized phenotype than their circulating counterparts. Indeed, local memory Tfh cells express higher levels of CXCR5, ICOS and PD-1 that correlate with higher level of Bcl-6. Because Bcl-6 expression is not stable and requires continuous reinforcement (Baumjohann et al., 2013), this difference in Bcl-6 expression levels could reflect the fact that local memory Tfh cells express CD69, bear high-affinity TCR and are in close contact with pMHCII<sup>+</sup>

memory B cells. Still, the Bcl-6 expression levels are lower to the ones found for effector Tfh cells, which is in accordance with previous studies showing that a cell, after leaving a CG, acquires a less Tfh-polarized phenotype and Bcl-6 expression is reduced (Choi et al., 2013a; Kitano et al., 2011; Liu et al., 2012b). Unlike MHCI-restricted CD8 T cells, it is now clear that Th cells require persistent Ag to achieve maximal expansion *in vivo* (Celli et al., 2005). There is also evidence for pMHCII expression with detectable impact on Th cells after viral infection (Jelley-Gibbs et al., 2005) or after protein immunization (Ugur et al., 2014). Hence, we reasoned that pMHCII expression could trap local memory Tfh cells that would eventually result in their more Tfh-polarized phenotype as compared to circulating memory Tfh cells. We indeed detected pMHCII at the surface of local memory B cells only. Moreover, *in vivo* blocking of pMHCII/TCR interactions correlated with the release of local memory Tfh cells into the circulating compartment. Taken together our studies therefore suggest that pMHCII depots could act as a local mechanism that shapes the TCR repertoire of memory Tfh cells such as cells bearing high-affinity TCR are retained and those with lower affinities are released. The competition between memory Tfh cells for pMHCII/TCR cognate interaction would participate to this phenomenon since only few pMHCII<sup>+</sup> B cells can be found in the memory phase. While Ag is not required for the maintenance of immune memory (Lau et al., 1994; Maruyama et al., 2000; Swain et al., 1999), we propose that it is important for the correct placement of memory Tfh cells in proximity to memory B cells in the B follicles of the lymphoid site draining initial Ag entry and for the release of circulating memory Tfh cells. In favor of this hypothesis, a very recent study showed that Rituximab treatment resulted in a lack of naïve and CG B cells in human lymph nodes without affecting the Tfh cell populations (Wallin et al., 2014). Thus, Tfh cells do not require an on-going CG response for their maintenance. However, what the authors also showed is that Rituximab treatment had no effect on the pool of memory B cells thus confirming that memory Tfh cell/memory B cell

interactions control the maintenance of the pool of memory lymphocytes.

While our work focused on the phenotype and function of memory Tfh cells, we also studied the phenotype of memory B cells. We found that memory B cell phenotype can also be categorized based on their localization. Local memory B cells form a homogeneous population, bear class-switched Ig and express a phenotype that likely programs them to rapidly become Ab-secreting PC after Ag re-exposure. In contrast, circulating memory B cells bear mainly IgM and form a heterogeneous population phenotypically, with around one third of these cells that potentially has the capacity to rediversify in CG. We further tested the functional outcome of these phenotypic differences. Using cell transfer, we were able to address *in vivo* how local and circulating memory Tfh cells regulate the early B cell response of naïve and memory B cells. We comprehensively demonstrated that both subsets of memory Tfh cells have the capacity to sustain an emerging or a secondary B cell response to a level that is far higher than their CXCR5<sup>-</sup> counterparts. Strikingly, local memory Tfh cells promote more Ig class-switch. In contrast, circulating memory Tfh cells secrete more IFN- $\gamma$  and IL-21. Circulating memory Tfh cells are also PD-1<sup>lo</sup>CXCR3<sup>+</sup> and are localized outside of the B follicle. This mostly parallels findings showing that circulating memory PD-1<sup>lo</sup>CXCR3<sup>+</sup> Tfh cells in human blood have strong B cell helper capacities (Locci et al., 2013b). It was shown very recently that secondary CG participates to the improvement of B cell response (McHeyzer-Williams et al., 2015). We therefore propose that given the fact that circulating B cell memory is more plastic, this organization would ultimately enhance durable immune protection. One other interesting finding was that this subdivision is not peculiar to protein vaccination but was also observed after virus infection such as Influenza PR8 intranasal infection. Altogether, our studies therefore emphasize how the systemic memory T and B cell compartment is organized to efficiently protect against a similar or related Ag that primed in the first place this memory pool.

One other question raised by our studies is how this memory anatomy develops. Published observations favor an early programming during the immune response to obtain this organization. Asymmetric segregation during T lymphocyte proliferation after activation would lead to different cell fates (Chang et al., 2007). Moreover, a comprehensive analysis of Th cell response over the primary and memory responses in LN demonstrated the requirement for co-stimulation at the original priming for the development of effective memory responses (MacLeod et al., 2006). In addition, effector Tfh cells develop only locally in the draining lymphoid organs (Fazilleau et al., 2007). Finally, He and colleagues showed that circulating CCR7<sup>lo</sup>PD-1<sup>hi</sup>CXCR5<sup>+</sup> Th cells are generated early during Tfh differentiation and participate to the emergence of the memory pool (He et al., 2013). Here, we show that the development of the memory compartment is not only programmed early but is a long-term process, and demonstrated that local and circulating memory Tfh cells are inter-connected. Importantly, this process could be critical for effective protein vaccination and required to promote a rapid and robust secondary response to the vaccine boost. In this manner, as local pMHCII expression would decline with time, the local and circulating Tfh compartment would also decay.

In summary, our results clearly indicate that memory Tfh and B cells are intimately connected. In the draining lymphoid organs, both memory Tfh and B cells interact in the B follicle to form a pool that serves as a reservoir. Over time, some cells are released from this pool and participate to the circulating memory compartment. This circulating population is highly effective and plastic allowing the possibility to these cells to rapidly react and adapt to Ag re-exposure. Overall, this specific memory anatomy would ultimately allow a better immune protection. Hence, creating and boosting local Ag depots and/or enhancing memory Tfh cell compartment by addition of CpG, the TLR9 agonist, to the vaccine emulsion (Chakarov and Fazilleau, 2014a) become important mechanisms for controlling local

immunity and, more importantly, regulating the systemic and highly protective memory compartment.

## **Materials and Methods**

### **Mice**

C57BL/6 (CD45.2<sup>+</sup>) mice were purchased from Centre d'Élevage Janvier (Genest Saint Isle, France). OT-II (CD45.2<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup>) TCR transgenic mice and TE $\alpha$  TCR transgenic mice expressing CFP under the actin promoter (TE $\alpha$ -CFP) were bred in UMS006. Only females of 8-12 weeks of age were used for experimental procedures. All experiments were performed in accordance with national and European regulations and institutional guidelines. Mouse experimental protocols were approved by the local ethics committee (Regional approval N°311155523, ethical review N° MP/19/58/06/12).

### **Immunization and reagents**

IFA, Sigma Adjuvant System (SAS) and OVA were from Sigma-Aldrich. CpG (5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3) was from Miltenyi Biotec. 1W1K (EAWGALANKAVDKA), E $\alpha$ 52-68 (ASFEAQGALANIAVDKA), E $\alpha$ 52-68-OVA from Genecust. NP-OVA and NP-KLH from Biosearch Technologies. Mice were either immunized sc at the base of tail or ip with 40  $\mu$ g of peptide 1W1K, 100  $\mu$ g of OVA, NP-OVA or NP-KLH in the indicated adjuvant. FTY720 was used at the concentration of 10mg/kg (Cayman Chemical).

### ***In vitro* culture**

Cell cultures were set up in a medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 10 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin (from Life Technologies BRL Life Technologies) in 24- or 96-well flat-bottom culture plates in a final volume of 1 ml and 250  $\mu$ l, respectively. Supernatants were collected to perform Mouse Immunoglobulin Isotyping flowcytomix experiment following manufacturers' protocol (eBioscience).

## **ELISA**

ELISA plates (Thermo scientific) were coated with 10 µg/ml NP15-BSA (Biosearch Technologies Inc). NP-specific IgM and IgG were detected in plasma from blood by ELISA as described elsewhere (Chakarov and Fazilleau, 2014a).

## **RNA extraction and cDNA synthesis**

RNA was isolated with the RNeasy Mini Kit (Quiagen). cDNA was reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative PCR amplifications were performed using TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and were performed on the LightCycler 480 (Roche Applied Science).

## **Immunoscope analyses**

PCR were conducted in 50 µl on 1/50 of the cDNA with 2 U of Taq polymerase (Promega) in the supplier's buffer. cDNA was amplified using Vβ-specific sense primers and antisense primers hybridizing in Cβ segments. Amplified products were then used as template for an elongation reaction with fluorescent-tagged oligonucleotides (run-off reactions).

## **Cloning and sequencing of TCRBV rearrangements**

TOPO Blunt cloning kit (Invitrogen Life Technologies) is used. PCR amplification was performed on cloned bacteria and was followed by a second step of elongation using an ABI PRISM Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems). Sequencing products were then read on 16 capillaries (Genetic Analyzer; Applied Biosystems).

### Flow cytometry analysis and cell sorting

Cell suspensions were prepared in PBS/2% FCS, 5mM EDTA. For Ag-specific Th and B cells analysis, organs were dissociated, filtered and treated with 2.4G2 for 10 minutes. To track antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells, cells were incubated with PE-1W1K-IA<sup>b</sup> tetramer (7 µg/ml) and APC anti-CXCR5 (Miltenyi Biotec) for 2 hours at room temperature. The tetramer 1W1K-IA<sup>b</sup> is obtained from NIH Tetramer core facility. To track antigen-specific B cells were stained for 60 minutes with NP-PE (Biosearch Technologies Inc) or OVA-Alexa488 (Invitrogen) at a final concentration of 1 µg/mL. After tetramer or NP-PE staining, cells were washed and then incubated on ice for 45 min with fluorophore (or biotin)-labeled mAbs. The following mAbs purchased from BD Biosciences were used: anti-Bcl-6, anti-CCR7, anti-CD69, anti-CXCR3, anti-IgM, anti-IgG2a/b, anti-Vβ14, anti-TCRβ, anti-Ki67, anti-BrdU, anti-CD138, anti-CXCR5 anti-CD45.1, anti-CD4, anti-CD8α, anti-CD95. The following mAbs purchased from eBioscience were used: anti-B220, anti-CD4, anti-Ly-6C, anti-GL-7, anti-CD62L, anti-CD44, anti-CCR6, anti-IgD, anti-ICOS, anti-PD-1, anti-CD80, anti-PDL-2 and biotin-Y-Ae. The cells were then suspended with Fixable Viability Dye eFluor450 or eFluor660 (eBioscience) for dead cells exclusion. For intracellular staining cell suspensions were fixed and permabilized using BD Fixation/Permeabilization kit. Data were collected on a BD LSRII™ or on a BD LSRII/Fortessa (BD Biosciences) and analysed using FlowJo software (Tree Star). To generate antigen-specific memory T cells, 1-2 x 10<sup>5</sup> naive OT-II or TEα T cells were transferred intravenously (iv) into C57BL/6 mice, followed by sc immunization with either OVA protein or Ea52-68 peptide. At day 30 post-immunization, mice were sacrificed; dLN (inguinal and periaortic) and spleen were harvested for sorting of local and circulating memory Tfh cells respectively using FACSARIA-SORP (BD Biosciences).

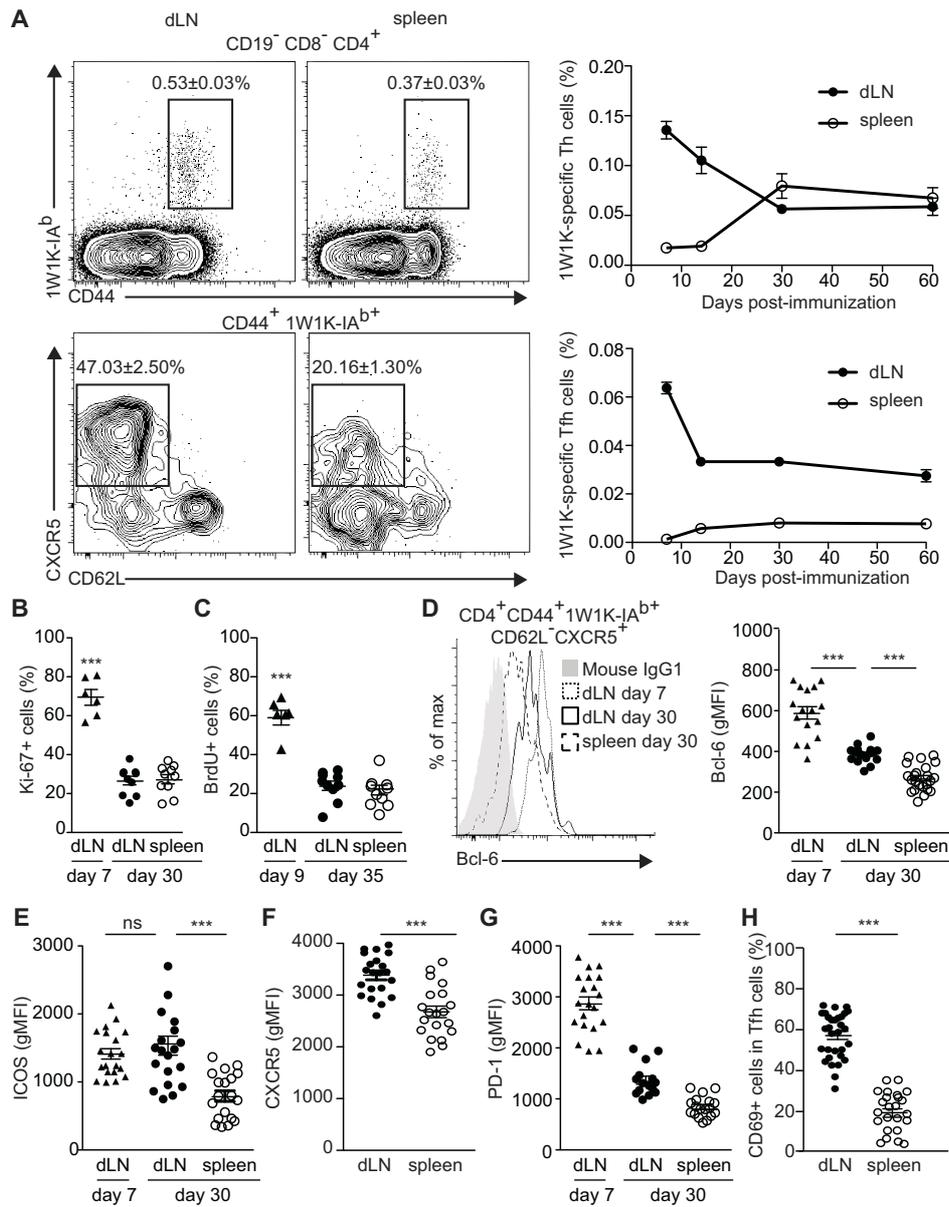
### **Immunofluorescence**

dLN and spleen were harvested into PLP buffer (0.05M phosphate buffer containing 0.2ml-lysine [pH 7.4], 2 mg/ml NaIO<sub>4</sub>, 10 mg/ml paraformaldehyde), fixed overnight and dehydrated in 30% sucrose prior to embedding in OCT freezing media (Sakura Finetek). 10 mm frozen sections were cut on a CM1950 Cryostat. Sections were stained in PBS (0.01% Triton X-100 and 5% goat serum) using the following Abs: anti-B220 and anti-CD4 (eBioscience), CD45.1 (BD Biosciences). Images were acquired on a Apotome ZEISS Inv. Regions and cells were defined with IMARIS image analysis software.

### **Statistical analysis**

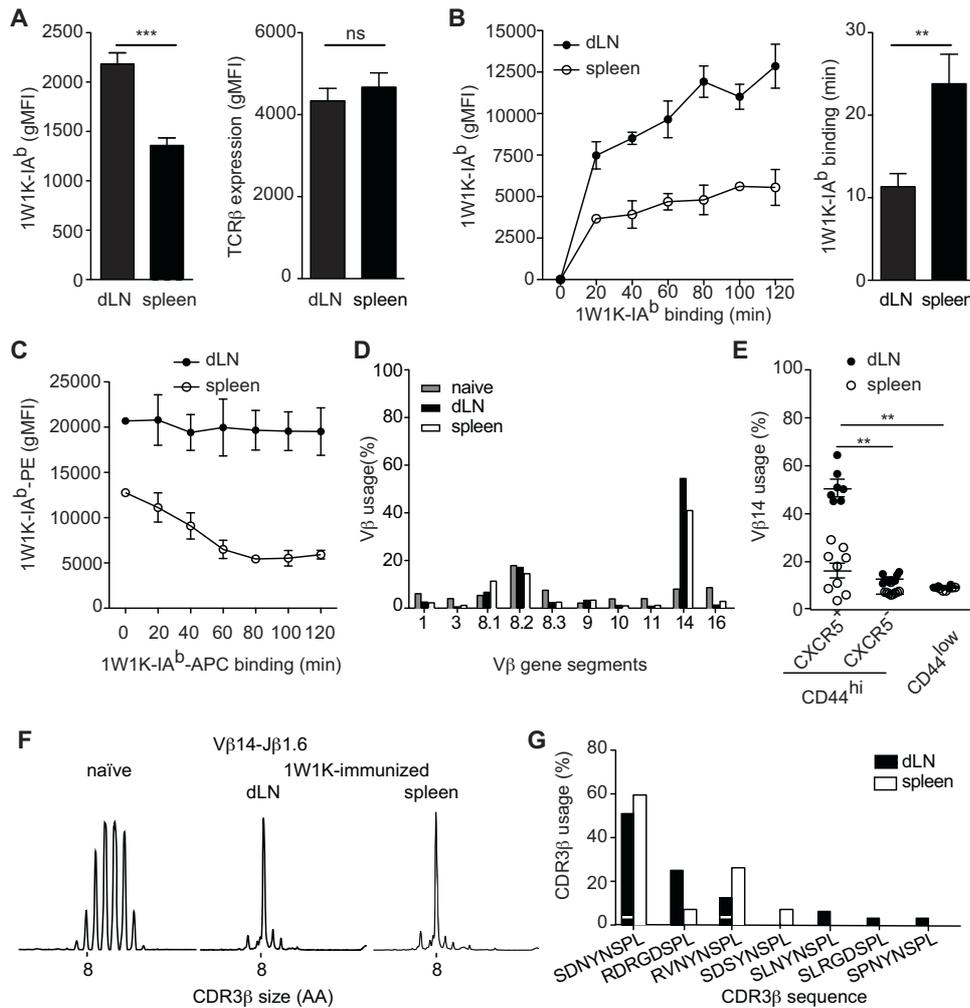
Differences between variables were evaluated using the non-parametric Mann-Whitney test. All statistical analyses were carried out with Prism 4.0 software (GraphPad). *p*-values less than 0.05 were considered statistically different.

Figures



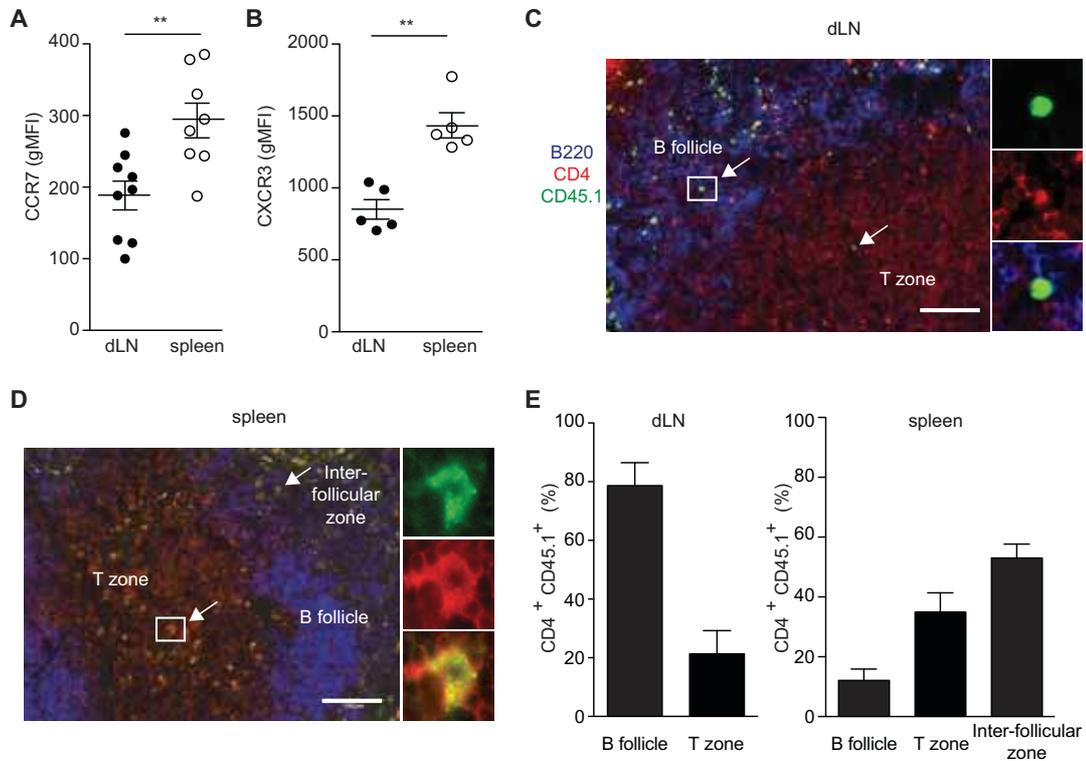
**Figure 1: Tracking local and circulating 1W1K-specific memory Tfh cells**

30 days after sc immunization with 40µg of 1W1K in IFA+CpG, dLN and spleen were analyzed for the detection of 1W1K-specific activated CD4<sup>+</sup> T cells (1W1K-IA<sup>b</sup>CD44<sup>+</sup>) (A, top) and 1W1K-specific Tfh cells (CXCR5<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) (A, bottom)(mean±SEM, n≥22). Kinetics of 1W1K-specific Th cells and 1W1K-specific Tfh cells are shown (A, right; mean±SEM, n= 5/ time point). Intracellular expression of Ki-67 among 1W1K-specific Tfh cells at day 7 and day 30 post-immunization (B). Day 27 or day 1 post-immunization, mice were injected ip with BrdU or PBS every 48h for 1 week. Frequency of BrdU<sup>+</sup> among 1W1K-specific Tfh cells (C). Expression level of Bcl-6, ICOS CXCR5 and PD-1 by 1W1K-specific memory Tfh cells as compared to 1W1K-specific effector Tfh cells (D-G). Frequency of CD69<sup>+</sup> cells among 1W1K-specific memory Tfh cells (H). Each dot represents an individual mouse; horizontal lines denote the mean value of groups and SEM (B, C, D, E, F, G, H). Data are representative of three (B, C) or five (A, D, E, F, G, H) independent experiments. ns, non significant; \*\*\*P<0.001.



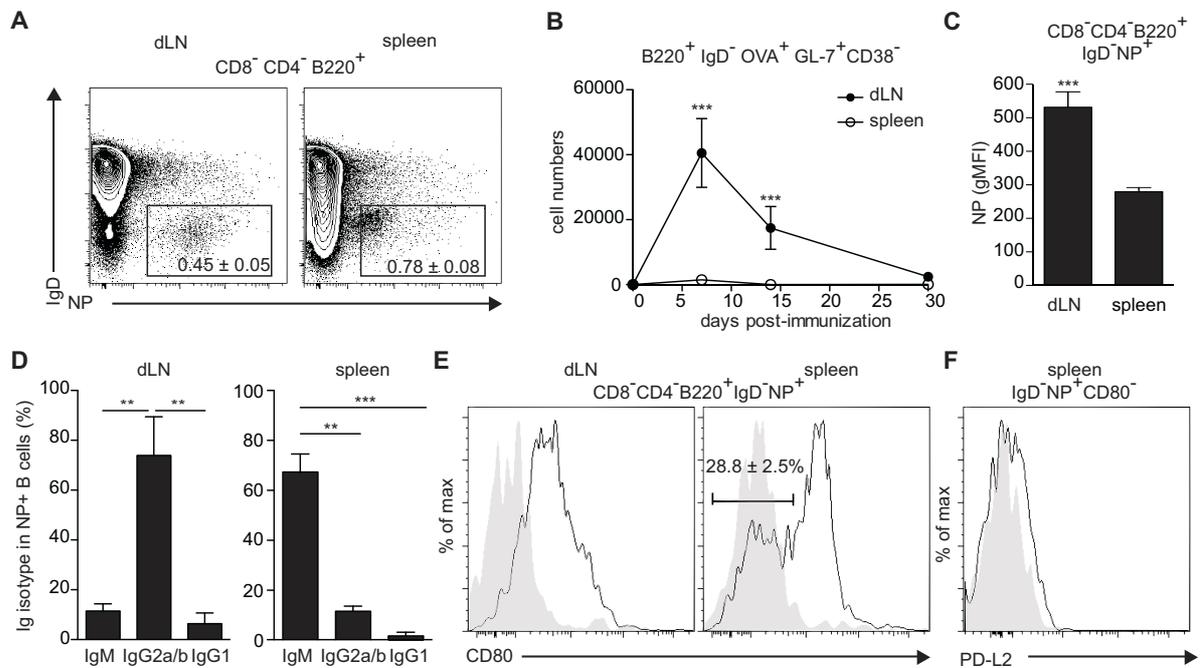
**Figure 2: Local 1W1K-specific memory Tfh cells bear high-affinity TCR**

gMFI of 1W1K-IA<sup>b</sup> tetramer and TCRβ staining at the surface of dLN and spleen 1W1K-specific memory Tfh cells (1W1K-IA<sup>b</sup>CD44<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) at day 30 post-immunization (A; mean±SEM, n≥22). gMFI of 1W1K-IA<sup>b</sup> tetramer staining at the surface of day 30 1W1K-specific memory Tfh cells after staining with varying times of pMHCII tetramer (B, left; mean±SEM, n≥ 4/time point). Estimated mean of time of pMHCII tetramer staining in minutes for each subset to reach a gMFI of 3930 is also depicted (B, right; mean±SEM, n≥4). Decay of PE-1W1K-IA<sup>b</sup> tetramer staining at the surface of day 30 1W1K-specific memory Tfh cells after staining with optimal concentration and time of PE-MHCII tetramer and after addition with varying times of APC-pMHCII tetramer (C, mean±SEM, n=5). Frequency of Vβ14 by flow cytometry among 1W1K-specific CD44<sup>hi</sup> CXCR5<sup>+</sup> or CXCR5<sup>-</sup> as compared to CD44<sup>low</sup>CD4<sup>+</sup> T cells. Each dot represents an individual mouse; horizontal lines denote the mean value of groups and SEM (D). Vβ usage by quantitative RT-PCR from naïve Th cells or day 30 dLN and spleen 1W1K-specific memory Tfh cells purified and pooled from 20 immunized mice (E). CDR3β length distribution for Vβ14-Jβ1.6 rearrangement from naïve CD4<sup>+</sup> T cells or day 30 dLN and spleen 1W1K-specific memory Tfh cells purified and pooled from 20 immunized mice (F). Usage of the different CDR3β amino-acid sequences. A white stripe on the black bar separates the different nucleotidic sequences among unique amino-acid sequence. Data are representative of at least three independent experiments. ns, non significant; \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001.



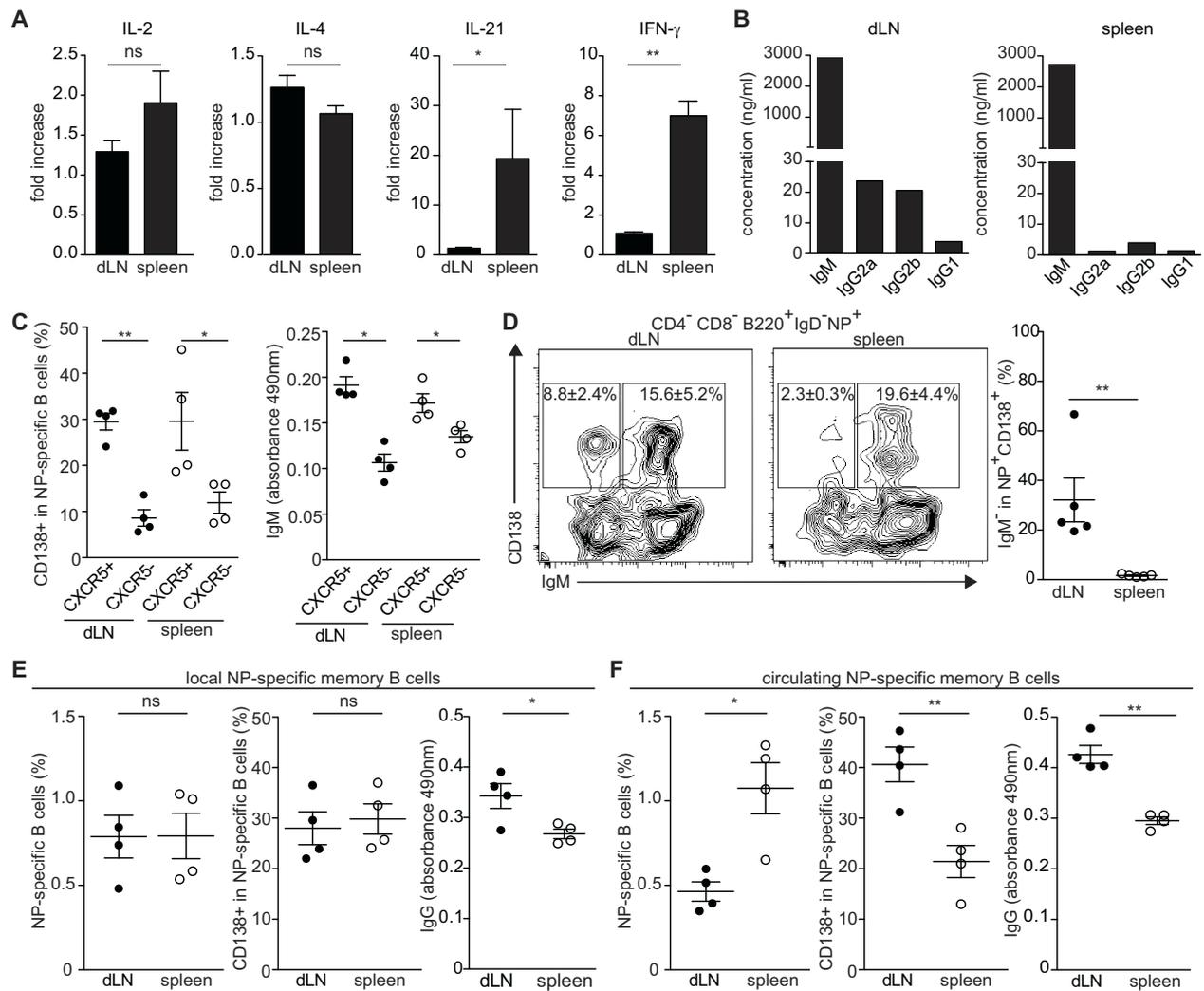
**Figure 3: Local 1W1K-specific memory Tfh cells localize preferentially in the B cell follicle**

30 days after sc immunization with 40 $\mu$ g of 1W1K in IFA+CpG, dLN and spleen 1W1K-specific memory Tfh cells (1W1K-IA<sup>b</sup>CD44<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) were analyzed for CCR7 (A) and CXCR3 (B). Each dot represents an individual mouse; horizontal lines denote the mean value of groups and SEM. 10<sup>6</sup> naïve CD4<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> OT-II cells were injected iv into C57BL/6 mice that were sc immunized the day after with OVA in SAS. 30 days after, confocal microscopy studies of dLN and spleen were performed using anti-B220 (blue), anti-CD4 (red) and anti-CD45.1 (green) mAb. Localization of CD4<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> cells in B follicle (B220<sup>+</sup>), T zone (CD4<sup>+</sup>) and inter-follicular zone is highlighted (C, dLN; D, Spleen; scale bar, 100 $\mu$ m). CD4<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> cell distribution in the different areas was quantified using IMARIS (E). Data are representative of at least three independent experiments. \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.



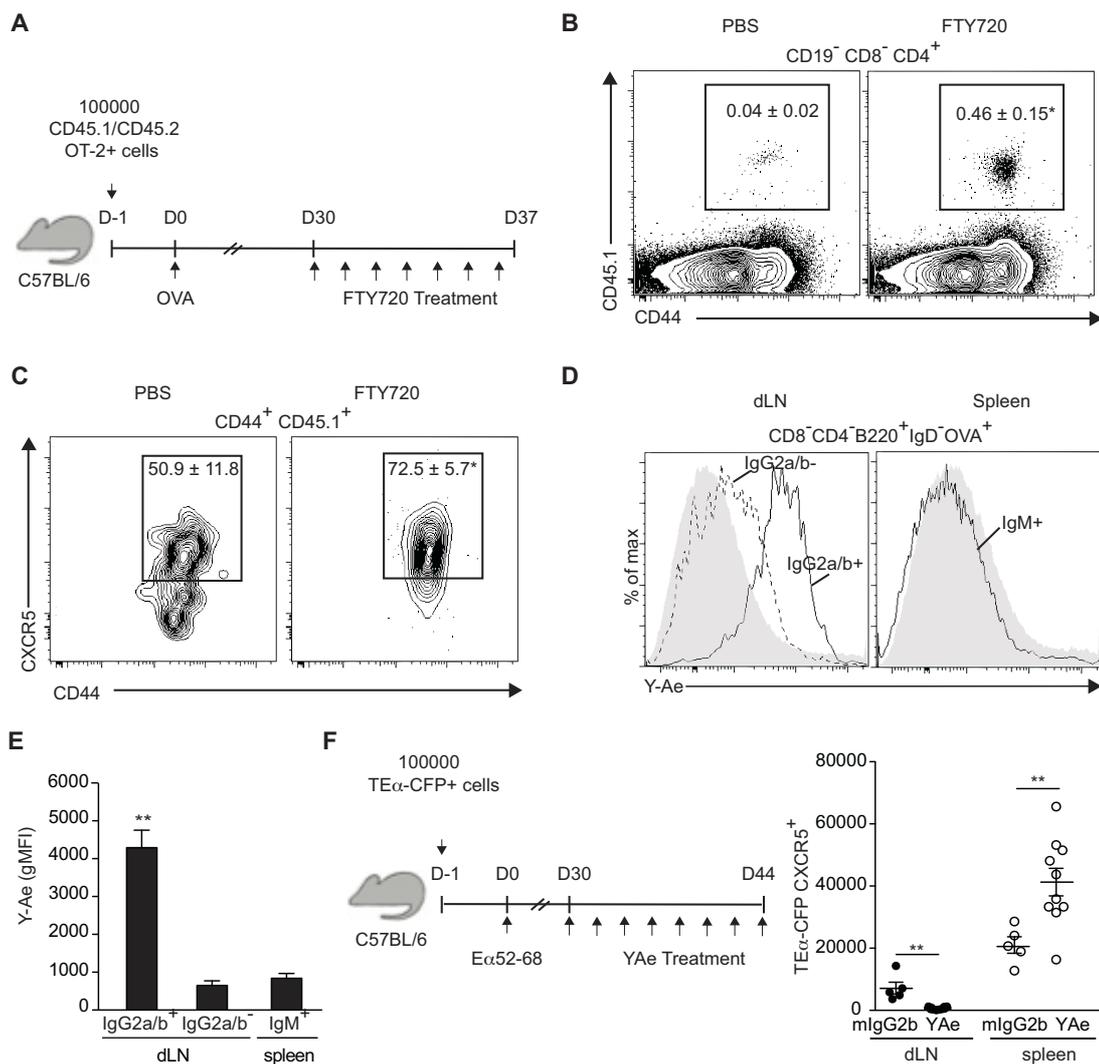
**Figure 4: Tracking local and circulating Ag-specific memory B cells**

C57BL/6 mice were immunized sc with  $100 \mu g$  NP-OVA in IFA+CpG. Dot plots of NP-specific B cells at day 30 post-immunization in the dLN and in the spleen (A; mean $\pm$ SEM,  $n=5$ ). Dynamics of OVA-specific  $IgD^- CD38^- GL-7^+$  B cells after immunization (B; mean $\pm$ SEM,  $n \geq 4$ /time point). Geometric mean fluorescence intensity (gMFI) of NP staining among  $B220^+ IgD^- NP^+$  B cells at day 30 post-immunization (C; mean $\pm$ SEM,  $n=5$ ). Ig isotype distribution among  $B220^+ IgD^- NP^+$  B cells at day 30 post-immunization (D; mean $\pm$ SEM,  $n \geq 4$ ). CD80 expression at the surface of dLN and spleen  $B220^+ IgD^- NP^+$  B cells (E; mean $\pm$ SEM,  $n=5$ ) and of PDL-2 (F) at the surface of spleen  $B220^+ IgD^- NP^+ CD80^-$  B cells at day 30 post-immunization. Histograms in grey represent isotype controls. Data are representative of at least three independent experiments. \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .



**Figure 5: Local memory Tfh cells are more potent to induce Ig isotype-switch of naïve and memory B cells**

C57BL/6 mice were transferred iv with  $10^5$  purified CD4<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> naïve OT-II cells and sc immunized 24h later with OVA in IFA/CpG. 30 days after, dLN and spleen CD4<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>OT-II cells were purified, stimulated *in vitro* with anti-CD3/CD28 beads. 48h later cells were collected and their RNA was extracted and retro-transcribed into cDNA. qPCR were then performed to evaluate the transcript level (A; mean±SEM, n=4). Naïve B cells were stimulated with anti-IgM F(ab)<sub>2</sub> for 24h and loaded with OVA peptide. Then, cells were co-cultured at ratio 1:1 with sorted dLN or spleen memory CD4<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>OT-II cells prepared as described in A. 5 days later, culture supernatants were collected to perform flowcytomix experiment. Concentrations of the different Ig are presented (B).  $10^4$  dLN or spleen CD4<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>OT-II cells from day 30 sc immunized mice were transferred into naïve mice (C-D) or into mice previously immunized 30 days before with NP-KLH in SAS either ip (E) or sc (F). Then, mice were ip immunized with NP-OVA. 5 days after, sera of mice were collected to perform ELISA and spleens were analyzed by flow cytometry. Each dot represents an individual mouse; horizontal lines denote the mean value of groups and SEM (C, D, E, F). Data are representative of at least three independent experiments. ns, non significant; \*P<0.05; \*\*P<0.01



**Figure 6: Local and circulating Ag-specific memory Tfh cells are interconnected.**

$10^5$  CD4<sup>+</sup> naïve OT-II were injected iv into C57BL/6 mice that were immunized with OVA in IFA/CpG the day after. 30 days post-immunization, mice were iv treated daily for 7 days with FTY720 (10mg/kg) or PBS as control. Scheme of the experimental setup (A) and analysis of OVA-specific activated CD4<sup>+</sup> T cells (CD45.1<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) (B) and OVA-specific Tfh cells (CXCR5<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) (C) (mean±SEM,  $n \geq 5$ ). Histograms representing Y-Ae expression at the surface of IgG2a/b<sup>+</sup> or IgG2a/b<sup>-</sup> B220<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>OVA<sup>+</sup> B cells in the dLN and at the surface of IgM<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>OVA<sup>+</sup> B cells in the spleen 30 post-immunization with Ea52-68-OVA in IFA+CpG. As control mice were immunized with OVA alone (gray histograms) (D). gMFI of Y-Ae staining presented in B (E, mean±SEM,  $n=5$ ).  $10^5$  CD4<sup>+</sup> naïve TEα-CFP were injected iv into C57BL/6 mice that were immunized with Ea52-68 in IFA/CpG the day after. 30 days post-immunization, mice were treated every two days for 14 days with Y-Ae or a mIgG2b isotype control. Scheme of the experimental setup (left) and number of CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CFP<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> TEα cells in dLN and spleen are depicted (F). Each dot represents an individual mouse; horizontal lines denote the mean value of groups and SEM. Data are representative of at least three independent experiments. ns, non significant; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ . See also Figure S5.

Supplementary Figures

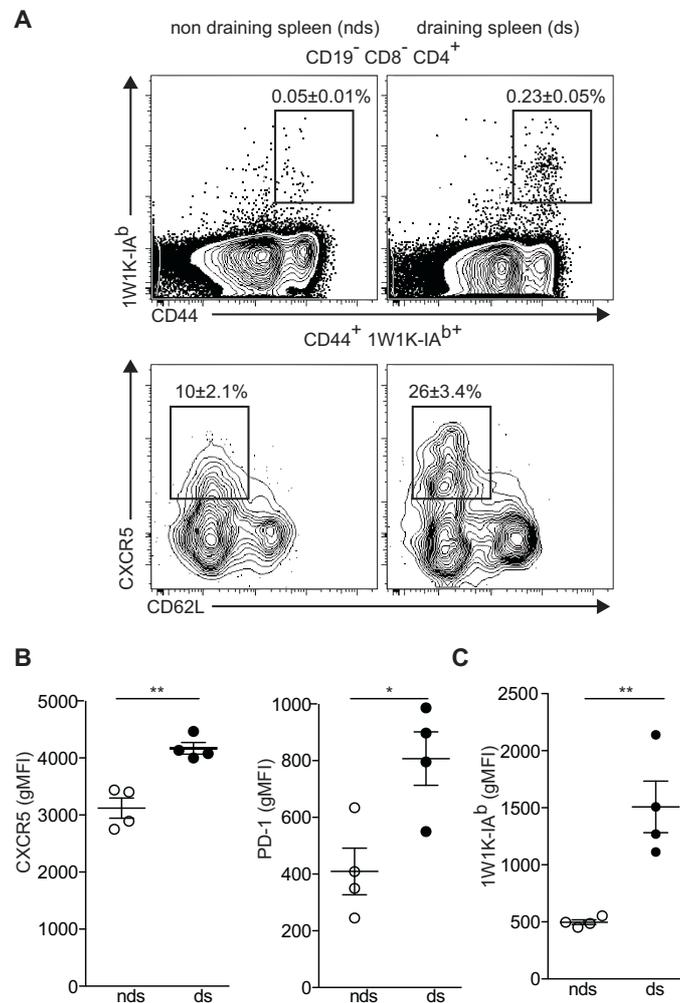
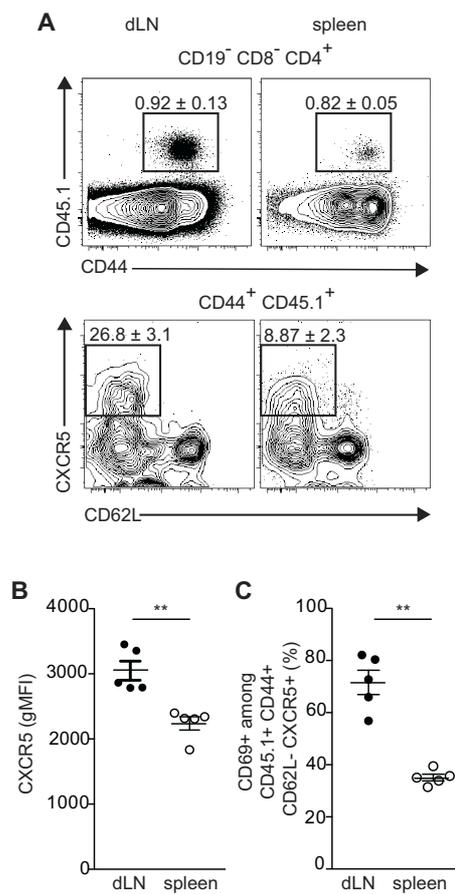


Figure S1, related to Figure 1

**Local 1W1K-specific memory Tfh cells in the spleen after intraperitoneal immunization.**

30 days after sc or ip immunization with 1W1K in SAS, non draining spleen from sc-immunized mice (nds) and draining spleen from ip-injected mice (ds) were analyzed for the detection of 1W1K-specific Th cells (1W1K-IAb+CD44+) (A, top) and 1W1K-specific Tfh cells (CXCR5+CD62L-) (A, bottom) (mean±SEM, n=5). (B) gMFI of CXCR5 and PD-1 staining and of 1W1K-IAb tetramer staining (C) at the surface of nds and ds 1W1K-specific memory Tfh cells at day 30 post-immunization.

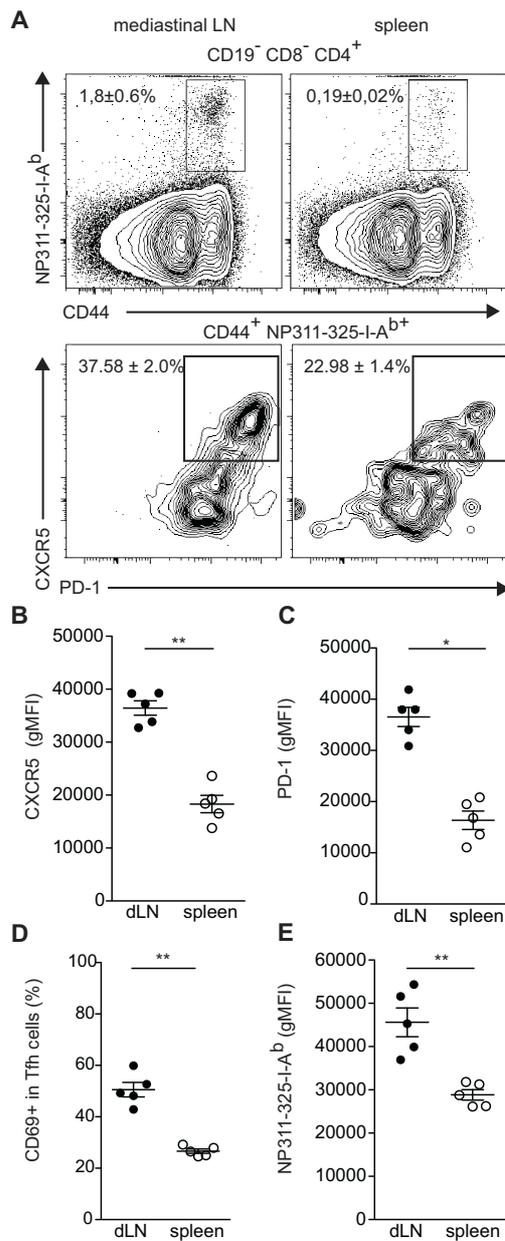
\*P<0.05; \*\*P<0.01



**Figure S2, related to Figure 1**

**Local and circulating OVA-specific memory Tfh cells after transfer of naive OT-2 cells.**

C57BL/6 mice were transferred iv with 100000 purified CD4<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> naive OT-2 cells and sc immunized 24h later with OVA in IFA/CpG. 30 days after, dLN and spleen were analyzed for the detection of OVA-specific Th cells (CD45.1<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) and OVA-specific Tfh cells (CXCR5<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) (A) (mean±SEM, n=5). CXCR5 expression at the surface of OVA-specific memory Tfh cells (B) and frequency of CD69<sup>+</sup> in OVA-specific Tfh cells (C). \*\*P<0.01



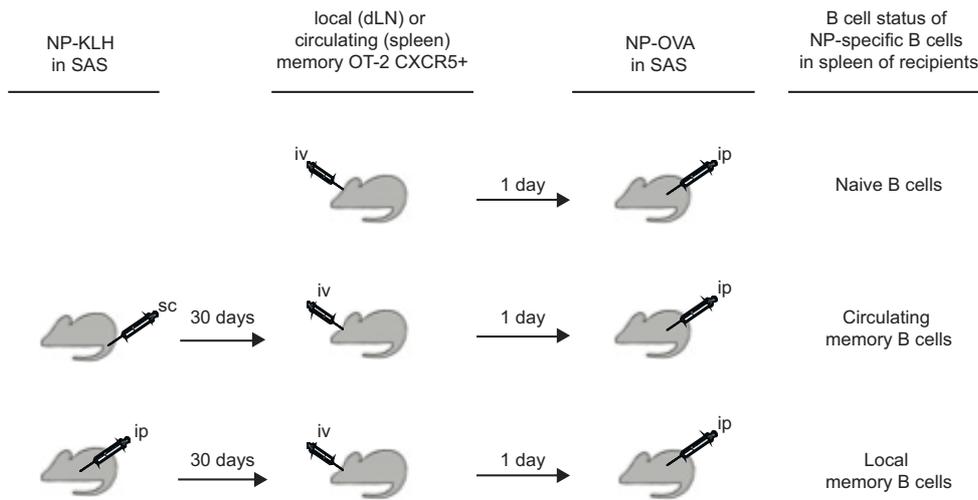
**Figure S3, related to Figure 1**

**Local and circulating Ag-specific memory Tfh cells after influenza infection**

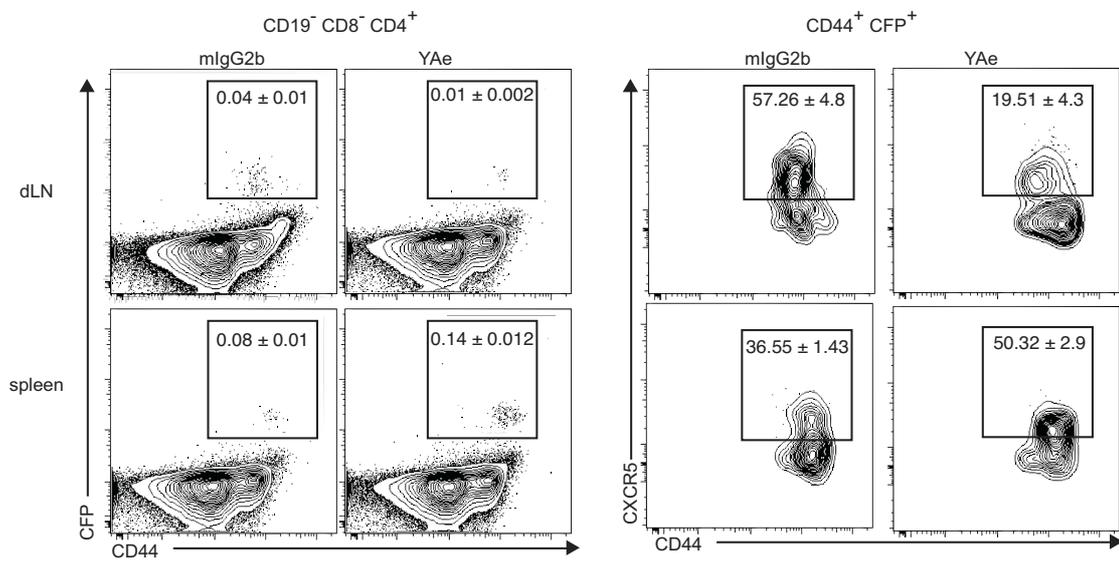
45 days after intranasal infection with PR8 virus (MLD50 =1), mediastinal dLN and spleen were analyzed for the detection of NP311-325-specific Th cells (NP311-325-I-Ab<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>) (A, top) and Tfh cells (CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>) (A, bottom) (mean±SEM, n=5).

gMFI of CXCR5 (B), gMFI of PD-1 (C), frequency of CD69 (D) and gMFI of NP311-325-I-Ab<sup>+</sup> tetramer staining (E) among NP311-325-specific Tfh cells

\*P<0.05; \*\*P<0.01



**Figure S4, related to Figure 5:**  
**Experimental scheme of *in vivo* transfer and immunization**  
 sc, subcutaneous; iv, intravenously; ip, intraperitoneally.



**Figure S5, related to Figure 6**

**Local and circulating Ag-specific memory Tfh cells are interconnected.**

After treatment with mlgG2b isotype control or Y-Ae (see the scheme of the experimental setup Fig6F), dLN and spleen were analyzed for the detection of CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CFP<sup>+</sup> TE $\alpha$  specific activated CD4<sup>+</sup> T cells (CFP<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) (B, top) and E $\alpha$ 52-68-specific Tfh cells (CXCR5<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) (bottom) (mean $\pm$ SEM, n $\geq$ 5).

## References and Notes

1. Fazilleau, N., et al., *Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(7): p. 753-61.
2. Crotty, S., *T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease*. *Immunity*, 2014. **41**(4): p. 529-542.
3. Fazilleau, N., et al., *Follicular helper T cells: lineage and location*. *Immunity*, 2009. **30**(3): p. 324-35.
4. Crotty, S., *Follicular Helper CD4 T Cells (T(FH))*. *Annual Review of Immunology*, 2011. **29**: p. 621-663.
5. Nurieva, R.I., et al., *Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages*. *Immunity*, 2008. **29**(1): p. 138-49.
6. Haynes, N.M., et al., *Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation*. *J Immunol*, 2007. **179**(8): p. 5099-108.
7. Bryant, V.L., et al., *Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells*. *J Immunol*, 2007. **179**(12): p. 8180-90.
8. Kuchen, S., et al., *Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration*. *J Immunol*, 2007. **179**(9): p. 5886-96.
9. Linterman, M.A., et al., *IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses*. *J Exp Med*, 2010. **207**(2): p. 353-63.
10. Zotos, D., et al., *IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism*. *J Exp Med*, 2010. **207**(2): p. 365-78.
11. Reinhardt, R.L., H.E. Liang, and R.M. Locksley, *Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(4): p. 385-93.
12. Hsu, H.C., et al., *Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(2): p. 166-75.
13. Johnston, R.J., et al., *Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation*. *Science*, 2009. **325**(5943): p. 1006-1010.
14. Linterman, M.A., et al., *Roquin differentiates the specialized functions of duplicated T cell costimulatory receptor genes CD28 and ICOS*. *Immunity*, 2009. **30**(2): p. 228-41.
15. Rasheed, A.U., et al., *Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(7): p. 1892-903.
16. Weber, J.P., F. Fuhrmann, and A. Hutloff, *T follicular helper cells survive as long-term memory cells*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(8): p. 1981-8.
17. Luthje, K., et al., *The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(5): p. 491-8.
18. Hale, J.S., et al., *Distinct Memory CD4 T Cells with Commitment to T Follicular Helper- and T Helper 1-Cell Lineages Are Generated after Acute Viral Infection*. *Immunity*, 2013. **38**(4): p. 805-17.
19. Chevalier, N., et al., *CXCR5 Expressing Human Central Memory CD4 T Cells and Their Relevance for Humoral Immune Responses*. *Journal of Immunology*, 2011. **186**(10): p. 5556-68.

20. Morita, R., et al., *Human Blood CXCR5(+)/CD4(+) T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion*. *Immunity*, 2011. **34**(1): p. 108-21.
21. Locci, M., et al., *Human Circulating PD-1/CXCR3/CXCR5 Memory Tfh Cells Are Highly Functional and Correlate with Broadly Neutralizing HIV Antibody Responses*. *Immunity*, 2013. **39**(4): p. 758-69.
22. Bentebibel, S.E., et al., *Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(176): p. 176ra32.
23. Liu, X., et al., *Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo*. *J Exp Med*, 2012. **209**(10): p. 1841-52.
24. He, J., et al., *Circulating Precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T Cells Indicate Tfh Cell Activity and Promote Antibody Responses upon Antigen Reexposure*. *Immunity*, 2013. **39**(4): p. 770-81.
25. Kitano, M., et al., *Bcl6 Protein Expression Shapes Pre-Germinal Center B Cell Dynamics and Follicular Helper T Cell Heterogeneity*. *Immunity*, 2011. **34**(6): p. 961-972.
26. Choi, Y.S., et al., *Bcl6 Expressing Follicular Helper CD4 T Cells Are Fate Committed Early and Have the Capacity To Form Memory*. *J Immunol*, 2013. **190**(8): p. 4014-26.
27. Yusuf, I., et al., *Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150)*. *J Immunol*, 2010. **185**(1): p. 190-202.
28. Iyer, S.S., et al., *Identification of novel markers for mouse CD4 T follicular helper cells*. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(12): p. 3219-32.
29. Ugur, M., et al., *Resident CD4+ T cells accumulate in lymphoid organs after prolonged antigen exposure*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 4821.
30. Baumjohann, D., et al., *Persistent Antigen and Germinal Center B Cells Sustain T Follicular Helper Cell Responses and Phenotype*. *Immunity*, 2013. **38**(3): p. 596-605.
31. Forster, R., et al., *Expression of the G-protein--coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells*. *Blood*, 1994. **84**(3): p. 830-40.
32. Dogan, I., et al., *Multiple layers of B cell memory with different effector functions*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(12): p. 1292-9.
33. Pape, K.A., et al., *Different B Cell Populations Mediate Early and Late Memory During an Endogenous Immune Response*. *Science*, 2011. **331**(6021): p. 1203-7.
34. Zuccarino-Catania, G.V., et al., *CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(7): p. 631-7.
35. McHeyzer-Williams, L.J., et al., *Class-switched memory B cells remodel BCRs within secondary germinal centers*. *Nat Immunol*, 2015. **16**(3): p. 296-305.
36. Ise, W., et al., *Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression by memory follicular helper T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(32): p. 11792-7.
37. Chakarov, S. and N. Fazilleau, *Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation*. *EMBO Mol Med*, 2014. **6**: p. 590-603.
38. Fazilleau, N., et al., *The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(4): p. 375-84.
39. Sathaliyawala, T., et al., *Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets*. *Immunity*, 2013. **38**(1): p. 187-97.

40. Wei, S.H., et al., *Sphingosine 1-phosphate type 1 receptor agonism inhibits transendothelial migration of medullary T cells to lymphatic sinuses*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(12): p. 1228-35.
41. Murphy, D.B., et al., *A novel MHC class II epitope expressed in thymic medulla but not cortex*. *Nature*, 1989. **338**: p. 765-768.
42. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. *Nature*, 1999. **410**(6754): p. 708-712.
43. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 745-63.
44. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(6): p. 487-92.
45. Choi, Y.S., et al., *Cutting Edge: STAT1 Is Required for IL-6-Mediated Bcl6 Induction for Early Follicular Helper Cell Differentiation*. *J Immunol*, 2013. **190**(7): p. 3049-53.
46. Celli, S., Z. Garcia, and P. Bousso, *CD4 T cells integrate signals delivered during successive DC encounters in vivo*. *J Exp Med*, 2005. **202**(9): p. 1271-8.
47. Jelley-Gibbs, D.M., et al., *Unexpected prolonged presentation of influenza antigens promotes CD4 T cell memory generation*. *J Exp Med*, 2005. **202**(5): p. 697-706.
48. Lau, L.L., et al., *Cytotoxic T-cell memory without antigen*. *Nature*, 1994. **369**(6482): p. 648-52.
49. Maruyama, M., K.P. Lam, and K. Rajewsky, *Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen*. *Nature*, 2000. **407**(6804): p. 636-42.
50. Swain, S.L., H. Hu, and G. Huston, *Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors*. *Science*, 1999. **286**(5443): p. 1381-3.
51. Wallin, E.F., et al., *Human T follicular helper and T follicular regulatory cell maintenance is independent of germinal centers*. *Blood*, 2014. **124**(17): p. 2666-74.
52. Chang, J.T., et al., *Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses*. *Science*, 2007. **315**(5819): p. 1687-91.
53. MacLeod, M., et al., *CD4 memory T cells survive and proliferate but fail to differentiate in the absence of CD40*. *J Exp Med*, 2006. **203**(4): p. 897-906.

## II / Les T<sub>FH</sub> mémoires de la MO

Des études ont pu montrer, en utilisant un modèle de transfert adoptif de LT CD4 SMARTA spécifiques pour le peptide immunodominant de la glycoprotéine (GP<sub>61-80</sub>) du virus LCMV, l'existence d'une population de LT CD4 mémoires capable de se nicher au niveau de la MO dans les phases tardives après infection. Dans cette étude, les auteurs ont montré que ces LT CD4 sont quiescents et de phénotype CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> et qu'ils se situent préférentiellement à proximité de cellules stromales productrices d'IL-7 nécessaire à leur survie. Au niveau fonctionnel, ces cellules induisent efficacement la maturation d'affinité d'Ac des cellules B activées par le même Ag (Tokoyoda et al., 2009). Même si cette étude ne l'a pas encore démontré, les auteurs suggèrent que les réactions immunes secondaires ont lieu au niveau des OLII ce qui implique que ces cellules doivent être réactivées et mobilisées de la MO, vraisemblablement par l'immuno-surveillance d'APC professionnelles (Tokoyoda et al., 2009) (Okhrimenko et al., 2014) (Sercan Alp et al., 2015) (Hanazawa et al., 2013).

La grande différence au niveau expérimental qui distingue notre étude de celle de Tokoyoda et al, est que nous n'avons pas utilisé de système transgénique pour la caractérisation de ces populations de T<sub>FH</sub> mémoires. Comme pour l'étude décrite auparavant nous avons choisi un modèle de vaccination protéique de souris sauvage ayant un répertoire polyclonal. Malgré la fréquence faible des précurseurs Ag spécifiques, nous avons pu optimiser nos marquages et réaliser une caractérisation phénotypique des populations de LT CD4 mémoires spécifiques de l'Ag dans la MO.

Afin de mesurer la dynamique d'apparition des LT CD4 mémoires spécifiques à l'Ag au sein de la MO, nous avons tout d'abord commencé par évaluer l'évolution dans le temps des T<sub>FH</sub> mémoires spécifique à l'Ag au niveau des NL drainants et de la rate durant la phase mémoire plusieurs mois après immunisation (de j30 à j120) (Figure 19). Nous avons montré que de j30 à j120 post-immunisation, le pourcentage de T<sub>FH</sub> mémoires locales spécifiques à l'Ag diminuent et qu'au contraire une population de phénotype moins polarisé (CXCR5<sup>lo</sup>PD-1<sup>lo</sup>) s'y accumule. Toutefois globalement au niveau des NL drainants on retrouve une diminution du pourcentage et du nombre absolu de LT CD4 spécifique à l'Ag. Cependant, au niveau de la rate, le compartiment de T<sub>FH</sub> mémoires circulant reste assez constant ainsi que plus globalement le pourcentage de LT CD4 spécifiques à l'Ag. Concernant à présent la MO, de façon intéressante nous voyons une apparition ainsi qu'une accumulation à des temps plus tardifs, avec un pic à j90, des LT CD4 spécifiques à l'Ag (Figure 20A). Au niveau phénotypique nous avons d'une part observé que les T<sub>FH</sub> mémoires locales et circulantes

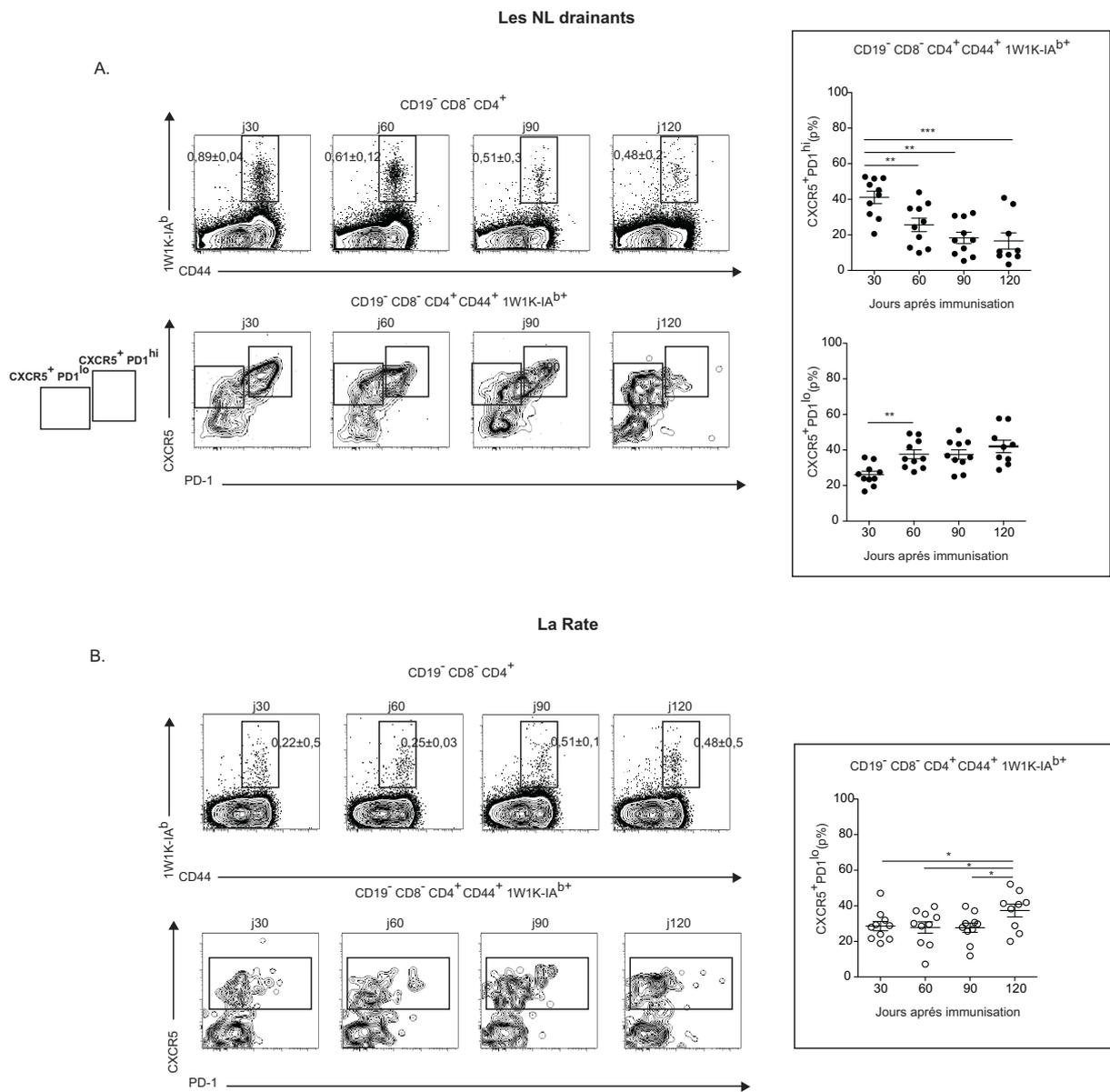
n'expriment pas Ly6C. Ainsi, Ly6C semble être un marqueur spécifiquement exprimé par les LT CD4 mémoires de la MO (Figure 20B).

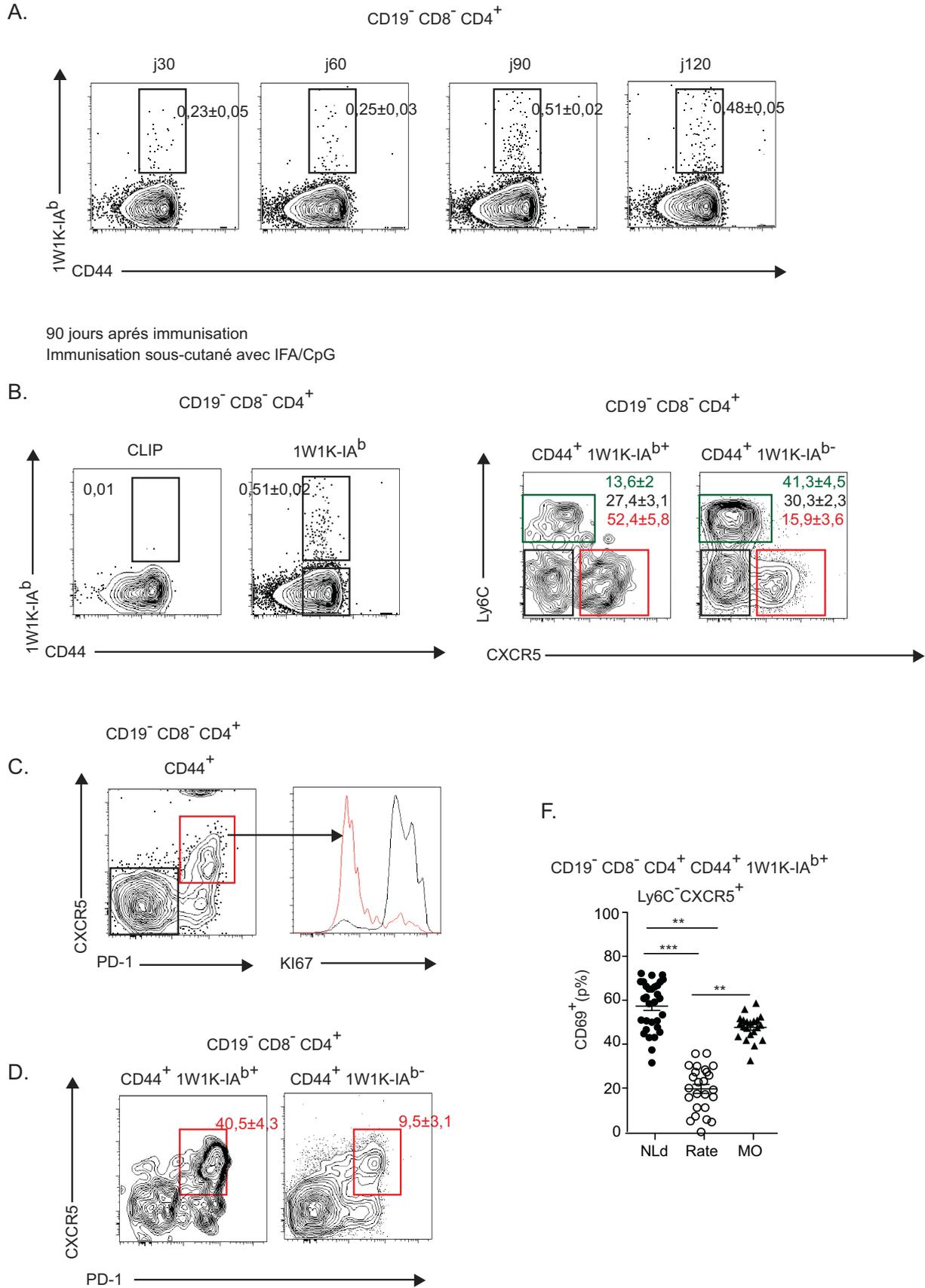
Toutefois dans les travaux de Tokoyoda et ses collègues, l'analyse de l'expression de marqueurs phénotypes caractéristiques des  $T_{FH}$  tels que CXCR5 ou encore PD-1, dont le niveau d'expression nous permet notamment de distinguer les  $T_{FH}$  mémoires locales des circulantes, n'a pas été réalisée. De façon surprenante, nous avons mis en évidence pour la première fois, qu'au sein des LT CD4 mémoires spécifiques à l'Ag, il existe une population de LT CD4 mémoires quiescentes (KI67<sup>-</sup>) qui expriment les marqueurs caractéristiques des  $T_{FH}$  avec le phénotype suivant : CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> et CD69<sup>+</sup> (Figure 20C-F). Phénotypiquement ces populations présentent de nombreuses ressemblances comparées à leurs homologues au niveau des NL drainants. En effet, les niveaux d'expression de CXCR5 et PD-1 sont significativement plus élevés que pour les  $T_{FH}$  mémoires circulantes retrouvées au niveau de la rate. Cependant, et tout comme décrit dans la littérature, des populations de LT CD4 mémoires spécifiques à l'Ag exprimant Ly6C sont aussi retrouvées mais toutefois l'expression de Ly6C n'est jamais corrélée avec l'expression de CXCR5 et PD-1 (Figure 20B et D). Une analyse comparative au niveau transcriptomique, en se basant sur l'expression de transcrit de FT et de protéines de surface, est en cours de réalisation et s'effectuera entre différentes populations de LT CD4 mémoires spécifiques à l'Ag. Etant limité par la fréquence rare de nos populations spécifiques à l'Ag, nous avons choisi la technologie de Fluidigm sur cellule individuelle (single-cell) qui à l'avantage de nécessiter peu de matériel. Les gènes que nous ciblerons interviennent dans le développement, la différenciation et/ou le maintien des  $T_{FH}$  (Figure 21). En effet, nous ciblerons des gènes impliqués dans la différenciation des  $T_{FH}$  (ex : Bcl6, Blimp1, Plgl1, cMaf, ascl2, STAT1, SAP). Enfin, nous nous intéresserons aussi à évaluer le niveau d'expression de gènes impliqués dans la localisation (ex: CXCR5, CCR7, CXCL13), le maintien et/ou la survie des  $T_{FH}$  (ex : CD69, S1P1, IL-7R) (Figure 21).

Par ailleurs, nous avons des résultats préliminaires qui suggèrent que les LT CD4 mémoires Ly6C<sup>+</sup> et les LT CD4 mémoires CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> pourraient se localiser dans des endroits différents. En effet, les cellules Ly6C<sup>+</sup> présentent des niveaux d'expression significativement plus élevée d' IL7r suggérant une proximité plus importante avec les cellules stromales (IL7<sup>+</sup>). L'expression de CXCR4 est en cours d'évaluation. De plus des marquages sur coupes histologiques de MO sont en cours pour évaluer la localisation de ces cellules ainsi que leur proximité avec les plasmocytes à longue durée. Du point de vue fonctionnel, nous testerons *in vivo* par transfert adoptif et *ex vivo* par stimulation et mise en

culture avec des LB pré-activés, la capacité d'aide aux LB ainsi que la nature des cytokines sécrétées.

En conclusion, nos travaux ont permis pour la première fois d'identifier, au niveau de la MO, une population qui présente un phénotype proche des T<sub>FH</sub> mémoires locales des NL drainants. Les expériences en cours permettront d'affiner les connaissances sur le phénotype et la fonction de ces cellules, ainsi que la relation que ces cellules ont avec les plasmocytes à longue durée de vie, ainsi qu'avec les populations de T<sub>FH</sub> mémoires locales et circulantes que nous avons pu caractériser dans le même modèle expérimental.





**Figure 20 : Dynamique et Caractérisation phénotypique des LT CD4 spécifiques à l'Ag de la MO.**

1	Gapdh	Housekeeping gene
2	b2M	Housekeeping gene
3	Cd4	T cell marker
4	Cd19	B cell marker
5	CD44	T cell marker
6	CD62L	T cell marker
7	Cd3e	T cell marker
8	Bcl-6	Transcription factor
9	Prdm1 (Blimp1)	Transcription factor
10	Vdr	Transcription factor
11	Plagl1	Transcription factor
12	Foxo1	Transcription factor
13	Foxo3	Transcription factor
14	Ascl2	Transcription factor
15	Etv1	Transcription factor
16	Rorc	Transcription factor
17	Rora	Transcription factor
18	Tbx21 (T-Bet)	Transcription factor
19	Gata3	Transcription factor
20	c-maf	Transcription factor
21	Foxp3	Transcription factor
22	Stat1	Transcription factor
23	Stat3	Transcription factor
24	Stat4	Transcription factor
25	Stat5	Transcription factor
26	Stat6	Transcription factor
27	Batf	Transcription factor
28	Ikzf2 (Helios)	Transcription factor
29	Irf4	Transcription factor
30	Vav1	Transcription factor
31	Rc3h1 (roquin)	Transcription factor
32	Itch	Transcription factor
33	Plen	Transcription factor
34	Pou2af1	Transcription factor
35	Traf3	Transcription factor
36	Hes5	Transcription factor
37	Zwap70	Transcription factor
38	Cxcr3	Chemokine Receptor
39	Cxcr4	Chemokine Receptor
40	Cxcr5	Chemokine Receptor
41	Ccr6	Chemokine Receptor
42	Ccr7	Chemokine Receptor
43	S1pr1	Chemokine Receptor
44	S1pr2	Chemokine Receptor
46	Pdcd1 (PD1)	Costim molecule
47	Sh2d1a (SAP)	Costim molecule
48	Cd40lg	Costim molecule
49	CD28	Costim molecule
50	Tnfrsf4 (OX40)	Costim molecule
51	Cd84	Costim molecule
52	Slamf1 (CD150)	Costim molecule
53	Slamf6 (Ly108)	Costim molecule
54	Cd200	Surface molecule
55	Tnfrsf18 (GITR)	Surface molecule
56	TIGIT	Surface molecule
57	Ctla4	Surface molecule
58	Fcrl4 (FR4)	Surface molecule
59	Nt5e (CD73)	Surface molecule
60	P2rx7	Surface molecule
61	Tnfrsf13b (BLYS)	Surface molecule
62	Gpr183 (Ebi2)	Surface molecule
63	Tnfrsf8 (Cd30l)	Surface molecule
64	Cd69	Surface molecule
65	Ly6C	Surface molecule
66	Nrp1	Surface molecule
67	Btla	Surface molecule
68	Fas-L	Surface molecule
69	Tfrc (CD71)	Surface molecule
70	LAG3	Surface molecule
71	Ly6A (Sca1)	Surface molecule
72	Tnfrsf1a (TNFR2)	Surface molecule
73	CD274 (PDL1)	Surface molecule
74	Il2	Cytokine/Receptor
75	Il21	Cytokine/Receptor
76	Il21r	Cytokine/Receptor
77	Il2ra (CD25)	Cytokine/Receptor
78	Il2rb	Cytokine/Receptor
79	Il2rg	Cytokine/Receptor
80	Il7r	Cytokine/Receptor
81	Il6ra	Cytokine/Receptor
82	Il6st (gp130)	Cytokine/Receptor
83	Il4	Cytokine/Receptor
84	Ifng	Cytokine/Receptor
85	Il17a	Cytokine/Receptor
86	Il17f	Cytokine/Receptor
87	Il10	Cytokine/Receptor
89	Ebi3	Cytokine/Receptor
90	p28 (IL-27)	Cytokine/Receptor
91	p35 (IL-35)	Cytokine/Receptor
88	Vb14-Cb	T cell Receptor
92	Entpd1 (CD39)	Enzyme
93	Sostdc1	Enzyme

Figure 21 : Liste des 93 gènes testés avec la technologie du Fluidigm

## *DISCUSSION ET PERSPECTIVES*

## 1/ La Classification des $T_{FH}$ mémoires spécifiques à l'Ag.

Suite à l'élimination d'un agent pathogène, la majorité (souvent 90 à 95%) des cellules T effectrices meurent laissant derrière elles un compartiment hétérogène de cellules mémoires. Il y a plus d'une décennie maintenant que le concept de mémoire systémique a été redéfini par la division des cellules mémoires circulantes en deux sous-ensembles distincts sur la base de : leurs fonctions effectrices, leurs capacités de prolifération et de migration (Sallusto et al., 1999b). Les  $LT_{CM}$  sont restreints aux tissus lymphoïdes secondaires et le sang alors que les  $LT_{EM}$  migrent principalement entre les tissus périphériques, le sang et la rate. A ces populations dites circulantes, vient se rajouter récemment l'identification de  $LT_{RM}$  qui représente le compartiment résident au niveau des tissus périphériques.

Le concept d'immuno-surveillance qui consiste à admettre que les LT naïfs ou mémoires recirculent en permanence dans l'organisme tels des sentinelles dans l'objectif de scanner les APC à la recherche d'Ag spécifique doit être repensé. Ainsi, l'immuno-surveillance pour les LT mémoires ne s'accompagne pas nécessairement par une capacité recirculatoire permanente. En effet, un autre moyen, pour le LT mémoire, d'augmenter la probabilité de rencontrer l'Ag en question est de rester localisé au niveau des OL drainant « le chemin infectieux » habituellement emprunté par le pathogène (mode d'infection : sang, muqueuses, voie respiratoire, tube digestif etc) où la probabilité de rencontrer le même Ag en cas de réponse secondaire est grande. Autrement dit on pourrait désigner ce nouveau concept « d'immuno-surveillance localisée ».

Nos travaux ont permis de mettre en évidence l'hétérogénéité des  $T_{FH}$  mémoires qui présente des similitudes avec les répartitions décrites précédemment. En effet, les  $T_{FH}$  mémoires peuvent aussi se diviser en deux grands compartiments: Les  $T_{FH}$  mémoires circulantes (tout comme les  $T_{EM}$  et  $T_{CM}$ ) et les  $T_{FH}$  mémoires résidentes (similaires au  $T_{RM}$ ).

- Les  $T_{FH}$  mémoires circulantes ( $T_C$ ) peuvent être retrouvées au niveau du sang, de la rate mais étant  $CD62L^-$  elles ne semblent pas avoir la capacité de re-circuler au niveau des OLII drainants et non drainants, ni dans les tissus périphériques.
- Pour ce qui concerne les  $T_{FH}$  mémoires résidentes nous pouvons les subdiviser en deux sous-catégories :

=> Celles qui restent localisées au sein de l'OL où elles se sont développées et où elles vont exercer leur fonctions: les « T<sub>FH</sub> mémoires résidentes locales » (T<sub>RL</sub>) aux niveaux des OL drainants.

=> Les « T<sub>FH</sub> mémoires résidentes en périphérie » (T<sub>RP</sub>), qui ont quitté les NL drainants et sont allées se nicher au niveau de la MO (Figure 22).

En outre, les T<sub>FH</sub> mémoires sont caractérisées par l'expression du récepteur de chimiokine CXCR5 leur permettant de se localiser à proximité ou dans les follicules B ainsi que d'exercer rapidement leurs fonctions spécifique d'aide et de soutien aux LB en cas de réponse immune secondaire (Sallusto et al., 1999b) (Breitfeld et al., 2000).

**Figure 22 : Tableau récapitulatif des différentes populations de T<sub>FH</sub> mémoires : Localisations, Phénotypes et Fonctions.**

	T <sub>FH</sub> mémoires RESIDENTES		T <sub>FH</sub> mémoires CIRCULANTES
<b>LOCALISATION</b>	T <sub>FH</sub> mémoires résidentes locales  OL drainants (NL ou rate)	T <sub>FH</sub> mémoires résidentes périphériques  Moelle osseuse	T <sub>FH</sub> mémoires périphériques  Rate / Sang
<b>PHENOTYPE</b>	CXCR5 <sup>+</sup> CCR7 <sup>lo</sup> PD1 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> Ly6C <sup>-</sup>		CXCR5 <sup>lo</sup> CCR7 <sup>+</sup> PD1 <sup>lo</sup> CD69 <sup>-</sup>
<b>FONCTION</b>	Phase précoce après restimulation antigénique		+ commutation Isotypique + maturation affinité ++ IL-21 / IFN- $\gamma$
	++ commutation Isotypique ++ maturation affinité	?	

## 2/ Les paramètres impliqués dans la RETENTION des $T_{FH}$ mémoires

L'existence de  $T_{FH}$  mémoires résidentes dans les OLII ou bien au niveau de la MO soulève de nombreuses questions quant aux mécanismes impliqués dans la rétention de ces cellules. Parmi ces questions en voici deux principales :

*\*Comment est-ce que ces populations sont retenues au niveau des OL ?*

*\*Pourquoi certaines  $T_{FH}$  mémoires sont retenues et d'autres re-circulent dans l'organisme ?*

A ces questions nous avons tenté d'apporter des éléments de réponses. Voyons d'abord les mécanismes connus qui pourraient être impliqués dans la rétention des  $T_{FH}$  mémoires au niveau des OLI (MO) et OLII (NL drainants).

### 2.1/ L'interaction CD69-S1Pr

Des études récentes ont montré que les LT mémoires résidents au niveau des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes présentent la caractéristique commune d'exprimer CD69 par opposition aux LT mémoires circulants qui sont  $CD69^{-}$  (Ugur et al., 2014) (Sathaliyawala et al., 2013). La molécule CD69 est généralement considérée comme un marqueur d'activation précoce exprimé suite à l'engagement du TCR avec les complexes p:CMH. Concernant les  $T_{RM}$ , dont la plupart sont  $CD69^{hi}$ , des travaux récents suggèrent que l'interaction du S1PR avec CD69 a un rôle important dans la résidence à long terme de ces cellules au sein des tissus non lymphoïdes. En fait, une régulation négative de la transcription du S1PR1 par CD69 a été suggérée. En effet, des données montrent que CD69 peut interagir physiquement avec S1P1, résultant en une inhibition mutuelle de l'expression de surface et de la dégradation S1P1 (Bankovich et al., 2010) (Mackay et al., 2015). Par conséquent, CD69 peut bloquer la sortie des cellules T, médiée par le S1P, des tissus lymphoïdes. De même, lors du développement thymique, les thymocytes expriment CD69 ce qui permet leur rétention dans le thymus. Lorsque les thymocytes sont pleinement matures, ils perdent l'expression à leur surface de CD69 et quittent ainsi le thymus vers la périphérie (Alfonso et al., 2006). En outre, une étude a montré récemment que l'expression de CD69 est nécessaire pour optimiser la formation des  $T_{RM}$  dans les tissus non lymphoïdes tels que la peau et les ganglions de la racine dorsale suite à une infection par le HSV (Mackay et al., 2013). De même, les LT  $CD4^{+} CD69^{-/-}$

ne parviennent pas à établir des populations de LT CD4 mémoires résidants de la MO nécessaires pour la génération de réponses Ac à longue durée de vie (Shinoda et al., 2012). De plus, Ugur et al ont montré récemment que les LT CD4 CD69<sup>hi</sup> mémoires au niveau des OL expriment à leurs surfaces des niveaux faibles de S1PR (Ugur et al., 2014).

Au vu de tous ces travaux on pourrait suggérer que CD69, fortement exprimé par les T<sub>FH</sub> mémoires résidentes des NL drainants et de la MO, contrairement aux T<sub>FH</sub> mémoires circulantes, pourrait être impliqué dans le maintien et/ou la génération de ces cellules. Il serait intéressant de mesurer le niveau d'expression du S1PR au sein de nos populations d'intérêt et d'évaluer l'impact d'une absence de CD69 à la surface des T<sub>FH</sub> mémoires résidentes sur le maintien et la génération de ces cellules.

## **2.2/ Rôle de l'Ag lors de la génération et du maintien des T<sub>FH</sub>**

### **2.2.1/ L'Ag dans la génération et le maintien des T<sub>FH</sub> effecteurs**

L'engagement continu et prolongé du TCR avec l'Ag est essentiel lors de plusieurs étapes du développement des LT CD4 et ceci, plus précisément pour les T<sub>FH</sub>. En effet dès l'étape initiale de différenciation lors d'une infection ou immunisation, il est décrit que des rencontres répétées avec les DC qui portent l'Ag peuvent se produire *in vivo* et sont essentielles pour moduler les programmes de différenciation des LT CD4 (Celli et al., 2012). De façon complémentaire à ces observations, il est clairement établi que la signalisation prolongée suite à l'engagement du TCR est essentielle pour la différenciation progressive en T<sub>FH</sub> pendant la persistance virale. Une interaction établie par un TCR de haute-affinité (traduisant ainsi une signalisation accrue via le TCR) sont des éléments importants de la différenciation des T<sub>FH</sub> (Fazilleau et al., 2009b). Semblable à des interactions de haute affinité, des données suggèrent qu'une stimulation excessive et prolongée via le TCR entraîne aussi spécifiquement le développement robuste des T<sub>FH</sub> (Fahey et al., 2011). Par la suite, une fois les pré-T<sub>FH</sub> générées elles interagissent de façon Ag spécifique avec les LB au niveau de la frontière zone T-B.

L'amplitude de la réponse médiée par les T<sub>FH</sub> est également dictée par la quantité d'Ag et est directement corrélée avec le nombre de LB du CG. De plus, le phénotype cellulaire des T<sub>FH</sub> est dépendant de stimulations antigéniques soutenues, comme indiqué par la perte rapide de PD-1 et de l'expression diminuée de CXCR5 lors du transfert dans des hôtes naïves. Le

maintien des cellules  $T_{FH}$  au cours de la réaction de CG exige une interaction soutenue avec les LB du CG (Baumjohann et al., 2013).

D'autre part, ces observations sont en accord avec les études utilisant un modèle d'infection chronique par le LCMV dans lequel la persistance virale induit préférentiellement la génération de  $T_{FH}$ . En effet, il a été démontré que lors de l'infection chronique par le LCMV, l'expression de Bcl-6 et de c-Maf augmentent, alors que l'expression de T-bet diminue au sein des cellules T CD4 spécifiques du virus au fur et à mesure que l'infection virale progresse, ce qui est compatible avec le développement progressif des  $T_{FH}$  (Fahey et al., 2011). Dans ce contexte, les auteurs ont aussi constaté que lorsque le nombre de  $T_{FH}$  est réduit lors de l'infection ou que leur fonction est altérée, de multiples paramètres de l'immunité antivirale des LB sont atteints, le système immunitaire devient ainsi incapable de contrôler la réplication du virus (Fahey et al., 2011). Cependant l'Ag ainsi qu'une forte stimulation antigénique peut être délétère et à l'origine de maladies auto-immunes. En effet, il a été montré que des réponses  $T_{FH}$  fortes et prolongées peuvent conduire à l'activation non spécifiques de LB dits « bystander », à une hypergammaglobulinémie, et la production d'Ac poly- et auto-réactifs (Baumjohann et al., 2013).

### **2.2.2/ Le rôle de l'Ag et de l'affinité du TCR lors de la génération et du maintien des $T_{FH}$ mémoires**

La mise en place du lignage  $T_{FH}$  contrairement aux autres lignages  $T_{H1}$  ou  $T_{H2}$  par exemple, est dépendante d'interactions spécifiques avec plusieurs APC (DCs et LB). De plus la qualité de ces interactions va influencer le développement de ces cellules ainsi que le maintien de leur phénotype. En effet, une étude montre que les LT CD4 qui ont un TCR de haute affinité pour l'Ag se différencient préférentiellement en  $T_{FH}$  effecteurs (Fazilleau et al., 2009b). Ces données sur la génération des  $T_{FH}$  effecteurs suggèrent un rôle de l'Ag pour le lignage  $T_{FH}$  lors de la phase mémoire.

Toutefois dans la phase mémoire le rôle de l'Ag est très controversé. C'est pourquoi la question majeure qui s'impose à notre étude et qui fait l'objet encore aujourd'hui de vives controverses repose sur la nature du rôle ou de l'implication de l'Ag en phase mémoire. Dans notre étude nous avons démontré par l'utilisation de l'Ac YAc l'existence de complexes p:CMHII à la surface des LB spécifiques à l'Ag en phase mémoire et uniquement au niveau

du NL drainants le site d'immunisation. Ces résultats font suite aux travaux de N. Fazilleau et ses collègues qui ont aussi montré en 2007 l'existence de ce qu'ils appellent des « dépôts antigéniques » au niveau des NL drainants le site de vaccination (Fazilleau et al., 2007).

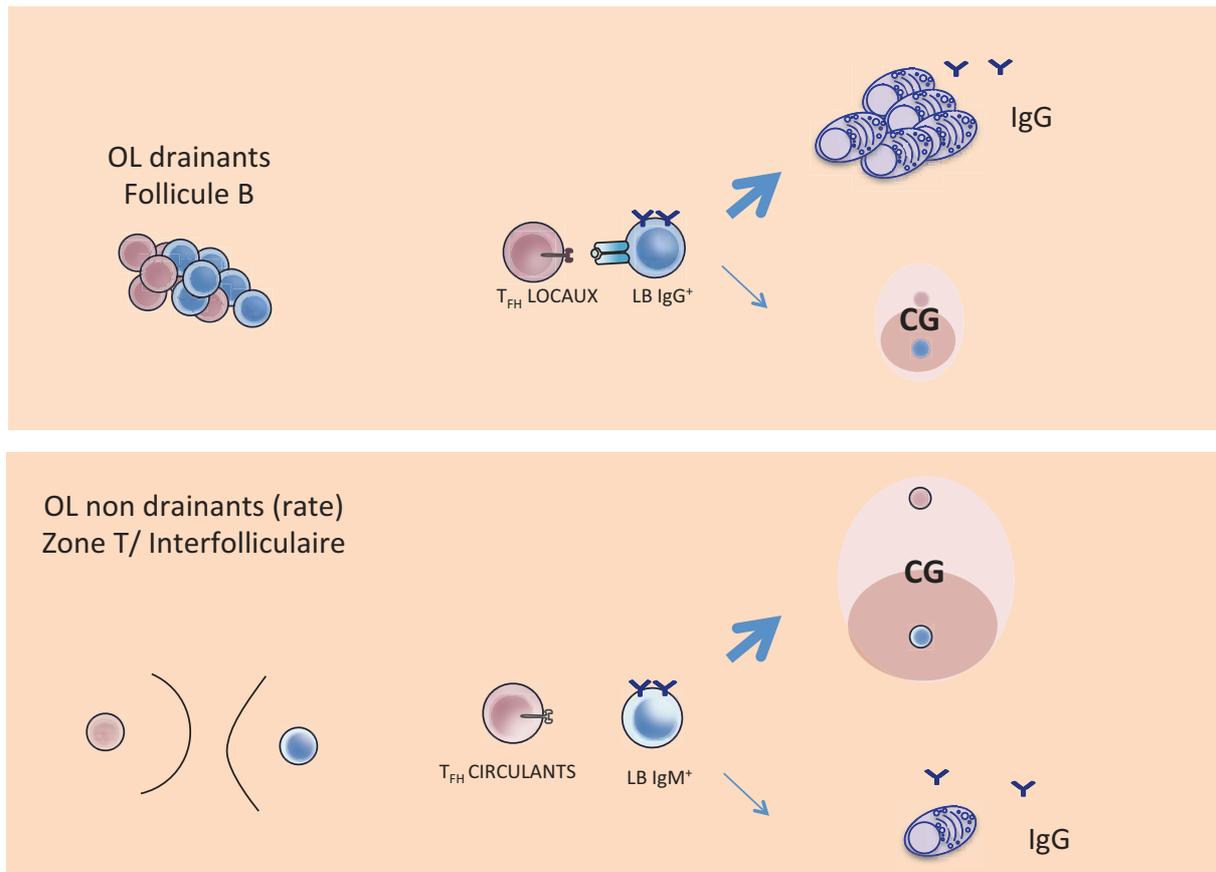
Certes, la mémoire immunologique de façon générale est définie par la capacité des cellules mémoires à survivre en l'absence d'Ag, cependant, cela n'exclut pas un rôle de l'Ag en phase mémoire. Des données suggèrent que les LT mémoires (LT CD4 et LT CD8) peuvent survivre en l'absence de molécules du CMH et que leur survie ne dépend pas d'une stimulation par le TCR (Murali-Krishna et al., 1999) (Swain et al., 1999). Toutefois et plus précisément pour les LT CD4, cette question est très controversée car certaines études maintiennent que la survie des LT CD4 mémoires nécessite le contact avec l'Ag résiduel persistant (van Essen et al., 2000). De plus, très récemment a été montré dans le contexte de l'infection au *Mycobacterium tuberculosis* que des cellules T<sub>FH</sub> mémoires résident localement dans le parenchyme des poumons en présence d'Ag et survivent en cas de transfert dans des hôtes naïfs, donc sans Ag (Moguche et al., 2015). Dans notre étude nous n'affirmons pas que les T<sub>FH</sub> mémoires locales vs circulantes sont incapable de survivre en l'absence des complexes p:CMHII au niveau des NL drainants car nous montrons que ces populations survivent et préservent leur phénotype 120 jours après immunisation. De plus, sachant que le pourcentage des LB mémoires spécifiques à l'Ag est faible nous suggérons que l'engagement des TCR à la surface des T<sub>FH</sub> mémoires, avec les complexes p:CMHII portés par les LB, n'induit pas la prolifération de ces cellules car elles sont bien quiescentes (Ki67<sup>-</sup>) et non proliférative (BrdU<sup>-</sup>) en comparaison aux T<sub>FH</sub> effecteurs. Cependant, d'autres expériences telles que des transferts de cellules T<sub>FH</sub> mémoires spécifique à l'Ag dans un hôte naïf pendant plusieurs semaines permettront d'évaluer la survie et le maintien de ces cellules en l'absence d'Ag. Néanmoins, nous n'excluons pas un éventuel rôle de l'Ag dans l'homéostasie et/ou le maintien phénotypique et/ou fonctionnel de ces cellules.

### **3/ Fonctionnalités et destins des couples T<sub>FH</sub>- LB mémoires**

Le rôle majeur que nous attribuons aux complexes p:CMHII repose sur leur contribution dans la mise en place d'une architecture particulière caractérisée par la rétention des T<sub>FH</sub> mémoires de hautes affinités au niveau des NL drainants ainsi que la recirculation des T<sub>FH</sub> de plus faibles affinités retrouvées au niveau de la rate. Parallèlement aux T<sub>FH</sub> mémoires, nous avons observé que les LB IgG<sup>+</sup> mémoires au niveau des NL drainants ont des BCR de

hautes affinités contrairement aux LB IgM<sup>+</sup> qui ont des BCR de plus faibles affinités. Seuls les compartiments T<sub>FH</sub> et LB de hautes affinités pour l'Ag restent localisées au niveau des NL drainants. Cette disposition en miroirs pourrait contribuer à orienter les réponses secondaires vers des destins distincts en favorisant par exemple soit une réponse secondaire extra-folliculaires avec la génération rapide de plasmocytes ou bien la formation de CGs.

L'observation que les LB mémoires des NL drainants et de la rate sont à proximité de différentes populations de T<sub>FH</sub> mémoires suggère que lors d'une réponse secondaire ces différents couples T<sub>FH</sub>-LB pourraient avoir un destin bien distinct. En effet, 5 jours après un boost antigénique, nous avons montré une capacité supérieure des T<sub>FH</sub> mémoires locales à induire, par les LB mémoires, de la commutation isotypique et la génération d'Ac de haute affinité comparé aux T<sub>FH</sub> mémoires circulantes. Les T<sub>FH</sub> mémoires circulantes présentent toutefois, après restimulation *ex vivo*, une capacité supérieure à produire de l'IL-21 et de l'IFN- $\gamma$  qui sont deux cytokines impliquées respectivement dans la génération du CG et la commutation de classe. Cependant, cinq jours après restimulation semblent courts pour évaluer la capacité des LB à former un CG *de novo*. Il serait ainsi intéressant d'observer le devenir des LB à des temps plus tardifs après restimulation. En outre, l'analyse phénotypique associée aux données récentes de la littérature suggère que les LB mémoires IgM<sup>+</sup> spécifiques à l'Ag vont préférentiellement participer à la génération d'un CG *de novo*. Le taux de mutation faible porté par les BCR des LB mémoires IgM<sup>+</sup> est compatible avec le fait que ces cellules sont générées plus ou moins indépendamment de la formation du CG et suggèrent que pour améliorer et diversifier l'affinité de ces Ac, ces LB avec l'aide des T<sub>FH</sub> mémoires vont préférentiellement générer un CG (Kaji et al., 2012) (Figure 22). Néanmoins, récemment McHeyzer-Williams LJ et al montrent à travers leur étude que les LB mémoires IgM<sup>+</sup> se différencient principalement en plasmocytes CD138<sup>+</sup> alors que les LB mémoires IgG<sup>+</sup> vont préférentiellement former un CG secondaire et rediversifier leur Ac (McHeyzer-Williams et al., 2015). Ces données démontrent la complexité du système dans lequel il faut tenir compte de la nature de l'aide apporté par les T<sub>FH</sub> mémoires à proximité des LB mémoires pouvant ainsi guider le destin des LB mémoires indépendamment de leur nature isotypique.

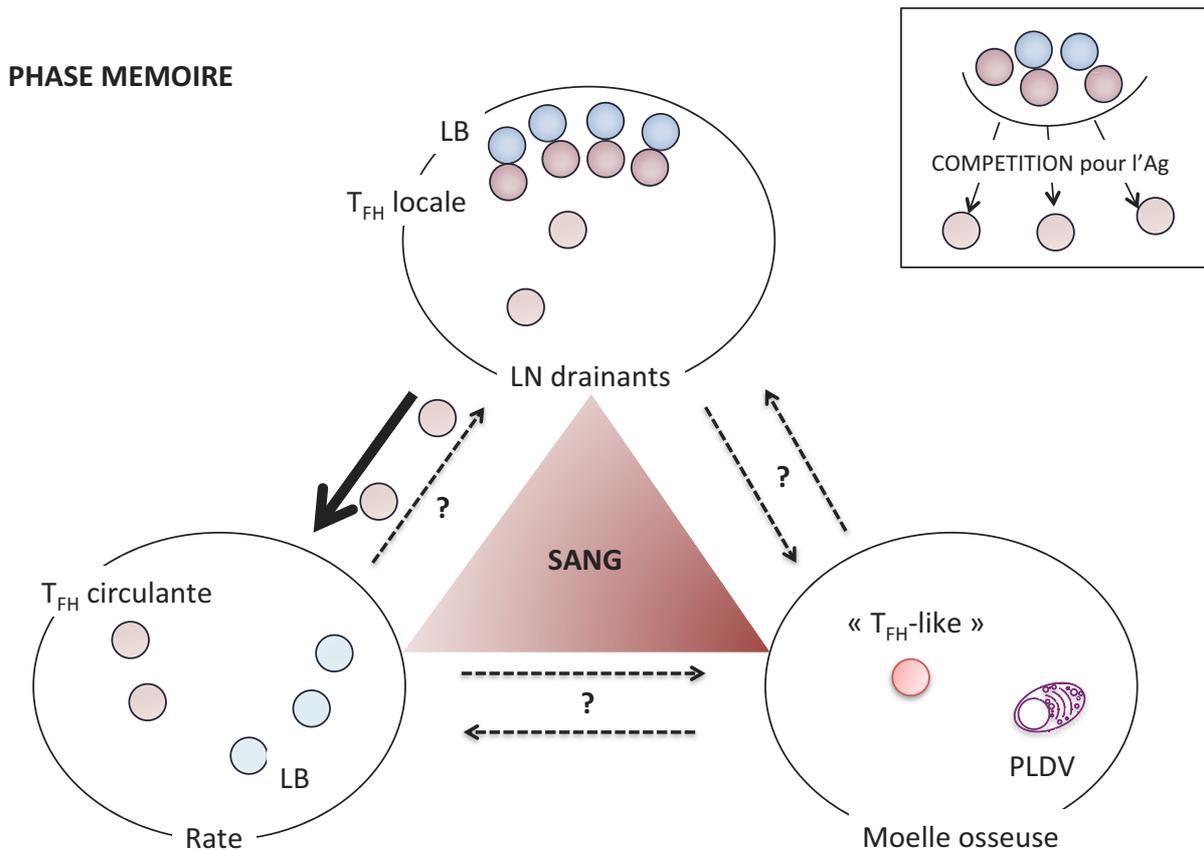
**Figure 22 : Destin des LB mémoires après restimulation antigénique**

#### 4/ Compétition et compartimentalisation des T<sub>FH</sub> mémoires locales des NL drainants vs circulantes de la rate

Avec l'utilisation de souris reporter permettant de suivre la dynamique d'expression de Bcl-6 au sein des T<sub>FH</sub>, nous savons à présent qu'une catégorie de T<sub>FH</sub> mémoires provient des T<sub>FH</sub> effecteurs qui ont quitté le CG (Liu et al., 2012a). Cependant, la découverte de T<sub>FH</sub> mémoires circulantes soulève la question de l'existence d'autres voies de génération des T<sub>FH</sub> mémoires. A l'appui de cette hypothèse, une étude montre que les cellules T CD4 déficientes pour SAP ont une capacité équivalente aux cellules « sauvages » à se différencier en T<sub>FH</sub> mémoires circulantes et fournit ainsi une preuve que les T<sub>FH</sub> mémoires pourraient être générées avant de devenir des T<sub>FH</sub> pleinement matures (Qi et al., 2008). Cependant, les paramètres guidant le choix des T<sub>FH</sub> à devenir locales ou circulantes restent non élucidés.

D'après nos travaux, nous avons mis en évidence que les  $T_{FH}$  mémoires locales et circulantes présentent un répertoire de TCR très semblable partageant ainsi les mêmes réarrangements dominants. Toutefois, nous avons aussi montré que les TCR caractérisant les différentes populations présentent une affinité distincte. D'après ces résultats nous proposons que l'affinité du TCR pourrait contribuer à la compartimentalisation et/ou le devenir de ces cellules. De ce fait, nous proposons que la génération des différentes populations de  $T_{FH}$  mémoires est un processus dynamique régi par une compétition pour des complexes p:CMHII localement au niveau des OL drainants. Cette compétition pour l'Ag pourrait avoir lieu précocement au stade pré- $T_{FH}$  et/ou bien plus tardivement lors de la fin de la réaction du CG (Figure 23).

Enfin, comme nous l'avons décrit en Introduction, les  $T_{FH}$  sont caractérisées par leur plasticité, peut-on ainsi imaginer que les  $T_{FH}$  mémoires locales puissent donner des  $T_{FH}$  mémoires circulantes et réciproquement. Pour répondre à cette question il faudrait pouvoir suivre spécifiquement l'une des deux populations indépendamment de leurs localisations. Des travaux supplémentaires sont nécessaires à l'identification de nouveaux marqueurs spécifiques permettant de distinguer strictement ces deux populations de  $T_{FH}$  mémoires.

**Figure 23 : Modèle de Compétition et Circulation des  $T_{FH}$  mémoires.**

### 5/ Les $T_{FH}$ mémoires résidentes périphériques au niveau de la MO

En opposition au concept d'immuno-surveillance des LT, les LT CD4 mémoires résidents dans la MO ne scannent pas en permanence les APC au niveau des OLII à la recherche de leur Ag. A l'inverse, il semblerait que ce soit des APC professionnelles qui scanneraient les LT CD4 mémoires de la MO, même si cela n'a pas encore été démontré directement. Les LT CD4 spécifiques à l'Ag réactivés doivent être en mesure d'atteindre rapidement les OLII et mettre en place une réponse immune secondaire. Toutefois, des travaux montrent que la MO peut aussi être le site d'une réponse immune secondaire. En effet, des populations de DC résidentes dans la MO ont été décrites. De ce fait, il a été montré que les cellules T naïves et mémoires peuvent tous deux être activés dans la MO *in situ* (Sapoznikov et al., 2008) (Feurerer et al., 2003). Cependant, dans un contexte d'immunisation ou d'infection la mise en place d'un CG dans la MO n'a jamais été observée.

Quel est le rôle des  $T_{FH}$  mémoires nichées au niveau de la MO, là où l'on retrouve des plasmocytes à longue durée de vie? Nous ne pouvons pas négliger l'hypothèse que les  $T_{FH}$  mémoires de la MO pourraient avoir une action liée localement à la présence des plasmocytes à longue durée de vie. Ces dernières sécrètent de façon continue des Ac de haute affinité. De plus, leur survie dépend de plusieurs facteurs dont l'IL-6 et le ligand induisant la prolifération APRIL sécrétés par les éosinophiles (Chu et al., 2011). En outre, Pelletier N. et al ont montré, que les plasmocytes spléniques peuvent exprimer des complexes p:CMHII et induire la prolifération *in vitro* de LT naïfs (Pelletier et al., 2010). De plus, cette étude démontre qu'en l'absence de plasmocytes, une augmentation des  $T_{FH}$  spécifiques à l'Ag est observée. Les auteurs montrent que les plasmocytes qui ont subi la commutation isotypique participent à un rétrocontrôle négatif ce qui permettrait de limiter la fonction des  $T_{FH}$  en fin de réponse primaire et lors d'une réponse secondaire (Pelletier et al., 2010). Au vu de ces données, l'hypothèse d'une présentation antigénique par les plasmocytes à longue durée de vie au niveau de la MO est à tester. Tout comme pour les  $T_{FH}$  mémoires et les LB mémoires résidants au niveau des NL drainants, on pourrait suggérer l'existence d'une interaction Ag-spécifique entre ces deux partenaires cellulaires de même spécificité antigénique au niveau de la MO.

Enfin une des questions qui reste en suspens concerne la provenance de ces  $T_{FH}$  mémoires de la MO. Quelle est la nature du précurseur de ces cellules? D'après les dynamiques d'apparition de ces cellules, nous constatons qu'elles apparaissent beaucoup plus tardivement avec un pic cellulaire à partir de 90 jours après immunisation. De plus, alors que le compartiment de  $T_{FH}$  mémoires circulantes de la rate est plutôt constant en pourcentage et en nombre celui des  $T_{FH}$  mémoires locales au niveau des NL drainants diminuent progressivement probablement comme la quantité de complexes p:CMHII à la surface des LB mémoires. Une des hypothèses serait que les précurseurs des  $T_{FH}$  mémoires de la MO proviennent des NL drainants. De plus, leur phénotype caractérisé par une forte expression de PD-1, CD69 et CXCR5, renvoie fortement à celui des  $T_{FH}$  mémoires résidentes au niveau des NL drainants. Afin de tester cette hypothèse, il serait utile de bloquer par exemple avec du FTY720 la sortie en phase mémoire des  $LT_{RL}$  et voir si on retrouve toujours une apparition des  $LT_{RP}$  dans la MO.

## 6/ Les T<sub>FH</sub> mémoires : des bio-marqueurs dans notre sang.

Les T<sub>FH</sub> mémoires circulantes représentent un compartiment hétérogène de part l'expression différentielle de diverses molécules à leur surface. Sur la base de l'expression de CXCR3 et CCR6, les cellules T<sub>FH</sub> mémoires circulantes peuvent être classées en plusieurs catégories : les T<sub>FH1</sub> (CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>) et les T<sub>FH2</sub> (CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>) et T<sub>FH17</sub> (CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>) (Morita et al., 2011) (Le Coz et al., 2013). De plus, l'expression différentielle de ICOS, de PD-1 et de CCR7 définit en outre des sous-populations fonctionnellement distinctes (Locci et al., 2013a) (He et al., 2013) (Boswell et al., 2014). De façon importante, une altération, dans le sang, de l'équilibre de ces sous-populations semble être associée à la qualité des réponses humorales.

Dans nos études nous décrivons les T<sub>FH</sub> mémoires circulantes retrouvées au niveau de la rate. L'analyse des T<sub>FH</sub> mémoires circulantes dans la littérature est essentiellement faite dans le sang périphérique (Morita et al., 2011) chez des patients sains ou atteints d'infection (Bentebibel et al., 2013) (Locci et al., 2013a) ou dans un contexte de maladies auto-immunes (Niu et al., 2015). Notre analyse dans le sang fut limitée par la fréquence très faible de LT CD4 spécifique à l'Ag. De plus, au niveau des NL non drainants le site d'immunisation, la présence de LT CD4 spécifiques à l'Ag est quasi inexistante. Nous avons donc fait le choix de garder la dénomination de « circulant » pour qualifier les T<sub>FH</sub> mémoires de la rate et faire en parallèle référence à ceux observés au niveau du sang chez l'Homme. Néanmoins nous aurions pu aussi les qualifier de « périphériques » en opposition aux T<sub>FH</sub> mémoires locales au niveau des NL drainants ou de la MO

Par ailleurs, la différence entre les T<sub>FH</sub> mémoires circulantes de souris et celles décrites chez l'Homme repose principalement sur le compartiment T<sub>FH1</sub>. Les T<sub>FH1</sub> chez l'Homme sont décrites comme moins efficace à aider les LB comparé aux T<sub>FH2</sub> ou T<sub>FH17</sub> (Morita et al., 2011). En outre, dans une étude sur le vaccin contre le virus de la grippe saisonnière, une augmentation de la taille de T<sub>FH1</sub> mémoire CXCR3<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> a été observée précocement après vaccination (Bentebibel et al., 2013). Cette observation pourrait expliquer l'efficacité limitée du virus contre la grippe. De plus, les personnes infectées par le VIH qui ont développé des Ac neutralisants à large spectre dirigés contre le VIH se sont révélés avoir une plus haute fréquence des sous-populations non T<sub>FH1</sub>, de phénotype CXCR3<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup>, capable de fournir

une aide efficace aux cellules B, comparés aux patients infectés qui ne disposent pas d'Ac neutralisants (Locci et al., 2013a).

Toutefois, il est à souligné que les études chez l'Homme sont limitées techniquement et ne peuvent cibler le rôle *in vivo* des populations de  $T_{FH}$  mémoires circulantes spécifiques à l'Ag après restimulation antigénique. Dans un contexte physiopathologique ou après vaccination, on suppose qu'une seule catégorie ( $T_{FH1}$ ,  $T_{FH2}$  ou  $T_{FH17}$ ) de  $T_{FH}$  mémoires circulantes sera générée. Toutefois, d'autres populations de  $T_{FH}$  mémoires de même spécificité antigénique sont générées mais se nichent dans différents organes. Dans ce contexte il semble plus pertinent de comparer les  $T_{FH}$  mémoires circulantes spécifiques à l'Ag avec les autres populations de  $T_{FH}$  mémoires aux localisations diverses (locales des NL drainants ou celles de la MO) et de même spécificité antigénique.

Dans notre modèle d'immunisation protéique, l'utilisation comme adjuvant de l'IFA combiné au CpG induit la génération d'une forte réponse pro- $T_{FH}$  et une commutation isotypique de type IgG2a (Chakarov and Fazilleau, 2014b). En phase mémoire, nous montrons que les  $T_{FH}$  circulantes sont de type  $T_{FH1}$   $CXCR3^+CCR6^-$ . *In vivo*, après restimulation antigénique et en phase précoce les  $T_{FH1}$  mémoires circulantes sont moins efficaces à aider les LB comparé à leurs homologues locales. Toutefois, vu leur capacité nettement plus importante à sécréter de l'IL-21 et de l'IFN- $\gamma$  nous suggérons d'observer à des temps plus tardifs avec l'hypothèse d'une participation à la génération de CG de *nov*.

Dans de nombreux contextes pathologiques, la fréquence et la nature des  $T_{FH}$  mémoires circulantes servent de bio-marqueurs et de diagnostic. Toutefois, cette notion de bio-marqueurs accordée aux  $T_{FH}$  mémoires circulantes repose sur des corrélations (virémies, titre d'Ac spécifiques ou d'auto-Ac). D'après nos travaux, nous montrons que le compartiment circulant est alimenté par le réservoir local de  $T_{FH}$  mémoires au niveau des NL drainants. Il est difficile chez l'Homme d'atteindre les OL drainants pour évaluer la qualité de ce réservoir. Néanmoins, des études supplémentaires permettant de comprendre comment influencer la qualité et/ou la quantité de ce réservoir pourraient permettre d'agir plus en amont.

Notre étude souligne l'importance de complexes p:CMHII dans la rétention de  $T_{FH}$  mémoires au niveau des OL drainants le site d'immunisation ou d'infection. Il serait

intéressant de voir si l'augmentation de la dose d'Ag affecte ou non la compartimentalisation des  $T_{FH}$  mémoires. Notre étude suggère en effet que l'immunisation avec des doses plus fortes d'Ag pourrait permettre le maintien à plus long terme du compartiment local de  $T_{FH}$  mémoires. Néanmoins, l'Ag à forte dose pourrait ne plus exercer son rôle de « trappeur » mais plutôt induire une stimulation proliférative des cellules mémoires.

En outre, nos observations reposent principalement sur des immunisations protéiques sous-cutanées où nous avons observé au niveau des OL drainants la persistance des  $T_{FH}$  mémoires locales. Il est possible que la génération de cette population ne soit pas systématiquement observée et dépend notamment du site d'immunisation. En effet, d'après l'étude de Tokoyoda et al, le transfert adoptif de LT CD4 transgéniques dans un système d'immunisation intraveineux (iv), induisant une réponse systémique, montre une prédominance quasi totale de  $T_{FH}$  mémoires au niveau de la MO (Tokoyoda et al., 2009). Cela pourrait supposer qu'en fonction du site d'immunisation (sous-cutané, iv, voie orale ou respiratoire) la dynamique et/ou la génération des différentes populations de  $T_{FH}$  mémoires ne seraient pas les mêmes. De plus, l'étude de Tokoyoda et al utilise du LPS en PBS pour leur immunisation iv alors que nous utilisons de l'IFA complétement avec du CpG. L'IFA (eau dans huile) crée des dépôts localement au niveau du site d'immunisation, toutefois lorsque nous immunisons avec du Squalène (huile dans eau) ou de l'Alum, nous observons au niveau phénotypique une distribution similaire en phase mémoire avec des  $T_{FH}$  mémoires locales dans les NL drainants et circulantes au niveau de la rate, l'unique différence repose dans la fréquence plus basse des  $T_{FH}$  mémoires spécifiques à l'Ag. En outre, la variation du site d'immunisation et/ou la nature des adjuvants utilisés pourrait aussi impacter sur le développement, la nature ( $T_{FH1}$ ,  $T_{FH2}$ ,  $T_{FH17}$ ) et/ou la fonction des différentes sous-populations de  $T_{FH}$  mémoires.

Le processus de fabrication d'un vaccin débute par la caractérisation de l'agent infectieux et comprendre son mode de fonctionnement. Ensuite, l'identification de l'Ag immuno-dominant du pathogène permet de confectionner des vaccins protéiques qui ont l'avantage d'être simple à fabriquer et de présenter moins de risque pour la santé contrairement à d'autres vaccins. En effet, les vaccins vivants atténués peuvent induire un faible risque infectieux et sont par conséquent déconseillés pour les personnes affaiblies immunitairement (infection au VIH, leucémie...). Le choix de l'adjuvant et le site de vaccination doivent aussi s'adapter à la nature et au mode d'infection du pathogène. En outre,

afin de générer une réponse Ac mémoires qui puissent garantir une protection à long terme contre l'agent infectieux, notre étude souligne l'importance de ne pas se focaliser uniquement sur les LB. D'après nos travaux, la nature des T<sub>FH</sub> mémoires, à proximité et de même spécificité antigénique que les LB, influence le devenir de la réponse immune secondaire avec soit la possibilité de donner rapidement une réponse plasmocytaire ou d'encourager la mise en place de CG. Ces deux axes de réponses semblent être nécessaires pour couvrir dans le temps les réponses immunes secondaires. La génération rapide d'Ac de haute affinité est importante pour neutraliser rapidement l'invasion du pathogène. Toutefois, les agents infectieux ont « l'art de survivre » : élaboration de formes de résistance pour les bactéries et les parasites, variabilité génétiques importante pour les virus. Une évolution qui permet aux pathogènes d'échapper aux défenses de l'hôte. La mémoire Ac doit alors aussi s'adapter et ceci est possible par la « rediversification » des Ac lors de la mise en place de CG.

Notre système immunitaire est-il capable dans le temps de « déplacer ces niches », de renforcer et réadapter les réponses Ac, de générer les « bonnes T<sub>FH</sub> mémoires » aux bons endroits capable de soutenir les LB et de s'adapter aux stratégies d'échappement du pathogène ? Le système immunitaire de chaque être humain est unique et de ce fait nous ne sommes pas tous égaux face aux infections. La vaccination est peut-être un moyen extraordinaire de rétablir de « la Justice », encore faut-il que les êtres humains soient justes entre eux...

## *RÉFÉRENCES*

- Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature immunology* 8, 639-646.
- Ahmed, R., and Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272, 54-60.
- Aiba, Y., Kometani, K., Hamadate, M., Moriyama, S., Sakaue-Sawano, A., Tomura, M., Luche, H., Fehling, H.J., Casellas, R., Kanagawa, O., *et al.* (2010). Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 12192-12197.
- Alfonso, C., McHeyzer-Williams, M.G., and Rosen, H. (2006). CD69 down-modulation and inhibition of thymic egress by short- and long-term selective chemical agonism of sphingosine 1-phosphate receptors. *European journal of immunology* 36, 149-159.
- Allen, C.D., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27, 190-202.
- Alugupalli, K.R., Leong, J.M., Woodland, R.T., Muramatsu, M., Honjo, T., and Gerstein, R.M. (2004). B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* 21, 379-390.
- Anderson, S.M., Hannum, L.G., and Shlomchik, M.J. (2006). Memory B cell survival and function in the absence of secreted antibody and immune complexes on follicular dendritic cells. *J Immunol* 176, 4515-4519.
- Ansel, K.M., McHeyzer-Williams, L.J., Ngo, V.N., McHeyzer-Williams, M.G., and Cyster, J.G. (1999). In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *The Journal of experimental medicine* 190, 1123-1134.
- Arden, B., Clark, S.P., Kabelitz, D., and Mak, T.W. (1995). Mouse T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42, 501-530.
- Avery, D.T., Deenick, E.K., Ma, C.S., Suryani, S., Simpson, N., Chew, G.Y., Chan, T.D., Palendira, U., Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., *et al.* (2010). B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *The Journal of experimental medicine* 207, 155-171.
- Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., and Hafler, D.A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167, 1245-1253.
- Bajenoff, M., Egen, J.G., Qi, H., Huang, A.Y., Castellino, F., and Germain, R.N. (2007). Highways, byways and breadcrumbs: directing lymphocyte traffic in the lymph node. *Trends in immunology* 28, 346-352.
- Ballesteros-Tato, A., Leon, B., Graf, B.A., Moquin, A., Adams, P.S., Lund, F.E., and Randall, T.D. (2012). Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity* 36, 847-856.

- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J.P., van Kooten, C., Liu, Y.J., Rousset, F., and Saeland, S. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annual review of immunology* 12, 881-922.
- Banchereau, J., Klechevsky, E., Schmitt, N., Morita, R., Palucka, K., and Ueno, H. (2009). Harnessing human dendritic cell subsets to design novel vaccines. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1174, 24-32.
- Bankovich, A.J., Shiow, L.R., and Cyster, J.G. (2010). CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *The Journal of biological chemistry* 285, 22328-22337.
- Barrington, R.A., Pozdnyakova, O., Zafari, M.R., Benjamin, C.D., and Carroll, M.C. (2002). B lymphocyte memory: role of stromal cell complement and FcγRIIB receptors. *The Journal of experimental medicine* 196, 1189-1199.
- Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature reviews Immunology* 9, 15-27.
- Batten, M., Ramamoorthi, N., Kljavin, N.M., Ma, C.S., Cox, J.H., Dengler, H.S., Danilenko, D.M., Caplazi, P., Wong, M., Fulcher, D.A., *et al.* (2010). IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells. *The Journal of experimental medicine* 207, 2895-2906.
- Baumjohann, D., Preite, S., Reboldi, A., Ronchi, F., Ansel, K.M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2013). Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity* 38, 596-605.
- Bauquet, A.T., Jin, H., Paterson, A.M., Mitsdoerffer, M., Ho, I.C., Sharpe, A.H., and Kuchroo, V.K. (2009). The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nature immunology* 10, 167-175.
- Bentebibel, S.E., Lopez, S., Obermoser, G., Schmitt, N., Mueller, C., Harrod, C., Flano, E., Mejias, A., Albrecht, R.A., Blankenship, D., *et al.* (2013). Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Science translational medicine* 5, 176ra132.
- Berek, C. (1992). The development of B cells and the B-cell repertoire in the microenvironment of the germinal center. *Immunological reviews* 126, 5-19.
- Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87-98.
- Bossaller, L., Burger, J., Draeger, R., Grimbacher, B., Knoth, R., Plebani, A., Durandy, A., Baumann, U., Schlesier, M., Welcher, A.A., *et al.* (2006). ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J Immunol* 177, 4927-4932.

- Boswell, K.L., Paris, R., Boritz, E., Ambrozak, D., Yamamoto, T., Darko, S., Wloka, K., Wheatley, A., Narpala, S., McDermott, A., *et al.* (2014). Loss of circulating CD4 T cells with B cell helper function during chronic HIV infection. *PLoS pathogens* *10*, e1003853.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Forster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *The Journal of experimental medicine* *192*, 1545-1552.
- Bryant, V.L., Ma, C.S., Avery, D.T., Li, Y., Good, K.L., Corcoran, L.M., de Waal Malefyt, R., and Tangye, S.G. (2007). Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5<sup>+</sup> T follicular helper cells. *J Immunol* *179*, 8180-8190.
- 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. *The Journal of experimental medicine* *194*, 1385-1390.
- Campbell, D.J., Kim, C.H., and Butcher, E.C. (2001a). Separable effector T cell populations specialized for B cell help or tissue inflammation. *Nature immunology* *2*, 876-881.
- Campbell, J.J., and Butcher, E.C. (2000). Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Current opinion in immunology* *12*, 336-341.
- Campbell, J.J., Murphy, K.E., Kunkel, E.J., Brightling, C.E., Soler, D., Shen, Z., Boisvert, J., Greenberg, H.B., Vierra, M.A., Goodman, S.B., *et al.* (2001b). CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* *166*, 877-884.
- Cannons, J.L., Qi, H., Lu, K.T., Dutta, M., Gomez-Rodriguez, J., Cheng, J., Wakeland, E.K., Germain, R.N., and Schwartzberg, P.L. (2010). Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity* *32*, 253-265.
- Cannons, J.L., Tangye, S.G., and Schwartzberg, P.L. (2011). SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annual review of immunology* *29*, 665-705.
- Celli, S., Day, M., Muller, A.J., Molina-Paris, C., Lythe, G., and Bousso, P. (2012). How many dendritic cells are required to initiate a T-cell response? *Blood* *120*, 3945-3948.
- Celli, S., Garcia, Z., and Bousso, P. (2005). CD4 T cells integrate signals delivered during successive DC encounters in vivo. *J Exp Med* *202*, 1271-1278.
- Chakarov, S., and Fazilleau, N. (2014a). Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation. *EMBO molecular medicine* *6*, 590-603.
- Chakarov, S., and Fazilleau, N. (2014b). Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation. *EMBO molecular medicine* *6*, 590-603.
- Champagne, P., Dumont, A.R., and Sekaly, R.P. (2001). Learning to remember: generation and maintenance of T-cell memory. *DNA and cell biology* *20*, 745-760.

- Chang, J.T. (2012). Polarity and lymphocyte fate determination. *Current opinion in cell biology* 24, 526-533.
- Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., *et al.* (2007). Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 315, 1687-1691.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198, 1875-1886.
- Chetoui, N., Boisvert, M., Gendron, S., and Aoudjit, F. (2010). Interleukin-7 promotes the survival of human CD4<sup>+</sup> effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway. *Immunology* 130, 418-426.
- Chevalier, N., Jarrossay, D., Ho, E., Avery, D.T., Ma, C.S., Yu, D., Sallusto, F., Tangye, S.G., and Mackay, C.R. (2011a). CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *J Immunol* 186, 5556-5568.
- Chevalier, N., Jarrossay, D., Ho, E., Avery, D.T., Ma, C.S., Yu, D., Sallusto, F., Tangye, S.G., and Mackay, C.R. (2011b). CXCR5 Expressing Human Central Memory CD4 T Cells and Their Relevance for Humoral Immune Responses. *J Immunol* 186, 5556-5568.
- Chien, Y.H., Gascoigne, N.R., Kavaler, J., Lee, N.E., and Davis, M.M. (1984). Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene. *Nature* 309, 322-326.
- Choi, Y.S., Eto, D., Yang, J.A., Lao, C., and Crotty, S. (2013a). Cutting Edge: STAT1 Is Required for IL-6-Mediated Bcl6 Induction for Early Follicular Helper Cell Differentiation. *J Immunol* 190, 3049-3053.
- Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 34, 932-946.
- Choi, Y.S., Yang, J.A., Yusuf, I., Johnston, R.J., Greenbaum, J., Peters, B., and Crotty, S. (2013b). Bcl6 expressing follicular helper CD4 T cells are fate committed early and have the capacity to form memory. *J Immunol* 190, 4014-4026.
- Chu, V.T., Frohlich, A., Steinhauser, G., Scheel, T., Roch, T., Fillatreau, S., Lee, J.J., Lohning, M., and Berek, C. (2011). Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nature immunology* 12, 151-159.
- Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R.I., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Y.H., Lim, H., Reynolds, J.M., Zhou, X.H., *et al.* (2011). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nature medicine* 17, 983-988.
- Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkurst, C.N., Muratet, M., *et al.* (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* 151, 289-303.

- Clybouw, C., Fischer, S., Auffredou, M.T., Hugues, P., Alexia, C., Bouillet, P., Raphael, M., Leca, G., Strasser, A., Tarlinton, D.M., *et al.* (2011). Regulation of memory B-cell survival by the BH3-only protein Puma. *Blood* *118*, 4120-4128.
- Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomini, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., *et al.* (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature immunology* *11*, 1093-1101.
- Collison, L.W., Delgoffe, G.M., Guy, C.S., Vignali, K.M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., Satoskar, A.R., Garcia, K.C., Hunter, C.A., Drake, C.G., *et al.* (2012). The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nature immunology* *13*, 290-299.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* *450*, 566-569.
- Coquerelle, C., and Moser, M. (2010). DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunological reviews* *234*, 317-334.
- Crotty, S. (2011a). Follicular Helper CD4 T Cells (T(FH)). *Annu Rev Immunol* *29*, 621-663.
- Crotty, S. (2011b). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annual review of immunology* *29*, 621-663.
- Crotty, S. (2014). T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity* *41*, 529-542.
- Cubas, R.A., Mudd, J.C., Savoye, A.L., Perreau, M., van Grevenynghe, J., Metcalf, T., Connick, E., Meditz, A., Freeman, G.J., Abesada-Terk, G., Jr., *et al.* (2013). Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nature medicine* *19*, 494-499.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., *et al.* (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature immunology* *9*, 1347-1355.
- Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., *et al.* (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* *443*, 350-354.
- de Leval, L., Gisselbrecht, C., and Gaulard, P. (2010). Advances in the understanding and management of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *British journal of haematology* *148*, 673-689.
- De Riva, A., Bourgeois, C., Kassiotis, G., and Stockinger, B. (2007). Noncognate interaction with MHC class II molecules is essential for maintenance of T cell metabolism to establish optimal memory CD4 T cell function. *J Immunol* *178*, 5488-5495.

- Deenick, E.K., Chan, A., Ma, C.S., Gatto, D., Schwartzberg, P.L., Brink, R., and Tangye, S.G. (2010). Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen presentation that is independent of unique B cell signaling. *Immunity* 33, 241-253.
- Del Prete, G. (1992). Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy* 47, 450-455.
- Djuretic, I.M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., and Ansel, K.M. (2007). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nature immunology* 8, 145-153.
- Dobner, T., Wolf, I., Emrich, T., and Lipp, M. (1992). Differentiation-specific expression of a novel G protein-coupled receptor from Burkitt's lymphoma. *European journal of immunology* 22, 2795-2799.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Megret, J., Storck, S., Reynaud, C.A., and Weill, J.C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol* 10, 1292-1299.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology* 10, 857-863.
- Eddahri, F., Denanglaire, S., Bureau, F., Spolski, R., Leonard, W.J., Leo, O., and Andris, F. (2009). Interleukin-6/STAT3 signaling regulates the ability of naive T cells to acquire B-cell help capacities. *Blood* 113, 2426-2433.
- Eto, D., Lao, C., DiToro, D., Barnett, B., Escobar, T.C., Kageyama, R., Yusuf, I., and Crotty, S. (2011). IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (T<sub>fh</sub>) differentiation. *PloS one* 6, e17739.
- Fahey, L.M., Wilson, E.B., Elsaesser, H., Fistonich, C.D., McGavern, D.B., and Brooks, D.G. (2011). Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *The Journal of experimental medicine* 208, 987-999.
- Fazilleau, N., Eisenbraun, M.D., Malherbe, L., Ebright, J.N., Pogue-Caley, R.R., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2007). Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. *Nature immunology* 8, 753-761.
- Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009a). Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* 30, 324-335.
- Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J., Rosen, H., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009b). The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat Immunol* 10, 375-384.
- Ferreira, R.C., Simons, H.Z., Thompson, W.S., Cutler, A.J., Dopico, X.C., Smyth, D.J., Mashar, M., Schuilenburg, H., Walker, N.M., Dunger, D.B., *et al.* (2015). IL-21 production by CD4<sup>+</sup> effector T cells and frequency of circulating follicular helper T cells are increased in type 1 diabetes patients. *Diabetologia* 58, 781-790.

- Feuerer, M., Beckhove, P., Garbi, N., Mahnke, Y., Limmer, A., Hommel, M., Hammerling, G.J., Kyewski, B., Hamann, A., Umansky, V., *et al.* (2003). Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nature medicine* *9*, 1151-1157.
- Fischer, M.B., Goerg, S., Shen, L., Prodeus, A.P., Goodnow, C.C., Kelsoe, G., and Carroll, M.C. (1998). Dependence of germinal center B cells on expression of CD21/CD35 for survival. *Science* *280*, 582-585.
- Fischer, S.F., Bouillet, P., O'Donnell, K., Light, A., Tarlinton, D.M., and Strasser, A. (2007). Proapoptotic BH3-only protein Bim is essential for developmentally programmed death of germinal center-derived memory B cells and antibody-forming cells. *Blood* *110*, 3978-3984.
- Forster, R., Davalos-Missslitz, A.C., and Rot, A. (2008). CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature reviews Immunology* *8*, 362-371.
- Forster, R., Emrich, T., Kremmer, E., and Lipp, M. (1994). Expression of the G-protein--coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood* *84*, 830-840.
- Forster, R., Mattis, A.E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., and Lipp, M. (1996). A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* *87*, 1037-1047.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* *99*, 23-33.
- Foy, T.M., Laman, J.D., Ledbetter, J.A., Aruffo, A., Claassen, E., and Noelle, R.J. (1994). gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *The Journal of experimental medicine* *180*, 157-163.
- Fujio, K., Okamura, T., and Yamamoto, K. (2010). The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Advances in immunology* *105*, 99-130.
- Garboczi, D.N., Utz, U., Ghosh, P., Seth, A., Kim, J., VanTienhoven, E.A., Biddison, W.E., and Wiley, D.C. (1996). Assembly, specific binding, and crystallization of a human TCR-alpha-beta with an antigenic Tax peptide from human T lymphotropic virus type 1 and the class I MHC molecule HLA-A2. *J Immunol* *157*, 5403-5410.
- Gascoigne, N.R., and Alam, S.M. (1999). Allelic exclusion of the T cell receptor alpha-chain: developmental regulation of a post-translational event. *Seminars in immunology* *11*, 337-347.
- Gatto, D., Paus, D., Basten, A., Mackay, C.R., and Brink, R. (2009). Guidance of B cells by the orphan G protein-coupled receptor EBI2 shapes humoral immune responses. *Immunity* *31*, 259-269.
- Geiger, R., Duhon, T., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Human naive and memory CD4+ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. *The Journal of experimental medicine* *206*, 1525-1534.

- 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.
- Glatman Zaretsky, A., Taylor, J.J., King, I.L., Marshall, F.A., Mohrs, M., and Pearce, E.J. (2009). T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *The Journal of experimental medicine* 206, 991-999.
- Good-Jacobson, K.L., Szumilas, C.G., Chen, L., Sharpe, A.H., Tomayko, M.M., and Shlomchik, M.J. (2010). PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nature immunology* 11, 535-542.
- Graef, P., Buchholz, V.R., Stemberger, C., Flossdorf, M., Henkel, L., Schiemann, M., Drexler, I., Hofer, T., Riddell, S.R., and Busch, D.H. (2014). Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8(+) central memory T cells. *Immunity* 41, 116-126.
- Gray, D., Kumararatne, D.S., Lortan, J., Khan, M., and MacLennan, I.C. (1984). Relation of intra-splenic migration of marginal zone B cells to antigen localization on follicular dendritic cells. *Immunology* 52, 659-669.
- Gray, D., and Skarvall, H. (1988). B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* 336, 70-73.
- Grewal, I.S., Xu, J., and Flavell, R.A. (1995). Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* 378, 617-620.
- Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., *et al.* (2013). CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *The Journal of clinical investigation* 123, 2873-2892.
- Hackstein, H., and Thomson, A.W. (2004). Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nature reviews Immunology* 4, 24-34.
- Hale, J.S., Youngblood, B., Latner, D.R., Mohammed, A.U., Ye, L., Akondy, R.S., Wu, T., Iyer, S.S., and Ahmed, R. (2013a). Distinct Memory CD4 T Cells with Commitment to T Follicular Helper- and T Helper 1-Cell Lineages Are Generated after Acute Viral Infection. *Immunity* 38, 805-817.
- Hale, J.S., Youngblood, B., Latner, D.R., Mohammed, A.U., Ye, L., Akondy, R.S., Wu, T., Iyer, S.S., and Ahmed, R. (2013b). Distinct memory CD4+ T cells with commitment to T follicular helper- and T helper 1-cell lineages are generated after acute viral infection. *Immunity* 38, 805-817.
- Halwani, R., Doroudchi, M., Yassine-Diab, B., Janbazian, L., Shi, Y., Said, E.A., Haddad, E.K., and Sekaly, R.P. (2006). Generation and maintenance of human memory cells during viral infection. *Springer seminars in immunopathology* 28, 197-208.

- Hams, E., McCarron, M.J., Amu, S., Yagita, H., Azuma, M., Chen, L., and Fallon, P.G. (2011). Blockade of B7-H1 (programmed death ligand 1) enhances humoral immunity by positively regulating the generation of T follicular helper cells. *J Immunol* 186, 5648-5655.
- Hanazawa, A., Lohning, M., Radbruch, A., and Tokoyoda, K. (2013). CD49b/CD69-Dependent Generation of Resting T Helper Cell Memory. *Frontiers in immunology* 4, 183.
- Harrington, L.E., Janowski, K.M., Oliver, J.R., Zajac, A.J., and Weaver, C.T. (2008). Memory CD4 T cells emerge from effector T-cell progenitors. *Nature* 452, 356-360.
- Haynes, N.M., Allen, C.D., Lesley, R., Ansel, K.M., Killeen, N., and Cyster, J.G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol* 179, 5099-5108.
- He, J., Tsai, L.M., Leong, Y.A., Hu, X., Ma, C.S., Chevalier, N., Sun, X., Vandenberg, K., Rockman, S., Ding, Y., *et al.* (2013). Circulating Precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T Cells Indicate Tfh Cell Activity and Promote Antibody Responses upon Antigen Reexposure. *Immunity* 39, 770-781.
- Heesters, B.A., Chatterjee, P., Kim, Y.A., Gonzalez, S.F., Kuligowski, M.P., Kirchhausen, T., and Carroll, M.C. (2013). Endocytosis and recycling of immune complexes by follicular dendritic cells enhances B cell antigen binding and activation. *Immunity* 38, 1164-1175.
- Herndler-Brandstetter, D., Landgraf, K., Jenewein, B., Tzankov, A., Brunauer, R., Brunner, S., Parson, W., Kloss, F., Gassner, R., Lepperdinger, G., *et al.* (2011). Human bone marrow hosts polyfunctional memory CD4+ and CD8+ T cells with close contact to IL-15-producing cells. *J Immunol* 186, 6965-6971.
- Hikida, M., Casola, S., Takahashi, N., Kaji, T., Takemori, T., Rajewsky, K., and Kurosaki, T. (2009). PLC-gamma2 is essential for formation and maintenance of memory B cells. *The Journal of experimental medicine* 206, 681-689.
- Hirata, T., Merrill-Skoloff, G., Aab, M., Yang, J., Furie, B.C., and Furie, B. (2000). P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. *The Journal of experimental medicine* 192, 1669-1676.
- Homann, D., Teyton, L., and Oldstone, M.B. (2001). Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nature medicine* 7, 913-919.
- Hsu, H.C., Yang, P., Wang, J., Wu, Q., Myers, R., Chen, J., Yi, J., Guentert, T., Tousson, A., Stanus, A.L., *et al.* (2008). Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* 9, 166-175.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczek, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.

- Hwang, E.S., Szabo, S.J., Schwartzberg, P.L., and Glimcher, L.H. (2005). T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 307, 430-433.
- Iqbal, J., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Vose, J.M., McKeithan, T., Kucuk, C., Geng, H., Deffenbacher, K., Smith, L., Dybkaer, K., *et al.* (2010). Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood* 115, 1026-1036.
- Ise, W., Inoue, T., McLachlan, J.B., Kometani, K., Kubo, M., Okada, T., and Kurosaki, T. (2014). Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression by memory follicular helper T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 11792-11797.
- Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.
- Iyer, S.S., Latner, D.R., Zilliox, M.J., McCausland, M., Akondy, R.S., Macmaster-Penalosa, P., Hale, J.S., Ye, L., Mohammed, A.U., Yamaguchi, T., *et al.* (2013). Identification of novel markers for mouse CD4 T follicular helper cells. *Eur J Immunol* 43, 3219-3232.
- Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R.A., Bettelli, E., and Kuchroo, V.K. (2009). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol* 183, 7169-7177.
- Jay, D.C., Mitchell, D.M., and Williams, M.A. (2013). Bim mediates the elimination of functionally unfit Th1 responders from the memory pool. *PLoS one* 8, e67363.
- Jelley-Gibbs, D.M., Brown, D.M., Dibble, J.P., Haynes, L., Eaton, S.M., and Swain, S.L. (2005). Unexpected prolonged presentation of influenza antigens promotes CD4 T cell memory generation. *J Exp Med* 202, 697-706.
- Jenkins, M.K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D.L., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Itano, A., and Pape, K.A. (2001). In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annual review of immunology* 19, 23-45.
- Johnston, R.J., Poholek, A.C., Ditoro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009a). Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science* 325, 1006-1010.
- Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009b). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 325, 1006-1010.
- Kaech, S.M., Tan, J.T., Wherry, E.J., Konieczny, B.T., Surh, C.D., and Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature immunology* 4, 1191-1198.

- Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature reviews Immunology* 2, 251-262.
- Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., Nagashima, T., Takahashi, Y., Kurosaki, T., Okada, M., *et al.* (2012). Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *The Journal of experimental medicine* 209, 2079-2097.
- Kamperschroer, C., and Quinn, D.G. (1999). Quantification of epitope-specific MHC class-II-restricted T cells following lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Cellular immunology* 193, 134-146.
- Kassiotis, G., Garcia, S., Simpson, E., and Stockinger, B. (2002). Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nature immunology* 3, 244-250.
- Kasturi, S.P., Skountzou, I., Albrecht, R.A., Koutsonanos, D., Hua, T., Nakaya, H.I., Ravindran, R., Stewart, S., Alam, M., Kwissa, M., *et al.* (2011). Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 470, 543-547.
- Kavaler, J., Davis, M.M., and Chien, Y. (1984). Localization of a T-cell receptor diversity-region element. *Nature* 310, 421-423.
- Kearney, E.R., Pape, K.A., Loh, D.Y., and Jenkins, M.K. (1994). Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1, 327-339.
- Kim, C., Wilson, T., Fischer, K.F., and Williams, M.A. (2013). Sustained interactions between T cell receptors and antigens promote the differentiation of CD4(+) memory T cells. *Immunity* 39, 508-520.
- Kim, C.H., Rott, L.S., Clark-Lewis, I., Campbell, D.J., Wu, L., and Butcher, E.C. (2001). Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 193, 1373-1381.
- Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., and Okada, T. (2011). Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* 34, 961-972.
- Klein, U., Kuppers, R., and Rajewsky, K. (1997). Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood* 89, 1288-1298.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., and Dalla-Favera, R. (2003). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2639-2644.
- Koguchi, Y., Buenafe, A.C., Thauland, T.J., Gardell, J.L., Bivins-Smith, E.R., Jacoby, D.B., Slifka, M.K., and Parker, D.C. (2012). Preformed CD40L is stored in Th1, Th2, Th17, and T

follicular helper cells as well as CD4<sup>+</sup> 8- thymocytes and invariant NKT cells but not in Treg cells. *PloS one* 7, e31296.

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.

Kondrack, R.M., Harbertson, J., Tan, J.T., McBreen, M.E., Surh, C.D., and Bradley, L.M. (2003). Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *The Journal of experimental medicine* 198, 1797-1806.

Kuchen, S., Robbins, R., Sims, G.P., Sheng, C., Phillips, T.M., Lipsky, P.E., and Ettinger, R. (2007). Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4<sup>+</sup> T cell-B cell collaboration. *J Immunol* 179, 5886-5896.

Kwok, W.W., Tan, V., Gillette, L., Littell, C.T., Soltis, M.A., LaFond, R.B., Yang, J., James, E.A., and DeLong, J.H. (2012). Frequency of epitope-specific naive CD4(+) T cells correlates with immunodominance in the human memory repertoire. *J Immunol* 188, 2537-2544.

Lanzavecchia, A., Iezzi, G., and Viola, A. (1999). From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* 96, 1-4.

Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2001). Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat Immunol* 2, 487-492.

Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2002). Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nature reviews Immunology* 2, 982-987.

Lau, L.L., Jamieson, B.D., Somasundaram, T., and Ahmed, R. (1994). Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* 369, 648-652.

Le Coz, C., Joublin, A., Pasquali, J.L., Korganow, A.S., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2013). Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease. *PloS one* 8, e75319.

Lee, S.K., Rigby, R.J., Zotos, D., Tsai, L.M., Kawamoto, S., Marshall, J.L., Ramiscal, R.R., Chan, T.D., Gatto, D., Brink, R., *et al.* (2011). B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *The Journal of experimental medicine* 208, 1377-1388.

Legac, E., Autran, B., Merle-Beral, H., Katlama, C., and Debre, P. (1992). CD4<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T cells: a new T-lymphocyte subset expanded during human immunodeficiency virus infection. *Blood* 79, 1746-1753.

Lenz, D.C., Kurz, S.K., Lemmens, E., Schoenberger, S.P., Sprent, J., Oldstone, M.B., and Homann, D. (2004). IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4<sup>+</sup>T cell memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9357-9362.

Li, Z., Zhang, Y., and Sun, B. (2011). Current understanding of Th2 cell differentiation and function. *Protein & cell* 2, 604-611.

Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hisson, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., *et al.* (2001). T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 15137-15142.

Lindqvist, M., van Lunzen, J., Soghoian, D.Z., Kuhl, B.D., Ranasinghe, S., Kranias, G., Flanders, M.D., Cutler, S., Yudanin, N., Muller, M.I., *et al.* (2012). Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *The Journal of clinical investigation* *122*, 3271-3280.

Linterman, M.A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R.R., Srivastava, M., Hogan, J.J., Verma, N.K., Smyth, M.J., Rigby, R.J., and Vinuesa, C.G. (2010). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med* *207*, 353-363.

Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., *et al.* (2011). Foxp3<sup>+</sup> follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nature medicine* *17*, 975-982.

Linterman, M.A., Rigby, R.J., Wong, R., Silva, D., Withers, D., Anderson, G., Verma, N.K., Brink, R., Hutloff, A., Goodnow, C.C., *et al.* (2009). Roquin differentiates the specialized functions of duplicated T cell costimulatory receptor genes CD28 and ICOS. *Immunity* *30*, 228-241.

Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin and development of dendritic cells. *Immunological reviews* *234*, 45-54.

Liu, X., Chen, X., Zhong, B., Wang, A., Wang, X., Chu, F., Nurieva, R.I., Yan, X., Chen, P., van der Flier, L.G., *et al.* (2014). Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. *Nature* *507*, 513-518.

Liu, X., Nurieva, R.I., and Dong, C. (2013). Transcriptional regulation of follicular T-helper (Tfh) cells. *Immunological reviews* *252*, 139-145.

Liu, X., Yan, X., Zhong, B., Nurieva, R.I., Wang, A., Wang, X., Martin-Orozco, N., Wang, Y., Chang, S.H., Esplugues, E., *et al.* (2012a). Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo. *The Journal of experimental medicine* *209*, 1841-1852, S1841-1824.

Liu, X., Yan, X., Zhong, B., Nurieva, R.I., Wang, A., Wang, X., Martin-Orozco, N., Wang, Y., Chang, S.H., Esplugues, E., *et al.* (2012b). Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo. *J Exp Med* *209*, 1841-1852.

Locci, M., Havenar-Daughton, C., Landais, E., Wu, J., Kroenke, M.A., Arlehamn, C.L., Su, L.F., Cubas, R., Davis, M.M., Sette, A., *et al.* (2013a). Human circulating PD-1<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup> memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* *39*, 758-769.

Locci, M., Havenar-Daughton, C., Landais, E., Wu, J., Kroenke, M.A., Arlehamn, C.L., Su, L.F., Cubas, R., Davis, M.M., Sette, A., *et al.* (2013b). Human Circulating PD-

1CXCR3CXCR5 Memory Tfh Cells Are Highly Functional and Correlate with Broadly Neutralizing HIV Antibody Responses. *Immunity* 39, 758-769.

Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology* 2012, 925135.

Lukacs, N.W. (2000). Migration of helper T-lymphocyte subsets into inflamed tissues. *The Journal of allergy and clinical immunology* 106, S264-269.

Luthje, K., Kallies, A., Shimohakamada, Y., Belz, G.T., Light, A., Tarlinton, D.M., and Nutt, S.L. (2012). The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. *Nature immunology* 13, 491-498.

Ma, C.S., Avery, D.T., Chan, A., Batten, M., Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Arkwright, P.D., Kreins, A.Y., Averbuch, D., Engelhard, D., *et al.* (2012). Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. *Blood* 119, 3997-4008.

Ma, C.S., and Deenick, E.K. (2014). Human T follicular helper (Tfh) cells and disease. *Immunology and cell biology* 92, 64-71.

Ma, C.S., Suryani, S., Avery, D.T., Chan, A., Nanan, R., Santner-Nanan, B., Deenick, E.K., and Tangye, S.G. (2009). Early commitment of naive human CD4(+) T cells to the T follicular helper (T(FH)) cell lineage is induced by IL-12. *Immunology and cell biology* 87, 590-600.

Mackay, C.R., Marston, W.L., and Dudler, L. (1990). Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *The Journal of experimental medicine* 171, 801-817.

Mackay, L.K., Braun, A., Macleod, B.L., Collins, N., Tebartz, C., Bedoui, S., Carbone, F.R., and Gebhardt, T. (2015). Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. *J Immunol* 194, 2059-2063.

Mackay, L.K., Rahimpour, A., Ma, J.Z., Collins, N., Stock, A.T., Hafon, M.L., Vega-Ramos, J., Lauzurica, P., Mueller, S.N., Stefanovic, T., *et al.* (2013). The developmental pathway for CD103(+)CD8<sup>+</sup> tissue-resident memory T cells of skin. *Nature immunology* 14, 1294-1301.

MacLennan, I.C. (1994). Germinal centers. *Annual review of immunology* 12, 117-139.

MacLeod, M., Kwakkenbos, M.J., Crawford, A., Brown, S., Stockinger, B., Schepers, K., Schumacher, T., and Gray, D. (2006). CD4 memory T cells survive and proliferate but fail to differentiate in the absence of CD40. *The Journal of experimental medicine* 203, 897-906.

MacLeod, M.K., David, A., McKee, A.S., Crawford, F., Kappler, J.W., and Murrack, P. (2011). Memory CD4 T cells that express CXCR5 provide accelerated help to B cells. *J Immunol* 186, 2889-2896.

Malherbe, L., Hausl, C., Teyton, L., and McHeyzer-Williams, M.G. (2004). Clonal selection of helper T cells is determined by an affinity threshold with no further skewing of TCR binding properties. *Immunity* 21, 669-679.

- Marshall, H.D., Chandele, A., Jung, Y.W., Meng, H., Poholek, A.C., Parish, I.A., Rutishauser, R., Cui, W., Kleinstein, S.H., Craft, J., *et al.* (2011). Differential expression of Ly6C and T-bet distinguish effector and memory Th1 CD4(+) cell properties during viral infection. *Immunity* *35*, 633-646.
- Martins, G., and Calame, K. (2008). Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annual review of immunology* *26*, 133-169.
- Maruyama, M., Lam, K.P., and Rajewsky, K. (2000). Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature* *407*, 636-642.
- Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L., and Lefrancois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* *291*, 2413-2417.
- Matzinger, P. (1998). An innate sense of danger. *Seminars in immunology* *10*, 399-415.
- Matzinger, P. (2002). An innate sense of danger. *Annals of the New York Academy of Sciences* *961*, 341-342.
- 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.
- McHeyzer-Williams, L.J., Milpied, P.J., Okitsu, S.L., and McHeyzer-Williams, M.G. (2015). Class-switched memory B cells remodel BCRs within secondary germinal centers. *Nature immunology* *16*, 296-305.
- McHeyzer-Williams, M., Okitsu, S., Wang, N., and McHeyzer-Williams, L. (2012). Molecular programming of B cell memory. *Nature reviews Immunology* *12*, 24-34.
- McHeyzer-Williams, M.G., and Davis, M.M. (1995). Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo. *Science* *268*, 106-111.
- McKinstry, K.K., Strutt, T.M., and Swain, S.L. (2010). The potential of CD4 T-cell memory. *Immunology* *130*, 1-9.
- Melief, C.J. (2003). Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *European journal of immunology* *33*, 2645-2654.
- Miller, J.F., and Mitchell, G.F. (1968). Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* *128*, 801-820.
- Mitsdoerffer, M., Lee, Y., Jager, A., Kim, H.J., Korn, T., Kolls, J.K., Cantor, H., Bettelli, E., and Kuchroo, V.K. (2010). Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 14292-14297.

- Moguche, A.O., Shafiani, S., Clemons, C., Larson, R.P., Dinh, C., Higdon, L.E., Cambier, C.J., Sissons, J.R., Gallegos, A.M., Fink, P.J., *et al.* (2015). ICOS and Bcl6-dependent pathways maintain a CD4 T cell population with memory-like properties during tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* 212, 715-728.
- Mohrs, M., Shinkai, K., Mohrs, K., and Locksley, R.M. (2001). Analysis of type 2 immunity in vivo with a bicistronic IL-4 reporter. *Immunity* 15, 303-311.
- Moir, S., and Fauci, A.S. (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nature reviews Immunology* 9, 235-245.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869-877.
- Moon, J.J., Chu, H.H., Pepper, M., McSorley, S.J., Jameson, S.C., Kedl, R.M., and Jenkins, M.K. (2007). Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 27, 203-213.
- Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., *et al.* (2011). Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34, 108-121.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* 7, 145-173.
- Moulton, V.R., Bushar, N.D., Leeser, D.B., Patke, D.S., and Farber, D.L. (2006). Divergent generation of heterogeneous memory CD4 T cells. *J Immunol* 177, 869-876.
- 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, D.B., Lo, D., Rath, S., Brinster, R.L., Flavell, R.A., Slanetz, A., and Janeway, C.A., Jr (1989). A novel MHC class II epitope expressed in thymic medulla but not cortex. *Nature* 338, 765-768.
- Niu, J., Song, Z., Yang, X., Zhai, Z., Zhong, H., and Hao, F. (2015). Increased circulating follicular helper T cells and activated B cells correlate with disease severity in patients with psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y.H., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., *et al.* (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29, 138-149.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325, 1001-1005.

- Nurieva, R.I., Podd, A., Chen, Y., Alekseev, A.M., Yu, M., Qi, X., Huang, H., Wen, R., Wang, J., Li, H.S., *et al.* (2012). STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (Tfh) cell generation and function. *The Journal of biological chemistry* 287, 11234-11239.
- Obst, R., van Santen, H.M., Mathis, D., and Benoist, C. (2005). Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4(+) T cell response. *The Journal of experimental medicine* 201, 1555-1565.
- Obukhanych, T.V., and Nussenzweig, M.C. (2006). T-independent type II immune responses generate memory B cells. *The Journal of experimental medicine* 203, 305-310.
- 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. *The Journal of experimental medicine* 176, 1273-1281.
- Okhrimenko, A., Grun, J.R., Westendorf, K., Fang, Z., Reinke, S., von Roth, P., Wassilew, G., Kuhl, A.A., Kudernatsch, R., Demski, S., *et al.* (2014). Human memory T cells from the bone marrow are resting and maintain long-lasting systemic memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 9229-9234.
- Osborne, L.C., Dhanji, S., Snow, J.W., Priatel, J.J., Ma, M.C., Miners, M.J., Teh, H.S., Goldsmith, M.A., and Abraham, N. (2007). Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R alpha mutant mice. *The Journal of experimental medicine* 204, 619-631.
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., and Hymowitz, S.G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual review of immunology* 29, 71-109.
- Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C.G., Qi, C.F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H.C., 3rd, Liu, C., Schwartzberg, P.L., and Leonard, W.J. (2002). A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298, 1630-1634.
- Pagan, A.J., Pepper, M., Chu, H.H., Green, J.M., and Jenkins, M.K. (2012). CD28 promotes CD4+ T cell clonal expansion during infection independently of its YMNM and PYAP motifs. *J Immunol* 189, 2909-2917.
- Pangault, C., Ame-Thomas, P., Ruminy, P., Rossille, D., Caron, G., Baia, M., De Vos, J., Roussel, M., Monvoisin, C., Lamy, T., *et al.* (2010). Follicular lymphoma cell niche: identification of a preeminent IL-4-dependent T(FH)-B cell axis. *Leukemia* 24, 2080-2089.
- Pape, K.A., Catron, D.M., Itano, A.A., and Jenkins, M.K. (2007). The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* 26, 491-502.
- Pape, K.A., Taylor, J.J., Maul, R.W., Gearhart, P.J., and Jenkins, M.K. (2011). Different B Cell Populations Mediate Early and Late Memory During an Endogenous Immune Response. *Science* 331, 1203-1207.

- Parry, R.V., Rumbley, C.A., Vandenberghe, L.H., June, C.H., and Riley, J.L. (2003). CD28 and inducible costimulatory protein Src homology 2 binding domains show distinct regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, Bcl-xL, and IL-2 expression in primary human CD4 T lymphocytes. *J Immunol* *171*, 166-174.
- Paul, W.E., and Seder, R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* *76*, 241-251.
- Paus, D., Phan, T.G., Chan, T.D., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. (2006). Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *The Journal of experimental medicine* *203*, 1081-1091.
- Pelletier, N., McHeyzer-Williams, L.J., Wong, K.A., Urich, E., Fazilleau, N., and McHeyzer-Williams, M.G. (2010). Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nature immunology* *11*, 1110-1118.
- Pepper, M., and Jenkins, M.K. (2011). Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nature immunology* *12*, 467-471.
- Pepper, M., Linehan, J.L., Pagan, A.J., Zell, T., Dileepan, T., Cleary, P.P., and Jenkins, M.K. (2010). Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells. *Nature immunology* *11*, 83-89.
- Pepper, M., Pagan, A.J., Igyarto, B.Z., Taylor, J.J., and Jenkins, M.K. (2011). Opposing signals from the Bcl6 transcription factor and the interleukin-2 receptor generate T helper 1 central and effector memory cells. *Immunity* *35*, 583-595.
- Pereira, J.P., Kelly, L.M., Xu, Y., and Cyster, J.G. (2009). EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature* *460*, 1122-1126.
- Perreau, M., Savoye, A.L., De Crignis, E., Corpataux, J.M., Cubas, R., Haddad, E.K., De Leval, L., Graziosi, C., and Pantaleo, G. (2013). Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *The Journal of experimental medicine* *210*, 143-156.
- Podshivalova, K., and Salomon, D.R. (2013). MicroRNA regulation of T-lymphocyte immunity: modulation of molecular networks responsible for T-cell activation, differentiation, and development. *Critical reviews in immunology* *33*, 435-476.
- Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J.F., Liu, L., Lim, H.K., Migaud, M., Israel, L., Chrabieh, M., Audry, M., *et al.* (2011). Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* *332*, 65-68.
- Purtha, W.E., Tedder, T.F., Johnson, S., Bhattacharya, D., and Diamond, M.S. (2011). Memory B cells, but not long-lived plasma cells, possess antigen specificities for viral escape mutants. *The Journal of experimental medicine* *208*, 2599-2606.
- Purton, J.F., Tan, J.T., Rubinstein, M.P., Kim, D.M., Sprent, J., and Surh, C.D. (2007). Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent. *The Journal of experimental medicine* *204*, 951-961.

- Qi, H., Cannons, J.L., Klauschen, F., Schwartzberg, P.L., and Germain, R.N. (2008). SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 455, 764-769.
- Qi, H., Egen, J.G., Huang, A.Y., and Germain, R.N. (2006). Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* 312, 1672-1676.
- Rasheed, A.U., Rahn, H.P., Sallusto, F., Lipp, M., and Muller, G. (2006). Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *European journal of immunology* 36, 1892-1903.
- Ravasi, T., Suzuki, H., Cannistraci, C.V., Katayama, S., Bajic, V.B., Tan, K., Akalin, A., Schmeier, S., Kanamori-Katayama, M., Bertin, N., *et al.* (2010). An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell* 140, 744-752.
- Rawal, S., Chu, F., Zhang, M., Park, H.J., Nattamai, D., Kannan, S., Sharma, R., Delgado, D., Chou, T., Lin, H.Y., *et al.* (2013). Cross talk between follicular Th cells and tumor cells in human follicular lymphoma promotes immune evasion in the tumor microenvironment. *J Immunol* 190, 6681-6693.
- Reinhardt, R.L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T., and Jenkins, M.K. (2001). Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 410, 101-105.
- Reinhardt, R.L., Liang, H.E., and Locksley, R.M. (2009). Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nature immunology* 10, 385-393.
- Riou, C., Yassine-Diab, B., Van grevenynghe, J., Somogyi, R., Greller, L.D., Gagnon, D., Gimmig, S., Wilkinson, P., Shi, Y., Cameron, M.J., *et al.* (2007). Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4<sup>+</sup> central memory T cells. *The Journal of experimental medicine* 204, 79-91.
- Rivino, L., Messi, M., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Geginat, J. (2004). Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4<sup>+</sup> central memory T cells. *The Journal of experimental medicine* 200, 725-735.
- Roosendaal, R., and Carroll, M.C. (2007). Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunological reviews* 219, 157-166.
- Roosendaal, R., Mempel, T.R., Pitcher, L.A., Gonzalez, S.F., Verschoor, A., Mebius, R.E., von Andrian, U.H., and Carroll, M.C. (2009). Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity* 30, 264-276.
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological reviews* 212, 8-27.
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22, 745-763.

Sallusto, F., Kremmer, E., Palermo, B., Hoy, A., Ponath, P., Qin, S., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999a). Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *European journal of immunology* 29, 2037-2045.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Araki, K., and Ahmed, R. (2010). From vaccines to memory and back. *Immunity* 33, 451-463.

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

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999c). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 410, 708-712.

Sapozhnikov, A., Pewzner-Jung, Y., Kalchenko, V., Krauthgamer, R., Shachar, I., and Jung, S. (2008). Perivascular clusters of dendritic cells provide critical survival signals to B cells in bone marrow niches. *Nature immunology* 9, 388-395.

Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J.J., Bickham, K.L., Lerner, H., Goldstein, M., Sykes, M., *et al.* (2013). Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* 38, 187-197.

Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A.B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *The Journal of experimental medicine* 192, 1553-1562.

Scheeren, F.A., Naspetti, M., Diehl, S., Schotte, R., Nagasawa, M., Wijnands, E., Gimeno, R., Vyth-Dreese, F.A., Blom, B., and Spits, H. (2005). STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nature immunology* 6, 303-313.

Schmitt, N., Liu, Y., Bentebibel, S.E., Munagala, I., Bourdery, L., Venuprasad, K., Banchereau, J., and Ueno, H. (2014). The cytokine TGF-beta co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nature immunology* 15, 856-865.

Schraml, B.U., and Reis e Sousa, C. (2015). Defining dendritic cells. *Current opinion in immunology* 32, 13-20.

Schwab, S.R., and Cyster, J.G. (2007). Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature immunology* 8, 1295-1301.

Schwickert, T.A., Victora, G.D., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Mugnier, M.R., Gitlin, A.D., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2011). A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *The Journal of experimental medicine* 208, 1243-1252.

Seddon, B., Tomlinson, P., and Zamoyska, R. (2003). Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nature immunology* 4, 680-686.

- Sercan Alp, O., Durlanik, S., Schulz, D., McGrath, M., Grun, J.R., Bardua, M., Ikuta, K., Sgouroudis, E., Riedel, R., Zehentmeier, S., *et al.* (2015). Memory CD8(+) T cells colocalize with IL-7(+) stromal cells in bone marrow and rest in terms of proliferation and transcription. *European journal of immunology* 45, 975-987.
- Shih, T.A., Meffre, E., Roederer, M., and Nussenzweig, M.C. (2002). Role of BCR affinity in T cell dependent antibody responses in vivo. *Nature immunology* 3, 570-575.
- Shimoda, M., Li, T., Pihkala, J.P., and Koni, P.A. (2006). Role of MHC class II on memory B cells in post-germinal center B cell homeostasis and memory response. *J Immunol* 176, 2122-2133.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., *et al.* (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867.
- Shinoda, K., Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Zehentmeier, S., Hosokawa, H., Iwamura, C., Koseki, H., Tumes, D.J., Radbruch, A., *et al.* (2012). Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 7409-7414.
- Shulman, Z., Gitlin, A.D., Targ, S., Jankovic, M., Pasqual, G., Nussenzweig, M.C., and Victora, G.D. (2013). T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science* 341, 673-677.
- Simpson, N., Gatenby, P.A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., Manku, H., Vyse, T.J., Roncador, G., Huttley, G.A., *et al.* (2010). Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 62, 234-244.
- Sokol, C.L., Chu, N.Q., Yu, S., Nish, S.A., Laufer, T.M., and Medzhitov, R. (2009). Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nature immunology* 10, 713-720.
- Sozzani, S. (2005). Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine & growth factor reviews* 16, 581-592.
- Stassen, M., Schmitt, E., and Bopp, T. (2012). From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1247, 56-68.
- Stavnezer, J., Guikema, J.E., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual review of immunology* 26, 261-292.
- Steinke, J.W., and Borish, L. (2001). Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respiratory research* 2, 66-70.
- Surh, C.D., and Sprent, J. (2008). Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29, 848-862.

- Suto, A., Kashiwakuma, D., Kagami, S., Hirose, K., Watanabe, N., Yokote, K., Saito, Y., Nakayama, T., Grusby, M.J., Iwamoto, I., *et al.* (2008). Development and characterization of IL-21-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *The Journal of experimental medicine* *205*, 1369-1379.
- Swain, S.L., Hu, H., and Huston, G. (1999). Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* *286*, 1381-1383.
- Taylor, J.J., Pape, K.A., and Jenkins, M.K. (2012). A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *The Journal of experimental medicine* *209*, 597-606.
- Teijaro, J.R., Njau, M.N., Verhoeven, D., Chandran, S., Nadler, S.G., Hasday, J., and Farber, D.L. (2009). Costimulation modulation uncouples protection from immunopathology in memory T cell responses to influenza virus. *J Immunol* *182*, 6834-6843.
- Tokoyoda, K., Zehentmeier, S., Hegazy, A.N., Albrecht, I., Grun, J.R., Lohning, M., and Radbruch, A. (2009). Professional memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity* *30*, 721-730.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* *302*, 575-581.
- Topham, D.J., and Doherty, P.C. (1998). Longitudinal analysis of the acute Sendai virus-specific CD4<sup>+</sup> T cell response and memory. *J Immunol* *161*, 4530-4535.
- Tsai, L.M., and Yu, D. (2014). Follicular helper T-cell memory: establishing new frontiers during antibody response. *Immunology and cell biology* *92*, 57-63.
- Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S., and Fagarasan, S. (2009). Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3<sup>+</sup> T cells in gut Peyer's patches. *Science* *323*, 1488-1492.
- Tube, N.J., Pagan, A.J., Taylor, J.J., Nelson, R.W., Linehan, J.L., Ertelt, J.M., Huseby, E.S., Way, S.S., and Jenkins, M.K. (2013). Single naive CD4<sup>+</sup> T cells from a diverse repertoire produce different effector cell types during infection. *Cell* *153*, 785-796.
- Turner, D.L., Bickham, K.L., Thome, J.J., Kim, C.Y., D'Ovidio, F., Wherry, E.J., and Farber, D.L. (2014). Lung niches for the generation and maintenance of tissue-resident memory T cells. *Mucosal immunology* *7*, 501-510.
- Ugur, M., Schulz, O., Menon, M.B., Krueger, A., and Pabst, O. (2014). Resident CD4<sup>+</sup> T cells accumulate in lymphoid organs after prolonged antigen exposure. *Nature communications* *5*, 4821.
- Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., and Strober, W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* *18*, 415-428.
- van Essen, D., Dullforce, P., Brocker, T., and Gray, D. (2000). Cellular interactions involved in Th cell memory. *J Immunol* *165*, 3640-3646.

van Leeuwen, E.M., Sprent, J., and Surh, C.D. (2009). Generation and maintenance of memory CD4(+) T Cells. *Current opinion in immunology* 21, 167-172.

Van, V.Q., Baba, N., Rubio, M., Wakahara, K., Panzini, B., Richard, C., Soucy, G., Franchimont, D., Fortin, G., Torres, A.C., *et al.* (2012). CD47(low) status on CD4 effectors is necessary for the contraction/resolution of the immune response in humans and mice. *PLoS one* 7, e41972.

Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annual review of immunology* 30, 429-457.

Vogelzang, A., McGuire, H.M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C.R., and King, C. (2008). A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity* 29, 127-137.

Wallin, E.F., Jolly, E.C., Suchanek, O., Bradley, J.A., Espeli, M., Jayne, D.R., Linterman, M.A., and Smith, K.G. (2014). Human T follicular helper and T follicular regulatory cell maintenance is independent of germinal centers. *Blood* 124, 2666-2674.

Wang, C., Hillsamer, P., and Kim, C.H. (2011). Phenotype, effector function, and tissue localization of PD-1-expressing human follicular helper T cell subsets. *BMC immunology* 12, 53.

Weber, J.P., Fuhrmann, F., and Hutloff, A. (2012a). T follicular helper cells survive as long-term memory cells. *Eur J Immunol* 42, 1981-1988.

Weber, J.P., Fuhrmann, F., and Hutloff, A. (2012b). T-follicular helper cells survive as long-term memory cells. *European journal of immunology* 42, 1981-1988.

Weber, K.S., Li, Q.J., Persaud, S.P., Campbell, J.D., Davis, M.M., and Allen, P.M. (2012c). Distinct CD4+ helper T cells involved in primary and secondary responses to infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 9511-9516.

Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., Hu-Li, J., Yao, Z., Cui, K., Kanno, Y., Roh, T.Y., Watford, W.T., *et al.* (2009). Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* 30, 155-167.

Wei, S.H., Rosen, H., Matheu, M.P., Sanna, M.G., Wang, S.K., Jo, E., Wong, C.H., Parker, I., and Cahalan, M.D. (2005). Sphingosine 1-phosphate type 1 receptor agonism inhibits transendothelial migration of medullary T cells to lymphatic sinuses. *Nat Immunol* 6, 1228-1235.

Weill, J.C., Le Gallou, S., Hao, Y., and Reynaud, C.A. (2013). Multiple players in mouse B cell memory. *Current opinion in immunology* 25, 334-338.

Weiner, H.L., da Cunha, A.P., Quintana, F., and Wu, H. (2011). Oral tolerance. *Immunological reviews* 241, 241-259.

- Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., *et al.* (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3<sup>+</sup> T reg cells. *The Journal of experimental medicine* 209, 1723-1742, S1721.
- Whitmire, J.K., Asano, M.S., Kaech, S.M., Sarkar, S., Hannum, L.G., Shlomchik, M.J., and Ahmed, R. (2009). Requirement of B cells for generating CD4<sup>+</sup> T cell memory. *J Immunol* 182, 1868-1876.
- Whitmire, J.K., Murali-Krishna, K., Altman, J., and Ahmed, R. (2000). Antiviral CD4 and CD8 T-cell memory: differences in the size of the response and activation requirements. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 355, 373-379.
- Williams, M.A., Ravkov, E.V., and Bevan, M.J. (2008). Rapid culling of the CD4<sup>+</sup> T cell repertoire in the transition from effector to memory. *Immunity* 28, 533-545.
- Wojciechowski, S., Jordan, M.B., Zhu, Y., White, J., Zajac, A.J., and Hildeman, D.A. (2006). Bim mediates apoptosis of CD127(lo) effector T cells and limits T cell memory. *European journal of immunology* 36, 1694-1706.
- Wrammert, J., Koutsonanos, D., Li, G.M., Edupuganti, S., Sui, J., Morrissey, M., McCausland, M., Skountzou, I., Hornig, M., Lipkin, W.I., *et al.* (2011). Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *The Journal of experimental medicine* 208, 181-193.
- Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S., and Dong, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *The Journal of biological chemistry* 282, 9358-9363.
- Yang, Y., Ghosn, E.E., Cole, L.E., Obukhanych, T.V., Sadate-Ngatchou, P., Vogel, S.N., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (2012). Antigen-specific memory in B-1a and its relationship to natural immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 5388-5393.
- Yasuda, T., Kometani, K., Takahashi, N., Imai, Y., Aiba, Y., and Kurosaki, T. (2011). ERKs induce expression of the transcriptional repressor Blimp-1 and subsequent plasma cell differentiation. *Science signaling* 4, ra25.
- Yellin, M.J., Sippel, K., Inghirami, G., Covey, L.R., Lee, J.J., Sinning, J., Clark, E.A., Chess, L., and Lederman, S. (1994). CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. *J Immunol* 152, 598-608.
- Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., *et al.* (2009). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* 31, 457-468.

- Yusuf, I., Kageyama, R., Monticelli, L., Johnston, R.J., Ditoro, D., Hansen, K., Barnett, B., and Crotty, S. (2010). Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J Immunol* 185, 190-202.
- Zhang, X., Li, L., Choe, J., Krajewski, S., Reed, J.C., Thompson, C., and Choi, Y.S. (1996). Up-regulation of Bcl-xL expression protects CD40-activated human B cells from Fas-mediated apoptosis. *Cellular immunology* 173, 149-154.
- Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596.
- Zhou, L., Ivanov, II, Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology* 8, 967-974.
- Zhu, J., Jankovic, D., Grinberg, A., Guo, L., and Paul, W.E. (2006). Gfi-1 plays an important role in IL-2-mediated Th2 cell expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18214-18219.
- Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.M., Smyth, M.J., *et al.* (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *The Journal of experimental medicine* 207, 365-378.
- Zuccarino-Catania, G.V., Sadanand, S., Weisel, F.J., Tomayko, M.M., Meng, H., Kleinstein, S.H., Good-Jacobson, K.L., and Shlomchik, M.J. (2014). CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nature immunology* 15, 631-637.

