



Mécanismes impliqués dans la polarisation des lymphocytes T CD4+ folliculaires et l'initiation de l'immunité muqueuse après immunisation intradermique par un antigène particulaire

Charles Nuttens

► To cite this version:

Charles Nuttens. Mécanismes impliqués dans la polarisation des lymphocytes T CD4+ folliculaires et l'initiation de l'immunité muqueuse après immunisation intradermique par un antigène particulaire. Santé publique et épidémiologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066429 . tel-01315319

HAL Id: tel-01315319

<https://theses.hal.science/tel-01315319>

Submitted on 13 May 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.



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité
Immunologie
(ED Physiologie et Physiopathologie)

Présentée par
M. Charles NUTTENS

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Mécanismes impliqués dans la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ folliculaires et l'initiation de l'immunité muqueuse après immunisation intradermique par un antigène particulaire

Soutenue le 12 mai 2014

devant le jury composé de :

Pr. Pierre AUCOUTURIER	Président du Jury
Dr. Fabienne ANJUERE	Rapporteur
Dr. Armelle PHALIPON	Rapporteur
Dr. Thomas BARANEK	Examineur
Dr. Nicolas FAZILLEAU	Examineur
Dr. Béhazine COMBADIÈRE	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier Mme Fabienne Anjuère et Mme Armelle Phalipon pour avoir accepté d'évaluer ce travail, ainsi que Mr Nicolas Fazilleau et Mr Thomas Baranek d'avoir accepté d'être examinateurs lors de ma soutenance. Je remercie également M. Pierre Aucouturier pour avoir accepté de la présider.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance aux personnes avec qui j'ai travaillé. Ils ont tous participé au formidable environnement humain et scientifique que j'ai côtoyé pendant ces trois années et demi, et ont contribué à transformer mes dernières années d'études en une extraordinaire aventure.

Je tiens tout d'abord à remercier Behazine Combadière, ma directrice de thèse, pour m'avoir permis de réaliser ce projet et pour m'en avoir donné les moyens. Je me sens privilégié d'avoir rencontré et travaillé avec une telle source d'inspiration scientifique, qui a su prendre le temps de me donner de précieux conseils. Merci de m'avoir transmis et enseigné les ficelles de la recherche scientifique, qui m'ont permis d'acquérir une réelle autonomie dans mon travail et dans mes raisonnements scientifiques.

Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans l'aide et les conseils techniques et scientifiques de nombreuses personnes qui n'ont pas hésité à s'impliquer dans mon projet de thèse. Je tiens à remercier en particulier Olivia Bonduelle pour m'avoir enseigné de nombreuses techniques ainsi qu'Helene Perrin pour les discussions scientifiques et ses nombreux conseils. Je remercie Nora Yahia pour sa bonne humeur et ses gâteaux. Louis Chonco et Clément Lévin, mes « T_{FH} mates », avec qui nous avons étudié sans relâche la vie de ces LT. Je remercie également Mireille Centlivre, Angéle Soria et Mélody Duffossé pour leurs avis intéressants sur des discussions moins scientifiques.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreux collaborateurs : Christophe Combadière, Arnaud Moris, Nicolas Fazilleau et Alexandre Boissonnas qui n'ont pas hésité à me donner des conseils dans leurs domaines d'expertises respectifs et qui se sont impliqués dans mon projet de thèse. Travailler avec ces personnes expérimentées m'a permis de développer une vision plus globale mon projet et de me poser les questions différemment.

Merci à Marie-Ange et Pascale, nos deux gestionnaires, qui m'ont toujours permis de commander à la dernière minute et qui ont réglé toutes les situations administratives nécessaires au bon déroulement de cette thèse, même dans les situations les plus in extremis.

Je n'oublie évidemment pas mes « Lab Mates » pour leur aide, et surtout pour leur bonne humeur, pour nos fous rires et autres moments de détente. Merci pour toutes ces journées passées ensemble au labo. Et en particulier Fab, pour être lui-même (et aussi pour les cellules en 3D), PG pour ses soirées et sa musique, Anya pour les "kiddy break", Oli para los cursos de español, Elo et sa folie de la salsa ainsi que Lucie et Oriane. Je remercie également Virginie, Stéph, Alejendra, Camille, Constance, Chris, Ludo, Mat, Sylvain, Charlotte, Marion, Charles, Solène, Victor, Philippe, Maxime, Jessica et Pauline, ainsi que tous ceux que j'ai connu moins longtemps, mais qui ont participé à créer une atmosphère de travail incroyable.

Je remercie écore mes « Running Mates », Fab, Christophe, Arnaud, Stéph, Alejendra et Anya avec qui j'ai partagé énormément d'aventures pendant toute nos courses épuisantes.

Je voudrais finir en remerciant ma famille, qui m'a soutenu et encouragé durant ces très longues années d'études, et enfin Cassandra pour beaucoup trop de choses.

Résumé

La nature des cellules dendritiques (DC) engagées lors d'une vaccination conditionne la qualité de la réponse immunitaire adaptative. L'immunisation par la peau est particulièrement efficace car elle cible de nombreuses sous-populations de DC cutanées telles que les cellules de Langerhans (LC). Cependant, les relations entre ces DC et les cellules effectrices associées à la réponse humorale ne sont pas connues. L'objectif de ma thèse est d'identifier les mécanismes cellulaires précoces impliqués dans l'initiation de la réponse humorale, dans un contexte de vaccination intradermique (i.d.) avec un antigène particulière. En étudiant la distribution spatiale et temporelle des particules synthétiques de PLA adsorbées par la protéine p24 du VIH, nous avons observé leur prise en charge par les DC cutanées mais également par les DC résidentes des ganglions drainant de la peau. Cependant, l'étude de la réponse immunitaire a démontré que seules les cellules cutanées, et en particulier les LC, induisent la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ folliculaires (T_{FH}) et le développement des lymphocytes B sécrétant des IgA. L'immunisation i.d. a également généré l'infiltration de cellules inflammatoires au niveau du site d'injection et du ganglion. En utilisant un modèle murin *Ccr2*^{-/-}, nous avons démontré que les cellules dépendantes de CCR2⁺ interfèrent avec la formation des T_{FH}. Enfin, l'étude du micro-environnement ganglionnaire suggère que TNF est favorable à la polarisation des T_{FH}. En conclusion, ces résultats soulignent l'importance de cibler les DC cutanées lors de la vaccination afin de proposer de nouvelles stratégies vaccinales.

Mots Clés

Cellules dendritiques, lymphocytes T CD4⁺ folliculaires, vaccination intradermique, immunité humorale, cellules de Langerhans.

Summary

The quality of the adaptive immune response to a vaccine is driven by the nature of dendritic cells (DCs) engaged during vaccination. Skin immunization is particularly efficient as it targets the numerous cutaneous DCs, including Langerhans cells (LCs). However, the relationship between DCs and effector cells associated with humoral immunity has not been elucidated. The main objective of my thesis was to identify cellular mechanisms implicated in the initialization of the humoral immune response, in the context of intradermal (i.d.) vaccination with particle-based antigens. In examining the spatial and temporal distribution of synthetic PLA particles adsorbed with the HIV-p24 protein, we observed their uptake by both cutaneous DCs and also skin-draining lymph node (dLNs) resident DCs. However, our immune response study highlighted that only skin cells, and in particular LCs, were able to stimulate polarization of follicular helper T cells (T_{FH}) and the development of IgA-secreting B lymphocytes. I.d. vaccination also induced an inflammatory cell infiltration at both the injection site and in dLNs. Using a *Ccr2*^{-/-} mouse model, we have shown the CCR2⁺ dependant cells can interfere in T_{FH} polarization. Finally, the study of the dLN micro-environment suggested TNF can promote T_{FH} formation. In conclusion, these findings highlight the importance of targeting skin DC in vaccination to propose new vaccine strategies.

Keywords

Dendritic cells, follicular helper T cells, intradermal vaccination, humoral response, Langerhans cells.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	1
Liste des illustrations	2
Liste des tableaux	3
Etude Bibliographique	4
1 Avant-propos.....	5
2 VIH-1, un modèle de contamination par les muqueuses	7
2.1 Le virus de l'immunodéficience humaine	7
2.1.1 Classification, génome, protéines et structure	7
2.1.2 Cycle de réplication	8
2.2 Épidémiologie de la transmission par les voies sexuelles	9
2.2.1 Épidémiologie	9
2.2.2 Risque de transmission	9
2.2.3 Pratiques sexuelles à risque.....	10
2.3 Mécanismes précoces de l'infection par les muqueuses sexuelles	11
2.3.1 Régions d'infection.....	11
2.3.2 Principales populations cellulaires infectées.....	12
2.4 La recherche vaccinale anti-VIH	13
2.4.1 Les mécanismes d'échappement du VIH	13
2.4.2 Les essais de vaccination humaine	14
2.4.3 La réponse immunitaire cellulaire et humorale systémique	15
3 L'importance des muqueuses dans la protection contre le VIH.....	17
3.1 Rôles des IgA muqueux dans la protection contre le VIH	17
3.2 Génération des plasmocytes et formation des LB mémoires	18
3.2.1 Persistance des plasmocytes à longue durée de vie	18
3.2.2 Formation des LB mémoires	19
3.2.3 Migration vers les muqueuses.....	19
3.3 La vaccination par la muqueuse vaginale	20
3.4 La vaccination par des sites inducteurs alternatifs.....	20
4 Potentiel de la peau en vaccination et mécanismes immunitaires	22
4.1 Pourquoi immuniser par la peau ?	22
4.2 Structure de la peau humaine et murine	23
4.2.1 Organisation des différents tissus	23
4.2.2 Les tissus cutanés.....	24
4.2.3 Structure du ganglion drainant la peau	25
4.3 Le réseau de DC cutanées	27
4.3.1 L'origine des DC.....	27

4.3.2	Les cellules de Langerhans	28
4.3.3	Les sous-populations de DC dermiques.....	29
4.4	Les DC résidentes des ganglions	30
4.5	Les méthodes de vaccination cutanée	31
4.6	Intérêt des particules fines en vaccination cutanée	32
4.6.1	Les différentes natures de particules.....	32
4.6.2	L'influence de la taille des particules.....	34
4.6.3	Prise en charges par les DC	35
5	Induction de la réponse immunitaire par l'immunisation i.d.	36
5.1	Capture de l'antigène et activation des DC	36
5.2	Infiltration de cellules inflammatoires.....	37
5.3	Migration de antigène et des cellules vers le ganglion drainant.....	38
5.4	Initiation de la réponse humorale dans les ganglions drainants	40
5.4.1	Les différents sous-types de lymphocytes T_H	40
5.4.2	Activation des lymphocytes B (antigène dépendant)	42
5.4.3	Les mécanismes moléculaires précoces	43
5.4.4	Le développement extra-folliculaire (T_H dépendant).....	45
5.4.5	Le développement par les centres germinatifs (T_{FH} dépendant)	45
6	Rôle des T_{FH} dans la réponse humorale	48
6.1	Caractéristiques et implication des T_{FH} dans la réponse humorale	48
6.1.1	Origines des T_{FH} et définition actuelle.....	48
6.1.2	Facteurs de transcriptions et cytokines.....	48
6.1.3	Rôles dans l'immunité humorale	49
6.2	Le développement des T_{FH}	50
6.2.1	Différents modèles de différenciation.....	50
6.2.2	Le modèle de différenciation en plusieurs étapes.....	52
6.3	Implication des cytokines et des DC dans la différenciation en T_{FH}	55
6.3.1	Les cytokines associées à la différenciation en T_{FH}	55
6.3.2	Implication des DC cutanées.....	56
7	Conclusion	59
	Présentation du projet de recherche	60
	Résultats	63
1	Distribution spatiale et temporelle <i>in vivo</i> des particules de PLA injectées par voie i.d.	64
1.1	Introduction	64
1.2	Matériel et méthodes	65
1.3	Résultats	68

1.4	Discussions et perspectives	76
2	Implication des DC cutanées dans l'induction des T _{FH} et le développement de plasmocytes sécrétant des IgA.....	79
2.1	Introduction à l'article	79
2.2	Article	81
2.3	Résumé des résultats et de la discussion.....	110
3	Résultats supplémentaires : Analyse transcriptomique du micro-environnement inflammatoire ganglionnaire favorisant la polarisation des T _{FH}	113
3.1	Introduction	113
3.2	Matériels et méthodes	114
3.3	Résultats et discussion	115
4	Altération de la réponse T _{FH} par les monocytes inflammatoires dans les souris déficientes en CCR2.....	118
4.1	Introduction	118
4.2	Résultats	120
4.3	Discussion	122
	Discussion et perspectives	123
1	Résumé des objectifs et résultats obtenus	124
2	Le rôle de la diffusion passive de l'antigène	126
3	Implication des cellules cutanées dans la réponse IgA localisée au niveau du ganglion	128
4	La répartition de l'antigène dépend du modèle particulier utilisé	130
5	Comment l'inflammation module la réponse humorale ?	131
6	La migration des plasmocytes vers les muqueuses	132
7	Conclusion générale	134
	Références bibliographiques	135

LISTE DES ABBREVIATIONS

APC :	Cellule présentatrice d'antigènes	LC :	Cellules de Langerhans
BALT :	Tissu lymphoïde associé aux bronches	LPS :	Lipopolysaccharide
BLIMP1:	PR domain zinc finger protein 1 (PRDM1)	LT :	Lymphocytes T
CCR2 :	C-C chemokine receptor type 2	MALT :	Tissu lymphoïde associé aux muqueuses
CD :	Cluster de Différentiation	MHC :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CT :	Toxine Cholérique	MVA :	Modified Vaccinia Virus Ankara
CTL :	CT CD8+ cytotoxique	PAMP :	Motif moléculaire associé aux pathogènes
CXCR5 :	C-X-C chemokine receptor type 5	PLA :	Acide polylactique
DC :	Cellule dendritique	PRR :	Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
dDC :	Cellules dendritique dermale	s.c. :	Sous-cutané
dLN :	Ganglion drainant	SALT :	Tissu lymphoïde associé à la peau
DT :	Toxine Diphtérique	SIDA :	Syndrome de l'immunodéficience acquise
DTR :	Récepteur de la toxine diphtérique	SIgA :	Immunoglobuline A sécrétoire
FDC :	Cellules dendritique folliculaire	SIV :	Virus de l'immunodéficience simienne
FLT3L :	FMS-like tyrosine-kinase 3 ligand	STAT :	Signal de transduction et d'activation de la transcription
GALT :	Tissu lymphoïde associé à l'intestin	t.c. :	Transcutané
gp :	glycoprotéine	TCR :	Récepteur des LT
HBV :	Virus de l'Hépatite B	TGF:	Transforming Growth Factor
HEV :	Veinule à endothélium épais	TH :	LT CD4+ auxiliaire
HSIV	Human - Simian Immunodeficiency Virus	Th1 :	LT CD4+ auxiliaire de type 1
i.d. :	Intra-dermique	T_{FH} :	LT CD4+ folliculaire
i.m. :	Intra-musculaire	T_{REG} :	LT CD4+ régulateur
IFN :	Interféron	Tip-DC :	TNFα - and Inducible Nitric Oxide Synthase-Producing Dendritic Cells
Ig :	Immunoglobuline	TLR :	Récepteur de type Toll
IL :	Interleukine	TNF :	Tumor Necrosis Factor
IRF4 :	Interferon regulatory factor 4	VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
ISO :	Organisation internationale de normalisation	VLP :	Virus-Like Particle
LB :	Lymphocytes B	XBP1	X-box binding protein 1

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1	- Génome et structure du VIH	7
Figure 2	- Cycle de réplication du VIH dans les cellules cibles	8
Figure 3	- Prévalence du VIH dans le monde en 2009 parmi les adultes de 15 à 49 ans	9
Figure 4	- Evolution des prises de risques inhérent aux comportements sexuelles dans différents pays présentant une forte prévalence pour le VIH	10
Figure 5	- Schéma et coupe histologique de l'épithélium muqueux des voies sexuelles males et femelles	11
Figure 6	- Représentation des récepteurs membranaires impliqués dans contaminations par le VIH de différentes populations cellulaires et les mécanismes cellulaires d'infection des LT résidant dans la couche stromale de la muqueuse	12
Figure 7	- Evolution de la charge virale et du nombre de lymphocytes T CD4+ chez l'Homme après l'infection par le VIH	13
Figure 8	- Schéma des différentes voies de développement des plasmocytes	18
Figure 9	- Rôle des cellules stromales de la moelle osseuse dans l'induction de la survie des plasmocytes à longue durée de vie	19
Figure 10	- Rapport risque/efficacité de différentes préparations vaccinales	22
Figure 11	- Schéma et coupe histologique représentant la structure de la peau humaine	24
Figure 12	- Schéma et coupe histologique représentant les différentes zones d'un ganglion drainant	25
Figure 13	- Origines des différentes classes de cellules dendritiques chez la souris	27
Figure 14	- Schéma représentant les différentes voies d'immunisation cutanée	31
Figure 15	- Structure chimique des PGA, PLA et PLGA	33
Figure 16	- Comparaison de la taille des particules utilisées en vaccination et de différentes classes d'agents pathogènes	34
Figure 17	- Mécanismes de capture de l'antigène par les BCR des LB, de dégradation et de présentation par les molécules de MHCII	43
Figure 18	- Rôles des facteurs de transcription dans l'inhibition du développement des plasmocytes	44
Figure 19	- Mécanismes moléculaires par lesquels les T _{FH} contrôlent les processus de différenciation des LB des centres germinatifs	47
Figure 20	- Développement des LB vers la voie extra-folliculaire ou formant des centres germinatifs après interaction avec les T _{FH}	49
Figure 21	- Différents modèles de développement des T _{FH}	50
Figure 22	- Mécanismes moléculaires d'interaction entre les LT CD4+ et les DCs conduisant à la polarisation en pré-T _{FH}	53
Figure 23	- Mécanismes moléculaires d'interaction entre les T _{FH} et les LB permettant le maintien de leur phénotype	54
Figure 24	- Implication des cytokines dans le contrôle des facteurs de transcription permettant la polarisation des LT CD4+ en T _{FH}	55

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	- Risques de contamination liés à aux sites d'infections	9
Tableau 2	- Etudes cliniques vaccinales de phase IIb et III anti-VIH	14
Tableau 3	- Phénotype des cellules dendritiques cutanées chez la souris et l'homme avant migration vers les ganglions lymphatiques	28
Tableau 4	- Phénotype des cellules dendritiques cutanées et résidentes des ganglions lymphatiques chez la souris et l'homme après migration	30
Tableau 5	- Liste des sous-types de TH effecteurs, de leurs caractéristiques spécifiques associées et de leurs rôles dans la protection immunitaire	40

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Avant Propos
2. VIH-1, un modèle de contamination par les muqueuses
3. L'importance des muqueuses dans la protection contre le VIH
4. Potentiel de la peau en vaccination et mécanismes immunitaires
5. Induction de la réponse immunitaire par l'immunisation i.d.
6. Rôle des T_{FH} dans la réponse humorale
7. Conclusions

1 Avant-propos

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a été isolé en 1983 [1] et reconnu comme l'agent infectieux responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Depuis, l'épidémie s'est étendue à toutes les régions du monde. Les dernières estimations de UNAIDS dénombrent 35,3 millions de personnes contaminées par le VIH dans le monde en 2012 [2]. Les thérapies anti-rétrovirales permettent d'augmenter significativement la durée de vie des patients et ont permis de réduire le nombre de décès associés au VIH de 2,3 millions en 2005 à 1,6 million en 2012 [2]. Cependant, aucun traitement thérapeutique ne permet d'éliminer le virus après la contamination.

Malgré le développement de nos connaissances sur le virus ainsi que ses mécanismes de transmission, le VIH continue de contaminer environ 2,5 millions de nouveaux individus. Le développement d'un vaccin préventif contre le VIH a été lancé il y a plus de 30 ans. Cependant, les approches de vaccination classiques basées sur l'injection de virus atténué sont inadaptées au VIH et les stratégies d'immunisation par protéines recombinantes, peptides synthétiques et plasmides ADN n'ont pas réussi à induire une protection efficace [3]. Les recherches se sont alors portées sur l'utilisation de vaccins vivants recombinants, parmi lesquels l'adénovirus Ad5 recombinant de Merck a conduit à un essai clinique de phase II. Les résultats ont montré l'induction d'une réponse immune à médiation cellulaire cytotoxique, mais inefficace à induire une protection contre l'infection. Plus récemment, l'essai clinique de phase III RV144 (« Thai Trial ») a testé l'utilisation d'un modèle prime-boost utilisant 2 vecteurs vaccinaux différents. Le premier, AIDSVAX, correspond à un vecteur recombinant CanaryPox qui exprimait les antigènes gag/protéase ainsi que l'enveloppe gp120 du virus associé à la partie transmembranaire de la gp41. Le second vecteur, AIDSVAX, était composé des protéines d'enveloppe gp120. Les résultats publiés dans New England Journal of Medicine en 2009 ont montré que le taux d'infection par le VIH parmi les volontaires qui ont reçu le vaccin expérimental était 31% inférieur au taux d'infection chez des volontaires ayant reçu le placebo [4]. Ces résultats représentent une avancée considérable dans le développement d'un vaccin contre le VIH mais la protection induite par ce candidat vaccin est trop faible pour sa commercialisation.

Les principales contraintes du VIH résident en ses capacités à créer des réservoirs viraux rapidement après la contamination, ainsi qu'à épuiser le système immunitaire en mutant rapidement ainsi qu'en infectant les LT CD4⁺ (T_H). Les corrélats de protection ont successivement montré l'importance de la réponse cellulaire cytotoxique et

l'implication des anticorps neutralisants systémiques dans le contrôle de l'infection virale. De nombreuses stratégies vaccinales ont été envisagées et testées pour développer une immunité cellulaire et humorale systémique mémoire, mais celles-ci se sont toutes révélées être inefficaces chez l'homme. L'une des options les plus prometteuses actuellement est l'induction d'une immunité ciblée au niveau de la zone de contamination pour neutraliser le virus avant l'infection des premières cellules. Avec un taux de 70% à 80% de transmission du VIH par les voies sexuelles, il semble nécessaire de diriger nos efforts sur le développement d'un vaccin protégeant les muqueuses vaginale et rectale. Plusieurs études suggèrent que la présence d'IgA neutralisants sécrétées dans la lumière vaginale (SIgA) est associée à une protection contre l'infection [5-7]. Cependant, la vaccination conventionnelle semble limitée à induire une réponse systémique. Le tissu muqueux présente une organisation immunitaire particulière qu'il est nécessaire de bien connaître pour induire une réponse effectrice. Des études sur l'application de solution vaccinale par les voies sexuelles ont démontré que ces muqueuses présentent un environnement non favorable pour délivrer l'antigène. De plus, la technique invasive ciblant les organes sexuels est très mal tolérée chez l'Homme.

Les voies de vaccination cutanée, intra-nasale et sublinguale ont démontré leurs capacités à induire une réponse IgA dans la muqueuse vaginale chez la souris et/ou chez l'homme [6, 8-11]. Il existe donc un lien immunologique entre le site inducteur et le site effecteur qu'il semble intéressant d'utiliser pour développer de nouvelles stratégies de vaccination protégeant les muqueuses sexuelles. L'une des particularités de la peau et des muqueuses est la présence d'une grande diversité de sous-populations de cellules dendritiques (DC) résidentes qui sont impliquées dans la capture des antigènes et de leur présentation aux lymphocytes T (LT) et lymphocytes B (LB). Il a été démontré que l'amplitude de la réponse immunitaire et sa qualité sont directement impactées par la nature de la sous-population de DC qui prend en charge l'antigène injecté [12, 13]. Le développement de la biotechnologie a permis de mettre au point des particules aux propriétés physiques et chimiques adaptées à la prise en charge par les DC et permet ainsi de mieux les cibler [14, 15]. L'injection cutanée de particules adsorbées avec des protéines virales représente une stratégie de vaccination prometteuse pour cibler les DC de la peau et permettre d'induire une réponse immunitaire localisée au niveau des muqueuses. Cependant, certaines interactions cellulaires et moléculaires impliquées dans l'initiation de la réponse humorale ainsi que la capacité à induire une immunité effectrice dans les muqueuses ne sont pas connues.

2 VIH-1, un modèle de contamination par les muqueuses

Les muqueuses constituent la couche de tissus qui sépare le milieu extérieur du milieu intérieur dans les différentes cavités internes. Chez l'Homme l'adulte, les muqueuses recouvrent une surface d'environ 400 à 600 m² [16]. Comme la peau, les muqueuses permettent de protéger l'organisme de l'intrusion des agents pathogènes. En revanche, elles possèdent également un rôle d'absorption et de sécrétion inhérent à l'organe qu'elles protègent (p. ex. absorption de nutriments, sécrétion de mucus). Certaines muqueuses sont donc extrêmement fines pour exercer ce rôle, ce qui les rend plus perméables aux agents pathogènes. Il a été estimé que 70% des agents pathogènes pénètrent dans l'organisme par les muqueuses [17], dont le VIH.

2.1 Le virus de l'immunodéficience humaine

2.1.1 Classification, génome, protéines et structure

Le VIH fait partie de la famille des *retroviridae*, de la sous-famille des orthoretrovirinae et du genre *lentivirus*. Deux sous-groupes de VIH ont été identifiés. Le VIH-1, responsable de la pandémie actuelle, et le VIH-2, moins contagieux et qui sévit principalement en Afrique de l'Ouest. Le séquençage du génome du HIV-1 a permis de mettre en évidence une diversité génétique importante qui a abouti à la répartition des différents variants en 4 groupes, nommés M (major), O (outlier), N(non M ni O) et plus récemment le groupe P. Le groupe M, qui prédomine largement, est issu d'une contamination de l'homme par le VIS (Virus d'Immunodéficience Simienne) infectant le chimpanzé (SIVcpz) [18].

Le génome du VIH-1 est encodé sur 2 simples brins d'ARN identiques de 9.8 kb, codant pour 9 protéines [19] (figure 1.a). Le virion possède une structure sphérique de 110 à 150 nm de diamètre [20] formée par une matrice protéique (p17 de *gag*) qui est recouverte par une double couche lipidique issue de la cellule hôte (figure 1.b et 1.c). La glycoprotéine virale de l'enveloppe (*env*) est formée par la sous-unité de surface gp120 associée à la sous-unité membranaire gp41 et sont insérées à la membrane sous forme de trimères. La matrice renferme la capsid (p24 de *gag*) qui va protéger le matériel génétique, recouvert de nucléocapsides (p7 de *gag*) et des enzymes nécessaires aux premières étapes de réplication du virus : la transcriptase inverse (p66, p55 de *pol*), l'intégrase et la protéase. Ces enzymes sont la première cible des traitements

antirétroviraux car elles sont spécifiques des rétrovirus. Les gènes *rev*, *nef*, *vif*, *vpu*, *vpr* et *tat* codent pour des protéines régulatrices [21].

2.1.2 Cycle de réplication

Le VIH infecte principalement les cellules qui expriment le récepteur membranaire CD4, dont les LT CD4+, les macrophages, les DC et les cellules microgliales cérébrales. Le cycle viral peut être divisé en 8 étapes (figure 2) : (1) le virion se fixe sur la cellule cible par l'interaction entre la protéine de surface virale gp120 et le récepteur membranaire CD4. Ceci entraîne une modification conformationnelle de gp120 et son interaction avec des co-récepteurs (p. ex. CCR5), qui engendre la libération de gp41. (2) La fixation de gp41 sur la membrane cellulaire et son activité de fusion aboutit à la fusion de la membrane cellulaire et de la membrane virale. La capside est relarguée dans le cytoplasme et se désintègre en libérant ainsi son contenu génétique et les enzymes virales. (3) La transcriptase inverse transcrit le brin d'ARN simple brin en ADN simple brin, puis synthétise le brin complémentaire pendant une seconde étape, aboutissant à un ADN double brin. Cette étape est particulièrement importante car la transcriptase inverse génère beaucoup d'erreurs pendant la transcription, ce qui est à l'origine de la mutation rapide du virus. (4) L'ADN double brin migre ensuite dans le noyau et s'insère à un locus aléatoire du génome de la cellule cible par l'action de l'intégrase. (5) La transcription du gène précédant le lieu d'insertion, va entraîner celle du génome viral. L'ARNm viral va subir une étape d'épissage avant d'être traduit en polyprotéines virales. (6) Les polyprotéines de structures et d'enzymes du virus sont adressées à la membrane où leurs interactions initieront la formation du virion. (7) La capside sort ensuite de la cellule infectée par bourgeonnement en arrachant une partie de la membrane cellulaire sur laquelle sont déjà fixées les protéines virales de surface gp41 et gp120. (8) Les virions produits par la cellule infectée sont immatures et non infectieux, ils nécessitent une étape finale de maturation durant laquelle les polyprotéines sont clivées pour former un virion mature. Le cycle réplcatif est décrit plus précisément dans la review de A. Engelman et P. Cherepanov [22].

2.2 Épidémiologie de la transmission par les voies sexuelles

2.2.1 Épidémiologie

Le VIH contamine environ 2,5 millions de personnes par an dans le monde, dont 1,9 millions résident dans des pays à faible ou moyen revenu (figure 3). La contamination se fait par les voies sexuelles (rapport vaginal, anal ou oro-génital), la voie sanguine ou la voie materno-foetale. Les études épidémiologiques soulignent que la transmission du VIH par les voies sexuelles représente 70% à 80% des nouvelles contaminations. Dans le but de réduire le taux d'incidence du VIH, de nombreux programmes mondiaux ont émergé pour endiguer l'épidémie, principalement par des campagnes de prévention, de dépistage et de traitement thérapeutique. La circoncision chez les hommes réduit le risque de transmission de 60% [23] et la prise d'un traitement antirétroviral préventif réduit la transmission de 40% dans chez la population homosexuelle [24]. Il est démontré que le traitement précoce par antirétroviral réduit le risque de transmission de 96% par rapport à un traitement tardif (SIDA déclaré) [25]. Cependant, ces dispositifs sont rarement mis en place dans les pays sous-développés, généralement par manque de moyens financiers. De plus, certaines populations considèrent la circoncision comme une atteinte à leur religion et leur culture.

2.2.2 Risque de transmission

Le risque de transmission dépend de nombreux facteurs, mais reste relativement faible lors d'un rapport sexuel (tableau 1). En moyenne, il est évalué à 0.5/1000 lors d'un rapport pénis/vagin insertif, 1/1000 lors d'un rapport pénis/vagin réceptif et de 5/1000 lors d'un rapport anal. En comparaison, ce taux atteint 250/1000 en transmission mère enfant lors de l'accouchement [26]. Cependant, le risque de contamination varie énormément en fonction de la charge virale de l'individu infecté, le traitement médical, les pratiques sexuelles ou encore le recours à la circoncision. Dans la majorité des cas, un seul virion est la cause de l'infection de l'individu. Ceci induit un « effet entonnoir » (angl. « bottleneck effect ») de la variabilité génétique du virus dans les premiers stades de l'infection. Il est donc essentiel que la réponse immunitaire soit effective très rapidement pour endiguer l'infection avec sa dispersion systémique et l'apparition d'une diversité génétique incontrôlable par le système immunitaire, ainsi que la formation de réservoirs viraux [27].

2.2.3 Pratiques sexuelles à risque

Le rapport annuel de l'UNAIDS publié en 2013 montre un regain des comportements sexuels à risque pris par les populations habitant dans les zones endémiques (figure 4) [2]. Parmi les critères évalués, le nombre d'adolescents entre 15 ans et 24 ans ayant eu une première relation sexuelle avant 15 ans ainsi que le nombre de personnes qui n'utilisent pas le préservatif a augmenté dans certains pays, et concerne principalement les hommes. L'étude du pourcentage d'adultes ayant des relations sexuelles avec des partenaires multiples représente le facteur le plus préoccupant de par le nombre de pays touchés. Ce comportement favorisant la transition du VIH est d'ailleurs largement observé dans les essais cliniques. Dans l'étude de l'efficacité de la thérapie précoce des antirétroviraux, réalisée chez des couples dont 1 seul partenaire est contaminé, parmi les 39 individus nouvellement contaminés, 11 l'ont été par un variant du virus différent génétiquement de celui de leurs partenaires [25]. Le laxisme des politiques de prévention est également mis en cause sur la répercussion du développement de l'épidémie. En dépit des méthodes mises à disposition pour réduire les risques de transmissions, les comportements sexuels à risques restent donc une cause majeure de la contamination par le VIH.

2.3 Mécanismes précoces de l'infection par les muqueuses sexuelles

2.3.1 Régions d'infection

Chez la femme, le virus pénètre dans l'organisme par l'épithélium pavimenteux pluristratifié non-kératinisé du vagin et de l'exocol, la partie extérieure du canal utérin ou par l'épithélium monostratifié de l'endocol, la première partie du canal utérin (figure 5). Chez le singe, l'inoculation intravaginale par le VIS induit également une infection des muqueuses de l'utérus ce qui démontre que le virus est capable de franchir la glaire cervicale, localisée dans l'endocol [28]. Bien que ces résultats n'aient jamais été confirmés chez l'humain, ils laissent supposer que l'utérus est susceptible d'être contaminé et en particulier lors de l'ovulation, pendant laquelle la structure de la glaire cervicale est altérée. Chez l'homme, l'infection se fait principalement par épithélium pavimenteux pluristratifié faiblement kératinisé de la partie intérieure du prépuce et de l'urètre (figure 5). La partie extérieure du prépuce et le gland sont recouverts par un épithélium fortement kératinisé, ce qui forme une barrière physique limitant la pénétration du VIH [29]. Cependant, ces résultats sont issus d'études réalisées sur les populations caucasiennes. A l'opposé, une étude récente menée sur la population africaine a démontré l'absence de différence d'épaisseur de kératinisation entre l'épithélium de la partie interne et externe du prépuce [30]. Ces résultats remettraient en cause les raisons pour lesquelles la circoncision diminue le risque de transmission.

L'utilisation d'explants d'endocol humain a montré *ex vivo* que les particules virales libres, mais également les cellules contaminées sont capables d'infecter les tissus [31]. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* chez la souris et le singe ainsi que par des analyses génétiques chez l'homme [32]. La glaire cervicale joue un rôle important en piégeant les virions ce qui favorise une interaction plus longue avec les cellules de l'épithélium mais les rend plus vulnérables à l'action des substances antivirales de l'immunité innée [33]. Les virions libres ou associés aux cellules infectées, transportés par le liquide séminal ou les sécrétions vaginales, sont capables d'interagir avec les cellules épithéliales génitales par des récepteurs spécifiques (e.g. syndecans [34], glycoprotéine 340 [35], sous-unité $\beta 1$ des intégrines [33]) pour traverser l'épithélium par transcytose, endocytose ou par infection productive, puis infecter les cellules cibles résidentes de l'épithélium et de la lamina propria sous-jacente. De plus, lors de rapports sexuels, des abrasions de l'épithélium peuvent survenir, favorisant ainsi l'accès aux

cellules cibles par le virus. Les expériences *in vivo* chez les macaques ont déterminé que la pénétration des virions dans les muqueuses est effective entre 30 et 60 minutes [36].

2.3.2 Principales populations cellulaires infectées

Lors de la transmission par les muqueuses, le VIH infecte majoritairement les LT CD4⁺ résidentes, les cellules de Langerhans (LC) résidentes dans les muqueuses, les DC stromales et peut également être susceptible d'infecter les macrophages et les cellules NK (figure 6). Les LT CD4⁺ sont principalement dispersés dans la lamina propria du vagin, de l'exocol et de l'endocol, généralement regroupés sous la membrane basale, mais également présent en nombre limité dans l'épithélium pavimenteux du vagin et de l'exocol [37]. Des expériences *ex vivo* chez l'homme et le singe ont montré que ces LT possèdent majoritairement un phénotype mémoire (CCR5⁺) et sont infectés productivement dès les premières heures après inoculation du virus [38].

Les LC résident uniquement dans l'épithélium et sont également susceptibles à l'infection par le VIH [38] via l'expression des protéines membranaires CD4, CCR5 et CD207. Si l'utilisation d'anticorps anti-CD4 et anti-CCR5 est capable de bloquer l'entrée du virus, les anti-CD207 n'ont pas d'effet. Il semble que l'internalisation du virus par l'interaction avec CD207 induit le transport des endosomes vers les granules de Birbeck et conduit à la dégradation rapide du virus. La production et la sécrétion de virions ont été observées dans certaines études, [39, 40] mais n'ont pas été confirmées dans d'autres. La production active de virions par les LC reste donc controversée. Cependant, il est démontré que les LC peuvent capturer une grande quantité de virions et les transporter vers la membrane basale lors de leurs migrations et ainsi disséminer le virus aux LT. La co-culture de LC infectées avec des LT a conduit à une infection rapide des LT mais les mécanismes restent inconnus et ces résultats n'ont pas été démontrés *in vivo* [40].

Les DC stromales interagissent avec le VIH via les récepteurs CCR5 et DC-SIGN [41], cependant, leur rôle dans la dissémination du virus n'est pas clair. Pour résumer, l'infection des DC stromales n'est pas observée dans les expériences *ex vivo* utilisant des explants humains [42]. Cependant, l'infection des DCs stromales est observée dans les biopsies de femme contaminées [43] ainsi que chez le singe, rapidement après contamination [44]. Il a été démontré dans des explants d'exocol humains que les macrophages sont également susceptibles d'être infecté par le VIH [45]. Dans certaines études, les macrophages représentent la population majoritairement infectée par une souche de VIH pénétrant via CCR5 [42]. En revanche, les macrophages de la muqueuse

intestinale n'expriment pas CCR5 et sont peu permissifs à l'infection [46]. Des études *in vitro* ont montré que les macrophages dérivés de monocytes semblent également pouvoir capturer les virions par macropinocytose sans récepteur spécifique et maintenir les particules intactes pendant plusieurs jours avant de les transférer au LT [47]. Si les macrophages des muqueuses génitales possèdent cette capacité, ils seraient alors fortement impliqués dans la propagation locale du virus.

2.4 La recherche vaccinale anti-VIH

L'infection initiale aboutie à une expansion locale pendant la première semaine pour ensuite devenir systémique [48]. L'infection systémique est divisée en 4 phases (figure 7) : (1) la primo-infection caractérisée par la réplication intensive du virus dans les LT CD4+ entraînant leur destruction et également associée à la formation de réservoirs viraux [49]. (2) Une rapide phase de dissémination des virions dans l'organisme associé à la duplication du virus dans les organes lymphoïdes secondaires ainsi qu'à la formation de réservoirs viraux. (3) Une phase de latence asymptomatique de plusieurs années pendant laquelle la quantité de LT CD4+ diminue progressivement associée à l'épuisement du thymus, et enfin (4) la dernière phase où le SIDA est déclaré, suivie par des infections de maladies opportunistes. Malgré les avancées considérables dans la compréhension des mécanismes d'infection et de la connaissance de l'immunité muqueuse aucun vaccin efficace n'a pu être développé. Les contraintes du VIH ont obligé la communauté scientifique à repenser les stratégies de protection et développer des méthodes de vaccination spécifiquement adaptées au virus ciblé.

2.4.1 Les mécanismes d'échappement du VIH

La réponse immunitaire induite par les individus infectés permet un contrôle partiel de la réplication du virus, sans aboutir néanmoins à l'éradication totale. Plusieurs facteurs spécifiques au VIH permettent d'expliquer cela. Le génome du VIH mute très rapidement à cause de la mauvaise fidélité de la reverse transcriptase et des cycles de réplication très rapides, qui génèrent 10^{10} nouveaux virions chaque jour. La reverse transcriptase induit 0,2 erreur par génome pour chaque cycle de réplication [50]. Ces mécanismes induisent la génération d'une diversité importante de variants, obligeant le système immunitaire à réadapter la spécificité des antigènes ciblés. Cette variabilité est également un frein majeur en vaccination car elle oblige à créer un vaccin reconnaissant les régions les plus conservées du virus. De plus, le virus forme des réservoirs dans de nombreux sites parmi lesquels les organes lymphoïdes du système digestif sont les plus

décrits. Dans ces réservoirs, le virus reste à l'état latent dans la cellule et ne se réplique pas. Ces cellules ne sont donc pas détectées par le système immunitaire comme une cellule infectée. De nouveaux traitements anti-rétroviraux ont été développés spécialement pour activer les virus latents des réservoirs, cependant ce processus est trop lent et il a été estimé qu'il faudrait entre 60 ans et 80 ans pour supprimer toutes les cellules infectées d'un individu.

2.4.2 Les essais de vaccination humaine

De nombreux candidats vaccins ont été développés pendant les dernières années. Certains étaient spécifiquement conçus pour stimuler la réponse cellulaire, et d'autres la réponse humorale. Cependant, seuls 6 ont pu être poursuivis en essais cliniques de phase IIb ou III, dont le dernier est encore en cours d'étude (tableau 2). Parmi eux, aucun n'a pu être commercialisé, mais ils ont apporté de nombreuses informations sur les corrélats de protection nécessaires pour induire une bonne protection préventive. Vax 003 et Vax 004 ont testé la capacité protectrice de la vaccination par des monomères recombinant de gp120, mais aucune protection n'a pu être démontrée [51, 52]. L'essai STEP réalisé en 2007 utilisait un vecteur adénovirus de type 5 (Ad5) non réplcatif conçu pour induire une réponse cellulaire. Ce vaccin n'a pas protégé les individus vaccinés [53] et les analyses postérieures ont démontré un risque plus élevé chez une population spécifique d'individus ayant déjà rencontré l'adénovirus avant la vaccination [54]. Les raisons de ce phénomène n'ont pas été clairement démontrées, mais ont pu être induites par l'augmentation de la migration des LT CD4 dans les muqueuses [54]. Le célèbre "Thai Trial" (RV144) est le premier à montrer une efficacité de protection des individus vaccinés (31%). Cependant, cette protection est relativement faible et ce modèle de vaccination était très contraignant car il est basé sur un modèle prime-boost de 6 injections et utilisant 2 formules vaccinales différentes. La formulation ALVAC correspond à un vecteur recombinant CanaryPox qui exprimait les antigènes gag/protéase de clade B (souche LAI) du VIH ainsi que l'enveloppe gp120 du virus de clade E associés à la partie transmembranaire de la gp41 de la souche LAI. La seconde formulation AIDSVAX est composée des protéines d'enveloppe gp120 de clade B et de clade E. Les études postérieures ont mis en évidence un corrélat de protection pour la réponse IFN- γ des LT CD4+ spécifiques de l'enveloppe.

2.4.3 La réponse immunitaire cellulaire et humorale systémique

L'immunité cellulaire a démontré son potentiel pour contrôler la réplication du virus. Chez le singe, la déplétion des LT CD8+ entraîne la perte du contrôle de l'infection en phase aiguë et chronique [55]. De plus, il a été démontré que l'utilisation de stratégies de vaccination développées pour induire une réponse cellulaire lytique (CTL) permet de réduire la charge virale après infection par le SIV [56, 57]. Chez l'homme, la proportion de LT spécifiques à HIV représente de 1,6% à 18,4% pour les CD8+ et 0,2 à 2,94% pour les CD4+ chez les patients infectés. Il a été démontré *in vitro* que les LT CD8+ spécifiques sont capables de détecter et détruire les cellules infectées par le VIH. De plus, le contrôle de l'infection durant la phase aiguë est corrélé avec l'augmentation de la réponse CRL spécifique du VIH [58]. Les épitopes majeurs reconnus par les LT CD8+ sont principalement issus de Gag, Pol, Nef, RT et Env. L'antigène viral associé à la réponse CTL est principalement Gag et non Env ou Pol. Plus récemment, la réponse CTL a été principalement associée à Gag et non Env ou Pol pour le SIV dans un essai de vaccination chez le macaque [56]. En revanche, ces épitopes sont restreints à Gag et Nef pour les LT CD4+ [59].

Des anticorps sont rapidement sécrétés chez les individus infectés, cependant, les anticorps neutralisants n'apparaissent que plus tardivement [60]. De plus la majorité des anticorps ciblent la conformation monomérique de la protéine de surface virale gp120, issues des débits viraux, et non la conformation trimérique [61]. Une partie des sites potentiellement neutralisants de gp120 sont protégés par une glycosylation locale ou par la formation de poches hydrophobes, protégeant ainsi l'épitope [62]. La production d'anticorps monoclonaux contre certaines parties de gp120 ou les parties externes de gp41 a permis de contrôler certaines souches de VIH [63]. Chez le macaque, des études ont montré que l'injection d'anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine virale de surface est capable de réduire la transmission du HSIV [7]. L'injection d'anticorps neutralisants est capable de protéger efficacement le singe contre une infection expérimentale par voie vaginale. Cependant, l'immunisation avec le virus inactivé, avec des sous unités de gp120 ou un virus recombinant ne permet pas de produire des anticorps neutralisants. De plus, le taux de mutation rapide de gp120 rend difficile le choix des épitopes contre lesquels il faut immuniser. Cependant, il a été montré suite au Thai Trial que certains individus avaient développé des anticorps neutralisants contre une région conservée de gp120 [64]. Ces résultats suggèrent le rôle important de la

réponse cellulaire et humorale dans le contrôle de l'infection et la nécessité d'adapter les antigènes à la réponse souhaitée, mais ne permet pas de prévenir de l'infection

Les 3 points essentiels :

- (1) Après infection, le VIH est capable d'échapper au système immunitaire.
- (2) Actuellement, aucun vaccin ne permet de protéger efficacement contre le VIH.
- (3) Le VIH se transmet principalement par les voies sexuelles.

3 L'importance des muqueuses dans la protection contre le VIH

Les échecs du développement des vaccins prophylactiques et thérapeutiques sont principalement associés aux capacités intrinsèques du VIH à échapper au système immunitaire. Il semble donc nécessaire de développer un vaccin permettant de bloquer l'entrée du virus. Les muqueuses sexuelles étant le site principal de pénétration du VIH, il est important de mieux comprendre les mécanismes d'induction d'une réponse immunitaire capable d'induire une protection localisée dans les muqueuses vaginales et rectales.

3.1 Rôles des IgA muqueux dans la protection contre le VIH

Une particularité importante des muqueuses est la production d'SIgA dimériques résistantes à la dégradation par les protéases microbiennes et capables de franchir la barrière épithéliale par transcytose pour être libérée dans la lumière de la cavité muqueuse. Chez l'Homme, 2 types d'IgA existent : IgA1, présente dans le sang et dans les muqueuses, et IgA2, principalement présente dans les muqueuses et plus résistante à la dégradation par les protéases bactériennes [65]. Les IgA ont un rôle important dans le maintien de l'homéostasie avec les bactéries commensales résidentes des muqueuses. Des plasmocytes exprimant IgG sont également retrouvés dans les voies génitales chez le singe et l'homme [66] et de grandes quantités d'IgA et d'IgG ont été mesurées dans les sécrétions vaginales [67].

Chez le macaque, il a été montré que l'administration vaginale d'une dose importante d'anticorps spécifiques à HIV est capable de protéger de l'infection par le SHIV [68, 69]. Une étude de vaccination par voie i.m. puis intranasale avec des sous-unités de gp41 fixés à des virosomes ont permis d'induire une immunité protectrice au niveau du vagin, confirmé par 13 tentatives d'infection par une souche de SHIV [6]. Les singes protégés ont montré la présence d'IgA spécifiques à gp41 dans le vagin, capable de bloquer la transcytose du virus. Des IgG spécifiques ont également été détectés dans le vagin et dans le sérum. En revanche, seules les IgG vaginales avaient une activité neutralisante. Chez l'homme, l'étude réalisée sur une cohorte de 424 travailleuses du sexe au Kenya a montré que 14% demeurent séronégatives malgré une exposition répétée au VIH [5]. Dans cette population résistante, il a été mis en évidence un taux élevé de SIgA neutralisant dans les lavages cervicovaginaux, dirigés contre les protéines d'enveloppe. Ces études montrent le potentiel de la protection des muqueuses par une quantité suffisante de SIgA et d'IgG.

3.2 Génération des plasmocytes et formation des LB mémoires

Les plasmocytes sont les seules cellules de l'organisme capables de sécréter des anticorps. Ils correspondent à un état complètement différencié des LB qui se développent dans les ganglions drainants, des plaques de Peyer et la rate. Il existe 3 sous-types de plasmocytes, issus de 3 voies de développement distinctes (figure 8). Le premier sous-type correspond au développement des LB de la zone marginale résidents de la rate. Cependant, cette population est particulière car elle est principalement activée par des antigènes bactériens et véhiculés par le sang ou lors d'une infection systémique. Son développement est décrit en détail par S. Pillai, A. Cariappa, et S.T. Moran [70, 71] et plus récemment par A. Cerutti, M. Cols et I. Puga [72]. Le second sous-type de plasmocytes émerge du développement extra-folliculaire des LB et conduit à la formation rapide de plasmocytes à courte durée de vie (moins d'une semaine) et à faible affinité pour l'antigène. Le troisième sous-type est issu du développement des LB dans les centres germinatifs des follicules B et aboutit à la production plus tardive (plus d'une semaine) de plasmocytes à longue durée de vie et à forte affinité pour l'antigène. Le système immunitaire adaptatif se caractérise également par la formation de LB mémoires qui se différencient à nouveau en plasmocytes lors d'une seconde rencontre avec l'antigène [73, 74]. Les plasmocytes à longue durée de vie et les LB mémoires ont la particularité de se développer dans les centres germinatifs des follicules B puis de migrer vers les sites effecteurs (p.ex. rate, moelle osseuse, muqueuses) dans lesquelles ils peuvent persister plusieurs dizaines d'années sans présence de l'antigène [75].

3.2.1 *Persistance des plasmocytes à longue durée de vie*

Les plasmocytes à longue durée de vie produisent une quantité importante d'anticorps lors d'une infection, puis la majorité des cellules entrent en apoptose alors que certaines migrent dans des sites secondaires propices à leur maintien. Il a été montré par transfert adoptif dans des souris naïves que ces plasmocytes peuvent continuer à produire des anticorps sans proliférer et survivre plus de 1 an, et ce en absence de développement d'un phénotype mémoire [76]. Majoritairement, ces plasmocytes sont localisés dans la moelle osseuse, toutefois certains sont retrouvés également dans la rate et les muqueuses où ils continueront à sécréter des anticorps [77]. En culture, les LB différenciés en plasmocytes meurent rapidement, en partie par la répression du facteur anti-apoptotique BCL-2A1 par Blimp-1 [78]. La survie des plasmocytes est induite par des mécanismes précoces d'inhibition de l'apoptose et par un micro-environnement

spécifique. Dans la moelle osseuse, la survie des plasmocytes est permise par la sécrétion d'IL-6 par les cellules stromales et l'interaction de CD44, TNF et CXCL12 [79] (figure 9).

3.2.2 Formation des LB mémoires

Comme les plasmocytes à longue durée de vie, les LB mémoires persistent après l'infection et nécessitent des conditions particulières pour survivre. Cependant, la population mémoire ne sécrète pas d'anticorps mais répond plus rapidement que les LB naïfs lors d'une seconde rencontre avec le même antigène [80]. Le rappel de la mémoire est initié lorsque les LB mémoires reconnaissent à nouveau l'antigène pour lequel ils sont spécifiques. Ils se transforment alors en plasmocytes et sécrètent rapidement des anticorps. Les LB mémoires se développent en parallèle des plasmocytes à longue durée de vie. Ils sont également issus du centre germinatif et conservent leur forte affinité pour l'antigène et peuvent être maintenus des dizaines d'années indépendamment de l'antigène, si leur micro-environnement le permet [75]. Les LB mémoires sont retrouvés dans la rate, les muqueuses ou dans les follicules B des organes lymphoïdes secondaires. En comparant la répartition des LB mémoires après immunisation intranasale, deux études ont montré que les LB mémoires exprimant IgA sont retrouvés dans l'intestin et dans les ganglions lymphatiques drainants, alors que les LB mémoires exprimant IgG sont retrouvés de façon systémique. Les auteurs mettent en avant ici aussi le rôle de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ dans la localisation muqueuse des LB exprimant IgA [81].

3.2.3 Migration vers les muqueuses

Les chimiokines et les intégrines sont des facteurs importants qui vont intervenir dans la sortie des plasmocytes des organes lymphoïdes secondaires et la migration vers la moelle osseuse ou les muqueuses. La sous-expression de CXCR5 et CCR7 joue un rôle important dans la sortie du ganglion, alors que la surexpression de CCR4 et CCR3 est cruciale pour leurs migrations vers la moelle osseuse en réponse à CXCL12 et CXCL9 respectivement [82]. Les plasmocytes résidant dans la moelle osseuse expriment également l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ qui va se lier à VCAM1 exprimé à la surface des cellules épithéliales de la moelle osseuse. En revanche, les plasmocytes IgA⁺ qui migrent vers l'intestin expriment l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ qui facilite le recrutement aux muqueuses via MADCAM1 [83]. Si la migration des plasmocytes des plaques de Peyer vers la muqueuse intestinale est très bien décrite, les mécanismes de migration vers la muqueuse sexuelle ne sont pas clairs. Il semble que CCR10 [84] et l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ [85] soient impliquées dans la migration et la localisation muqueuse des plasmocytes à

longue durée de vie et des LB mémoires. Cependant les mécanismes moléculaires favorisant l'expression de $\alpha 4\beta 7$ plutôt que $\alpha 4\beta 1$ ne sont pas connus [86].

3.3 La vaccination par la muqueuse vaginale

De nombreux vaccins ont été développés pour être appliqués ou injectés par les voies sexuelles et ont montré une bonne réponse immunitaire. Une méthode d'immunisation par injection haute pression (sans aiguille) à travers la muqueuse vaginale a été également testée chez le lapin en utilisant un ADN. Les résultats ont montré une augmentation du taux d'IgA plus importante que par injection avec aiguille [87]. Récemment, l'application vaginale d'un polymère anionique adsorbé avec les glycoprotéines d'enveloppe virale a réussi à induire une augmentation de la réponse spécifique IgG et IgA chez la souris et le lapin [88]. L'application d'un vaccin ADN au niveau de la muqueuse rectale et vaginale ont également montré une stimulation de la réponse immunitaire. Bien que les muqueuses possèdent un réseau de cellules dendritiques dense, le principal défaut de cette voie de vaccination est son environnement rude, néfaste au maintien de l'antigène. Les protocoles d'application du vaccin sont donc réalisés avec des vecteurs spécifiques et consistent à des inoculations répétées. De plus, ces voies de vaccination ont été très mal tolérées par les volontaires lors d'essais cliniques et sont inenvisageables pour une vaccination à grande échelle.

3.4 La vaccination par des sites inducteurs alternatifs

L'immunisation par voie intranasale en utilisant un adénovirus recombinant avec gp120 de SIV chez le macaque a permis d'induire la sécrétion d'IgG et d'IgA dans les sécrétions vaginales. Chez l'homme, l'immunisation avec la protéine gp41 fixée sur des virosomes et injectée par voie i.m puis intranasale 15 jours après a permis d'induire une sécrétion d'IgG et d'IgA spécifique dans le vagin [11]. Il est donc possible d'initier la réponse immunitaire dans des sites inducteurs distaux pour induire une réponse au niveau de la muqueuse vaginale [89]. Chez la souris, la vaccination i.d. et t.c. avec des particules synthétiques de PLA adsorbées par la protéine p24 du HIV a induit une sécrétion importante d'IgA spécifiques dans les sécrétions vaginales. Cependant, la localisation des LB exprimant IgA était différente. Après l'immunisation t.c., les LB exprimant IgA ont été détectés dans la *lamina propria* ainsi que dans l'épithélium, alors que la vaccination i.d. a induit une localisation restreinte à la *lamina propria* [10]. Plusieurs études chez la souris et chez l'homme démontrent que l'utilisation de la toxine cholérique comme adjuvant permet d'augmenter la réponse effectrice humorale dans les muqueuses

distantes du site d'immunisation [90-92]. Le lien entre l'initiation de la réponse au niveau d'un site inducteur et la génération d'une réponse effectrice dans la muqueuse vaginale représente donc une stratégie innovante pour le développement d'un vaccin contre le VIH.

Les 3 points essentiels :

- (1) La présence d'anticorps de type IgA neutralisants dans les muqueuses permet de réduire le risque d'infection.
- (2) Les intégrines et les chimiokines sont essentielles dans la migration des plasmocytes et LB mémoires vers les sites effecteurs
- (3) Il est possible d'induire une réponse effectrice au niveau de la muqueuse vaginale par une immunisation cutanée.

4 Potentiel de la peau en vaccination et mécanismes immunitaires

4.1 Pourquoi immuniser par la peau ?

Les premiers vaccins développés utilisent des souches virales vivantes atténuées injectées par voie intramusculaire (i.m.) et sous-cutanées (s.c.). Ces vaccins (p. ex. fièvre jaune, rubéole, rougeole, oreillons, varicelle) ont l'avantage de produire une réponse cellulaire et humorale ainsi qu'une immunité à long terme, induite par la multiplication virale limitée qui recrée les premiers cycles de l'infection. Cependant, ces vaccins peuvent s'avérer pathogènes ou inefficaces chez les personnes immunodéprimées. Le second inconvénient des virus atténués est leur hypothétique possibilité de réversion vers une forme pathogène. Dans le cas de virus à l'origine de maladie chronique et incurable tel que le VIH, l'utilisation de virus vivant atténué est potentiellement dangereuse.

Pour pallier ces inconvénients, les vaccins protéiques, ainsi que les vaccins à ADN, sous forme de plasmide qui code pour l'antigène, ont formé une seconde génération de vaccin. Ils ne présentent aucune pathogénicité et sont donc sans danger. Cependant, leur immunogénicité s'est révélée considérablement plus faible car aucune réplication virale n'a lieu (figure 10). Les travaux sur les vaccins ADN ont démontré que l'environnement immunologique du site d'immunisation conditionne l'amplitude et la qualité de la réponse immunitaire. Dans l'une de ces études, les résultats ont montré que l'immunogénicité du vaccin ADN injecté par la voie i.m. est corrélée au nombre de cellules présentatrices d'antigènes (APC) présentes au niveau du site d'injection [93]. Dans une seconde étude, les auteurs ont montré que la réponse cellulaire cytotoxique n'est induite que lors de l'immunisation par «gene gun» ciblant les tissus cutanés, et ont remarqué l'absence de réponse cellulaire par l'injection i.m. [94]. Lors de la vaccination, le muscle comme la peau bénéficient de l'infiltration de APC au niveau du site d'immunisation du vaccin (p. ex. neutrophiles, macrophages). Cependant, la peau bénéficie également de la présence de nombreuses DC résidentes spécialisées dans la présentation antigénique [95]. Parallèlement, de nombreuses études réalisées *in vivo* chez la souris et en utilisant des modèles *in vitro* chez l'homme ont démontré l'efficacité de cibler les DC cutanées en leur adressant l'antigène par des anticorps spécifiques de protéines membranaires de surface, dont DC-SIGN [96], Dectin [97] et Langerin [98] pour induire des réponses humorales et/ou cellulaires. Les DC résidentes contribuent

largement à la prise en charge du vaccin et à sa présentation aux lymphocytes et font de la peau un tissu privilégié en vaccination grâce à son potentiel immunologique.

4.2 Structure de la peau humaine et murine

4.2.1 *Organisation des différents tissus*

La peau est un organe d'origine ectodermique formé de plusieurs couches superposées, qui recouvre les surfaces de l'organisme en contact avec le milieu extérieur. Chez l'homme adulte, sa surface mesure environ 2 m² avec une épaisseur s'étalant de 0,5 mm au niveau de la paupière jusqu'à 4 mm au niveau des extrémités de la voute plantaire. La peau représente la première barrière physique, mais également immunitaire. En effet, le tissu cutané est infiltré par de nombreuses cellules immunitaires (p. ex. DC, macrophages, LT) et il est associé à un réseau de ganglion lymphatiques. Les tissus lymphoïdes associés à la peau (SALT) ont été décrits en 1983 par Streilein [99] puis revus en 1986 [100] pour aboutir aujourd'hui à un concept moderne selon lequel la peau est composée de (1) cellules présentatrices d'antigènes (APC) résidentes (p. ex. LCs, CD207+ dDCs), (2) de LT mémoires résidents de la peau (3) de kératinocytes qui apportent un support dans la réponse immunitaire et (4) d'un réseau de ganglions périphériques drainants les tissus cutanés. La peau n'est donc plus considérée comme une simple barrière physique, mais comme un organe faisant partie du système immunitaire. Chez l'homme, environ 500 ganglions sont recensés et sont généralement groupés en aires ganglionnaires (p. ex. bras, thorax, cou). Chez la souris, 22 ganglions différents ont été décrits répartis en 3 zones : intra-thoracique, intra-abdominal et périphérique et drainant chacune des régions différentes de la peau et des muqueuses [101]. Si les ganglions intra-thoraciques drainent uniquement des muqueuses locales (p. ex. intestin, poumons), il semble que les ganglions périphériques drainent principalement la peau, mais également les muqueuses à proximité (p. ex. vagin, cavité bucale). Cependant, les régions drainées par les ganglions ne sont pas exactement cartographiées.

4.2.2 Les tissus cutanés

Chez l'homme et la souris, la peau est organisée structuralement par 2 couches de tissus aux caractéristiques morphologiques distinctes: **l'épiderme** et **le derme**, qui sont séparés par une membrane basale (figure 11). Certains considèrent **l'hypoderme**, sous-jacent au derme, comme une couche de la peau, mais ce concept ne fait pas l'unanimité.

L'épiderme forme le tissu externe en contact direct avec l'environnement. Il est composé principalement de kératinocytes organisés en couches pluristratifiées. L'épithélium est subdivisé en 4 sous-couches distinctes : (1) La couche basale, la plus interne de l'épithélium, est composée de kératinocytes en division qui vont se différencier pour former les couches supérieures et ainsi sont responsables du renouvellement de l'épiderme. (2) La couche épineuse est formée par plusieurs couches de kératinocytes qui adoptent une conformation pavimenteuse et commence à sécréter de la kératine. (3) La couche granuleuse est constituée des kératinocytes sous-jacents qui se sont différenciés pour former des jonctions serrées entre eux [102]. Ils ont la particularité d'être énucléés. (4) Enfin, la couche cornée correspond à l'empilement de kératinocytes morts, nommés cornéocytes, qui sont directement au contact du milieu extérieur et disparaissent par desquamation. Ces deux dernières sous-couches représentent donc la barrière physique contre les pathogènes, les agents chimiques et la déshydratation [103]. Les kératinocytes représentent environ 90% des cellules de l'épiderme, qui contient également des mélanocytes, des cellules de Merkel sensorielles et des cellules immunitaires, dont les LC et des LT résidents de l'épiderme. L'épiderme n'est pas vascularisé par le réseau sanguin, ni lymphatique, obligeant les cellules immunitaires à migrer dans l'épiderme depuis le derme sous-jacent.

La membrane basale est une fine couche de fibres (protéoglycane, collagène IV et de glycoprotéines de structure) située à l'interface entre l'épiderme et le derme. Son rôle est de réguler le trafic cellulaire entre ces 2 tissus [104].

Le derme est un tissu résistant et élastique qui présente une faible densité cellulaire et principalement composé d'une matrice extracellulaire de protéoglycanes, de collagène IV, d'élastine et de composants fibreux, sécrétés par les fibroblastes [105]. Le tissu dermique est également composé de cellules immunitaires, beaucoup plus diverses que l'épiderme. On y retrouve différentes

sous-populations de DC, des LC en transit, des macrophages dermiques, des LT mémoires, des LTy δ et des LT natural killer [106, 107]. Le derme est richement vascularisé par le réseau sanguin ce qui facilite l'infiltration de cellules inflammatoires (p. ex. neutrophiles, monocytes inflammatoires) au niveau du site d'infection en réponse à un panel de chimiokines localement produit [108]. Le réseau lymphatique est également fortement développé dans le derme, permettant aux cellules de la peau de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour initier la réponse immunitaire [109]. On retrouve dans le derme une invagination de l'épiderme formé par le follicules pileux, dans laquelle on retrouve une quantité importante de LC.

L'hypoderme est une couche graisseuse (50% de corps gras) constituée principalement d'adipocytes, de macrophages et de fibroblastes qui sécrètent l'élastine. L'hypoderme est un tissu pauvre en cellules immunitaires résidentes ce qui pourrait limiter son intérêt en vaccination. Cependant, il a été démontré que la présence de lipides permet la rétention de l'antigène injecté qui contribue à la persistance de la réponse immunitaire.

Il existe de nombreuses différences entre les tissus cutanés de l'homme en comparaison à la souris. L'épaisseur de l'épiderme est en moyenne de 16 μm chez la souris contre 66 μm chez l'homme. Ceci est principalement dû aux nombres de couches de kératinocytes qui composent l'épiderme murin (2 ou 3) en comparaison à l'homme (environ 10). De plus, la couche granuleuse est absente chez la souris [110]. Le derme est d'environ 100 μm chez la souris contre plusieurs mm pour l'homme. La souris possède également une couche composée de fibres musculaires lisses intermédiaires entre le derme et l'hypoderme qui permet de donner une élasticité supplémentaire à la peau de certains animaux. Enfin, la souris comporte une densité de follicules pileux beaucoup plus importante en comparaison de l'homme.

4.2.3 Structure du ganglion drainant la peau

Les ganglions drainants sont essentiels dans l'initiation de la réponse immunitaire car ils optimisent la rencontre des lymphocytes naïfs avec les APC de la peau qui migrent par le réseau de vaisseaux lymphatiques [111]. Les ganglions lymphatiques sont constitués de trois zones distinctes : **le cortex**, **le paracortex** et **la médulla**, et protégés par une capsule fibreuse conjonctive formant le sinus sous-capsulaire sous-jacent, dans lequel se déverse la lymphe afférente des tissus drainés (figure 12). Le sinus sous

capsulaire est composé uniquement de macrophages qui vont filtrer la lymphe afférente. La lymphe traverse ensuite les différentes zones du ganglion par les sinus corticaux bordant latéralement le cortex, le paracortex et la médulla avant de se jeter dans les sinus médullaires situés dans la partie centrale du ganglion. La lymphe rejoint alors les vaisseaux efférents qui quittent le ganglion pour se jeter dans la circulation sanguine.

Le cortex, situé juste en dessous du sinus sous capsulaire, est composé principalement de LB et de cellules dendritiques folliculaires (FDC), qui forment les follicules B. Ces follicules peuvent être différenciés en follicules primaires en absence de réponse immunitaire, ou en follicule secondaire, lors de la formation de centre germinatif générée durant la réponse immunitaire.

Le paracortex sous jacent est composé de LT et de DC résidentes du ganglion ainsi que de veinules post-capillaires appelées HEV (High Endothelial Venules) par lesquelles les LT et LB naïfs migrent du sang vers le ganglion en réponse à CCL21 [112].

La médulla est la région centrale du ganglion, continuée de macrophages médullaires et de LB mémoires.

Les ganglions drainant la peau sont composés à 95% de LB et LT, respectivement regroupés dans les follicules B du cortex en réponse à la chimiokine CXCL13 sécrétée par les FDC et dans la zone T du paracortex, en réponse aux chimiokines CCL19 et CCL21 sécrétées par les FRC (Fibroblastic Reticular Cells) (figure 12). [113, 114]. Ces lymphocytes sont majoritairement naïfs, cependant, certains ont un phénotype mémoire. Les LB explorent les ganglions environ 24 heures, contre 10 heures pour les LT, à la recherche d'un antigène spécifique de leurs récepteurs spécifiques [115]. S'ils ne sont pas activés, ils quittent le ganglion en rejoignant la circulation sanguine pour rejoindre un autre ganglion. Ce mécanisme permet d'optimiser la rencontre entre un lymphocyte et les APC qui présentent l'antigène. De nombreux macrophages sont présent dans le sinus sous capsulaire et dans la médulla. Leur principal rôle est de capturer les antigènes qui circulent par la lymphe afférente pour ensuite les présenter, non dégradés, aux LB du cortex sous jacents [116]. Ceci constitue la première étape d'activation antigène spécifique des LB, détaillée dans le chapitre 3. En fonction de leur localisation, 2 sous-types de macrophages sont différenciés chez la souris : les macrophages sous capsulaires situés dans le sinus sous capsulaire (CD169+, CD11b+ F4/80-) et les macrophages de la zone médullaire (CD169+/-, CD11b+, F4/80+) [117].

4.3 Le réseau de DC cutanées

Les DC représentent une population d'APC spécialisé dans la détection, la capture et la présentation des antigènes dégradés aux LT et LB par leurs complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I (MHC I) ou II (MHC II) . Il existe de nombreuses sous-populations de DC différentes, généralement spécifique d'un tissu en particulier. On dénombre 4 sous-populations de DC cutanée chez la souris ainsi que chez l'homme. Si certaines sous-populations semblent similaires chez les 2 espèces (p. ex. LC), il est difficile de faire l'analogie entre les autres sous-populations par le manque de marqueur commun [118]. CD1a et CD1c sont couramment utilisées chez l'homme, mais sont absentes chez la souris. En revanche il est démontré que certaines sous-populations présentent les mêmes précurseurs et réalisent les mêmes fonctions [119], suggérant ainsi une correspondance entre l'homme et la souris.

4.3.1 *L'origine des DC*

Chez l'homme comme chez la souris, la nomenclature actuelle classifie les DC en 3 classes en fonction de leurs origines (figure 13) :

Les DC conventionnelles ou classiques (cDC) se développent à partir des précurseurs myéloïdes MDP (Macrophage and Dendritic cell Progenitors) qui mûrissent successivement en CDP (Common Dendritic cell Progenitors) puis en pré-DC dans la moelle osseuse et de façon dépendante à Flt3L (Fms-like tyrosine kinase receptor 3 ligand) [120]. Les pré-DC migrent dans les différents tissus, puis se différencient en sous-populations distinctes en réponse à la stimulation par différentes cytokines. Cependant, il a été démontré que les CDP peuvent également se développer à partir d'une population de précurseurs de la lignée lymphoïde CLP (Common Lymphoid Progenitor) qui a été à l'origine de l'ambiguïté dans la classification des DC en «DC myéloïdes » et «DC lymphoïdes ». Il est donc actuellement considéré que les cDC peuvent être d'origine myéloïde ou lymphoïde.

Les DC plasmacytoïdes (pDC) se développent également à partir de pré-DC, mais se distinguent morphologiquement des cDC par une absence de dendrite. En revanche, les pDC développent une morphologie dendritique lors de leur activation. Cette population n'est pas présente dans le tissu cutané mais est résidente des ganglions drainants la peau.

Les DC dérivées des monocytes représentent une population hétérogène et moins caractérisée. Leur point commun est le développement de ces DC à partir de monocytes circulants qui sont recrutés au site d'inflammation par diapédèse et activés en DC inflammatoires.

4.3.2 *Les cellules de Langerhans*

Dans la peau, les LC sont résidentes de l'épiderme, dans laquelle ils étendent leurs dendrites à travers les kératinocytes [102] pour échantillonner leur milieu environnant. Ce mécanisme de dSEARCH (dendrite Surveillance Extension and Retraction Cycling Habitude) correspond à des cycles d'allongement et de rétraction des dendrites à travers les kératinocytes pour dans le but de détecter d'éventuels agents pathogènes [121]. On retrouve également des LC dans le derme, lorsqu'elles migrent vers le réseau lymphatique. Il a été montré chez la souris et dans des explants humains que l'immunisation i.d. avec le virus ankara de la vaccine (MVA) stimule la migration des LC de l'épiderme vers le derme [122]. Morphologiquement, ces LC "en route" présentent un nombre moins important de dendrites, dont la longueur est réduite [122]. Chez la souris, les LCs expriment le marqueur CD207 (ou Langerin), EpCAM, CD24 et Sirpα en plus des marqueurs communs aux populations de DCs cutanées CD11c et MHCII (tableau 3). Chez l'homme, les LC sont également présentes dans l'épiderme et sont caractérisées par CD207 en plus de CD1a, CD1c et HLA-DR.

La population de LCs est assez particulière car elle développe localement à partir d'un précurseur hématopoïétique radiorésistant recruté dans l'épiderme à l'état embryonnaire [123] [124]. Leur développement en LC dépend d'une source autocrine de TGF-β1 (transforming growth factor-β1) [125] et du ligand de M-CSFR (macrophage colony-stimulating factor receptor) [126]. Cependant, il a été démontré que ce mécanisme de renouvellement local est associé à la différenciation de précurseurs monocytaires en LC en condition inflammatoire. Ces monocytes semblent être recrutés dans le derme depuis la circulation sanguine en réponse à l'expression de ligand de CCR2 par les fibroblastes. Ces monocytes expriment M-CSFR et CCR2, et se différencient en LC en réponse à la stimulation par MIP-3α et CCL20 sécrétées par les kératinocytes [127].

Les LC ont d'abord été considérés comme des cellules spécialisées dans l'activation de la réponse CTL. En utilisant le modèle murin transgénique Langerin-DTR, dans lequel il est possible de supprimer conditionnellement les cellules qui expriment CD207 (Langerin) [128, 129], de nombreuses études ont confirmé ces résultats *in vivo*.

Récemment, il a été démontré chez la souris l'implication des LC dans la réponse LT CD8+ dans un contexte de vaccination i.d. [122]. A l'opposé, certaines études démontrent que les LC ne sont pas impliquées dans la génération de la réponse cellulaire. Il a été démontré qu'une infection par la peau du virus de la vaccine et de l'herpès (HSV1) n'induit pas de réponse CD8+ [130, 131]. La nature cytolytique de ces virus est mise en cause pour expliquer ces résultats. Des LC isolées de la peau humaine ont été capables d'induire une réponse T_H1 ainsi que la réponse CD8+ [132]. Les résultats, étudiés en globalité, démontrent l'implication des LC dans la présentation croisée et la stimulation des CTL, ainsi que leur rôle dans la stimulation des LT CD4+. L'orientation de la réponse immunitaire par les LC est donc fortement dépendante de la nature de l'agent pathogène ou de l'antigène injecté.

La population de LC semble également impliquées dans l'induction de la tolérance, en condition non inflammatoire [133, 134]. Il a été démontré que les LC migrent constitutivement depuis l'épiderme vers le ganglion drainant en transportant des antigènes du soi et sont capables de stimuler le développement de lymphocytes T régulateur (T_{REG}) [135].

4.3.3 Les sous-populations de DC dermiques

Le modèle de souris transgénique langerin-DTR a permis de mettre en évidence l'existence d'une population résidente du derme qui exprime également CD207 (CD207+ dDC) [136]. Cette population se distingue des LCs par l'expression de marqueurs de surfaces différents (CD103+, EpCAM-, Sirpα-) (tableau 3) ainsi que par son développement à partir des pré-DC. Les CD207+ dDC sont capables de présenter l'antigène par le MCH I et sont principalement impliquées dans l'activation des LT CD8+. Tous les résultats montrent que cette population est majoritairement responsable de la réponse CTL. Ceci a été, en outre, démontrés dans un contexte d'immunisation par HSV-1[137], de vaccination par ADN [138] et de vecteur lentiviraux [139]. Cette population est généralement discriminée des LC par le marqueur CD103, cependant, il a été reporté récemment que cette population semble hétérogène, dont environ la moitié exprime CD103 et la seconde moitié ne l'exprime pas chez la souris [140]. Les deux autres populations du derme n'ont pas de marqueurs spécifiques et sont donc plus difficilement différenciables. L'expression ou non de CD11b en plus de CD11c et MHC II, permet de les distinguer et ont donné leur nom de CD11b+ DC et CD11b- DC. Il a été récemment démontré en utilisant un système de souris transgénique CCR2^{-/-} que la

population de CD11b⁺ DC peut être facilement confondue avec la population de macrophage dermique (CD11b⁺ CD11c^{low} MHCII⁺ Ly-6C⁺ CD64⁺ CCR2^{low}) et représente ~11% des cellules CD11b⁺ et une population de DC inflammatoires dépendante de CCR2 (CD11b⁺ CD11c^{low} MHCII⁺ Ly-6C^{low} CD64⁺ CCR2⁺) qui représentent ~8% [141]. Chez l'homme, on distingue également 4 populations dermiques (tableau 3). Bien que les CD1a⁺ DC et les LC expriment CD1a et CD1c, les LC peuvent être identifiés par l'expression de CD207, de la molécule d'adhésion EpCAM ainsi qu'une expression plus élevée de CD1a. Les CD141⁺ DC possèdent des fonctions de présentation via le MHC I similaire aux CD207⁺ dDCs [142, 143].

4.4 Les DC résidentes des ganglions

Les ganglions sont composés de nombreuses sous-populations de DC représentant environ 2% des cellules totales (tableau 4). Ces DC sont divisées en deux catégories : les DCs résidentes des tissus lymphoïdes et les DC cutanées décrites ci-dessus, qui migrent constitutivement dans le ganglion.

Parmi les **DC résidentes**, 3 populations sont distinguées chez la souris et chez l'homme. Chez la souris, les CD8⁺ DC sont spécialisées dans la présentation croisée de l'antigène et induisent principalement des réponses cellulaires. Cette population est généralement perçue comme la version lymphoïde de la population de CD207⁺ dDC car ils se développent à partir des mêmes précurseurs. Les CD4⁺ DC sont plutôt associées à la stimulation des LT CD4⁺. Cependant, son implication exacte dans la réponse immunitaire n'a été que peu étudiée. Une population double négative (DN) CD4⁻ CD8⁻ est également décrite mais elle est encore mal caractérisée. Enfin, un nombre important de plasmacytoïdes DC (pDC) résident également dans le ganglion drainant. Les pDC expriment les récepteur de type Toll (TLR) 7 et TLR9 et sont impliquées dans la réponse à l'ADN et l'ARN virale par la production d'IFN de type I [144, 145]. Chez l'homme, on retrouve des sous-populations analogues à la souris, mais qui n'expriment pas les mêmes marqueurs. La population CD141⁺ DC est impliquée dans la présentation croisée des antigènes alors que la population CD1c⁺ DC induit une réponse de type Th1. Ces 3 populations résident dans le paracortex, à proximité des LT mais sont également capables d'étendre leurs dendrites à travers les vaisseaux lymphatiques pour capturer les antigènes qui y diffusent. De façon analogue aux lymphocytes, les DC résidentes entrent dans le ganglion via les HEV sous le contrôle des récepteurs aux chimiokines exprimés.

Parmi les **DC cutanées**, on retrouve les populations décrites précédemment avec cependant une modification des marqueurs associés. Chez l'homme, seule la population CD14⁺ DC change de nom pour CD206⁺ DC car dans le ganglion, cette population semble perdre l'expression de CD14. En revanche, les fonctions sont conservées. Chez la souris, seules quelques marqueurs membranaires sont modifiés lors de la migration (tableau 4).

4.5 Les méthodes de vaccination cutanée

La vaccination sous-cutanée (s.c.) désigne la voie d'injection pratiquée avec une aiguille capable d'atteindre la couche adipeuse localisée dans l'hypoderme. Par analogie, la vaccination intramusculaire (i.m.) est pratiquée à l'aide d'une aiguille dont la taille permet d'atteindre le muscle (figure 14). Ces deux voies d'administration n'impliquent donc pas les DC résidentes du tissu cutané, mais permettent l'infiltration leucocytaires en réponse aux molécules inflammatoires sécrétées au niveau du site de vaccination. Le choix de l'hypoderme ou du muscle comme cible vaccinale se fait par pure commodité. Le geste médical en lui-même est simple et rapide à réaliser et il est possible d'injecter de grands volumes de solution vaccinale (>1 mL) [108].

La vaccination intradermique (i.d.) désigne l'injection d'un antigène directement dans le derme à l'aide d'une aiguille inclinée à 75° (technique de Mantoux), de micro-aiguilles ou d'un injecteur à air comprimé (gene-gun). Cette voie d'immunisation cible les DC présentes dans le derme ainsi que les macrophages dermiques. Chez l'Homme, l'injection i.d. permet d'injecter entre 100 et 200 µL [146]. Chez la souris, cette voie d'immunisation se pratique dans le flanc de l'animal (maximum 100 µL) ou dans l'oreille (maximum 50 µL / oreille) en guidant l'injection le long du cartilage. Cependant, cette technique est difficile à réaliser et nécessite un entraînement particulier. Une injection trop profonde ciblerait l'hypoderme. Les principaux inconvénients de cette technique sont que l'injection est assez douloureuse et peut entraîner une réaction locale (érythème, œdème).

La vaccination transcutanée (t.c.) désigne l'application d'une solution liquide d'antigène directement sur la surface externe de la peau. Cette technique demande une préparation préalable de la peau qui va permettre d'enlever la couche de cornéocytes superficielle ainsi que la couche de sébum qui obstrue les conduits des follicules pileux. La vaccination t.c. a pour but de cibler ces conduits dans lesquels la préparation vaccinale sera piégée et les antigènes pris en charge par les LC de l'épiderme.

Différentes études montrent que l'immunisation i.d. induit une réponse immunitaire de meilleure qualité que l'immunisation s.c et i.m. Chez la souris, une étude a comparé l'immunisation par les voies t.c., i.d. et s.c en utilisant des particules synthétiques biodégradables, sur lesquelles ont adsorbé la protéine p24 du VIH. Les résultats ont mis en évidence que la vaccination i.d. permet d'induire une réponse cellulaire et humorale systémique et localisé au niveau dans les muqueuses. En revanche, la vaccination s.c n'a induit qu'une réponse humorale systémique. À l'opposé, l'immunisation t.c semble générer principalement une réponse cellulaire [10]. Dans une seconde étude comparant les voies i.m. et i.d., les auteurs montrent que l'injection d'un vaccin ADN dans le derme induit une réponse cellulaire, absente dans la vaccination i.m [94]. De nombreux protocoles visent à évaluer le potentiel de la voie i.d. en comparaison des voies i.m. et s.c. chez l'homme, en termes d'efficacité vaccinale et de dose antigénique. Les résultats varient selon les préparations vaccinales testés, cependant il est admis que la voie i.d. est capable d'induire des réponses immunitaires d'intensité au moins équivalente aux voies i.m. et s.c. (anticorps neutralisants et protection à long terme) avec une dose antigénique plus faible (1/5^{ème} de la dose injectée par voie i.m. et s.c.) [147].

4.6 Intérêt des particules fines en vaccination cutanée

La principale problématique des vaccins protéiques non-adjuvantés est leur faible immunodétection par les APC du système immunitaire. Les constructions particulières ont émergé dans le but de reconstruire la structure d'une particule virale sur laquelle il est possible d'y adsorber des antigènes viraux. Ceci induit naturellement un agrégat protéique qui permet d'augmenter la quantité d'antigène capturée par les APC. En vaccination, les particules apportent de nombreux avantages [148]. Le principal avantage est de pouvoir recréer une structure conformationnelle similaire aux virus, dont les APC sont adaptés à phagocyter. L'absence de réplication dans ces particules en fait un vecteur vaccinal facile à manipuler comparé aux virus atténués.

4.6.1 *Les différentes natures de particules*

Parmi les différentes constructions, les plus étudiées sont les vecteurs viraux tels que le MVA, les VLP (Virus-Like Particles), les particules solides (p. ex., bille d'or) et les particules biodégradables (p. ex. polymères). À l'opposé des particules solides biocompatibles (p. ex. or, silice, polystyrène) qui s'accumulent dans les reins ou le foie après la vaccination, les VLP et les particules de polymère possèdent la caractéristique d'être biodégradable ce qui leur permet d'être éliminées rapidement. Ces particules ne

semblent pas induire de toxicité pour l'organisme [149], cependant, des essais complémentaires doivent être menés.

Les Virus-Like particles

Les VLP sont des particules virales sans génome et non répliquative dont la taille peut varier de 50 à 100 nm, et reproduit une conformation virale. Elles sont formées par l'assemblage spontané des protéines de la capsid et de l'enveloppe d'un virus dans des levures. L'absence de génome viral ainsi que son incapacité à se répliquer en font une particule facile à manipuler tout en conservant sa capacité à pénétrer dans les cellules cibles par les mêmes mécanismes que le virus [150]. Des recherches sur le développement d'un vaccin contre le Chikungunya ont démontré la capacité des VLP à induire une immunité cellulaire et humorale efficace chez le singe [151]. Des recherches menées sur la grippe ont également montré que les VLP induisent une protection de plus longue durée que la préparation vaccinale classique. Les principales contraintes de ces particules sont le coût et le temps de production que nécessitent leur fabrication. Les VLP ont été autorisés en vaccination humaine avec un vaccin contre le virus de l'hépatite B. Plus récemment, un second vaccin contre le papillomavirus humain (Gardasil, Merck & Co) a également été homologué [152].

Les particules de polymère biodégradable

Ces particules sont formées à partir d'une émulsion d'eau et d'huile, dans laquelle est dissous le polymère utilisé [153]. Il existe plusieurs types de polymères utilisés dont le PLA (Poly Lactic Acid), le PGA (Poly Glycolides Acide) ou encore le PLGA (Poly Lactic Glycolic Acid) (figure 15). Ces particules possèdent des tailles de 10 nm à 200 nm. L'acide poly lactique (PLA) est un polymère biocompatible et biodégradable composé de monomère d'acide lactique, le produit naturel de la respiration anaérobie. Il est possible d'encapsuler l'antigène au sein de la matrice de polymère ou de l'adsorber sur la surface des particules [153]. Des études chez la souris ont été réalisées avec des particules de PLA sur lesquelles ont été adsorbées la protéine p24 du HIV-1. Les résultats ont démontré leurs capacité à induire une réponse humorale sérique comparable à l'immunisation avec l'ADN codant pour p24 ou par la protéine purifiée co-injectée avec l'adjuvant CFA (Complete Freund Adjuvant) [153]. La réponse humorale muqueuse induite par les particules de PLA adsorbées avec la protéine p24 a été comparée à la réponse induite par la co-injection de protéines adjuvantées par MF59, un adjuvant à base de squalène. Les résultats ont montré l'induction d'un taux d'anticorps

neutralisants similaire. En revanche, les régions contre lesquelles les anticorps étaient spécifique différaient ce qui laisse supposer que l'adsorption protéique sur les particules peut modifier la conformation spatiale de l'antigène et ainsi révéler de nouveaux épitopes [154]. L'étude de la réponse cellulaire a également mis en évidence une meilleure induction de la réponse CTL en utilisant les particules de PLA.

4.6.2 L'influence de la taille des particules

Les particules sont naturellement capturées par les APC car elles sont élaborées pour représenter des tailles similaires aux agents pathogènes (figure 16). L'organisation internationale de normalisation (ISO) a publié un bulletin en 1998 qui définit l'appellation des particules en fonction de leur taille. Les « nanoparticules » sont comprises entre 1 nm et 100 nm de diamètre, les « particules fines » entre 100 nm et 2,5 µm et les « particules grossières » entre 2,5 µm et 10 µm [155]. La taille est extrêmement importante car elle influence la nature des APC qui capturent les particules ainsi que le mécanisme d'internalisation. Les nanoparticules et particules fines de petit diamètre (20 nm à 200 nm) sont principalement capturées par les DC alors que les particules de taille plus importante (500 nm à 5000 nm) sont majoritairement capturées par les macrophages [156, 157]. De plus, les mécanismes d'internalisation diffèrent également. Il a été montré que les DC capturent les particules par endocytose médiée par puits de clathrine alors que les macrophages les internalisent majoritairement par pinocytose [156]. En ciblant préférentiellement des sous-populations différentes d'APC, la taille des particules influe donc de façon indirecte l'orientation de la réponse immunitaire. Il a été montré que les particules de 40 nm à 80 nm induisent plutôt une réponse cellulaire, alors que les particules de 90 nm à 120 nm orientent la réponse vers une prolifération des LT CD4. En revanche, les nanoparticules (<20nm) ne sont pas capables d'induire une réponse cellulaire [158]. La taille des particules est également importante pour l'activation des LB lorsque le vaccin est injecté par voie s.c ou i.d. Il a en effet été montré que les grosses particules qui migrent librement vers le ganglion drainant sont capturées par les macrophages du sinus sous capsulaire, alors que les nanoparticules et petites particules fines peuvent diffuser à travers la barrière de macrophage et s'infiltrer dans les follicules B sous-jacents. L'antigène est ainsi capable d'activer les LB naïfs directement, ou par l'intermédiaire les FDC [159].

4.6.3 Prise en charge par les DC

Les APC de la peau sont capables de capturer les particules dont la taille peut atteindre 4600 nm pour les macrophages et 1700 nm pour les DC [160]. Plus récemment, il a été démontré que la capacité de phagocytose diminue proportionnellement avec la taille des particules et que la taille optimum se situe entre 150 nm et 4500 nm en fonction de la nature des APC [161, 162]. En comparant l'injection s.c. de particules de polystyrène de différentes tailles et de VLP, les auteurs ont mis en évidence la capacité des particules de 20 nm à 200 nm et des VLP (30 nm) à diffuser librement vers le ganglion drainant via le réseau lymphatique, alors que les particules de diamètre plus important (500 nm à 2000 nm) ont été uniquement prises en charge par les DC du site d'injection [157]. Ceci montre que seules les nanoparticules et les petites particules fines sont capables de rejoindre librement (non associé aux cellules) le ganglion et peuvent être prises en charge par les DC résidentes du ganglion. À l'opposé, des particules fines de taille plus importante doivent être préalablement transportées par des cellules résidentes du site d'injection. La plupart des particules ne sont pas immunogènes intrinsèquement, seule l'adsorption des protéines exogènes à leur surface permet d'induire une réponse immunitaire. Il est également possible de co-adsorber des ligands des TLR et des NOD qui permettent d'activer les DC par les voies de transduction associées tout en leur délivrant l'antigène, maximisant ainsi leurs rôles dans l'induction de la réponse immunitaire. En utilisant des particules fines de PLA, la co-adsorption d'un ligand de NOD1 avec la protéine p24 du VIH-1 a ainsi permis d'augmenter la production d'anticorps sériques après vaccination s.c. chez la souris. De plus, il a été montré dans le modèle murin, inactivé pour certaines voies de transduction du signal induites par les TLR, que certains ligands sont également impliqués dans le processus de phagocytose [163].

Les 3 points essentiels :

- (1) Les DC cutanées constituent une population d'APC spécialisée dans la présentation antigénique.
- (2) Les particules fines permettent de cibler les APC pour délivrer l'antigène et les activer
- (3) La peau est composée de tissus cutanés et lymphoïdes permettant l'interaction entre les APC et les LT et LB.

5 Induction de la réponse immunitaire par l'immunisation i.d.

La mise en place de la réponse immunitaire se fait en plusieurs étapes : (1) la détection et la capture des antigènes par les DC, (2) la migration vers les ganglions drainants, (3) la présentation antigénique aux lymphocytes T et B et enfin (5) l'activation des lymphocytes et leur expansion clonale. Les LT CD4+ jouent un rôle central dans la coordination de la réponse immunitaire. Ils sont notamment impliqués dans la stimulation des LB permettant leur différenciation en plasmocytes, l'amplification et le maintien de la réponse des LT CD8+ cytotoxiques (CTL), le contrôle de l'auto-immunité ou encore la régulation de l'amplitude et de la persistance de la réponse immunitaire.

5.1 Capture de l'antigène et activation des DC

Les différentes sous-populations de DC sont capables de prendre en charge les antigènes qu'elles rencontrent, cependant, il semble que les mécanismes sont différents selon les DC. La capacité de phagocytose et de présentation antigénique des LC a été démontrée *in vitro* en 1989 avec des peptides dérivés de la myoglobine [164]. Les études ultérieures ont confirmé que les LC capturent les antigènes principalement par phagocytose et également par pinocytose et grâce aux récepteurs CD11b, C5aR, FcR [165]. Les LC et DC dermiques sont capables de capturer une multitude de pathogènes ou composés vaccinaux. Il a notamment été démontré la capacité des LC à capturer des virus à tropisme épithélial comme le HSV-1, le VZV ou le virus de la vaccine [166]. Les CD207+ dDC sont également capables de capturer le HSV-1, ainsi que les débris apoptotiques de LC induits par l'infection du virus [166]. La capture des particules synthétiques a été très bien démontrée pour les populations de LC et de DC du derme en utilisant différentes tailles de particules.

En condition non inflammatoire, les DC de l'épiderme et du derme sont dans un état immature associé à une forte capacité d'endocytose et une plus faible expression de MHCII [167]. Le mécanisme de capture des antigènes et le microenvironnement local sont responsables de la maturation des DC qui seront alors prêts à migrer par les vaisseaux lymphatiques pour rejoindre le ganglion. Le microenvironnement inflammatoire local est rapidement mis en place par les cellules de l'immunité innées telles que les macrophages, les cellules NK, les mastocytes et les keratinocytes . Ces cellules sont activées par les TLR et produisent des molécules pro-inflammatoires, dont IL-1, IL-6 et TNF- α . TNF- α et IL-1 β , qui sont fortement responsables de la migration des LC et DC dermiques vers les vaisseaux lymphatiques [168]. Les DC expriment

également de nombreux TLR qui participent à leurs activations ainsi qu'à la production de cytokines. C'est pour cela que de nombreuses préparations vaccinales incluent des ligands aux TLR, dans le but d'augmenter l'immunité locale et d'activer plus efficacement les DC. La maturation des DCs s'accompagne d'une modification morphologique, dont la rétraction des dendrites est bien décrite [122]. Les DC activées présentent également une augmentation de l'expression des protéines de co-stimulation CD80, CD86 et CD40 qui sont essentielles pour la stimulation des LT.

5.2 Infiltration de cellules inflammatoires

Durant l'inflammation, les DC, les macrophages et les kératinocytes sécrètent les chimiokines, dont CCL2 et CXCL8, qui vont contribuer à l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion endothéliale E-selectine et P-selectine par les vaisseaux sanguins. Ceci permet une rapide infiltration de neutrophiles [169], de monocytes et de cellules NK dans la zone d'immunisation, puis plus tardivement, de LT effecteurs [95]. Ces cellules ont un rôle important dans l'amplification de la réponse inflammatoire locale et participent à l'activation des DC locales. De plus, ces cellules inflammatoires sont capables de capturer une grande quantité d'antigène et de migrer vers les ganglions drainants. Il a également été mis en évidence que les neutrophiles recrutés dans la peau sont capables de migrer dans la moelle osseuse pour participer à l'induction de LT CD8+ mémoires [170]. La population de DC inflammatoires, dérivée de monocytes, est également retrouvée en quantité importante lors d'une inflammation [171]. Le transfert adoptif de monocytes inflammatoires en condition non inflammatoire n'aboutit pas à la différenciation en DC inflammatoires, ce qui démontre le rôle important de l'inflammation dans l'apparition de cette population. Outre l'expression de CD11c et du MHC II spécifiques des DC, les DC inflammatoires expriment également les marqueurs CD11b, Ly6C et CD64 chez la souris [172]. Chez l'homme, les DC inflammatoires humaines sont caractérisées par l'expression de HLA-DR, CD11c, BDCA1, CD1a mais également de molécules habituellement considérées comme des marqueurs de macrophages, telles que CD206 et CD14 [173]. En revanche, leur infiltration dans la peau humaine n'est pas clairement établie [174]. Plusieurs noms sont associés à cette population dont Tip (TNF/iNOS-producing)-DC [175], monocytes-DC (moDC) [176] et DC inflammatoires [119]. Cette population a été décrite pour induire une réponse Th1 dans un modèle d'infection cutanée par *Leishmania major* [177] ainsi qu'une réponse cellulaire *in vivo* [178] et *ex vivo* [178]. Cependant, leurs rôles dans la réponse à la vaccination i.d. n'a jamais été étudié. Comme pour les DC cutanées, il est démontré que

les DC inflammatoires peuvent migrer dans les ganglions drainants pour y transporter les antigènes capturés au niveau du site d'infection.

5.3 Migration de l'antigène et des cellules vers le ganglion drainant

L'injection i.d. permet aux protéines vaccinales de diffuser passivement et très rapidement (<0,5 minute) vers les ganglions drainants [179, 180] en empruntant les vaisseaux du réseau lymphatique de la peau, ce qui correspond à la première vague d'arrivée de l'antigène dans le ganglion drainant le peau. Le passage des antigènes à travers la paroi des vaisseaux lymphatiques semble résulter de la pression exercée lors de l'injection. Une grande proportion de ces particules est rapidement capturée par la population de macrophages sous capsulaires des ganglions, alors que la fraction restante continue de circuler à travers le réseau lymphatique ganglionnaire par les sinus corticaux et médullaires, avant de quitter le ganglion par les vaisseaux efférents. Il est décrit que les DC résidentes du ganglion sont stratégiquement positionnées aux abords des vaisseaux lymphatiques par lesquelles ils peuvent capturer des antigènes par leurs dendrites qui s'infiltrant à travers les cellules de la paroi endothéliale [181]. De plus, il a été démontré qu'en fonction de la taille, les particules sont capables de franchir la barrière de macrophages sous capsulaires et diffusent directement dans les follicules B, activant ainsi les LB naïfs.

La seconde vague d'arrivée correspond à la migration cellulaire depuis la peau en empruntant également le réseau de vaisseaux lymphatiques [109]. L'expression des chimiokines CCR7 et CXCR4 par les LCs et les DC dermiques sont responsables de leurs migrations vers les vaisseaux lymphatiques, en réponse à l'expression de CCL21 et CCL19 par le ganglion [109]. En condition inflammatoire, TNF- α semble être responsable de l'expression de CCR7 et CXCR4 avec une augmentation de CXCR4 plus précoce pour les LC [182]. La migration de LC est réalisée en deux étapes. : la première correspond à la descente des LC de l'épiderme vers le derme dépendant de l'expression de CXCR4 et de l'augmentation de CXCL12 dans le derme. De plus, la sécrétion de TNF- α par les keratinocytes permet de réduire l'expression d'E-cadherin et de CCR6, impliquée dans le maintien de la position épidermique des LC [183]. TNF- α est également impliqué dans l'expression de l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ par les LC, qui leurs permettent d'interagir et franchir la membrane basale séparant l'épiderme du derme [184]. Les DC du derme et les LC "en route" migrent à travers la matrice dense extracellulaire du derme en la dégradant grâce à l'expression de MMP (Matrix Metallo

Proteinases) à leur membrane. Chez l'homme et la souris, il a été démontré que la migration des LC et DC du derme est fortement dépendante de l'expression de MMP-2 et MMP-9 [185]. Le mécanisme de passage de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques semble être dépendant de l'expression de CCL5; CCL20 et CXCL5 ainsi que des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, qui sont surexprimées par les cellules des vaisseaux lymphatiques en conditions inflammatoires [186]. La seconde étape correspond à la migration des cellules du derme vers les ganglions par le réseau de vaisseaux lymphatiques, qui pénètrent au niveau du sinus sous capsulaire puis migrent dans la zone T du ganglion par l'expression de CCR7 [187]. Il est également supposé que CCR8, via son ligand CCL1, est impliqué dans le mécanisme d'entrée des DC et qu'il n'est pas affecté par la déficience des intégrines $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 7$ [188]. Des expériences de microscopie intra-vitale ont montré que les DC sont principalement localisées à proximité des HEV, pour faciliter l'interaction avec les lymphocytes qui migrent depuis le sang [189]. En voulant s'intéresser plus précisément aux LCs, l'équipe de B.Malissen a développé une souris transgénique exprimant la protéine EGFP sous contrôle du promoteur CD207 et ont mis en évidence la localisation des LCs et CD207⁺ dDC dans la zone profonde du paracortex, à l'opposé des DC CD207⁻ qui sont localisées proche du follicule B [128] ce qui semble mettre en évidence l'existence d'une micro-anatomie du paracortex. En injectant des DC cutanées marquées, il a également été mis en évidence leur capacité à migrer vers les zones T du ganglion, permettant ainsi un placement stratégique pour activer les LT [190]. Dans la même étude, il a également été montré que les DC sont capables de se déplacer à l'intérieur du paracortex dans les premiers jours suivant leurs infiltrations probablement via l'expression de CCR7 mais les mécanismes exacts ne sont pas connus [190].

La cinétique de migration des antigènes qui diffusent passivement et des différentes populations cellulaires a bien été étudiée et les résultats montrent des différences en fonction des conditions d'injections, du volume et de la préparation vaccinale. Les antigènes qui diffusent passivement arrivent dans les minutes qui suivent l'injection, suivis par les cellules inflammatoires (p. ex. neutrophiles, DC inflammatoires, macrophages) qui arrivent entre 4 et 8 heures et enfin une dernière vague qui correspond à l'arrivée des LC de l'épiderme et des DC du derme qui arrivent à partir de 16 heures après l'injection. Des expériences en condition inflammatoire [128, 191] et non inflammatoire [192] ont démontré que les DC du derme arrivent dans le ganglion plus rapidement que les LC de l'épiderme.

5.4 Initiation de la réponse humorale dans les ganglions drainants

La mise en place de la réponse immunitaire humorale se fait en plusieurs étapes : (1) la présentation des fragments antigéniques par les APC aux LT CD4+ conduisant à leurs activation, (2) l'activation des LB par l'antigène non dégradé et enfin (3) l'interaction entre les LT CD4+ et les LB pour permettre leurs différenciation en plasmocytes. Les LT CD4+ étaient différenciés en 2 sous-types nommés T_{H1} (Helper T cells type 1) et T_{H2} (Helper T cells type 2), associés à la réponse cellulaire et humorale respectivement. Depuis, de nouveaux sous-types ont été différenciés, dont chacun est impliqué plus ou moins exclusivement dans un type de réponse immunitaire. Les plasmocytes correspondent à un état complètement différencié des LB dont leur développement nécessite une étape d'activation déclenchée par la détection d'un antigène ainsi qu'une étape de différenciation finale déclenché par l'interaction avec les T_H pendant laquelle les LB activés se différencient en plasmocytes. Ces différentes étapes requièrent des interactions cellulaires et moléculaires spécifiques pour l'initiation de la réponse et son maintien.

5.4.1 Les différents sous-types de lymphocytes T_H

Le processus d'activation des LT CD4+ naïfs s'initie lorsque leurs récepteurs antigéniques (TCR) se lient de manière spécifique à un antigène présenté par les molécules de MHC d'une APC [193]. Les signaux induits par le TCR ainsi que les molécules de co-stimulations telles que CD28 (ligand de CD80 et CD86), CD30L et OX40 déclenchent la prolifération des LT CD4+ naïfs en T_H effecteur [194]. En fonction du micro-environnement inflammatoire et des molécules de co-stimulations engagées, les LT CD4+ naïfs vont se différencier en sous-types effecteurs différents (p. ex. T_{H1} , T_{H2} , T_{H9} , T_{H17} , T_{FH} , T_{REG}), discriminés par leurs facteurs de transcriptions ainsi que leurs panels de cytokines spécifiques secrétées [195]. Aujourd'hui, au moins 7 sous-types de T_H effecteurs sont identifiés. Ils sont différenciés par leurs marqueurs de surface, leurs fonctionnalités, la sécrétion d'un panel de cytokines distinctes ainsi que par l'expression de facteurs de transcriptions qui leur sont spécifiques [196] (tableau 5). Parmi les T_H , un sous-type est nommé LT CD4+ folliculaires (T_{FH}) et constitue une population essentielle pour participer à la formation des centres germinatifs dans les follicules B, où a lieu le développement des plasmocytes à forte affinité pour l'antigène et à longue durée de vie.

Les facteurs de transcriptions sont des protéines qui se lient à des séquences d'ADN spécifiques, de manière à initier ou réguler la transcription d'un ensemble de gènes. Ils

sont induits par l'activation des voies de transduction STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) qui résulte de la stimulation des récepteurs membranaires associés à ces voies. Les cytokines présentent dans le microenvironnement ainsi que les protéines membranaires de co-stimulation qui se fixent aux récepteurs des LT CD4+ naïfs sont donc principalement responsables de l'induction d'un facteur de transcription en particulier, et permettent donc de sélectionner l'une des voies de différenciation des T_H . L'une des caractéristiques intéressantes de tous les sous-types de T_H effecteurs est leur capacité à amplifier leur propre développement. Par exemple, IL-12 et IFN- γ induisent le facteur de transcription T-bet (T-box transcription factor) impliqué dans la polarisation en T_{H1} , via STAT4 et STAT1 respectivement [197-199]. Or T-bet est capable de remodeler le gène *Ifng* d'une part, mais également de stimuler la production d'IL-12R.

Outre leurs différences phénotypiques, ces différents sous-types de T_H possèdent également des différences fonctionnelles. Les T_{H1} sont impliqués dans la réponse immunitaire cellulaire contre les virus et les bactéries, principalement par l'activation des CTL et des macrophages alors que les T_{H2} soutiennent la différenciation des LB pour la production d'IgE et l'action des éosinophiles, favorisant l'élimination des parasites extracellulaires (p. ex. helminthes). Les T_{H17} sont importants pour le contrôle des infections bactériennes extracellulaires et fongiques au niveau des muqueuses et jouent un rôle dans le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée tels que les neutrophiles polynucléaires. Il a été récemment montré que les T_{H17} sont impliqués dans la stimulation des LB au niveau des plaques de Peyer, associés à une stimulation de la production de SIgA au niveau de la muqueuse intestinale. Cependant, ce mécanisme passerait par une étape intermédiaire de différenciation des T_{H17} en T_{FH} [200]. Une fonction principale des T_H est de participer à l'activation des LB et à la stimulation de la production d'anticorps. Initialement associé aux T_{H2} , il a été démontré que les T_{H1} , T_{H17} et T_{FH} participent également à la stimulation de la production d'anticorps [200, 201]. Cependant, T_{H1} , T_{H2} et T_{H17} , sont principalement impliqués dans la commutation de classe isotopique des immunoglobulines durant le développement des LB extra-folliculaires de faibles affinités. La population T_{FH} est en revanche obligatoire pour la formation des centres germinatifs et le développement des LB de forte affinité pour l'antigène et à longue durée de vie [202]. Cette population est donc essentielle dans la mise en place de la réponse humorale.

5.4.2 *Activation des lymphocytes B (antigène dépendant)*

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les LB matures sont regroupés en amas cellulaires nommés par le terme générique de "follicules B". Dans le ganglion drainant, les follicules B sont situés dans le cortex, bordant les sinus sous capsulaire d'une part et le paracortex (zone T) de l'autre. L'organisation des follicules B est médiée par la chimiokine CXCL13 sécrétée par les FDC, une sous-population de cellules stromales résidentes du ganglion qui apporte la structure et le microenvironnement nécessaire à la migration des LB sous l'influence de leurs récepteurs CXCR5 [203]. La première étape du développement des plasmocytes correspond à l'activation LB en réponse à la fixation d'un antigène sur le récepteur spécifique des LB (BCR). L'antigène peut provenir de plusieurs sources : les macrophages résidents des sinus sous capsulaires [116, 204], les FDC ou par les DC ayant migrés à proximité des follicules B [205, 206]. De plus, les LB peuvent capturer directement de petits antigènes solubles qui traversent la barrière de macrophages sous capsulaires passivement [207]. Cependant, les antigènes supérieurs à 100 kDa (p. ex. p24 de HIV-1 : 24 kDa) tels que les virus, ou les nanoparticules ne semblent pas pénétrer dans le follicule B de manière passive, [208] mais sont capables de franchir cette barrière dans certaines conditions, dont les mécanismes sont encore mal compris. En utilisant une méthode de transfert adoptif de LB transgéniques dont le BCR est spécifique de HEL, K.Pape et ses collaborateurs ont montré que les complexes fluorescents HEL-GFP injectés par voie i.d. migrent vers le ganglion drainant la peau dans les secondes qui suivent l'injection. L'antigène inonde rapidement le sinus sous capsulaire (0.5 minute après injection) avant de diffuser dans les follicules B (3.5 minutes après injection). Bien que la colocalisation de l'antigène et des LB transgéniques soit très rapide, la production de fragments dans les MHC II n'apparaît que plus tardivement (4 heures après l'injection). En analysant la population de CD11c+ (population hétérogène de DC résidant du ganglion et ceux provenant de la peau), ils démontrent l'habileté des LB à capturer l'antigène ainsi qu'à le dégrader et le charger dans les molécules de MHCII plus efficacement que la population de DC [179]. De nombreux résultats suggèrent que l'activation des LB est plus efficace quand ils reconnaissent un antigène lié à un membre en comparaison avec un antigène libre capturé directement. Cependant, les mécanismes et les molécules membranaires mises en jeu ne sont pas complètement connus.

La liaison spécifique entre les BCR d'un LB et l'antigène, déclenche un réarrangement du cytosquelette d'actine qui se traduit par la formation d'un micro cluster membranaire

permettant de réunir géographiquement de nombreux BCR. Associée à des molécules d'adhésion, l'activation d'un nombre suffisant de BCR par l'antigène stimule la cascade d'activation LYN/SKY qui aboutit à l'internalisation des antigènes en relation avec les BCR regroupés dans la synapse immunologique [209]. L'activation du BCR et l'internalisation de la synapse immunologique sont associées à la sécrétion d'hydrolase et à la maturation d'endosomes tardifs qui permettent de libérer l'antigène ainsi que de le dégrader [210, 211]. En contrôlant la malléabilité du réseau d'actine, la tyrosine kinase SYK favorise le transport des MHC II vers le lysosome, dans lequel s'opère le chargement des fragments d'antigènes [212]. Pour finir, les molécules du MHC II chargées sont adressées à la membrane cellulaire pour que le fragment soit présenté aux LT CD4+ (figure 17). La différenciation des LB en plasmocytes nécessite l'interaction physique avec des LT CD4+. Cependant, les LB ne sont pas stratégiquement placés pour les rencontrer. La mise en place de la réponse humorale dépend donc d'une série de migrations et d'interactions cellulaires coordonnées dans l'espace et dans le temps. La migration des LB activés vers la frontière entre la zone T et le follicule B (frontière T/B) est attribuée à la surexpression des récepteurs couplés à une protéine G EBI2. Ce récepteur est surexprimé chez les LB quelques heures après leur activation par un antigène [213, 214]. L'inactivation du gène *Ebi2* chez le modèle murin entraîne une diminution de la réponse humorale. De plus, l'absence de *Ebi2* chez les LB est associée à une perte de la mobilité vers la frontière T/B [213]. L'activation des LB entraîne également la surexpression de CCR7 responsable de la migration vers la zone T en réponse aux chimiokines CCL19 et CCL21 [215]. Les LB spécifiques sont alors idéalement positionnés pour interagir physiquement avec les LT CD4+, préalablement activés par des APC et pour le même antigène. En fonction du sous-type de T_H engager dans l'interaction, les LB peuvent se différencier en plasmocytes via la voie extra-folliculaire, ou la voie folliculaire.

5.4.3 Les mécanismes moléculaires précoces

Les mécanismes moléculaires favorisant l'engagement des LB vers un développement en plasmocytes extra-folliculaires plutôt qu'en plasmocytes différenciés dans les centres germinatifs se résument simplement par l'activation précoce ou non des facteurs de transcriptions impliqués dans la maturation en plasmocytes. Les LB, situés à la frontière T/B, qui expriment précocement BLIMP1 (PRDM1 - PR domain zinc finger protein 1), XBP1 (X-box binding protein 1) et IRF4 (Interferon regulatory factor 4) vont se développer en plasmocytes via la voie extra-folliculaire. En revanche les LB qui

expriment BCL6, PAX5 (Paired box protein Pax-5) et MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) garderont un phénotype de LB (figure 18). Ils migreront à nouveau dans le follicule B pour former les centres germinatifs. Les LB du centre germinatif se différencieront en plasmocytes à longue durée de vie ou en LB mémoire après la maturation de leur affinité pour l'antigène et la commutation de classe d'immunoglobuline.

BLIMP1 est un facteur de transcription essentiel dans le développement des plasmocytes et la sécrétion d'immunoglobulines [216]. De plus, BLIMP1 inhibe l'expression de deux autres facteurs de transcription, BCL6 et PAX5, tous les deux impliqués dans la formation des centres germinatifs [78, 217]. Cette rétroaction négative est importante car elle rend impossible un retour des plasmocytes différenciés à l'état précédent du développement. BLIMP1 est également responsable de l'induction de nombreux gènes impliqués dans le programme de développement des plasmocytes, dont *Xbp1* et *Irf4* [86]. À l'inverse, l'expression de *Bcl6* va inhiber la transcription de *Blimp1* et donc bloquer le développement en plasmocyte. De même, PAX5 est nécessaire pour conserver une identité de LB et la répression de sa transcription est obligatoire pour le développement en plasmocytes [217]. Cependant, la perte de PAX5 seul ne permet pas la formation de plasmocytes. PAX5 et MITF sont tous les deux des répresseurs de *Xbp1* et *Irf4*. L'activation des LB en plasmocytes à courte durée de vie et en LB du centre germinatif intervient de façon simultanée pour induire une réponse rapide d'une part et plus spécifique de l'autre. L'activation ou non de ces facteurs de transcription est principalement induite par les signaux des T_H, dont seuls les lymphocytes T CD4+ folliculaires (T_{FH}) sont capables de diriger le développement des LB dans la voie folliculaire. Cependant, des études suggèrent que la nature de l'antigène, l'affinité du BCR pour l'antigène ainsi que la nature des cellules présentant l'antigène au LB peuvent également être impliquées dans l'orientation de la voie de développement. Les DC ont fait l'objet de nombreuses recherches *in vitro* chez l'homme et dans le modèle murin. Leur capacité à influencer la prolifération, la différenciation et la commutation de classe des immunoglobulines a été mise en évidence, et ce indépendamment de l'interaction avec les LT. Il a notamment été démontré que la production d'IL-12 par les DC qui présente l'antigène aux LB naïfs favorise le développement rapide de plasmocytes sécrétant des IgM alors l'IL-6R soluble promeut le maintien des LB [218]. Cependant il est impossible de confirmer ces observations dans les modèles *in vivo*, car il ne permet pas de faire abstraction de l'implication des LT. Actuellement, aucun lien précis n'est établi entre les voies de développement des plasmocytes et l'activation des LB naïfs par

les antigènes et les APC. L'interaction avec les différents sous-types de T_H reste le facteur déterminant dans la différenciation des LB en plasmocytes.

5.4.4 Le développement extra-folliculaire (T_H dépendant)

Après interaction avec les T_H à la frontière T/B, les LB qui s'engagent dans la voie de développement extra-folliculaire vont migrer dans la zone inter-folliculaire des ganglions drainants [219]. Après une étape de multiplication clonale rapide, les LB générés se différencient en plasmocytes. Le développement des plasmocytes extra-folliculaires est associé à la perte progressive des marqueurs B220, CD19, CD79 α et CD79 β ainsi que les molécules de costimulation CD86 et MHCII, réduisant alors leur capacité d'interaction avec les LT. La réponse extra-folliculaire est un mécanisme rapide (moins d'une semaine) et représente la première vague de production d'anticorps spécifiques, mais de faible affinité. Les plasmocytes engagés dans cette voie sécrètent rapidement des IgM mais l'on observe également une commutation de classe dépendante des T_H . Les plasmocytes issus de la voie extra-folliculaire entrent en apoptose dans les jours suivants leur activation (environ 3 jours) [220, 221]. Cependant, il est clairement démontré que l'interaction avec des DC peut induire la survie de ces plasmocytes [222]. Malgré l'avantage que représente la rapidité de la réaction extra-folliculaire, son principal défaut est de produire des anticorps de faible affinité pour l'antigène.

5.4.5 Le développement par les centres germinatifs (T_{FH} dépendant)

Après l'interaction avec les T_{FH} , des LB matures peuvent se développer vers une seconde voie et initier à la formation de centres germinatifs [223]. En fonction des antigènes, leur formation s'initie entre 7 et 14 jours après immunisation/infection. Les centres germinatifs sont des zones localisées dans le follicule B dans lesquelles les LB prolifèrent. Ceux dont le BCR présente une meilleure affinité pour l'antigène se développent en plasmocytes à longue durée de vie. L'interaction entre les LB et les T_{FH} à la frontière T/B induit l'expression des facteurs de transcription réprimant leur différenciation en plasmocytes. BCL6 est un facteur obligatoire pour la formation du centre germinatif qui est fortement exprimé par les LB du centre germinatif [224]. Les souris dont le gène *Bcl6* est inactivé dans la population de LB ne forment pas de centre germinatif et ne génèrent pas de plasmocytes à longue durée de vie [225]. BCL6 agit principalement sur la répression de l'expression de BLIMP1, ce qui permet aux LB de continuer à se développer avant de se transformer en plasmocytes [226]. MTA3 est également impliqué dans la formation des centres germinatifs en interagissant

physiquement avec BCL6 pour augmenter son activité répressive. Lorsque l'expression de MTA3 est réduite, le niveau d'expression de BCL-6 n'est pas modifié, cependant, l'expression de BLIMP1 augmente. À l'opposé, lorsque BCL6 et MTA3 sont surexprimés artificiellement dans des plasmocytes, BLIMP1 et XBP1 sont inhibés, et CD19 et MHCII sont ré-exprimés [227]. MITF est également un facteur de transcription impliqué dans l'inhibition du développement des plasmocytes, et en son absence, BLIMP1 et IRF4 sont spontanément transcrits [228]. Pour finir, PAX5 est quant à lui impliqué dans l'inhibition du développement des plasmocytes, et nécessaire dans le maintien du phénotype des LB [229]. La caractéristique la plus importante de PAX5 est d'activer AID, une enzyme cruciale pour l'hypermutation somatique ainsi que la commutation de classe des immunoglobulines.

L'une des caractéristiques des plasmocytes différenciés dans les centres germinatifs est l'augmentation de l'affinité pour l'antigène par le mécanisme d'hypermutation somatique. Ce mécanisme permet un ré-agencement des gènes de la chaîne variable (le plus souvent la substitution d'une base) qui aboutit à la formation de variants légèrement différents du BCR initial. Durant la prolifération rapide des LB du centre germinatif, le mécanisme d'hypermutation somatique va entraîner une diversité importante de variants de BCR, dont seuls les plus affins vers l'antigène seront conservés. L'enzyme AID joue un rôle majeur dans ce mécanisme en échangeant ponctuellement l'acide aminée cytosine en uracile, à l'origine des mutations. La sélection des BCR les plus affins pour l'antigène requière la présence de l'antigène non dégradé, qui est principalement fourni par les FDC ou les DC présents dans les centres germinatifs. Récemment, les techniques d'imagerie *in vivo* ont permis de comprendre l'organisation des centres germinatifs [230]. Le centre germinatif est divisé en 2 zones : une zone sombre, dans laquelle a lieu la prolifération des LB du centre germinatif et l'hypermutation somatique et une zone claire, dans laquelle les LB de forte affinité pour l'antigène sont sélectionnés et leurs survies stimulées par la population de T_{FH}. La sélection des LB du centre germinatif ayant une forte affinité semble être dépendante de la quantité d'antigènes présente ainsi que de la population de T_{FH} [231, 232].

À la fin de ce processus, les LB sélectionnés vont se différencier en plasmocytes. Cependant, les éléments moléculaires qui initient la phase de développement en plasmocytes sont peu connus. *In vitro*, la signalisation par CD40 semble être fortement impliquée dans ce phénomène, en agissant sur la diminution de la quantité d'ARNm de *bcl-6* [233]. De plus, l'activation du BCR induit la phosphorylation de BCL6 qui mène à

sa dégradation [234]. Cependant, les signaux et les mécanismes responsables de cette régulation restent à démontrer *in vivo*. L'activation du BCR uniquement n'induit pas l'expression de BLIMP1. Son expression nécessite l'activation par des cytokines telles que IL-2 et IL-5 [235]. Les cytokines jouent donc un rôle extrêmement important pour le développement en plasmocytes. Dans des lignées cellulaires, la combinaison d'IL-2 et IL-5 [236] ou la présence d'IL-6 seule [237] sont suffisantes pour initier la transcription de BLIMP1. IL-21 induit également l'expression de BLIMP1 en présence d'IgM spécifiques et augmente le nombre de plasmocytes [238]. Cependant, IL-21 induit aussi l'expression de BCL6, ce qui semble montrer que de nombreux facteurs doivent être coordonnés pour initier la différenciation des LB du centre germinatif en plasmocytes. La population de T_{FH} joue un rôle important dans ce processus en modifiant ses interactions avec les LB, dont OX40, CD40L et en sécrétant IL-21. Cependant, les mécanismes précis ne sont pas connus (figure 19). Les centres germinatifs ont donc un rôle primordial dans la génération de la réponse humorale car ils permettent le développement des plasmocytes à longue durée de vie et des LB mémoires. La population de T_{FH} étant la seule à induire la génération des centres germinatifs, il est essentiel de privilégier sa polarisation lors de la vaccination.

Les 3 points essentiels :

- (1) La réponse inflammatoire au niveau de la peau joue un rôle essentiel dans l'activation cellulaire.
- (2) La migration des APC de la peau vers les ganglions drainants permet de présenter les antigènes vaccinaux aux LT CD4+
- (3) La formation des centres germinatifs dans lesquels se développent les plasmocytes à longue durée de vie et à forte affinité pour l'antigène est dépendante des T_{FH}

6 Rôle des T_{FH} dans la réponse humorale

6.1 Caractéristiques et implication des T_{FH} dans la réponse humorale

6.1.1 Origines des T_{FH} et définition actuelle

Les T_{FH} ont été initialement mise en évidence avec les expériences de R.Foster, comme une population de LT CD4+ capable de migrer dans les centres germinatifs des follicules B grâce à l'expression de CXCR5 (C-X-C chemokine receptor type 5), un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G. Les analyses fonctionnelles *in vitro* étudiées en 2000 par P.Schaerli et D.Breitfeld dans des amygdales humaines ont mis en évidence la capacité des cellules CD4+ CXCR5+ à induire une meilleure stimulation de la production d'anticorps et de la commutation de classe des immunoglobulines en comparaison à la population CD4+ CXCR5- [239]. Chez l'homme comme chez la souris, la population de T_{FH} est définie comme un sous-type de T_H effecteurs qui interagit avec les LB des follicules pour former les centres germinatifs et stimuler la production d'anticorps à forte affinité. La définition phénotypique décrit les T_{FH} comme une population de LT CD4+ (CD3+ ; CD4+) qui expriment CXCR5, ICOS, PD-1, BCL6 [240] et secrètent IL-21 [241]. Plus récemment une étude a montré l'expression de FR4 (nutrient transporter folate R 4) lors d'une infection virale. FR4 est exprimé constitutivement par les LT CD4+ naïfs, puis est sous exprimé durant une infection. En revanche son expression est exprimée à nouveau chez la population de T_H alors qu'elle reste absente pour les T_{H1} [242]. Cependant, des études sont nécessaires pour savoir si ce marqueur est spécifique aux T_{FH} .

6.1.2 Facteurs de transcription et cytokines

L'une des spécificités des T_{FH} est l'expression du facteur de transcription bcl-6 (B-cell lymphoma 6 protein). Dans un modèle murin dont le gène *Bcl6* est inactivé (*Bcl6*^{-/-}), la population de T_{FH} est absente, alors que les autres sous-types d'effecteurs ne semblent pas affectés. De plus, l'expression constitutive de *Bcl6* chez les LT CD4+ entraîne la différenciation en T_{FH} [243] et inhibe la polarisation des T_{H1} , T_{H2} et T_{H17} par la répression de leurs facteurs de transcriptions associés, dont Blimp-1, un facteur de transcription général associé au développement des non- T_{FH} [243, 244]. La protéine bcl-6 se fixe également sur les gènes codant pour *T-bet* et *ROR γ t* pour inhiber leurs transcription. La cytokine IL-21 joue un rôle majeur dans la différenciation des LB en plasmocytes à

longue durée de vie chez la souris et chez l'homme par la voie de différenciation STAT3 et l'inhibition du facteur de transcription *Blimp-1*. Des études ont montré que les patients atteints par une mutation de la voie STAT3 présentent un sévère déficit de LB mémoires associé à l'incapacité d'IL-21 à induire la différenciation des LB en plasmocytes à longue durée de vie [245]. Ces patients présentent également une réduction du nombre de T_{FH} [246]. En revanche, une déficience de STAT1 n'induit aucune modification. Ces résultats ont été confirmés chez la souris en utilisant des modèles transgéniques dans lesquels *Il-21* ou *Il-21R* sont inactivés [247]. En plus d'IL-21, la sécrétion autocrine de TGF- β par les T_{FH} en réponse à IL-6 a également été mise en évidence pour contribuer au maintien de leurs phénotypes [248]. Cependant, cette observation est issue de la caractérisation de T_{FH} issu d'un phénotype T_{REG} localisé dans les plaques de Peyer. Des expériences *in vitro* ont démontré que la formation des T_{FH} ne requière par TGF- β alors que cette cytokine est nécessaire pour la différenciation en T_{H17} [249]. Si la sécrétion de TGF- β par les T_{FH} est encore discutée, il est maintenant bien démontré que cette cytokine joue un rôle majeur dans la commutation de classe des IgM en IgA [250].

6.1.3 Rôles dans l'immunité humorale

Dès les premières expériences en 2000, D.Breitfeld et ses collaborateurs ont démontré *in vitro* que la population de CD4⁺ CXCR5⁺ avait la capacité de stimuler la production d'IgG et d'IgA, que n'avaient pas les CD4⁺ CXCR5⁻ [239]. Depuis, la capacité des T_{FH} à induire la production d'anticorps de forte affinité a été confirmée *in vivo* dans le modèle murin [243, 251]. Il est maintenant démontré plus précisément que l'interaction entre les T_{FH} et les LB oriente leur développement en plasmocytes à longue durée de vie et à forte affinité pour l'antigène. Ces plasmocytes se développent uniquement dans le centre germinatif. À l'opposé, le développement extra-folliculaire forme des plasmocytes dont les immunoglobulines présentent une faible affinité pour l'antigène (figure 20). Le développement extra-folliculaire nécessite un temps de maturation des plasmocytes très court (quelques jours) alors qu'il faut plus d'une semaine pour former les plasmocytes à forte affinité. Les mécanismes sous-jacents de cette voie de développement des LB requièrent de nombreux signaux qui sont majoritairement contrôlés par les T_{FH}. Ces cellules n'apportent pas uniquement une aide aux LB pour la production d'anticorps, elles sont responsables de leurs survies, stimulent la commutation de classe isotypique des immunoglobulines (p.ex. IgM, IgG, IgA, IgE) [243, 252], participent à la maturation de l'affinité pour l'antigène et sont impliquées dans la différenciation des LB en

plasmocytes à longue durée de vie ou en LB mémoires. Leurs interactions avec les LB du centre germinatif sont donc essentielles pour le maintien de l'immunité humorale à long terme et la mise en place de la réponse mémoire. Les souris transgéniques inactivées pour le gène *Bcl6* ne produisent pas de T_{FH} ni de LB du centre germinatif, en revanche, elles développent quand même des LB mémoires ce qui semble indiquer que les T_{FH} ne sont pas obligatoires pour le développement du phénotype mémoires [73]. Chez l'homme, il a été montré que l'amplitude de la réponse humorale induite par la vaccination saisonnière trivalente contre la grippe est corrélée à la quantité de T_{FH} circulant (ICOS+CXCR3+CXCR5+)[253]. Si les rôles et la définition des T_{FH} sont maintenant bien admis, l'origine ainsi que le développement de cette population restent encore controversés.

6.2 Le développement des T_{FH}

6.2.1 Différents modèles de différenciation

Hormis le facteur de transcription, la distinction entre les différents sous-types de T_H effecteurs est attribuée aux panels de cytokines sécrétés ainsi qu'à leurs fonctions. Cependant, il a été montré que la population de T_{FH} sécrète des cytokines caractéristiques d'autres sous-types de T_H effecteurs, tel que IFN- γ [243, 254], IL-4 [255, 256] et IL-17 [257], sécrétés respectivement par T_{H1} , T_{H2} et T_{H17} . Des études *in vitro* ont également montré que les T_{H1} et T_{H2} sont également capables de migrer vers la frontière entre la zone T et le follicule B pour participer à la réponse anticorps en stimulant les LB [201]. En plus de *bcl6*, les T_{FH} expriment d'autres facteurs de transcription tel que cMaf et Batf qui sont également exprimés par les T_{H2} et T_{H17} [258]. Tout ces résultats semblent montrer que la population de T_{FH} se développe à partir des autres sous-type de T_H en utilisant un programme de différenciation secondaire. Cependant, de nombreux éléments tendent à montrer que ce sous-type est bien distinct des autres. Les mécanismes de développement des T_{FH} sont encore beaucoup discutés et de nombreux arguments relancent la question des origines exactes des T_{FH} et de leur développement. On peut différencier 3 origines possibles qui s'accordent chacune avec un modèle de différenciation distinct [259]. (figure 21):

Modèle de programme secondaire : Dans ce modèle, les T_{FH} ne seraient pas un sous-type indépendant mais correspondraient à la maturation des autres sous-types de T_H effecteur en T_{FH} selon un second programme de différenciation. La principale évidence

de ce modèle est le partage de nombreuses caractéristiques entre les T_{FH} et les autres sous-population de T_H , dont principalement les cytokines sécrétées et les facteurs de transcription communs. De façon analogue aux T_{FH} , les T_{H17} secrètent également IL-21 et peuvent être activés par la voie STAT3 [260]. Une étude utilisant des souris possédant des gènes rapporteurs Bcl6-RFP, IL-4-GFP, IFN γ -YFPet IL-17A-GFP a mis en évidence la possibilité des sous-populations T_{H1} , T_{H2} et T_{H17} à exprimer bcl-6 dans les temps tardifs après immunisation [261]. Les soupçons d'un second programme de différenciation sont encore plus évidents au niveau des plaques de Peyer où il est démontré que les T_{H17} acquièrent un phénotype de T_{FH} et sont impliqués dans la production d'anticorps [200, 262]. Si les T_{FH} sont issus d'un second programme de différenciation, leur profil transcriptomique devrait être relativement similaire à leurs populations d'origines. Cependant, la différence d'expression de gènes entre le sous-type T_{FH} et les sous-types T_{H1} , T_{H2} et T_{H17} est aussi importante qu'entre eux même.

Modèle de différenciation direct : Ce modèle se base sur le développement direct des LT CD4⁺ naïfs en T_{FH} . En utilisant une protéine de fusion YFP-BCL6, une récente étude à permis de mettre en évidence 2 vagues d'expression de BCL6 dans la population de T_{FH} , l'une apparait durant l'interaction avec des DC et la seconde plus tardive est associée à la surexpression de CXCR5 [263]. Le phénotype T_{FH} a donc été établi dès l'étape d'activation par les DC. De manière analogue aux autres sous-types de T_H effecteur, R.Nurieva et ses collaborateurs ont montré que la présence d'IL-6 ou IL-21 dans le milieu de culture de LT CD4⁺ naïfs purifiés induit l'expression de BCL6 et CXCR5 [244]. Or IL-6R et IL-21R sont tout les deux impliqués dans l'activation du facteur de transcription STAT3, l'un des facteurs de transcription nécessaire pour la polarisation en T_{FH} . Il a également été montré que ces 2 cytokines stimulent la sécrétion d'IL-21 [249, 264, 265]. Cependant, ce modèle est controversé. Dans des modèles de souris transgéniques déficientes pour IL-6, IL-21 ou IL-21R, la population de T_{FH} n'est pas affectée après immunisation [266] ou infection virale [267]. Cependant, la formation des centres germinatifs est aberrante en absence de production d'IL-21 par les T_{FH} [266, 267]. De plus, il a été démontré que la présence des LB est obligatoire pour le développement des T_{FH} [268]. S'il est confirmé que l'IL-6 et l'IL-21 jouent un rôle essentiel pour l'initiation de la polarisation des LT CD4⁺ en T_{FH} , ce modèle ne prend pas en compte l'implication des LB.

Modèle de différenciation dépendant des LB : Dans ce modèle, les LT CD4⁺ naïfs seraient activés par les APC mais la différenciation en T_{FH} serait induite par

l'interaction avec les LB. Non seulement il a été montré que les LB sont nécessaires au développement des T_{FH} mais il faut qu'ils soient spécifiques au même antigène que les T_H activés. Dans des expériences conduites sur des souris transgéniques pour lesquelles les BCR des LB sont spécifiques au lysozyme d'œuf de poule, l'infection virale n'a pas permis d'induire le développement de T_{FH} [243]. Bien que les LB soient capables de présenter les antigènes par leur MHC II, leur localisation dans le follicule B ne leur permettrait pas d'activer des LT CD4+ naïfs qui résident dans la zone T. Il semble que l'activation des LT CD4+ naïfs soit induite par des DC, et dans un second temps que les LB stimulent la différenciation en T_{FH} . Cependant, il a été démontré dans la condition particulière où l'antigène est persistant dans les organes lymphatiques secondaires que les LB ne sont pas obligatoires pour le développement des T_{FH} [269]. Il est donc possible de différencier des LT CD4+ naïfs en T_{FH} sans interaction les LB, mais cette condition est particulière.

6.2.2 *Le modèle de différenciation en plusieurs étapes*

En prenant en compte tout ces résultats, un modèle de développement des T_{FH} général a émergé. La présentation antigénique ainsi que l'activation des LT CD4+ et leur différenciation en T_{FH} seraient réalisées par les DC et contrôlées par la sécrétion de cytokines spécifiques. Cette première étape conduirait à la formation de pré- T_{FH} . En revanche, l'interaction avec les LB serait obligatoire pour maintenir le phénotype T_{FH} et stimuler leurs capacité à migrer dans les centres germinatifs [259]. Aussi bien chez la souris que chez l'homme, deux phénotypes de T_{FH} peuvent être différenciés, selon leurs états d'activation, les pré- T_{FH} et les T_{FH} . En fonction des nomenclatures ils peuvent également être nommés respectivement T_{FH} et T_{FH} du centre germinatif. Malgré les dénominations différentes, ils correspondent aux mêmes états d'activation. Il est possible de les différencier principalement par leurs marqueurs de surface [259]. Chez la souris, les pré- T_{FH} correspondent à des LT CD4+ qui expriment bcl-6, CXCR5 et PD1 [268]. En comparaison, les T_{FH} possèdent un niveau plus élevé de bcl-6 et de CXCR5 [268]. Ce niveau d'expression de CXCR5 est également observable pour les T_{FH} issus d'amygdale chez l'homme [270]. Chez la souris, les T_{FH} présentent une expression plus importante de PD-1 en comparaison des pré- T_{FH} [268, 271]. De même, on observe chez l'homme une surexpression d'ICOS par les T_{FH} [270]. La surexpression de CXCR5 se traduit par une localisation différente des deux phénotypes car elle permet aux T_{FH} de pénétrer à l'intérieur du centre germinatif alors que les pré- T_{FH} sont localisés à la frontière T/B. *In vitro*, les pré- T_{FH} ainsi que les T_{FH} peuvent stimuler la sécrétion d'anticorps par les LB [254, 270]. *In vivo*, les pré- T_{FH} ne peuvent cependant pas se différencier en T_{FH} sans

interaction avec les LB et sont incapables de participer à la formation du centre germinatif. En revanche, ils participent au soutien de la réponse humorale extra-folliculaire [272]. Les différentes étapes du développement des LT CD4⁺ en T_{FH} de ce modèle sont décrites ci-dessous.

Activation des LT CD4⁺ naïfs en pré-T_{FH} : La différenciation en T_{FH} est principalement contrôlée par le facteur de transcription *Bcl-6* [244]. En réponse aux cytokines, les protéines de la famille des STAT sont phosphorylées par le récepteur associé pour former des homo- ou hétéro-dimères qui vont migrer dans le noyau pour stimuler ou réprimer la transcription (figure 22). La transcription de *Bcl-6* est activée par la voie de signalisation STAT3 qui est initiée par les récepteurs aux cytokines IL-6 et IL-21. Il a d'ailleurs été démontré que les LT déficients pour la voie STAT3 ne sont pas capables de se différencier en T_{FH} [249]. Cependant, la relation entre STAT3 et *bcl-6* est plus complexe. STAT3 peut se fixer sur le gène *bcl6* et induire sa transcription [273] mais induit également l'activation de la transcription de Blimp-1 [274]. Or, comme *Bcl-6* et *Blimp-1* sont des antagonistes, il semble que l'induction de *bcl-6* plutôt que *blimp-1* par la voie STAT3 dépend d'autres facteurs de transcription dont c-Maf et Batf. STAT3 et c-Maf sont les principaux facteurs favorisant la transcription d'IL-6R et IL21R [275, 276] et permettent donc de créer une boucle d'amplification en stimulant l'expression des ces récepteurs de surface qui sont impliqués directement dans la stimulation de la voie STAT3, et indirectement dans l'expression de *bcl-6* [244, 249]. Les protéines membranaires d'activation des APC tels que CD80, CD86 et OX40L sont également impliquées dans la différenciation en T_{FH} en induisant la survie cellulaire. De plus l'activation d'ICOS sur les LT est associée à l'induction du facteur de transcription c-Maf par la voie des PI3 Kinase. Les souris inactivées pour le gène c-Maf présentent une altération de la différenciation des T_{FH} in vivo, due à l'absence d'IL-21 de façon dépendante à ICOS [277]. Il est maintenant admis que les DC sont capables d'initier le programme de différenciation en T_{FH} se traduisant par la surexpression de *bcl6* et l'expression de CXCR5 et sera l'objet d'un paragraphe complet (§3.4). Cependant, il est nécessaire aux T_{FH} d'interagir avec les LB pour conserver leur phénotype [278] et acquérir leur capacités de stimulation des LB.

Migration des pré-T_{FH} à la frontière T/B : La migration des pré-T_{FH} à la frontière des zones T et B leur permet de rencontrer les LB spécifiques. Le marqueur CXCR5, spécifique des T_{FH} est alors essentiel car il permet leur migration vers les follicules B en réponse à la chimiokine CXCL13 [279]. Cependant, l'expression de CXCR5 n'est pas

obligatoire. Le transfert adoptif de LT CD4⁺ dont le gène CXCR5 est inactivé a montré que la fréquence de T_{FH} est réduite mais que la sous-expression de CCR7 est suffisante pour induire la relocalisation à la frontière T/B. Cependant, l'expression de CXCR5 est obligatoire pour la migration à l'intérieur du centre germinatif [268]. A l'inverse, l'expression de CXCR5 par les pré-T_{FH} est suffisante pour induire leur relocalisation à la bordure T/B. Cependant, une forte expression de CCR7 peut bloquer la migration des T_{FH} vers les centres germinatifs en réponse à leurs ligands CCL19 et CCL21 [268]. CXCR5 est rapidement exprimé après l'interaction avec les APC ce qui confirme l'hypothèse du modèle de différenciation directe. Des études ont montré que les pré-T_{FH} activés par les APC perdent leurs marqueurs spécifiques en absence des LB [268]. Comme certaines APC, les LB activés expriment le récepteur ICOSL, qui est essentiel pour le développement des T_{FH} [249]. L'inactivation du gène ICOS dans un model murin [280] et l'utilisation d'anticorps bloquant anti-ICOSL [249, 280] inhibe complètement le développement des T_{FH}. IL-6 et IL-21 sont également importants dans la maturation des T_{FH}, bien qu'ils soient redondants. Il a été montré dans le model murin que l'inactivation d'IL-6 ou d'IL-21 n'affecte que faiblement la génération de T_{FH}, en revanche, la perte des deux cytokines simultanément réduit fortement la réponse humorale associée aux T_{FH}. La déficience de la production d'IL-6 par les LB a été mise en cause dans ce phénomène [281].

Formation du centre germinatif : Les T_{FH} stimulent la survie des LB du centre germinatif par CD40L, IL4, IL21 et BAFF (figure 23). Sans cette stimulation, les T_{FH} induisent l'apoptose des LB par l'interaction entre Fas, exprimé par les LB et FasL. De façon similaire aux mécanismes précoces de différenciation à la frontière T/B, l'interaction entre ICOS et ICOSL est également requise dans les stades tardifs de développement pour le maintien du phénotype T_{FH} [280]. SAP est une protéine exprimée par les T_{FH} qui est essentielle pour le développement des centres germinatifs. Elle est principalement impliquée dans l'adhésion entre les LB et LT. Chez l'homme, une déficience de SAP entraîne un syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X qui se traduit par une faible réponse humorale associée à une absence de centre germinatif. Dans le modèle murin, l'inactivation du gène SAP (SH2D1A) entraîne une réponse IgG précoce normale mais l'absence de réponse tardive et de réponse mémoire [282]. La transduction du signal par son ligand SLAM, présent à la surface des LB, induit la sécrétion d'IL4 par les T_{FH} qui sont impliqués dans la stimulation de la transcription d'AID et de *bcl6* par les LB. AID est directement impliqué dans l'hypermutation somatique qui permet d'augmenter l'affinité de l'immunoglobuline pour l'antigène. Les

mécanismes de différenciation des LB du centre germinatif en plasmocytes sont bien compris et principalement dirigés par l'expression du facteur de transcription Blimp1, cependant les facteurs influençant leurs différenciations ne sont pas clairs [232]. Le développement des plasmocytes et des LB mémoires est détaillé dans le chapitre suivant.

Le stade T_{FH} est souvent considéré comme un stade terminal de part l'importante expression de PD-1, fortement impliquée dans la mort cellulaire par apoptose. Ce modèle de différenciation terminale est appuyé par les observations *in vitro* selon lesquelles la mort cellulaire est inévitable pour les T_{FH} [270]. Cependant, des études de microscopie intra-vitale ont montré qu'une proportion des T_{FH} quitte le centre germinatif et migre vers les régions périphériques du follicules B [283]. Il est possible que ces T_{FH} se relocalisent à la frontière T/B pour stimuler de nouveau LB et former de nouveaux centres germinatifs ou se transformer en T_{FH} mémoires. Chez l'homme, cette population semble correspondre aux cellules $CD4^+ CXCR5^+$ circulante dans le sang, qui est capables d'induire la différenciation des LB en plasmocytes *in vitro* [284]. Il a été montré dans le modèle murin qu'une proportion des T_{FH} ($CXCR5^+ ; ICOS^hi$) sont capables de persister après la phase de contraction immunitaire jusqu'à 4 semaines après injection en subissant une modification phénotypique ($CXCR5^+ ICOS^{low}$). Cette population de cellules serait maintenue dans le ganglion à proximité des LB mémoires et exprimerait de faible quantité d'ARNm pour ICOS, OX40, $IFN\gamma$, IL-4 et IL-2. Après restimulation *in vitro*, cette population ré-exprime à nouveau IL-4, IL-10 et IL-21 ce qui suggère que cette population ait retrouvé une fonctionnalité propre au T_{FH} [285].

6.3 Implication des cytokines et des DC dans la différenciation en T_{FH}

6.3.1 Les cytokines associées à la différenciation en T_{FH}

Les DC participent à la différenciation des LT $CD4^+$ naïfs en différents sous-type de T_H en sécrétant des cytokines spécifiques et en exprimant des molécules de co-stimulation de nature variées. Parmi les cytokines impliquées, IL-6, IL-12 et IL-21 semblent être déterminant dans la différenciation en T_{FH} , en engageant l'activation des voies STAT3 et STAT4 (figure 24). De plus, il a été montré que IL-6 est nécessaire à plusieurs étapes du développement des T_{FH} [281]. Cependant, les sources exactes de ces cytokines ne sont pas déterminées. Les cDC sont capables de sécréter de grandes quantités d'IL-6, en particulier lors de la stimulation par des IFN de type 1 [286]. L'inactivation du récepteur *Ifnar1* spécifiquement dans les DC inhibe l'expression d'IL-6 et réduit la population de

T_{FH}. La population de pDC produit également IL-6 lors de l'activation par des produits microbiens [287] et sur-exprime ICOSL lors de l'infection par influenza [288]. Des études récentes *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'inactivation du gène Blimp-1 restreint aux DC réduit leur capacité à sécréter IL-6, associé à l'augmentation du taux de différenciation en T_{FH} ainsi que la formation des centres germinatifs.

IL-21 est également impliqué dans de nombreuses étapes du développement des T_{FH}, principalement lors de l'interaction avec les LB. Il est maintenant bien démontré qu'IL-21 permet d'activer bcl-6 via la voie STAT3. Cependant, l'inactivation d'IL-21 ne perturbe que légèrement le développement des T_{FH}, car sa fonction semble redondante avec IL-6. Si la sécrétion d'IL-6 par les DC est bien démontrée, aucune DC sécrétant IL-21 n'a été mise en évidence. L'activation de STAT4 par le récepteur de l'IL-12 semble être impliqué dans les mécanismes précoces de surexpression des gènes *Bcl6* et *IL21* chez l'homme et la souris [289]. Il a été montré que la sécrétion d'IL-12 par les DC peut être stimulée par les TLR4 et TLR7, ce qui montre l'importance de l'activation des DC lors de la vaccination [290]. Cependant, IL-12 semble également être impliqué dans la surexpression de T-bet, un inhibiteur de Bcl6. Enfin, il semble que l'affinité du TCR pour l'antigène influence la différenciation en T_{FH}. N.Fazilleau et ses collaborateurs ont démontré qu'une affinité forte entre le TCR et le fragment présenté par les molécule de MHC II des DC conduit à une interaction plus longue entre les 2 cellules qui permet une action prolongée des molécules de co-stimulation (e.g. ICOS/ICOSL) et les cytokines ce qui induirait préférentiellement un phénotype T_{FH} [291].

A l'opposé, IL-2 inhibe la différenciation en T_{FH} ainsi que le développement des centres germinatifs [292]. IL-2 induit la surexpression de Blimp-1 via la voie de signalisation STAT5 ainsi que T-bet, impliqué dans l'inhibition de la transcription de Bcl-6 en agissant directement sur le génome. De plus, certaines DC expriment chez l'homme et la souris des récepteurs à l'IL-2 [293]. Il est possible que l'IL-2 sécrété par les DC soit capable d'induire l'expression de Blimp-1 dans d'autres populations de DC environnantes, et ainsi inhiber leur production d'IL-6 par exemple. Cette hypothèse reste cependant à vérifier.

6.3.2 Implication des DC cutanées

Il est donc admis que la différenciation en T_{FH} résulte d'une balance de plusieurs signaux de co-stimulation (ICOSL) et de cytokines (IL-6, IL-12, IL-21) induit par les DC, qui tous ensemble font pencher la différenciation des LT CD4⁺ naïf en T_{FH} ou une autre sous-

population de LT CD4 effecteurs. Les études réalisées se sont principalement focalisées sur les facteurs associés à la différenciation en T_{FH}, mais peu ont étudié des populations de DC en particulier. Chez l'homme, il a été montré que des DC développées à partir de monocytes cultivés avec GM-CSF et IL-4 puis activées par LPS sont capables d'induire la production d'IL-21 dans une petite population de LT CD4 (14.8% ± 1.6%). L'étude des cytokines a révélé que l'IL-12 semble responsable de la production d'IL-21 par les LT par l'activation de la voie STAT4. De plus, les auteurs ont confirmé la capacité de ces LT CD4 à stimuler la production d'IgG et d'IgA [294]. Des études *ex vivo*, à partir d'explants de peau humaine, ont mis en évidence la capacité des DC CD14+ du derme à favoriser le développement des LT CD4+ en T_{FH} en comparaison à la population de LC épidermique associée à la différenciation en phénotype T_{H2}. La co-culture de LB avec des LT CD4+ pré incubés avec les DC CD14+ a permis de générer une forte sécrétion d'anticorps associés à la commutation de classe isotypique IgG et IgA, alors que les LT CD4+ pré-incubés avec les LC n'ont permis de sécréter que peu d'anticorps et sans commutation de classes [132]. A l'inverse, une étude récente a montré que les LC sont capables d'induire la production d'IL-21 par les T_H sans co-production d'IL-17. Bien que la fonctionnalité des LT n'ait pas été testée, il semble que ces LT montrent un phénotype T_{FH}. La même étude démontre que la sur-expression d'ICOSL par les LC réduit la sécrétion d'IL-21 par les LT, alors que ICOSL est décrit comme stimulant la différenciation des T_{FH} [295].

Chez la souris, l'infection cutanée par *C. albicans* induit la sécrétion d'IL-18 et d'IL-6 par les LCs. En comparaison, la population de CD207+ dDC produit moins d'IL-18 et d'IL-6 mais sécrète IL-12. Cependant, l'implication de ces deux types cellulaires dans la différenciation des T_{FH} n'a pas été évaluée [295]. L'expression de IL-12 par la population de DC inflammatoires a également été mise en évidence lors de l'infection par *Listeria* [296]. Une étude *in vivo* chez la souris a quant à elle démontré que la population de CD11b+ du derme ne semble pas être impliquée dans la différenciation des T_{FH}, en revanche l'implication des autres populations n'a pas été étudiée. Extrêmement peu d'études ont étudié les rôles des différentes DC de la peau dans la différenciation des T_{FH} après une immunisation. Botond Igyarto de l'équipe de D.Kaplan a récemment présenté les résultats de son étude lors du congrès Langerhans cells 2013 à Amsterdam dans laquelle il montre la capacité des LC et CD207+ dDCs à différencier les LT CD4+naïfs des ganglions périphériques en T_{FH} lors de l'injection d'un antigène dirigé spécifiquement vers l'une ou l'autre population par un système d'anticorps ciblant. Cependant, il démontre également l'absence d'activation des 2 populations de DC, concluant ainsi sur la capacité des LC et CD207+ dDC d'induire des T_{FH} fonctionnels en condition non

inflammatoire. Dans cette étude, le système est tout à fait particulier et ne correspond pas à une méthode d'immunisation/vaccination conventionnelle [297]. En utilisant un système similaire, permettant de distribuer l'antigène aux cellules dendritiques de la zone marginale spécifiquement, une étude a mis en évidence l'induction d'une réponse humorale extra-folliculaire sans induire la formation de centre germinatif ni de réponse mémoire. Cependant, lorsque des agonistes des TLR-7 et TLR-9 ont été ajoutés, la réponse s'est dirigée vers la formation du centre germinatif [298]. Dans la même direction, une publication montre que l'injection de particules fines recouvertes d'antigènes co-adsorbés avec les ligands des TLR 4 et 7 induisent préférentiellement une formation de centres germinatifs par rapport aux particules recouvertes d'antigènes associés à un ligand unique. En revanche la formation de plasmocytes précoces n'a pas été modifiée [299]. La contribution des TLR est donc évidente dans le développement des plasmocytes. L'utilisation Nod1 et Nod2 associée à des particules fines de PLA a également montré une meilleure capacité à induire une réponse humorale à long terme. Cependant, le développement des plasmocytes n'a pas été étudié dans cette étude [300]. Bien que leurs rôles dans l'induction des T_{FH} ne soient pas clairement établis, il semble que les DC soient fortement impliquées dans la polarisation des LT CD4⁺ naïfs en T_{FH} . Cibler et activer ces populations de DC lors de la vaccination i.d. est donc essentiel pour induire une réponse immunitaire humorale.

Les 3 points essentiels :

- (1) Les T_{FH} sont caractérisés par l'expression de BCL6, CXCR5, PD1, ICOS et la sécrétion de IL-21 ainsi que TGF- β 1.
- (2) Les T_{FH} sont spécialisés dans la formation des centres germinatifs et le développement des LB en plasmocytes à longue durée de vie et des LB mémoires.
- (3) Les cytokines IL-6, IL-12 et IL-21 sécrétées par les DC sont impliquées dans la polarisation des LT CD4⁺ naïf en T_{FH} .

7 Conclusion

Malgré le développement de nos connaissances sur le VIH ainsi que ses mécanismes de transmission, ce virus continue de contaminer des millions de nouveaux individus à travers le monde. Aujourd'hui aucun traitement thérapeutique ne permet d'éliminer le virus après la contamination, principalement à cause de la formation de réservoirs viraux, de son taux de mutation rapide et de l'infection des LT CD4+. L'une des options les plus prometteuses est d'induire d'une immunité ciblée au niveau de la zone de contamination capable de neutraliser le virus avant l'infection des premières cellules. Avec un taux de 70% à 80% de transmission par les voies sexuelles, il semble nécessaire de diriger nos efforts sur le développement d'un vaccin protégeant les muqueuses vaginale et rectale. La sécrétion d'IgA et d'IgG dans la lumière vaginale semble associée à la protection contre le VIH. La vaccination par la peau, associée à de nouveaux vecteurs antigéniques, a démontré sa capacité à induire une réponse IgA dans les muqueuses sexuelles chez la souris. La peau est constituée d'un tissu cutané dans lequel résident de nombreuses sous-populations de DC qui sont capables de capturer l'antigène particulaire et de migrer vers les ganglions lymphatiques drainants pour le présenter aux LT. Or il a été démontré que la nature des DC engagées dans cette relation impacte directement l'amplitude et la qualité de la réponse immunitaire. Les anticorps de forte affinité sont produits par les plasmocytes issus du développement du centre germinatif, puis migrent vers les muqueuses. Cependant, la génération des centres germinatifs nécessite une interaction entre les LB et les T_{FH} dans les ganglions. Cibler et activer les populations de DC favorisant la polarisation des LT CD4+ en T_{FH} permettrait donc de privilégier le développement des plasmocytes de forte affinité et d'augmenter ainsi la réponse humorale au niveau des muqueuses. Cependant, les interactions cellulaires nécessaires entre les DC et les LT CD4+ impliqués dans l'induction des T_{FH} sont très mal caractérisées. Dans sa globalité, cette approche semble être intéressante pour développer une nouvelle stratégie de vaccination permettant d'induire une réponse de type IgA localisée au niveau des muqueuses.

PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE

Notre équipe est principalement impliquée dans la compréhension des méthodes d'immunisation par les voies cutanées dont l'injection i.d et t.c. L'une des dernières études *in vivo* réalisées chez la souris a comparé l'amplitude et la qualité de la réponse immunitaire induite par 3 voies d'immunisation différentes. Dans cette étude, le modèle antigénique utilisé était composé de particules fines de PLA sur lesquelles a été adsorbée la protéine p24 de HIV-1 (PLA-HIV-p24) [10]. La voie t.c. a induit principalement une réponse cellulaire systémique ainsi qu'au niveau de la muqueuse vaginale. Aucune immunité humorale systémique n'a été détectée, en revanche, une importante sécrétion d'IgA a été détectée dans les sécrétions vaginales. À l'opposé, l'immunisation s.c. a favorisé la réponse humorale systémique se traduisant par la présence d'IgG spécifiques sériques. Cependant, cette voie d'immunisation ne stimule pas la production d'anticorps dans les muqueuses, ni la réponse cellulaire CD8+. Seule la vaccination i.d. a été capable de stimuler une réponse cellulaire ainsi qu'humorale sérique et muqueuse. L'analyse de la localisation des LB dans la muqueuse vaginale a permis de montrer leur regroupement dans la *lamina propria* après immunisation par voie i.d. alors que les LB ont été détectés aussi bien dans la *lamina propria* que dans l'épithélium lors de l'immunisation par voie t.c. Cette étude démontre l'importance des populations cellulaires ciblées par la vaccination dans l'orientation de la réponse immunitaire. De plus, elle a permis de confirmer la possibilité de stimuler une réponse muqueuse lors d'une immunisation par la peau. Les corrélats de protection contre le VIH mettent en avant l'importance de la réponse cellulaire. En utilisant le modèle de souris transgénique Langerin-DTR, une étude complémentaire a permis de déterminer partiellement l'origine de la réponse CD8+ observée lors de l'immunisation i.d. et t.c. Ce modèle transgénique permet de dépléter toutes les cellules qui expriment CD207 lors de l'injection de la toxine diphtérique (DT). En utilisant la capacité des CD207+ dDC à repeupler le derme plus rapidement que les LC repeuplent l'épiderme, l'injection de l'antigène à 2 jours (absence des LC et CD207+ DCs) ou 13 jours (absence des LC uniquement) après la déplétion permet d'étudier le rôle des 2 populations cellulaires distinctement. Les résultats de cette étude ont mis en évidence l'implication de la population de LC de l'épiderme dans la réponse CD8+. De plus, cette même étude a démontré clairement la capacité des LC à migrer dans le derme lors d'une immunisation i.d. et de capturer l'antigène, dans un modèle d'immunisation par MVA. En revanche, l'implication des DC dans la réponse humorale ainsi que les mécanismes sous-jacents, n'a encore jamais été évaluée dans le cas d'une immunisation i.d.

L'objectif principal de la thèse était donc **d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires de la vaccination i.d., responsables de l'initiation de la réponse humorale localisée dans la muqueuse vaginale.** Pour cela je propose :

- (1) D'identifier les populations d'APC de la peau capables de prendre en charges et de transporter l'antigène particulaire vers le ganglion drainant.
- (2) De déterminer l'implication des populations des différentes cellules de la peau et du ganglion drainant dans la polarisation des LT CD4⁺ naïfs en T_{FH}.
- (3) D'étudier le développement des plasmocytes et la sécrétion d'anticorps au niveau de la muqueuse vaginale.
- (4) De comprendre l'importance de l'environnement inflammatoire du ganglion et de définir le rôle des cellules inflammatoires dans la régulation de la réponse immunitaire.

Pour conserver le lien avec les études réalisées précédemment dans le laboratoire, j'ai utilisé le même modèle antigénique de particules fines de PLA sur lesquelles sont adsorbées la protéine p24 du VIH-1 (PLA-HIV-p24), injecté par voie i.d. dans le modèle murin. Ces particules permettent de cibler les APC du derme et de l'épiderme. De plus, il est possible de les suivre en utilisant des particules dans lesquelles est encapsulé le fluorochrome coumarin6 ce qui permet d'étudier la distribution des particules. Pour étudier l'initiation de la réponse humorale muqueuse, je me suis principalement intéressé à la population de T_{FH} car ils jouent un rôle central dans le développement des plasmocytes à longue durée de vie. Associés avec l'étude des LB du centre germinatif et les plasmocytes sécrétant des IgA spécifiques de p24, les résultats couvrent l'ensemble des étapes du développement des plasmocytes à longue durée de vie. L'implication des cellules de la peau dans la réponse humorale a été déterminée avec le modèle murin transgénique Langerin-DTR d'une part et un système d'ablation du site d'injection qui permet d'interrompre la migration de toutes les cellules de la peau. Le modèle Langerin-DTR permet quant à lui d'étudier l'implication des LC et des CD207⁺ dDC. Pour connaître quel microenvironnement inflammatoire induit dans le ganglion était favorable à la polarisation des LT CD4⁺ en T_{FH}, j'ai réalisé une étude transcriptomique du ganglion entier d'une part, et j'ai participé au projet de Louis Chonco, post doctorant dans le laboratoire, qui a étudié l'implication des cellules CCR2⁺ dans la polarisation des T_{FH} en utilisant un modèle de VLP injecté par voie i.d. dans un modèle murin transgénique *Ccr2*^{-/-}.

RESULTATS

Résultat 1 : Distribution spatiale et temporelle *in vivo* des particules de PLA injectées par voie i.d.

Résultat 2 : Implication des DC cutanées dans l'induction des T_{FH} et le développement de plasmocytes sécrétant des IgA.

Article #1 : *"Skin migratory cells fine-tune lymph node microenvironment for the generation of T follicular helper cells and mucosal immunity"*.

Résultats supplémentaires : Analyse transcriptomique du micro-environnement inflammatoire ganglionnaire favorisant la polarisation des T_{FH}.

Résultat 3 : Altération de la réponse T_{FH} par les monocytes inflammatoires dans les souris déficientes en CCR2.

Article #2 : *"Lack of CCR2-dependent myeloid cells recruitment dysregulates follicular helper T cells polarization"* (article en cours de préparation).

1 Distribution spatiale et temporelle *in vivo* des particules de PLA injectées par voie i.d.

1.1 Introduction

Les DC représentent une population cellulaire clé dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative grâce à leur capacité à capturer un antigène et le présenter aux LB et LT par le complexe de MHC de classe I et II. De plus, la nature des DC engagées conditionne la qualité de la réponse immunitaire. Cibler les DC lors de la vaccination est donc une stratégie intéressante afin d'orienter la qualité de la réponse immunitaire. La voie d'immunisation i.d. semble donc une alternative intéressante à la vaccination i.m. car elle permet de cibler les nombreuses sous-populations de DC résidentes de l'épiderme et du derme. L'utilisation de nanoparticules et les particules fines est une approche prometteuse pour cibler les DC car leur taille similaire aux agents infectieux est parfaitement adaptée à leur prise en charge par les DC en comparaison à des protéines solubles [159]. Il existe des particules de natures différentes dont les VLP, les particules non biodégradables, mais biocompatibles ou encore les particules de polymères biodégradables. Les particules fines de PLA font partie des particules synthétiques de polymères biocompatibles et biodégradables et possèdent un diamètre de 200 nm. De nombreux travaux ont étudié l'importance de la taille des particules dans la prise en charge par les différentes populations cellulaires. Dans leur globalité, les résultats suggèrent que les particules supérieures à 500 nm sont principalement capturées par les macrophages alors que les particules entre 100 nm et 400 nm de diamètre sont adaptées à la prise en charge par les DC. L'adsorption de protéines sur les particules représente donc un vecteur idéal pour transférer de grandes quantités d'antigènes aux DC. Associée à la voie d'injection i.d., l'utilisation de particules fines représente une solution innovante pour cibler les nombreuses sous-populations de DC résidentes de l'épiderme et du derme dans une approche de vaccination.

Cependant, aucune étude n'a étudié la distribution spatiale et temporelle de particules fines de PLA lors d'une injection i.d. Mon premier travail de thèse fut d'étudier *in vivo*, dans le modèle murin, la prise en charge des particules par les différentes populations cellulaires de la peau et des ganglions drainants. J'ai également étudié l'infiltration des cellules inflammatoires et déterminé leur migration vers les ganglions. Pour cela, j'ai utilisé des particules fines de PLA fluorescentes, produites par l'équipe de B.Verrier (Lyon). Le but de cette étude était de modéliser le flux d'antigène lors d'une injection i.d.

et de mettre en évidence quelles sous-populations de DC sont impliquées dans la capture des PLA.

1.2 Matériel et méthodes

Souris : Les souris C57Bl/6 ont été utilisées entre 6 et 8 semaines, provenant du fournisseur Charles River (L'Arbresle, France) et gardées dans le Centre d'Expérimentation Fonctionnelle (CEF), de la Pitié-Salpêtrière. Lors de l'injection i.d., les animaux ont été anesthésiés dans une chambre étanche par un mélange gazeux d'isofluorane à 3 % (Virbac, Carros, France), puis maintenus par une solution d'isofluorane à 1,5 % sous insufflateur sur une plaque thermo-régulée. L'ablation des oreilles a été réalisée en sectionnant à la base de l'oreille, sous anesthésie par injection couplée à un analgésique (Xylazine 2% / Ketamine 8% / NaCl). Aucun saignement n'a été observé. Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec les réglementations éthiques de bonne conduite sur les animaux. Autorisation d'expérimentation animale #00954.01.

Particules fines : Les nanoparticules utilisées ont été formulées à partir de polymère d'acide lactique (PLA) par l'équipe de Bernard Verrier (IBCP, Lyon) et encapsulées avec le fluorochrome coumarin-6 qui possède une absorption maximum de 444 nm et une émission de 505 nm. Ceci permet sa détection dans le même canal que le FITC ou la GFP. Le procédé de formulation et d'encapsulation est extrêmement stable, permettant de produire des lots de particules similaires dont le diamètre est de 200 nm en moyenne. Les particules de PLA sont conservées à 4 °C pendant une période limitée à 4 mois après leurs formulations.

Immunisation intradermique : L'injection est réalisée dans la face dorsale de l'oreille en utilisant une seringue à insuline (U-100, 29GX1/2" -0,33X12 mm, Terumo, Belgium). Une quantité de 2×10^{12} particules fluorescentes a été injectée par souris, dans un volume de 60 µl de PBS reparti dans les deux oreilles. Pour limiter le volume par injection, 3 injections par oreilles sont réalisées (10ul/injection). Aucun érythème n'est observé après injection. Les souris contrôles ont reçu un volume similaire de PBS.

Préparation des suspensions cellulaires : Aux temps indiqués sur les figures, les animaux ont été sacrifiés, puis les oreilles et les ganglions auriculaires drainants ont été collectés dans une solution de PBS / 2%SVF. Les ganglions ont été incubés 30 min à 37 °C en présence de collagenase IV (Sigma) pour améliorer la séparation des DC de la

matrice extracellulaire. Les ganglions ont ensuite été écrasés sur un tamis cellulaire (cell strainer, BD Falcon), puis ce dernier a été lavé 3 fois avec 1 mL de PBS / 2%SVF. Parallèlement, la face dorsale et la face ventrale des 2 oreilles ont été séparées, coupées en plusieurs morceaux et incubées pendant 2 h 30 à 37 °C avec de la Dispase II (Roche). Les tissus ont ensuite été écrasés sur un tamis cellulaire puis lavés. Après centrifugation, les cellules ont été resuspendues dans 1 mL de PBS / 2%SVF et énumérées.

Cytométrie en flux : Les cellules ont été marquées pour les molécules de surface pendant 20 minutes à 4 °C dans une solution de PBS / 2 % SVF puis lavées par centrifugation. Si l'anticorps primaire est couplé à la streptavidin, les cellules ont été incubées avec la biotine fluorescente adéquate pendant 20 minutes à 4 °C dans une solution de PBS / 2 % SVF puis lavée par centrifugation. Les cellules ont été ensuite fixées durant 10 minutes à 4 °C par une solution de PFA 4 %. Les cellules ont été lavées et conservées à 4 °C. Le marquage CD207 a été réalisé de façon intracellulaire. Pour cela les cellules ont été pré-incubées avec une solution de PBS / 0,1 % saponine après la fixation. Puis elles ont été incubées avec l'anti-CD207 pendant 20 minutes à 4 °C dans une solution de PBS / 0,1 % saponine puis lavées par centrifugation. Les cellules ont été analysées sur un FACS Fortessa (BD Bioscience) ainsi qu'avec le logiciel FlowJo.

Microscopie à fluorescence sur coupe congelée : Les observations histologiques ont été réalisées sur des coupes de ganglions et d'oreilles congelées et marquées pour les marqueurs mentionnés dans les figures. Les organes ont été collectés aux temps indiqués puis directement plongés dans une cire de cryoconservation (O.C.T - Tissue-Tek®, Sakura, Belgium) puis congelés à -80 °C dans un bain d'isopentane. Les organes ont ensuite été sectionnés en coupe de 5 µm d'épaisseur en utilisant un Cryostat Microm HM550 (Thermo Scientific, France) et les lames conservées à -80 °C. Avant le marquage immunohistochimique, les échantillons ont été décongelés à température ambiante, puis fixés 10 minutes par une solution de PFA 4 %. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 30 minutes avec une solution de PBS / 3%BSA. Les coupes ont été marquées par un anticorps primaire dilué à des concentrations optimum dans une solution de PBS / 1%SVF pendant 1 h 30 à température ambiante, lavées 3 fois avec du PBS puis marquées avec un anticorps secondaire fluorescent adéquat pendant 1 heure. Le marquage anti-CD207 a été réalisé de façon intracellulaire dans une solution de PBS / 0,1 % saponine pour l'incubation avec l'anticorps primaire et secondaire. Les fluorochromes couplés aux anticorps secondaires utilisés sont les Alexa350 (bleu),

Alexa488 (vert), Alexa594 (rouge) ou Alexa633 (rouge lointain). Après séchage, les échantillons ont été recouverts d'un milieu de montage avec ou sans DAPI selon les fluorochromes utilisés. Les lames ont été analysées avec les microscopes à fluorescence Olympus BX51 (Rungis, France) et Zeiss Z1 (Carl Zeiss Microscopy, Marly-le-Roi, France) puis les images traitées par le logiciel Zen (Zeiss) et ImageJ.

Microscopie confocale : Après la préparation de la suspension cellulaire, les cellules ont été déposées sur des lamelles recouvertes d'une matrice de polylysine à 10 % et incubées pendant 30 minutes à 37 °C. Les cellules ont ensuite été fixées par un bain de PFA 4 % pendant 10 minutes puis marquées en utilisant le protocole de marquage immunohistochimique. Les lamelles ont été montées sur des lames dans une goutte de milieu de montage avec ou sans DAPI puis observées par un microscope confocal Olympus FV-1000 (Rungis, France). Les images ont été traitées par le logiciel ImageJ et Imaris.

1.3 Résultats

Prise en charge des PLA par les DC résidentes de la peau après injection i.d

Le premier objectif de ce travail était d'identifier quelles sous-populations de DC cutanées sont capables de capturer les particules de PLA lors d'une injection par voie i.d. Des particules de PLA fluorescentes ont été injectées par voie i.d. dans l'oreille de souris permettant ainsi de les détecter par cytométrie en flux et par études histologiques. En nous appuyant sur les données récentes de différenciation des sous-populations de DC cutanées chez la souris, nous avons différencié les cellules de Langerhans (LC) (MHC II⁺ ; CD207^{hi} ; Sirpα⁺), les DC CD207⁺ dermiques (CD207⁺ dDC) (MHC II⁺ ; CD207⁺ ; Sirpα⁺) et les DC qui n'expriment pas CD207 (figure 1.A). Dans la littérature, cette dernière population est généralement divisée en 2 sous-populations : CD11b⁺ DC (MHC II⁺ ; CD207⁻ ; CD11b⁺ ; Sirpα⁺) et CD11b⁻ DC (MHC II⁺ ; CD207⁻ ; CD11b⁻ ; Sirpα^{low}) [140]. Cependant, la population de CD11b⁺ DC peut contenir également des macrophages dermiques (~10 %) qui expriment également MHC II et CD11b [141]. La population de CD11b⁻ DC est quant à elle très mal caractérisée. Par manque d'outils pour dissocier ces différentes populations avec précision, nous avons préféré les analyser en un seul groupe nommé dans cette étude « CD207⁻ DC ». Ces 3 populations ont été analysées par cytométrie en flux entre 1 heure et 48 heures après l'injection des PLA par voie i.d. En étudiant l'intensité de fluorescence correspondant à la coumarine-6, nous avons déterminé que les populations de LC et CD207⁺ dDC présentent une meilleure capacité à capturer les particules que la population hétérogène de CD207⁻ DC (figure 1.B). Nous observons une augmentation de l'intensité de fluorescence maximum à 4 heures après injection pour les 3 populations de DC, indiquant une quantité de particules capturées plus importante. En revanche, ce paramètre diminue à 24 heures, ceci pouvant s'expliquer par la dégradation des particules ou la migration des DCs fortement chargés vers les ganglions drainants. Malgré une proportion plus faible des CD207⁻ DC PLA⁺, cette population représente un nombre important de cellules PLA⁺, car elle est majoritaire dans la peau (~80 %) en comparaison des CD207⁺ dDC (~8 %) et des LC (~7 %). La cinétique du nombre absolu de cellules PLA⁺ montre une prise en charge des PLA par les différentes populations de DC dès 1 heure, suivie par une augmentation importante (figure 1.C). Des coupes histologiques transversales de la peau ont été réalisées, sur lesquelles nous distinguons la structure cellulaire dense de l'épiderme (DAPI en blanc) sur les faces dorsale et ventrale de l'oreille, ainsi que les zones de particules fluorescentes (vert) enclavées dans la matrice extracellulaire du derme (figure

1.D, panel de gauche). On remarque à proximité des ces zones la localisation des cellules exprimant CD207 (rouge) (figure 1.D, panel de droite). Après tri cellulaire des populations de LC (CD207⁺ ; CD103⁻) et CD207⁺ dDC (CD207⁺ ; CD103⁺), la localisation intracellulaire des particules a été confirmée par microscopie confocale (figure 1.E). Ces résultats démontrent que les différentes sous-populations de DC de la peau sont capables de prendre en charge les particules de PLA après injection par voie i.d. Néanmoins, les LCs et CD207⁺ dDC montrent une meilleure capacité de prise en charge en comparaison de la population de CD207⁻ DC. L'analyse globale de l'ensemble des populations cellulaires de la peau montre que les DC, toutes populations confondues, ne représentent que 3 % à 3,5 % des cellules PLA⁺ entre 1 heure et 24 heures après injection et montrent que les cellules inflammatoires semblent plus impliquées dans la prise en charges des particules de PLA (figure 1.F).

Infiltration de cellules inflammatoires au niveau du site d'injection

Les cellules inflammatoires telles que les macrophages, les neutrophiles et les DC inflammatoires sont connus pour capturer de grandes quantités d'antigènes mais également pour les apprêter. Nous avons donc étudié l'infiltration des cellules inflammatoires dans le tissu cutané et étudié leurs capacités à capturer les particules de PLA. Les résultats montrent une infiltration importante et progressive de neutrophiles ($CD11b^+$; $Ly6C^+$; $Ly6G^+$) entre 1 heure (3477 ± 630 cellules) et 16 heures ($18\,141 \pm 4439$ cellules) après l'injection de PLA. L'étude des macrophages ($CD11b^+$; $F4/80^+$; $Ly6C^-$) montre une augmentation importante entre 4 heures (5340 ± 1561 cellules) et 8 heures ($12\,394 \pm 2218$ cellules) suivie par une stabilisation jusqu'à 48 heures ($15\,549 \pm 2066$ cellules). En revanche la population de monocytes inflammatoires ($CD11b^+$; $Ly6C^+$; $CD11c^-$) et de DC inflammatoire ($CD11b^+$; $Ly6C^+$; $CD11c^+$) semble être déjà infiltrée dès 1 heure, et leur nombre ne varie pas au cours du temps (figure 2.A). La localisation des neutrophiles ($Ly6G$) et des macrophages ($F4/80$) a été confirmée par des études histologiques dans la peau (figure 2.B). Les neutrophiles et macrophages semblent jouer un rôle prépondérant dans le contexte inflammatoire local, car ils représentent 52,1 % et 34,9 % des cellules inflammatoires respectivement, alors que les monocytes inflammatoires et les DC inflammatoires ne représentent qu'une proportion minoritaire (figure 2.C, graphique de gauche). L'analyse restreinte aux cellules PLA^+ accentue l'importance des neutrophiles, qui représentent 70,16 % des cellules inflammatoire PLA^+ à 16 heures après l'injection des particules (figure 2.C, graphique de droite). Cette observation s'explique par les capacités de prise en charge de PLA différentes en fonction des populations. En effet, à 16 heures après injection, $96,5\% \pm 1,3$ des neutrophiles présents dans la peau ont capturé des particules (figure 2.D). En comparaison, la proportion de macrophages PLA^+ ne représente que $37,9\% \pm 7,4$. Les monocytes inflammatoires et DC inflammatoires sont également très impliqués dans la capture des particules de PLA avec un taux de $85,9 \pm 4,4$ % et $89,2 \pm 1,7$ % respectivement. Comme précédemment, la localisation intra-cellulaire des particules a été vérifiée par microscopie confocale (figure 2.E). Ces résultats démontrent la capacité des PLA à induire le recrutement de cellules inflammatoires au niveau du site d'injection et leur capacité de prise en charge des particules de PLA.

Migration des DC et des cellules inflammatoires vers le ganglion drainant auriculaire

Pour déterminer quelles sous-populations de la peau peuvent être impliquées dans le processus de présentation antigénique, nous nous sommes intéressés à la migration des différentes sous-populations de DC et de cellules inflammatoires vers les ganglions auriculaires, drainant le site d'injection. Les ganglions présentent des sous-populations de DC qui leur sont spécifiques. Parmi elles, les populations de CD8⁺ DCs (CD11c⁺ ; CD8α⁺) et pDC (CD11c⁺ ; CD11b⁻ ; Ly6C⁺) sont les mieux caractérisées (figure 3.A et 3.C). Nous retrouvons également les sous-populations de DC résidents de la peau LC, CD207⁺ dDC et les populations hétérogènes CD11b⁺ DC et CD11b⁻ DC qui, dans cette étude, sont regroupés dans la même population CD207⁻ DC (figure 3.A). Contrairement à la peau, l'expression de Sirpα ne permet pas de différencier les populations de LC et CD207⁺ dDCs. Nous avons choisi de les différencier par le marqueur CD103, exprimé par les CD207⁺ dDC. Les cellules inflammatoires sont identifiées en utilisant les mêmes marqueurs que pour la peau (figure 3.B). L'étude de la migration des différentes sous-populations montre 3 vagues d'arrivées cellulaires distinctes. L'une, très précoce, correspond à la migration des neutrophiles qui sont détectés majoritairement 4 heures après l'injection. Les macrophages et monocytes inflammatoires augmentent de façon significative à partir de 8 heures et représentent la seconde vague d'arrivée cellulaire (figure 3.D). La dernière vague est formée par les différentes populations de DC qui sont détectées plus tardivement, entre 16 heures (CD207⁻ DC) et 24 heures (LC et CD207⁺ dDC) (figure 3.A). Les DC inflammatoires arrivent dans le ganglion aussi rapidement que les monocytes inflammatoires (8 heures), en revanche leur nombre continue de s'accroître au cours du temps (figure 3.D).

Pour vérifier l'origine cutanée des différentes populations, l'oreille a été sectionnée à 1 heure après l'injection de PLA puis le nombre de cellules a été analysée (figure 3.E et F). L'ablation de l'oreille (EC) a interrompu la migration des macrophages et des monocytes inflammatoires, en revanche cela ne semble avoir aboli complètement la migration des neutrophiles (PBS : 4188 ± 738 ; PLA : $42\,507 \pm 7765$ cellules ; PLA + ablation : $25\,762 \pm 6135$ cellules) (figure 3.E). Ceci pourrait être expliqué par un recrutement des neutrophiles directement depuis la circulation sanguine. L'étude des DC montre que l'ablation ne parvient pas à interrompre complètement la migration des LC et CD207+ dDC (PBS : $35\,694 \pm 7609$; PLA : $65\,147 \pm 13\,731$ cellules ; PLA + ablation : $45\,488 \pm 3268$ cellules) et CD207- DC (PBS : $47\,249 \pm 12\,218$; PLA : $85\,733 \pm 12\,813$ cellules ; PLA + ablation : $64\,025 \pm 3944$ cellules) (figure 3.F). Il est possible que l'augmentation du nombre de DC dans le ganglion drainant résulte de la migration de DC provenant du site injecté, mais également des sites adjacents. La population de DC inflammatoires ne semble pas être affectée par l'ablation de l'oreille (figure 3.F), qui pourrait être également recruté directement du sang. Ces résultats suggèrent que les DC cutanées, les macrophages et les monocytes inflammatoires proviennent majoritairement de la zone d'injection et sont donc capables de transporter l'antigène vers les ganglions drainants. L'origine des neutrophiles et les DC inflammatoires reste cependant à confirmer.

Diffusion passive et rapide des particules de PLA vers le ganglion drainant

Lors des analyses, nous avons observé la présence d'une quantité importante de particules dans le ganglion dès 1 heure après l'injection. L'analyse globale montre un phénomène de capture très important des PLA par les cellules du ganglion drainant auriculaire dès 1 heure après injection ($3.049 \cdot 10^6 \pm 0.29 \cdot 10^6$ cellules). Le nombre de cellules augmente légèrement jusqu'à 4 heures ($3.878 \cdot 10^6 \pm 0.49 \cdot 10^6$ cellules) puis diminue progressivement jusqu'à 48 h ($0.313 \cdot 10^6 \pm 0.027 \cdot 10^6$ cellules) (figure 4.A). Ayant déterminé précédemment que l'arrivée cellulaire survient à partir de 4 heures après l'injection (neutrophiles), il semble que ce flux important de PLA soit dû à une diffusion passive (non associée aux cellules). Pour vérifier cette hypothèse, l'oreille a été sectionnée 1 heure après l'injection i.d. puis les ganglions drainants ont été analysés 4 heures et 24 heures après injection. Les résultats histologiques semblent montrer que la quantité PLA n'est pas modifiée par l'ablation de l'oreille et que la localisation dans le ganglion est similaire (figure 4.B). Ces observations ont été vérifiées par une quantification du nombre de cellules PLA⁺ en cytométrie en flux (figure 4.C). L'analyse de la proportion de cellules PLA⁺ pour chaque population du ganglion 24 heures après injection en condition d'ablation du site d'injection à 1 heure montre que les populations de DC et de cellules inflammatoires prennent en charge les PLA, avec des capacités variables (figure 4.D). Ces résultats montrent que la fraction de PLA transportés par la migration cellulaire est négligeable par rapport à la diffusion libre. De plus, les DC présentes dans le ganglion lors de l'injection sont capables de capturer ces PLA. Il est donc nécessaire de déterminer si les cellules du ganglion sont suffisantes pour initier la réponse immunitaire.

Distribution spatiale et temporelle des particules de PLA dans le ganglion drainant

Pour finir, nous avons étudié la distribution des particules dans le ganglion à 24 heures après injection pour déterminer quelles populations sont impliquées dans la prise en charge des PLA à des temps tardifs. Ces observations ont été réalisées sans ablation de l'oreille et autorise donc la migration des DC et cellules inflammatoires vers les ganglions. Cependant, nous venons de démontrer que la majorité des PLA diffusent de façon passive. Il est donc ici impossible d'identifier les cellules qui ont capturé les PLA dans l'oreille avant de migrer vers les ganglions de celles présentes dans le ganglion lors de l'injection et qui ont capturé les PLA ayant diffusé librement. Cette analyse traduit néanmoins la distribution globale des PLA en condition normale d'immunisation. L'analyse des sous-populations PLA⁺ montre que la grande majorité des PLA ont été capturées par les LB (48,1 %) et par les LT (29,8 %) (figure 5.A). Les populations de cellules inflammatoires et DC représentent 12,1 % et 9,84 % respectivement. Parmi la population de DC, on remarque que les 3 sous-populations résidentes de la peau ne représentent que 40,3 % des DC PLA⁺, alors que la population de DC inflammatoires est majoritaire et représente à elle seule 52,6 %. Les pDCs et CD8⁺ DCs résidentes du ganglion sont en revanche minoritaires. Parmi la population de cellules inflammatoires, les macrophages sont fortement impliqués dans la capture des PLA (63,1 %). Ce résultat s'explique par la localisation des macrophages sous capsulaire du ganglion qui représentent la première cible des PLA libres qui diffusent par le réseau lymphatique (figure 5.B). Les populations de neutrophiles et de monocytes inflammatoires sont largement représentées avec 22,1 % et 14,8 % respectivement (figure 5.A). La localisation intracellulaire des PLA a été vérifiée par microscopie confocale pour les populations de DCs (CD11c⁺), neutrophiles (Ly6G⁺), macrophages (F4/80⁺) (figure 5.C). Cependant, il est intéressant d'observer que la localisation est située à la membrane cellulaire pour la population des LB (B220⁺). L'étude de l'intensité de fluorescence des différentes populations du ganglion drainant confirme la capacité des neutrophiles et DCs inflammatoires à capturer de grande quantité de PLA. Les macrophages et les monocytes inflammatoires capturent une grande quantité dans les temps précoces (4 heures), qui diminue à 24 heures après injection (figure 5.D). L'étude des différentes populations de DCs montre que les LC, CD207⁺ dDCs et les CD8⁺ résidentes du ganglion ont capturé une quantité similaire de PLA à 4 heures, à l'opposé des CD207⁻ DC qui semblent avoir pris en charge plus de PLA (figure 5.E). En revanche, la quantité de particules capturé est très faible à 24 heures pour toutes les populations. Ces résultats suggèrent que les DC dégradent rapidement les particules. Ensemble, ces

résultats démontrent que l'antigène est pris en charge par les nombreuses sous-populations du ganglion, en quantité variable. Les cellules inflammatoires semblent être fortement impliquées dans la capture des particules, à l'opposé des DC cutanées qui ne représentent qu'une faible fraction de cellules PLA⁺.

1.4 Discussions et perspectives

L'étude de la distribution spatiale et temporelle d'un vaccin représente une première approche dans la compréhension des mécanismes précoces de la réponse immunitaire. L'interprétation de ces résultats permet de mieux concevoir les flux d'antigènes qui permettent d'initier la réponse immunitaire. L'un des résultats les plus surprenants est la diffusion passive (non associée aux cellules) de la majorité des particules de PLA. Il semble que la diffusion des antigènes injectés par voie i.d. vers le ganglion drainant est la conséquence de la pression induite par le volume injecté. Ce phénomène a déjà été décrit, cependant les mécanismes n'ont pas été clairement identifiés et la distribution de l'antigène dans le ganglion n'a pas été étudiée [179]. Dans notre modèle, la quantité de PLA transportée par les cellules semble négligeable en comparaison à la quantité qui diffuse passivement. Nous montrons que les DC résidentes des ganglions et celles résidentes de la peau ayant migré dans le ganglion avant l'injection ont accès aux PLA. Il serait intéressant de savoir si ces populations cellulaires sont activées par les PLA qui diffusent passivement et si elles sont capables de présenter l'antigène aux LT pour initier l'induction de T_{FH} . Les résultats des analyses histologiques dans le ganglion drainant montrent que les PLA sont capables de franchir la barrière des macrophages sous-capsulaire pour diffuser vers l'intérieur des follicules B. Ce phénomène est primordial car les LB doivent être activés par l'antigène libre ou par des DC résidents présentant l'antigène non dégradé [159], avant d'interagir avec les T_H . Leur migration rapide et le faible diamètre des particules de PLA semblent représenter un atout pour l'activation des LB. Cependant, il serait nécessaire de vérifier si la diffusion passive de PLA est obligatoire pour activer les LB dans le modèle de vaccination intradermique.

Nous démontrons dans cette étude la capacité des différentes sous-populations de DC de la peau à capturer les particules fines de 200 nm lors d'une immunisation i.d., mais nous soulignons également des différences entre les sous-populations. Les LC et les CD207+ DC présentent une meilleure capacité à capturer les PLA. Il serait intéressant d'étudier *ex vivo* par quels mécanismes (p.ex. endocytose, phagocytose, pinocytose) les différentes sous-populations internalisent les particules de PLA dans le but de comprendre pourquoi certaines populations sont plus aptes à prendre en charge les particules de PLA. Cependant, il faut analyser les résultats de fluorescence avec parcimonie car ils ne prennent pas en compte la dégradation des PLA ainsi que l'extinction du fluorochrome. Bien qu'actuellement aucune étude n'ait étudié ce phénomène, il est envisageable que la population de CD11b+ DC dégrade plus rapidement les particules de PLA en

comparaison des LC et CD207+ dDC. Il faudrait étudier plus précisément ce paramètre de dégradation pour créer un modèle plus précis de la prise en charge des PLA.

L'inflammation créée localement permet l'infiltration de nombreuses cellules inflammatoires dans la peau, également capables de capturer les PLA, puis de migrer vers le ganglion drainant, en contribuant largement au transport de PLA depuis le derme vers les ganglions drainants. Cette inflammation locale est probablement importante dans les mécanismes d'activation des DC et l'initiation de leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires. Il serait intéressant de confirmer si l'inflammation cutanée est nécessaire pour induire une réponse immunitaire et connaître les sous-populations cellulaires les plus impliquées pour induire l'inflammation. Nous avons clairement démontré une cinétique d'arrivée dans les ganglions drainants différente entre les DC et les cellules inflammatoires. En revanche, l'origine des différentes sous-populations n'est pas encore claire, en particulier pour la population de neutrophiles. Les neutrophiles sont produits dans la moelle osseuse, circulent dans le sang, et sont rapidement recrutés dans des sites d'infection, en réponse à une variété de molécules chimio-attractantes produites par le tissu inflammé [301]. De nombreuses études ont montré que les neutrophiles migrent vers les ganglions lymphatiques depuis ces tissus [169, 302]. Dans notre modèle, il est envisageable que les neutrophiles s'infiltrent également dans le ganglion directement depuis la circulation sanguine. Des études supplémentaires sont nécessaires pour le déterminer.

Ce travail a permis de mettre en évidence le flux d'antigène particulaire dans un contexte d'immunisation par la peau. Cependant, nous aurions voulu aller plus loin en réalisant une modélisation mathématique de diffusion de l'antigène en prenant en compte les nombreux paramètres (p. ex. volume d'injection, tailles des particules, activation cellulaire, capacité à capturer les particules, adjuvants...) pour créer un modèle qui permette de définir les différentes étapes de la distribution de l'antigène particulaire. Les modélisations mathématiques ont été largement utilisées en immunologie pour décrire la cinétique de la présentation d'antigène par les LT CD4 [303], différencier 3 modèles théoriques de l'expansion clonale des LB [304] ou encore étudier la capture des antigènes et leur expression par les molécules de CMH. La modélisation mathématique permet de créer un standard et ainsi de comparer les modèles entre eux. Il aurait été intéressant d'utiliser la modélisation pour démontrer l'implication de la voie d'injection, de l'antigène utilisé, de la taille des particules ou encore des molécules d'activation. Cependant, un tel projet aurait demandé de

nombreuses analyses supplémentaires telles que le discernement des nombreuses sous-populations de DCs qui composent la population de "CD11b⁺ DC" et "CD11b⁻ DC" et également des traitements statistiques, mathématiques et bio-informatiques complexes. Nous avons donc choisi de nous restreindre à une étude descriptive globale en nous focalisant principalement sur les LC et CD207⁺ dDC qui sont les populations les mieux caractérisées.

Ces résultats constituent une première approche de l'initiation de la réponse immunitaire, sans pour autant confirmer quelles populations cellulaires permettent de présenter l'antigène aux LT. En revanche, ils démontrent que les DC résidentes du ganglion ont un accès précoce aux particules de PLA qui diffusent passivement après l'injection i.d. De plus, les populations de LC et CD207⁺ dDC semblent fortement impliquées dans la capture des PLA dans la peau. Il est maintenant nécessaire d'étudier quelles populations sont impliquées dans l'activation des LT CD4⁺ et la génération des T_{FH}. Ces résultats étant principalement descriptifs, ils ne feront pas l'objet d'une publication à part entière. En revanche, certaines données ont été intégrées dans l'article principal.

2 Implication des DC cutanées dans l'induction des T_{FH} et le développement de plasmocytes sécrétant des IgA

2.1 Introduction à l'article

Les DC sont des éléments essentiels dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative en présentant les antigènes exogènes aux LT $CD4^+$ et $CD8^+$. En fonction de leur nature ainsi que des signaux perçus lors de leur activation, les DC vont sécréter des cytokines spécifiques qui orienteront les LT $CD4^+$ vers un profil de différenciation particulier. Le tissu cutané contient de nombreuses sous-populations de DC qu'il est possible de cibler en réalisant une injection i.d. [12, 140]. De plus, de nouveaux vecteurs d'antigènes particuliers synthétiques permettent de mieux transporter l'antigène vaccinal car ils possèdent une taille adaptée à la prise en charge par les DC, en comparaison à un antigène soluble. La vaccination i.d. associée aux nouveaux systèmes particuliers tels que les particules de PLA représente aujourd'hui une approche prometteuse pour améliorer et orienter la réponse immunitaire induite par la vaccination. Des études précédant ce projet et réalisées dans le laboratoire ont mis en évidence que l'immunisation i.d. par des particules synthétiques de PLA adsorbées avec la protéine p24 du VIH induit la génération d'une réponse T $CD8^+$ systémique et muqueuse ainsi que la sécrétion d'IgA dans la muqueuse vaginale [10]. La réponse cellulaire a été en partie attribuée à la population de LC [122]. En revanche, aucune étude n'a porté sur la réponse IgA muqueuse. En utilisant la capacité d'immunisation cutanée à induire une réponse effectrice muqueuse, nous souhaitons comprendre quels sont les mécanismes précoces à l'origine de la réponse humorale localisée dans les muqueuses. Pour cela, nous nous sommes intéressé principalement à la population de T_{FH} qui stimulent et contrôlent le développement des plasmocytes à longue durée de vie et les LB mémoires [73].

Le but de ce travail est d'identifier les DC impliquées dans la polarisation précoce des LT $CD4^+$ naïfs en T_{FH} lors d'une immunisation i.d. avec un antigène particulier. Nous avons étudié l'implication des différentes sous-populations de DC résidentes de la peau, mais également celles du ganglion drainant. Grâce à une collaboration avec l'équipe de B.Verrier, nous avons utilisé leur système de particules fines de PLA biodégradables sur lesquelles est adsorbée la protéine p24 du VIH-1 [153]. Comme l'ont montré les résultats de biodistribution précédents, ces particules possèdent une taille adaptée à la prise en charge par les DC et permettent ainsi de mieux les cibler. Nous avons fait le choix

d'utiliser un modèle *in vivo* qui permet d'étudier l'implication des DC en prenant en compte la complexité du système immunitaire et les possibles interactions que peuvent induire les cellules inflammatoires.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus est décrit dans l'article #1, qui va être soumis à « Journal of Immunology ».

2.2 Article

Skin migratory cells are essential for the generation of T follicular helper cells and mucosal immunity

Charles Nuttens^{1,2}, Clément Levin^{1,2}, Olivia Bonduelle^{1,2}, Helene Perrin^{1,2}, Louis Chonco^{1,2}, Nicolas Fazilleau⁴, Bernard Verrier³ and Béhazine Combadiere^{1,2}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 6, Unité Mixte de Recherche de Santé (UMR S) CR7, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses – Paris (Cimi-Paris), F-75013, Paris, France

² Institut National de Santé et de Recherche Médicale (INSERM) U1135, Cimi-Paris, F-75013, Paris, France

³ Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Claude Bernard de Lyon, 69367 Lyon Cedex 07, France

⁴ Centre de physiopathologie de Toulouse-Purpan, UMR 1043, CHU Purpan, 31024 Toulouse Cedex 3, France

Address correspondence to Dr. Behazine Combadiere: Center for Immunology and Microbial Infection-Paris (CIMI-Paris), UMR 1135, 91 boulevard de l'hôpital, 6th floor, room 605, 75013 Paris, France

ph: +33140779888

email: behazine.combadiere@upmc.fr

Running title: Skin migratory DC in TFH induction

Acknowledgments

This work was supported by the European commission-FP 7 health program of CUT'HIVAC "Cutaneous and Mucosal HIV Vaccination" (Grant # 241907) and Fondation pour la Recherche Medicale (FRM). C. Nuttens received a fellowship from Sidaction. We thank the Imaging Facility of the Pitié-Salpêtrière Hospital, Centre d'Experimentation Fonctionnelle (CEF animal facility). We also thank Dr Alexandre Boissonnas and Arnaud Moris helpful advice, Mrs Jo Ann Cahn for English editing, Dr Bernard Malissen for langerin-DTR mice.

The authors have no financial conflicts of interest.

Abstract

Skin contains numerous dendritic cells specialized in the capture and presentation of antigens. Intradermal (i.d.) injection of poly-lactic-acid fine particles coated with the HIV1-p24 protein (PLA-HIV-p24) have demonstrated good efficacy in initiating humoral and mucosal immune responses in mouse. As follicular helper T cells (T_{FH}) play a pivotal role in B cell help and isotypic switch of immunoglobulin (Ig), we thus questioned the role of skin antigen-presenting cells in the induction of T_{FH} for shaping IgG and IgA-secreting B cells. Fluorescent-particle tracking showed the high ability of Langerhans cells (LCs) and CD207⁺ dermal DCs to capture antigen in the skin and migrate to the draining lymph nodes (dLN). Using ear ablation model rapidly post immunization, we demonstrated that T_{FH} polarization and p24-specific IgD or IgA-secreting B cells expansion were fully aborted in absence of skin migratory cells. By investigating the different skin resident DC populations, we found that LCs were essential for IgA-secreting B cells expansion into dLNs. T_{FH} abortion driven also the abortion of mucosal immune responses. Our work highlights the importance of skin epidermal DCs in eliciting a strong T_{FH} and B cell responses. It provides insight in i.d. skin vaccination mechanisms to improve the expansion of the T_{FH} population for vaccine efficacy.

Introduction

T follicular helper (T_{FH}) cells constitute a specialized subset of CD4⁺ helper T cells that control, within secondary lymphoid organs, multiple steps of B cell maturation. Their role is crucial for establishment of germinal center (GC) reactions, including generation of class-switched long-lived plasma cells and memory B cells (Crotty, 2011; Tarlinton and Good-Jacobson, 2013). Key features of T_{FH} cells include expression of CXCR5, co-stimulatory molecules ICOS (Choi et al., 2011) and PD-1 (Good-Jacobson et al., 2010), Bcl-6 transcription factor, and signature cytokines interleukin (IL)-4, IL-10, IL-21 and TGF β 1 (Bryant et al., 2007; Dullaers et al., 2009; Reinhardt et al., 2009)[248], which are required for migration to B follicle, B cell differentiation, survival, and mucosal homing receptor expression (Crotty, 2011; Dullaers et al., 2009). The cellular and molecular mechanisms that regulate T_{FH} polarization for B cell responses are still unclear.

Mucosal immunity is required for protection against mucosa invading pathogens such as HIV. Indeed, HIV-1 infection is associated with impaired antibody responses and altered B cell differentiation. Broadly neutralizing antibodies (nAb) have been recently identified in numerous HIV infected individuals. These nAb present a large number of somatic hypermutations a hallmark of B cell maturation, suggesting a crucial role of T_{FH} in the generation and evolution of these potent nAb. Yet, T_{FH} isolated from lymph nodes (LN) of HIV-infected individuals provide inadequate B cell help in vitro. However, mechanism to induce T_{FH} generation for mucosal immunity is still unknown. In that regard, we urgently need to find strategies for proper induction of T_{FH} . The question of quality of antigen presenting cells (APC) for T_{FH} generation remains to be answered.

Recent advances have revealed that dendritic cells (DCs) are necessary and sufficient to initiate T_{FH} cell development, though final differentiation requires cognate interaction with antigen-experienced B cells (Deenick et al., 2010; Goenka et al., 2011; Nurieva et al., 2008). DC-derived cytokines IL-6, IL-12, and IL-21 have been shown to induce T_{FH} transcriptional development, while IL-2 repressed it (Ballesteros-Tato et al., 2012; Eto et al., 2011; Schmitt et al., 2009). Cucak et al. demonstrated that

CD11c⁺ conventional DCs (cDCs) secreted IL-6 upon stimulation with type I interferon, which stimulated generation of LN-resident T_{FH} cells (Cucak et al., 2009).

As T_{FH} cells are pivotal in initiating humoral immune responses, and given the fact that they were shown to induce mucosal homing receptor expression on B cells (Dullaers et al., 2009), we further investigated the implication of skin DCs in T_{FH} cell polarization and GC formation after i.d. vaccination. Targeting of LCs and other skin-associated DCs such as CD207⁺ dermal DCs (dDCs) is the main focus of intradermal (i.d.) vaccination (Combadiere and Liard, 2011). Our team has previously shown that i.d. immunization with HIV-1 p24 antigen-coated poly-lactic acid fine particles (PLA-HIV-p24) induced both cellular and humoral immune responses in mice serum and vaginal mucosa (Liard et al., 2011). We also found that i.d. immunization induced LCs activation for the induction of cellular CD8 immune responses (Liard et al., 2012) however their role in the induction of B cell responses needs to be investigated. In this work, we further found that skin migratory cells and LCs particularly were involved in T_{FH} cell polarization as either abrogation of skin migratory cells or depletion of Langerin⁺ cells led to reduced number of T_{FH} cells and p24-specific IgA secreting B cells in skin draining LN (dLNs) after i.d. vaccination.

Results

Antigen uptake by skin antigen-presenting cells and migration to the draining lymph node.

In order to question the pertinence of i.d. immunization and the involvement of APC in the generation of T_{FH} for mucosal immunity, we studied the antigen uptake by skin APC and migration to the draining lymph node after ears i.d. injection of poly-lactic-acid fine particles encapsulated with the coumarin-6 fluorochrome (PLA-C6) (figure 1A). The injection targeted the low cell density dermis tissue underlying the epidermis. The murine skin is composed of at least four resident DC populations (MHC-Class II), of which LCs and CD207⁺ dDCs both express langerin (CD207) but can be distinguished by the expression of Sirp α (Henri and Poulin, 2010) (figure 1B left panel). As the other two populations (CD11b⁺ DCs and CD11b⁻ DCs) are less characterized and seem to refer to heterogeneous populations of monocytes, macrophages, and DCs (Tamoutounour et al., 2013). To compare the ability of each skin DC population to capture PLA-C6, we analyzed coumarin6-positive DCs at different time points after i.d. injection (figure 1B right panels). All populations were able to rapidly uptake particles. Similar kinetics of antigen capture were observed in figure 1B. The intensity of PLA-C6 was similar in LCs and CD207⁺ dDCs at 1 hour to 24 hours after i.d. injection, which were higher than those found in CD207⁻ DCs (figure 1C). Finally, confocal microscopy confirmed the intracellular localization of PLA-C6 in CD207⁺ cells at 4 and 24 hours post-injection (figure 1D). These results highlight the ability of skin DC, including LCs, to efficiently capture PLA fine particles *in vivo*.

The migration of skin DCs to the auricular dLN has been monitored after i.d. injection of PLA-C6. LCs and CD207⁺ dermal DCs are discriminated from the population of CD207⁻ mix DCs by the expression of CD207⁺ marker in the lymph nodes. The population of CD207⁺ dDCs was distinguished from LC by the expression of CD103⁺, as the level of expression of Sirp α marker is the same for both populations (figure 2A). Skin DCs according to previous phenotypes increased between 1h and 24 hours after immunization. At 24 hours after injection, LCs population represents a minor portion with 7.3% $\pm$ 0.7 of skin resident DC in comparison to 40.9% $\pm$ 5.2 for CD207⁺ dermal DCs and 51.6% $\pm$ 6.2 for CD207⁻ DC (figure 2B). The intensity of fluorescence seems to be higher for LCs than CD207⁺ dermal DCs. The proportion of PLA-C6⁺ LC represents 9.6% $\pm$ 1.3 of PLA⁺ skin resident DC in the dLN in comparison to 22.9% $\pm$ 5.4 for CD207⁺ dermal DCs and 51.6% $\pm$ 6.2 for CD207⁻ DC (Figure 2C). The intracellular localization of PLA-C6 was confirmed by confocal microscopy for CD207⁺ DCs at 4 and 24 hours (Figure 2D). Altogether, these results demonstrate that skin DCs, and especially langerin⁺ DCs, are able to capture *in vivo* PLA fine particles directly in the skin and migrate to dLN.

Involvement of LCs in T_{FH} polarization and generation of antibody secreting B cells.

To investigate the role of LCs and CD207⁺ dermal DC in the generation of T_{FH} cells and GC B cells following i.d immunization we used PLA fine particles adsorbed with the HIV1-p24 protein (PLA-HIV1-p24) and langerin–diphtheria toxin receptor (DTR) transgenic mice. In this model, a single administration of diphtheria toxin (DT) depletes langerin⁺ DCs, including LCs and CD207⁺ dDCs (Kissenpfennig et al., 2005). However, LCs remain depleted for more than 3 weeks in these mice, whereas CD207⁺ dDCs recover in 5 to 7 days (Ginhoux et al., 2007). Mice received DT either 13 days (DT¹) or 2 days (DT²), prior to i.d immunization, thus lacking LCs or both LCs and CD207⁺ dDCs, respectively (figure 3A). DT injection efficiently depleted langerin⁺ cells and had no impact on langerin⁻ cells, as shown by flow cytometry analysis (figure 3B). Analysis of ear dLNs at 7 days post-injection revealed a severe reduction (39.7%±9.1) of total T_{FH} cells numbers in mice lacking LCs only (DT¹) as compared to positive control, and in similar proportions as in mice lacking both LCs and CD207 dDCs (DT²), suggesting that a major impact of LCs on T_{FH} cell development (Figure 3C). As shown by others, T_{FH} cells were gated on their expression of CXCR5 and PD-1 among the activated CD4⁺ T cells population (CD3⁺, CD4⁺, B220⁻, CD44⁺ CD62L⁻) (Figure S1A). We found that i.d immunization with PLA-HIV-p24 induced T_{FH} cell responses that peaked at day 7-post immunization (figure S1B). In addition, expression of TGF-beta confirmed T_{FH} cells lineage effector function (figure S1C). To ensure antigen specificity, control antigen free PLA-particles were injected and analysis of dLNs showed lack of T_{FH} cell polarization (figure S1D). We also demonstrated that the generation of T_{FH} cells after i.d. immunization was restricted to the auricular dLNs and not other non-draining lymph nodes suggesting a potential role of skin cell migration through lymphatic vessels in the T_{FH} responses (figure S1E).

Antibody secreting cells can be either generated by extra-follicular development, which occurs outside the B follicle, and by follicular development, which take place in germinal centers and involves T_{FH} cells (Tarlinton and Good-Jacobson, 2013). In line with these data, dLN GC area at 7 days post immunization was reduced in absence of LCs and CD207⁺ dDC (DT²) (Figure 3D). Moreover, GC B (B220⁺, GL7⁺, FAS⁺) cells were reduced by ~45% in both DT treatments, while p24-specific IgG

and IgA secreting cells were reduced by ~56% and ~71% respectively (figure 3E and 3F). The GC B cells population did not express IgD, as compared to the non-GC population, which mainly comprised IgD⁺ B cells (figure S2A). Similarly to T_{FH} cells, GC B cells peaked at 7 days post-injection (figure S2B). Therefore, LCs are involved in T_{FH}-associated germinal center responses following i.d. immunization as the absolute number of p24-specific IgG and IgA secreting B cells was correlated to T_{FH} cell numbers, suggesting a T_{FH}-dependent germinal center formation (figure S2C and S2D). However the disruption of T_{FH} polarization was not complete in absence of LC, which suggests the involvement of skin migratory cell population.

Skin migratory cells are required to elicit dLN germinal center reaction and T_{FH} cell polarization after i.d. immunization with PLA-HIV-p24 particles

Removal of the ear is a radical method to abort cell migration from skin to the dLNs after i.d. immunization. We used this method to question the role of skin migratory cells in the induction of T_{FH} cells and GC B cells. PLA-HIV-p24 or control PBS was injected by i.d. route in both ears, which were removed at 1 hour post-injection (figure 4A). I.d. injection allowed free draining PLA-C6 to reach the auricular DLN within the first hours and flood the subcapsular and cortical sinuses in control mice as well as in ear cut (EC) mice (figure 4B). Quantitative analyses by flow cytometry of PLA-C6⁺ cells in the dLNs revealed similar numbers of PLA-C6-bearing cell in control and EC mice at 4 hours (figure 4C). We hypothesized the dLN resident APC would induce T_{FH} polarization for the generation of antibody secreting cells. We therefore investigated the ability of PLA-HIV-p24 to generate T_{FH} cells in the dLNs after i.d. immunization in condition of ear ablation (EC). We observed an important decrease (86.4%±2.6) of T_{FH} polarization in this condition compared to control mice without ear ablation (Figure 4D). As consequence of T_{FH} polarization impairment, the ability of PLA-HIV-p24 to generate GC B cells was also affected (figure 4E). Finally, we showed that EC mice loss completely p24-specific IgG and IgA secreting cells (figure 4F). We confirmed the absence of T_{FH}, GC B cells and antibody secreting cells at 14 days after i.d. immunization (Figure S3A - D).

In order to investigate the induction of IgG-secreting cells at mucosal site, kinetics of p24-specific IgG antibody titer in vaginal lavage compared to serum were measured. We showed that in absence of skin migratory cells (ear ablation condition) p24-specific antibody responses in both serum and vaginal secretion were aborted (figure 5A and 5B). P24-specific secretory IgA were lowly detectable in the vaginal lavage due to the sensitivity of the assay (data not shown).

Discussion

Using PLA particles, we previously demonstrated that dermal and epidermal delivery of PLA-HIV-p24 induced mucosal immune responses. Here, we showed that the migration of skin cells from site of injection to dLN is required to elicit T_{FH} cell responses and GC formation for the induction of systemic and mucosal IgG. We highlight the ability of LC population to initiate the T_{FH} polarization associated with B cell responses for systemic and mucosal humoral responses after i.d. immunization. Because of the skin DC turn-over, LCs migrate continuously in the dLN. In ear cut conditions, dLN DC populations were able to uptake free drained PLA particles (data not shown). However, in absence of skin migratory cells, free antigen associated with LN resident DC was not able to initiate the T_{FH} polarization (ear cut condition). We have also investigated the activation profile of CD207⁺ DC and CD207⁻ DC in dLN in EC condition (Figure S4A). We found that the absence of up-regulation of activation markers such as CD86 and MHCII expression on PLA-C6-HIV-p24⁺ CD207⁺ DC in EC mice. However, LC migratory cells express activation markers CD86 and MHCII after migration to the dLN. In conclusion, even if major antigen diffusion is observed from the skin site of immunization to the subcapsular sinus of the dLN, in absence of skin migratory cells, the generation of T_{FH} remains difficult to obtain. We propose that by removing the ear of the mice, we abort skin cell migration from skin to the LN and thus we modified the inflammatory environment that could be important in the generation of T_{FH} cells and GC B cells. The skin migratory cells that contribute to the LN modification of micro-environment include LCs and other DC population since the ablation of LCs did partially abort the T_{FH} generation. This result excludes any participation of LN-resident DC such as CD8⁺ DC and pDC (Kastenmuller et al., 2012). In addition, our results did not show different in T_{FH} polarization and antibody-secreting cell generation for LCs depletion condition (DT 13 days prior immunization) compared to both LCs and CD207⁺ dermal DC depletion (DT 2 days prior immunization), which indicated CD207⁺ are not involved. Recently, Kumamoto et al. have shown the marker CD301b is expressed on 88% of mice skin DCs, which do not express CD207. In a model of OVA s.c.-injected with CpG, the authors conclude the CD301b⁺ DC population is implicated in T_{HI} polarization but not T_{FH} (Kumamoto et al., 2013). It could be interesting to use the CD301b-DTR

model to verify these results with our antigen model injected by i.d. route. In another study, conditional depletion of plasmacytoid DCs (pDCs) led to reduced virus-specific antibody titers after influenza infection, indicating that pDCs might be implicated in T_{FH} cell polarization (GeurtsvanKessel et al., 2008). Identification and targeting of DC populations involved in T_{FH} cells development would be of particular interest to design better vaccines against pathogens for which humoral immunity is required at mucosal site.

Together, those findings highlight the importance of skin migratory cells in the generation of T_{FH} and GC B cells formation. This work further provides a better understanding of the cellular mechanisms involved in the i.d. immunization to propose new vaccine strategies to control the immune response.

Materials and methods.

Mice. Female C57Bl/6 mice (6–8 week old) were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Langerin–DTR black/6 mice from the Transgenesis, Archiving and Animal Models (CNRS laboratory, France) were bred in the specific pathogen free animal facility (Nouvelle Animalerie Commune, Pitié-Salpêtrière, France). All animals were housed at the specific pathogen free animal facility (Centre d'Experimentation Fonctionnelle (CEF), Pitié-Salpêtrière, Paris). Mice were anesthetized prior to immunization with 3% isoflurane gas (Virbac, Carros, France) and maintained under 1.5% isoflurane. For ear ablation, mice were anesthetized with a mix solution of Xylazine 2% (Bayer AG, Leverkusen, Germany) and Ketamine 8% (Imalgen 1000, Merial, Lyon, France) in NaCl according to individual animal weight and duration of sedation. Langerin–DTR mice received 1mg of diphtheria toxin (Sigma-Aldrich) intraperitoneally 2 or 13 days before i.d. vaccination for langerin-expressing cells depletion. All animals were handled in strict accordance with good animal practice and complied with local animal experimentation and ethics committee guidelines.

Fluorescent nanoparticles/HIV-1 p24 nanoparticles (PLA)/protein. Poly-d l-lactic acid (PLA) fine particles of 200 nm were prepared by solvent diffusion as previously described (ref). Briefly, the polymer PLA50 (Mn = 50,000 g/mol, Phusis, St Ismier, France) was dissolved in acetone at a concentration of 2% (w/v). This organic solution was added drop wise into an aqueous solution, wherein the PLA precipitated to form particles. Solvents were then removed under reduced pressure at room temperature. The size and the Zeta potential of particles produced were measured at 25° C by Quasi-Elastic Light Scattering (QLS) using a ZetaSizer 3000 HS (Malvern Instruments, UK) after dilution of samples in 1 mM NaCl solution. The data were treated by the cumulant method, indicating a poly dispersity index lower than 0.1.

Protein antigens were passively adsorbed onto PLA particles. In the following experiments, a recombinant HIV-1 p24 protein (endotoxin level below 10 EU/mg) produced in *E. coli* by PX Therapeutics (Grenoble, France) was diluted in PBS at a concentration of 0.2 g/l. PLA nanoparticles diluted in water at a concentration of 0.5% (w/w) were added to the protein solution and the mix was

incubated 2h at room temperature (RT) under gentle agitation. After this incubation time, formulations were centrifuged RT; during 10 min at $1000 \times g$. Non-adsorbed protein collected in the supernatant was quantified using BCA Protein assay (Pierce, Bezons, France).

Particle pellets were resuspended in PBS at the concentration of 0.4 mg/mL of protein.

To prepare green fluorescent particles, 6-Coumarin was dissolved in acetone together with PLA at a concentration of 0.2% (w/v). During the precipitation process in the aqueous phase, 6- Coumarin was encapsulated in PLA nanoparticles (PLA-C6) as described in Primard et al. (Primard et al., 2010)

Immunization protocols. Intradermal (i.d.) administration of vaccine was performed in the dorsal side of the ear using insulin specific needles (U-100, 29GX1/2" -0,33X12 mm, Terumo, Belgium). No erythema was observed after immunization procedure. Control mice were injected with PBS with the same procedures. Each animal received a priming dose of PLA-HIV-p24, corresponding to 40 μg of p24 coated onto PLA particles, which represented a total amount of $2-3 \times 10^{11}$ PLA/mouse injected in both ears (50 μ L/ear in 3 micro-injection).

Preparation of murine cell suspensions. DLNs pressed through a 70-mm nylon mesh (cell strainer, BD Falcon), and washed with PBS supplemented with fetal calf serum (FCS). For bio-distribution, DLN were treated for 30 min at 37°C with collagenase IV (Sigma), 400 U ml/L in RPMI 1640 medium (Invitrogen Europe, Paisley, UK) prior to cell separation on cell strainer. For skin cell preparation, dorsal and ventral halves of ear were incubated in 2.5U Dispase-II (Sigma) during 150 min with gentle shaking at 4°C. Digested tissues were pressed through a 70-mm nylon mesh (cell strainer) and then filtered (Miltenyi) in order to remove most aggregates.

Flow cytometry. Cell suspensions were stained for surface markers during 20 minutes at 4°C in PBS 1X, 2% FCS except biotinylated CXCR5 which was incubated 45 minutes at 4°C in PBS 1X, 2% FCS and streptavidin-APC was used for detection. All antibodies were purchased from BD Biosciences. Cells were sequentially fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes at 4°C and rinsed. Intracellular staining was performed after fixation using PE-conjugated anti-mouse CD207/Langerin (clone eBioL31) or CD86 antibody from BD bioscience. Cells were permeabilized with 2% FCS ;

0.1% saponin (Sigma) ; PBS. Fluorescence was analyzed on a minimal of 2×10^5 cells of each population per sample with a FACS Fortessa flow cytometer or a FACS Canto II and analyzed using the FlowJo software.

Intracellular cytokine assays (ICS). Auricular DLNs were collected 7 days after i.d. immunization. Cells were restimulated in vitro for 5 h with HIV-1 p24 overlapping peptide, covering all p24 sequence, at a final concentration of 2 ug/mL in 10%FBS/RPMI 1640 or with 10%FBS/RPMI 1640 medium only. For the final 4 h Brefeldin A was added (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) at 5 ug/mL and 50 μ M monensin (Sigma–Aldrich, St Louis, USA). After washing and a 5 min centrifugation at 1500 rpm, cells were stained for surface marker using TFH protocol in addition to viability dye (LIVE/DEAD, Invitrogen, Europe, Paisley, UK). After fixation in PFA 4% and permeabilization with 0.1% saponin ; 1%FBS / PBS, cells were stained with conjugated antibodies against TGF- β (VioLegend, San Diego, USA). At least 100,000 events per sample were analyzed with FlowJo software.

Immunofluorescent microscopy on frozen tissue sections. Histology studies were performed on skin and DLN at indicated time after i.d. immunization. Tissues were removed and immediately embedded in O.C.T™ wax (Tissue-Tek®, Sakura, Belgium) for cryopreservation. Frozen tissues were sequentially cryosectioned (5 μ m sections) with a Microm HM550 cryostat (Thermo Scientific, France). Prior to staining, tissue sections were rehydrated and fixed for 10 min with PFA 4% or acetone and then washed for 10 min in PBS-1% bovine serum albumin (BSA) (Euromedex, France) followed by 30min blocking incubation in PBS-3% BSA at room temperature (RT). Endogenous biotin was blocked using the avidin/biotin blocking kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 30 min at RT (15 min avidin, 15 min biotin). Slides were sequentially incubated for 1 h 30 at RT with surface markers. Biotin anti-Langerin/CD207 (Euromedex, France) were used in PBS–BSA 1%, 0.1% saponin for intra cellular straining. Slides were carefully washed in PBS 1 $\times$ and then incubated 1 h RT with secondary chicken anti-rat IgG- Alexafluor 350; goat anti-rat IgG- Alexafluor 594 or goat anti-rat IgG- Alexafluor 633 (Invitrogen, Europe, Paisley, UK). For TFH staining, saturation and antibodies incubation were done in 0.05% Tween-20/ 1% FBS/ PBS and IgD, GL7 and CD4 directly coupled to

V450, FITC and PE-cf594 respectively (BD Biosciences) were used. After three washes in PBS, slides were mounted with Vectashield mounting medium containing DAPI (Vector Laboratories, UK) or Fluoromont-G mounting medium (SouthernBiotech, Alabama, USA) according to secondary antibodies used. For single cell analyse, cell preparation were first incubated (30 min at 37°C) on poly-lysine coated slide before fixation and staining. Slides were analyzed with a fluorescence microscope (BX51; Olympus, Rungis, France) equipped with an image processing and analysis system Qimaging (Media Cybernetics Inc, Silver Spring, MD, USA) or confocal microscope (FV-1000, Olympus, Rungis, France) using the Olympus acquisition software. All images were analyze using ImageJ software.

p24-specific IgG and IgA ELISPOT assay. ELISPOT plates were coated with recombinant HIV-1 p24 protein produced in E. coli by PX Therapeutics (Grenoble, France) diluted in PBS at a concentration of 0.4 g/L or PBS (background). DLN were collected at day 7 after immunization and cells were seeded in duplicated. Cells were incubated for 24 hr at 37°C. IgG or IgA ASC were detected with alkaline phosphatase conjugated-goat anti-mouse IgG or IgA Abs (Abcam), and revealed with BCIP/NBT substrate (Sigma-Aldrich). Spots were counted with an automated plate reader (AID). ELISPOT readouts were expressed as the number of HIV-p24-specific IgG or IgA in 2 dLNs.

Blood and vaginal lavages collection. Blood and vaginal lavages were collected prior to skin immunizations (pre-immune samples) and at time indicated on figures. Sera were recovered using 2 successive spin centrifugations. Vaginal secretions were collected by 3 successive gentle lavages with 30 µL sterile PBS were performed in the mouse vaginal cavity. Vaginal secretions were treated with 4 µL Completeµ protease inhibitor cocktail tablets (Roche, USA) 30 min on ice and centrifuged 10 min at 1300 rpm to remove mucus. Sera and vaginal lavages were stored at -80°C until testing.

Antibody dosage in sera and vaginal lavages. Antibodies were measured by an Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA). Briefly, 96 well MaxiSorp-plates (Nunc, Thermofisher Scientific, Rochester, NY, USA) were coated with 50 µL recombinant HIV-1 p24 (PX-Therapeutics, Grenoble, France) at 1 µg/mL in PBS and incubated overnight at 4°C. After washing, plates were blocked for 1 h

at 37°C with 300 µL blocking buffer (PBS, 1% sterile BSA, Euromedex, France). A volume of 45 µL of sera samples diluted at 1/2500 for IgG or 1/5 for IgA and 45 µL vaginal lavages diluted at 1/5 for IgG or 1/2 for IgA in assay buffer (1% BSA/ 0.05% Tween-20/ PBS) were incubated overnight at 4°C. All samples were tested in duplicates. After washing, 100 µL detection antibody, either biotin conjugated goat anti-mouse IgA (1/5000) (Southern biotech, Birmingham, AL, USA) or Horse Radish Peroxydase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (1/10,000) (Southern Biotech) were added for 1 h at 37°C. For IgA monitoring, after washing, Streptavidin- HRP (1/200) (R&D Systems, USA) was added for 20 min in blocking buffer at 37°C. Enzymatic activity was measured by adding 50 µL of tetramethylbenzidine (TMB) (Clinisciences, France), either 5 min (IgG) or 10 min (IgA) in the dark. Enzymatic reaction was stopped by addition of 50 µL stop solution (1N H₂SO₄, H₂O). Optical density (OD) of each well was monitored at 450 nm with a Multiscan Ex ELISA reader (Thermofisher) and Ascent Software version 2.6.

Statistical analyses. Prism-5 software was used for data handling, analysis, and graphic representations. Data are presented as the mean value $\pm$ standard deviation. For statistical analyses we used a Mann Whitney test and significance was set at p-value < 0.05.

Legends of figures

Figure 1: Epidermal and dermal DCs capture differential amount of PLA particles following i.d. immunization. Mice were injected i.d. with 1.2×10^{11} green fluorescent PLA-coumarin6 particles (PLA-C6) or PBS, and skin resident DC were analyzed from 1 to 48 hours post-injection. (A) Histological section of the ear confirmed the dermal localization of the injection. (B) Flow cytometry profile of mice skin resident DC subsets following staining with anti-MHCII, anti-CD207, and anti-Sirp α .. Absolute numbers of PLA-C6+ LCs, CD207+ dDCs and CD207- DCs from 1 to 48 hours are represented after immunization ($9 < n < 18$, statistical significance to PBS is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ using Mann-Whitney t-test). (C) Intensity of fluorescence of PLA-C6 captured by LCs, CD207+ dDCs and CD207- DCs from 1h, 4h, 24h hours. Injection of PBS represents the background fluorescence. (E) Representative confocal microscopy fields of CD207+ cells (red) at 4 hours (top) and 24 hours (bottom) after i.d. injection of PLA-C6 ($n=2$ independent experiments).

Figure 2: Characterization of skin migratory DC population in the draining LN. Mice were injected by i.d. route in the ear with 1.2×10^{11} PLA-C6. Auricular dLNs were collected from 1 to 48 hours after injection and DCs were characterized by flow cytometry. (A) Skin DCs in the dLN express CD11c and be distinguished from others on the basis of CD11b, CD207 and CD103 expression. Prior to analysis, dLN resident CD8+ DC, pDC and inflammatory DCs were excluded based on expression of CD8 and Ly6C markers. (B) The number of skin DCs in the aDLN were analyzed at 1 hour and 24 hours post immunization ($9 < n < 18$, statistical significance to PBS is indicated by * $p < 0.05$ using Mann-Whitney t-test). (C) Relative quantity of fluorescent PLA-C6 in LCs, CD207+ dDCs and CD207- DCs population by analysis of green fluorescent profil by flow cytometry in the auricular dLN at 1 24 hours after i.d. injection. Injection of PBS represents the background fluorescence (gray tinned line). The proportion of PLA-C6+ skin resident DC population at 24 hours after injection is given for each population. (D) Representative intracellular localization of fluorescent PLA-C6 was confirmed by confocal microscopy on CD207+ cells at 4 hours (left) and 24 hours (right) after i.d. injection of PLA-C6 ($n=2$ independent experiments).

Figure 3: Epidermal LC are participating in the induction of T_{FH} cells and B cell switch after i.d. immunization. (A) Langerin-GFP-DTR mice were injected by intraperitoneal route with 1 μ g of diphtheria toxin (DT) on day 2 for depletion of both epidermal LCs and CD207+ dDC or day 13 for reconstitution of the CD207+ dDC population before i.d. immunization with PLA-HIV-p24. Auricular dLNs were then collected 7 days after immunization (B) The depletion of CD207+ expressing cell in the ears was verified 2 days after injection of DT by flow cytometry on the MHCII population using the GFP reporter on CD207+ population (left). The CD207- population was not affected by DT treatments compared to not treated (right). (C - F) Mice were treated with DT 2 or 13 days prior to i.d. immunization with PLA-HIV-p24 or no treated. (C) Auricular dLNs were recovered 7 days after immunization and the number of T_{FH} cells were evaluated by flow cytometry. (D) Representative histological section of auricular dLN immuno-stained for germinal centre (GC) area by α -GL7 (green) and α -IgD (blue) and T_{FH} with α -CD4 in GC area. Mice were injected with PBS or p24-PLA NPs without or with DT treatment 2 days prior to immunization. GC centre area was calculated and expressed in μ m². Bar, 50 μ m. (E) Auricular DLNs were recovered 7 days after immunization and the number of GC B cells were evaluated by flow cytometry. (F) Quantification of p24-specific IgG- (left) and IgA- (right) antibody secreting cells determined by ELISPOT in aDLNs at 7 days after immunization with PLA-HIV-p24. (B: n=6 ; C-F: 6<n<9, statistical significance is indicated by *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using Mann-Whitney t-test)

Figure 4: Skin migratory cells are required to elicit T_{FH} cell polarization and dLN germinal center reaction after i.d. immunization with PLA-HIV-p24. (A) Mice were immunized by i.d. route with PLA-HIV-p24 or PLA-C6. Ears were then removed after 1 hour and auricular dLN were collected after 7 days for analysis. (B) Histological section of auricular dLN depicting lymphatic vessel network (red) 4 hours after i.d. injection of 1.2×10^{11} coumarin6-PLA NPs (green) in control mice (left panel) and ear cut mice (right panel). Data are representative of 3 independent experiments. Bar, 100 μ m. (C) Quantification of PLA-C6+ cells in dLNs of control and ear cut (EC) mice 4 hours after injection of PLA-C6 determined by flow cytometry. n=9. (D-E) Absolute numbers of T_{FH} (D) and GC B cells (E) cells in DLNs 7 days after immunization with PLA-HIV-p24 in control and EC mice. (F) Absolute

numbers of p24-specific IgG (left panel) or IgA (right panel) secreting cells in DLNs 7 days after immunization with PLA-HIV-p24 in control and EC mice. (D-G: 6<n<9, statistical significance is indicated by *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using Mann-Whitney t-test)

Figure 5: Skin migratory cells induce production of IgG- p24-specific antibody in serum and vaginal lavage after i.d. immunization with PLA-HIV-p24. Quantification of IgG p24-specific antibody in serum (A) and vaginal lavage (B) prior to immunization (d0) and from day 5 to day 28 after i.d. immunization with PLA-HIV-p24 in control (black square) and EC mice (red triangle). Injection of PBS (grey dot) represents background level (3<n<12).

Supplementary figure 1: T_{FH} cell polarization requires antigen-coated PLA, is restricted to auricular DLNs, and peaks at 7 days post-immunization

(A) T_{FH} cells were gated as CD3⁺, CD4⁺, CD44⁺, CD62L⁻, CXCR5⁺ and PD-1⁺ cells in auricular dLN 7 days after PLA-HIV-p24 i.d. immunization. (B) Absolute numbers of T_{FH} cells in dLNs from day 5 to day 28 after immunization. (C) Intracellular staining of TGFβ in T_{FH} (black line) and non-T_{FH} (gray tinned line) population 7 days after PLA-HIV-p24 immunization. Cells were re-stimulated with HIV-1 p24 overlapping peptides for 5 hours and cytokine secretion was blocked during 4 hours using Brefeldin A and Monensin before intra-cellular TGFβ staining. (D) Absolute numbers of T_{FH} cells in aDLNs 7 days after immunization with PBS, PLA-C6 or PLA-C6-HIV-p24 showing lack of T_{FH} polarization when PLA particles are free of antigen. (E) Absolute numbers of T_{FH} cells in various DLNs 7 days after PLA-HIV-p24 immunization showing restriction of T_{FH} cell polarization to auricular DLNs.

Supplementary figure 2: Germinal center B cells lose the IgD phenotype and the number of IgG- and IgA- p24-specific antibody secreting cells correlate the number of T_{FH}

(A) GC B cells were gated as B220⁺, FAS⁺ and GL7⁺ in auricular dLN 7 days after PLA-HIV-p24 immunization. Analysis of the expression of IgD confirmed GC B cells had endured isotypic class switch. (B) Absolute numbers of GC B cells in dLNs from day 5 to day 28 after immunization. (C-D) T_{FH} and p24-specific IgG- (C) and IgA- (D) secreting cell numbers are correlated.

Supplementary figure 3 : Free drained PLA-HIV-p24 does not elicit a delayed T_{FH} and B cells response

(A-D) Number of T_{FH} (A), GC B cells (B), IgG- (C) and IgA- (D) p24-specific antibody secreting cells in auricular dLN at 7 days and 14 days after immunization with PLA-HIV-p24 in control condition (empty bar) or ear cut at 1 hour after immunization (full bar). $3 < n < 9$

Supplementary figure 4 : Uptake of PLA-C6-HIV-p24 in the skin by CD207+ DC elicited their activation.

(A) Activation marker CD86 (left panel) and MHC II (right panel) expression were analysed on PLA+ CD207+ population at 24 hours after PLA-C6-HIV-p24 i.d. injection in control condition (black line) or ear cut at 1 hours after immunization (gray tinned line).

Ballesteros-Tato, A., and Randall, T.D. (2013). Priming of T follicular helper cells by dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* 92, 22–27.

Ballesteros-Tato, A., León, 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.

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⁺ T follicular helper cells. *J. Immunol.* 179, 8180–8190.

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.

Combadiere, B., and Liard, C. (2011). Transcutaneous and intradermal vaccination. *Hum. Vaccin.* 7, 811–827.

Crotty, S. (2011). Follicular Helper CD4 T Cells (T_{FH}). *Annu. Rev. Immunol.* 29, 621–663.

Cucak, H., Yrlid, U., Reizis, B., Kalinke, U., and Johansson-Lindbom, B. (2009). Type I Interferon Signaling in Dendritic Cells Stimulates the Development of Lymph-Node-Resident T Follicular Helper Cells. *Immunity* 31, 491–501.

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.

Dullaers, M., Li, D., Xue, Y., Ni, L., Gayet, I., Morita, R., Ueno, H., Palucka, K.A., Banchereau, J., and Oh, S. (2009). A T Cell-Dependent Mechanism for the Induction of Human Mucosal Homing Immunoglobulin A-Secreting Plasmablasts. *Immunity* 30, 120–129.

- 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 (Tfh) Differentiation. *PLoS ONE* 6, e17739.
- GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., van Rijt, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., et al. (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205, 1621–1634.
- Ginhoux, F., Collin, M.P., Bogunovic, M., Abel, M., Leboeuf, M., Helft, J., Ochando, J., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Grisotto, M., et al. (2007). Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J. Exp. Med.* 204, 3133–3146.
- Goenka, R., Barnett, L.G., Silver, J.S., O'Neill, P.J., Hunter, C.A., Cancro, M.P., and Laufer, T.M. (2011). Cutting Edge: Dendritic Cell-Restricted Antigen Presentation Initiates the Follicular Helper T Cell Program but Cannot Complete Ultimate Effector Differentiation. *J. Immunol.* 187, 1091–1095.
- 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. *Nat. Immunol.* 11, 535–542.
- Haase, A.T. (2010). Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* 464, 217-223.
- Henri, S., and Poulin, L.F. (2010). CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 207, 189–206.
- Kastenmuller, W., Torabi-Parizi, P., Subramanian, N., Lammermann, T., and Germain, R.N. (2012). A spatially-organized multicellular innate immune response in lymph nodes limits systemic pathogen spread. *Cell* 150, 1235-1248.

Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhé, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C.H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., et al. (2005). Dynamics and Function of Langerhans Cells In Vivo. *Immunity* 22, 643–654.

Kumamoto, Y., Linehan, M., Weinstein, J.S., Laidlaw, B.J., Craft, J.E., and Iwasaki, A. (2013). CD301b(+) dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity. *Immunity* 39, 733-743.

Liard, C., Munier, S., Arias, M., Joulin-Giet, A., Bonduelle, O., Duffy, D., Shattock, R.J., Verrier, B., and Combadière, B. (2011). Targeting of HIV-p24 particle-based vaccine into differential skin layers induces distinct arms of the immune responses. *Vaccine* 29, 6379–6391.

Merad, M., Ginhoux, F., and Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 935–947.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y., 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.

Reinhardt, R.L., Liang, H.-E., and Locksley, R.M. (2009). Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat. Immunol.* 10, 385–393.

Schmitt, N., Morita, R., Bourdery, L., Bentebibel, S.E., Zurawski, S.M., Banchereau, J., and Ueno, H. (2009). Human Dendritic Cells Induce the Differentiation of Interleukin-21-Producing T Follicular Helper-like Cells through Interleukin-12. *Immunity* 31, 158–169.

Tamoutounour, S., Williams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., et al. (2013). Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity* 39, 925–938.

Tarlinton, D., and Good-Jacobson, K. (2013). Diversity Among Memory B Cells: Origin, Consequences, and Utility. *Science* 341, 1205–1211.

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⁺ T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323, 1488-1492.

2.3 Résumé des résultats et de la discussion

Dans cette étude, nous mettons en évidence les mécanismes cellulaires nécessaires à l'induction de la réponse humorale dans le ganglion drainant dans un contexte d'injection par voie i.d. de particules fines de PLA. Une unique immunisation a permis d'induire la polarisation de LT CD4⁺ naïfs en T_{FH}, de générer la formation de centres germinatifs ainsi que le développement de plasmocytes sécrétant des IgG et IgA dans le ganglion. La déplétion de la population de LC de l'épiderme de façon transitoire a démontré leur implication dans le processus d'initiation de la réponse humorale. Cependant, seuls les LC présentes dans la peau lors de l'immunisation ont acquis la capacité d'induire la polarisation des LT CD4⁺ naïfs en T_{FH}. Les LC situées dans le ganglion n'ont pas été capables d'induire l'initiation de la réponse humorale. Ces résultats suggèrent qu'une seconde population cellulaire est également capable d'induire la polarisation de T_{FH}.

L'étude précédente de la distribution des particules fines de PLA a mis en évidence la diffusion d'une quantité importante de particules vers le ganglion drainant de façon passive et très rapide. Nous avons alors fait l'hypothèse que les DC résidentes du ganglion pourraient être impliquées dans l'induction des T_{FH}. Cependant, l'étude de la réponse immunitaire en condition d'ablation du site d'injection démontre que ces DC ne sont pas suffisantes pour initier la réponse et confirme également l'origine cutanée des cellules à l'origine de la polarisation en T_{FH}. Parmi les DC cutanées, nous avons exclu l'implication des CD207⁺ dermiques, ce qui laisse penser que les sous-populations CD11b⁺ ou CD11b⁻ seraient impliquées. En revanche, l'injection i.d. induit une infiltration de cellules inflammatoires au niveau du site d'injection, qui migrent vers le ganglion drainant rapidement. Ces résultats incitent à évaluer le rôle du micro-environnement inflammatoire du ganglion dans l'induction de la réponse T_{FH}.

Ce travail a cependant soulevé de nombreuses questions :

(1) Quelles sont les autres populations impliquées dans la polarisation des LT CD4⁺ en T_{FH} ?

Cette question n'a pas été répondue dans cet article par manque de modèles pour dépléter les populations de CD11b⁺ DC et CD11b⁻ DC. De plus, ces populations sont hétérogènes et encore mal identifiées. En revanche, un article récent de Y.Kumamoto a démontré récemment chez la souris que la population de CD301b⁺ DC dermique n'est pas impliquée dans la polarisation de T_{FH} dans

un modèle OVA co-injecté avec CpG2216 par voie s.c. [305]. Si cette population est distincte des LC et CD207+ dDC, les auteurs n'indiquent pas de correspondance avec une population précise de DC cutanées décrites. Cependant, ils estiment que cette population représente 88% des DC dermiques, correspondant à la proportion attendu de CD11b+ DC et CD11b- DC décrites par S.Henri [140]. Il aurait été intéressant d'utiliser le modèle murin CD301b+ DTR de Y.Kumamoto pour vérifier l'implication des cellules exprimant CD301b dans notre modèle.

(2) Quel est le rôle de l'inflammation cutanée dans l'activation des DCs?

Seuls les LC présentes sur le site d'immunisation ont acquis la capacité d'induire des plasmocytes sécrétant des IgG ou IgA spécifiques à p24. Il semble que l'inflammation cutanée générée par l'infiltration massive de cellules inflammatoires joue un rôle important dans le mécanisme de maturation des DC [306]. Il serait intéressant étudier les états d'activations des différentes sous-population de DC de la peau et du ganglion lors de l'immunisation avec les PLA-HIV-p24 pour tenter de comprendre le rôle de l'inflammation locale ainsi que de déterminer quelles populations inflammatoires sont requises dans ce processus.

(3) Quel est le rôle de l'antigène libre qui diffuse passivement vers le ganglion lymphatique ?

D'après les travaux de K.Pape et ses collaborateurs, les antigènes libres diffusent rapidement dans les follicules B et activent les LB naïfs [179]. Ce mécanisme permet de sélectionner les LB qui possèdent un BCR spécifique à l'antigène. Il serait intéressant de vérifier si la diffusion passive est nécessaire pour l'activation des LB dans notre modèle. L'antigène libre est probablement impliqué dans l'induction de la réponse inflammatoire du ganglion. Il est possible que l'inflammation locale crée un environnement favorable à la présentation antigénique par les LC qui migrent plus tardivement. Ou au contraire que l'inflammation soit défavorable à la réponse immunitaire [307].

(4) Quelles sont les molécules nécessaires dans le ganglion drainant pour favoriser la polarisation en T_{FH} et la génération des centres germinatifs ?

Il est démontré que les cytokines IL-6, IL-12 et IL-21 sécrétées par les DC favorisent la polarisation des LT CD4+ en T_{FH}. L'environnement local est donc extrêmement important dans le processus de différenciation des LT CD4+. Nous avons choisi de poursuivre nos investigations dans cette direction dans le but de déterminer une signature transcriptomique caractéristique à la réponse T_{FH}. Nous avons réalisé cette étude qui n'a pas été ajoutée au papier, car elle fera l'objet d'une étude plus détaillée. Les résultats de l'analyse préliminaire sont cependant décrits dans le chapitre suivant.

3 Résultats supplémentaires : Analyse transcriptomique du micro-environnement inflammatoire ganglionnaire favorisant la polarisation des T_{FH}

3.1 Introduction

La différenciation des LT $CD4^+$ en T_{FH} requiert de nombreuses interactions avec les cellules du ganglion. Les DC sont les premières à interagir en présentant l'antigène par leur MHC de classe II et en initiant le programme de développement spécifique des T_{FH} via l'induction du facteur de transcription *bcl6*, principalement via la voie de transduction STAT1, STAT3 et STAT4. Il est démontré que le profil de cytokines sécrétées par les DC joue un rôle essentiel. En activant directement les récepteurs liés aux voies STAT, elles permettent donc d'induire la polarisation vers un sous-type particulier. La polarisation des T_{FH} est associée à la sécrétion d'IL-6, IL-12 et IL-21 par les DC [308]. L'environnement local est donc extrêmement important dans le processus de différenciation des LT $CD4^+$.

Les cellules inflammatoires jouent également un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire cellulaire et humorale. Cependant, aucune étude n'a étudié le rôle précis de l'inflammation dans la polarisation des LT $CD4^+$ en T_{FH} . L'équipe de R.Germain a montré que les cellules lymphoïdes du ganglion sont naturellement localisées à proximité des macrophages pour capter leurs signaux inflammatoires d'activation lors de la détection d'un pathogène [309]. La diffusion passive et rapide de l'antigène induit probablement une inflammation locale. En revanche, elle n'est pas suffisante pour activer les DC présentes dans le ganglion et stimuler la polarisation des T_{FH} . La migration des cellules inflammatoires de la peau, observée dans l'étude de la distribution de l'antigène, modifie probablement le profil inflammatoire du ganglion.

En étudiant le transcriptome sur le ganglion entier à 3 jours après immunisation, nous avons essayé de déterminer une signature moléculaire traduisant un micro-environnement favorable à la polarisation des LT $CD4^+$ en T_{FH} après immunisation. Pour cela, nous avons utilisé notre modèle antigénique PLA-HIV-p24 injecté par voie i.d. et étudié les modifications que génère l'immunisation. Nous avons également étudié le micro-environnement ganglionnaire lors de la diffusion passive des particules en utilisant l'ablation du site d'injection à 1 heure après injection.

3.2 Matériel et méthodes

Souris et immunisation. Les souris C57BL/6 (6-8 semaines) provenant du fournisseur Charles River ont été injectées par voie intradermique dans la face dorsale de l'oreille sous anesthésie gazeuse avec une seringue à insuline (U-100, 29GX1/2" -0,33X12 mm, Terumo, Belgique). Un volume de 100 µL de particules fines de PLA sur lesquelles a été adsorbée la protéine p24 du VIH-1 (groupe PLA et PLA+EC) ou un volume équivalent de PBS (groupe PBS) a été administré en 6 points d'injection répartis sur les 2 oreilles. Pour le groupe PLA+EC, les oreilles ont été sectionnées à 1 heure après immunisation sous anesthésie par injection. Aucun saignement n'a été observé. Les ganglions auriculaires drainants le site d'injection ont été prélevés 72 heures après injection et congelés directement à -80°C dans des tubes cryogéniques.

Extraction de l'ARN. Les ganglions ont été décongelés à 0°C et directement écrasés dans le tampon de lyse fourni avec le kit d'extraction (QIAGEN RNeasy Mini kit, Qiagen, Hilden, Germany). L'extraction a été réalisée en suivant les instructions du fournisseur. La quantité d'ARN a été dosée par un spectrophotomètre NanoDrop2000 (ThermoScientific, Wilmington, USA) et la qualité évaluée en utilisant le Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Les ADN complémentaires ont été générés par le kit Ambion WT Expression (Life technology, Saint Aubin, France), marqués avec un kit Affimetrix et hybridés sur une puce "whole-transcript Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST" (Affimetrix, High Wycombe, UK).

Analyse statistique. La correction du bruit de fond et la normalisation des puces ont été réalisées en utilisant le logiciel Bioconductor R (R plug-in). L'analyse en composantes principales et la classification hiérarchique ont été effectuées à l'aide de Partek GS (Partek, St. Louis, USA). Le test statistique ANOVA a ensuite été réalisé pour identifier les gènes significativement différents entre les 3 groupes ($p \leq 0,01$). Les listes de gènes ont été analysées en utilisant un diagramme de Venn (Parteck GS) et les groupes de gènes étudiés dans Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems Inc.) pour déterminer les voies métaboliques et de signalisation.

3.3 Résultats et discussion

Pour identifier les molécules impliquées dans la polarisation des T_{FH} , nous avons réalisé 3 groupes correspondant à des conditions expérimentales différentes. Le premier groupe (« PBS ») correspond à l'injection de PBS par voie i.d. et permet de définir l'expression de base des gènes dans le ganglion. Le second groupe (« PLA ») correspond à l'injection de PLA-HIV-p24 qui autorise la diffusion passive des particules ainsi que la migration des cellules inflammatoires et des DC de la peau et correspond à la présence de T_{FH} . Le dernier groupe (« PLA+EC ») correspond à l'injection de PLA-HIV-p24 puis à l'ablation du site d'injection à 1 heure après injection. Seule la diffusion des particules est effective dans ce groupe. Ce groupe n'est pas associé à la présence de T_{FH} dans les ganglions auriculaires. Les ganglions ont été prélevés 72 heures après l'injection, un temps précoce où s'initient les premières étapes de la polarisation des T_{FH} [263]. En ne considérant que 15% des gènes qui présentent la sur-expression ou sous-expression la plus importante, l'analyse en composante principale, non supervisée, montre que le groupe PBS est clairement détaché des groupes PLA et PLA+EC (figure 1.A). Cependant, ces deux groupes ne semblent pas se différencier, hormis un point éloigné des autres pour lequel il est difficile d'en déterminer la raison. Le regroupement hiérarchique semi supervisé des groupes confirme ces résultats en affichant un profil transcriptomique du groupe PBS opposé aux groupes PLA et PLA+EC. La différence entre les groupes PLA et PLA+EC se résume à un nombre limité de gènes (figure 1.B), qui sont probablement modifiés par l'arrivée des cellules inflammatoires et DC de la peau. Ces gènes ont donc fait l'objet d'une attention particulière. Le test ANOVA a permis de sortir 1234 gènes significativement différents pour au moins l'un des 3 groupes, et ont été représentés en diagramme de Venn (figure 1.C) qui permet de définir quels gènes modifiés sont spécifiques d'un groupe ou modifiés dans plusieurs groupes. L'analyse de la fraction de gènes différents uniquement entre PLA vs PBS (285 gènes) correspond à la modification apportée par l'arrivée des cellules inflammatoires et des DC de la peau. L'analyse des gènes montre qu'ils appartiennent à un même réseau impliqué dans la stimulation du TNF α (figure 1.D panel de gauche). À l'opposé, nous avons déterminé que les gènes modifiés par l'arrivée des PLA libres (414 gènes - commun entre PLA vs PBS et PLA-EC vs PBS) sont impliqués dans la stimulation de ERK1 et ERK2 (Extracellular signal-regulated kinases). Ces protéines font partie de la famille des MAP kinases et jouent un rôle dans l'activation et le développement cellulaires [310, 311].

Ces résultats démontrent que la diffusion passive des PLA modifie le micro-environnement dans le ganglion en modifiant l'expression d'un nombre important de gènes. Il est donc évident que cette importante quantité d'antigènes joue un rôle dans la mise en place du micro-environnement du ganglion. Cependant, ces résultats ne nous permettent pas d'identifier dans quels mécanismes les PLA sont impliqués. Nous pouvons faire l'hypothèse qu'ils jouent un rôle favorable dans l'initiation de la réponse immunitaire, ou au contraire qu'ils induisent un phénomène de tolérance. Plusieurs hypothèses sont possibles et les résultats transcriptomiques ne nous permettent pas d'envisager une hypothèse en particulier. D'autre part, les résultats suggèrent que la migration cellulaire induit un contexte inflammatoire dépendant du TNF α . OX40 est un membre de la famille des récepteurs du TNF α important pour la survie de LT activés [312]. Or, OX40 est exprimé par les pré-T_{FH} et induit l'expression de CXCR5 ainsi que la migration des lymphocytes T CD4⁺ à la frontière T/B [313, 314]. CD40, exprimé par les LB, est également un membre de la famille des récepteurs du TNF et joue un rôle important dans la stimulation de la survie des LB, dans leur prolifération et dans la commutation de classe des Ig [315]. Le TNF- α est sécrété par de nombreuses populations cellulaires dont les macrophages, les mastocytes, les neutrophiles [302] et les DC inflammatoires [316]. Ces données appuient l'importance de TNF dans l'environnement ganglionnaire pour le développement des T_{FH} et des LB par la voie du centre germinatif. Cependant, il est nécessaire de vérifier nos résultats par PCR et d'étudier quelles populations pourraient être à l'origine de la production de TNF dans le ganglion. Il est évident que le rôle de l'inflammation local est important. Cependant la génération de l'inflammation est médiée par un réseau complexe de sous-populations cellulaires et de molécules difficiles à étudier.

Figure 1 : Implication de TNF dans le micro-environnement ganglionnaire favorisant la polarisation des T_{FH}

(A) Analyse en composante principale (PCA) de 15% des gènes qui possèdent la plus grande variation d'expression. (B) Représentation graphique des gènes sur-régulés (rouge) ou sous-régulés (vert) par rapport à la moyenne et significativement différents pour l'un des 3 groupes (ANOVA<0,05). (C) Diagramme de Venn représentant les expressions de gènes significativement différents (ANOVA<0,05, test ad hoc de Turkey <0.01) pour les groupes comparés 2 à 2. (D) Réseau représentant les interactions avec les gènes exclusivement différents entre PLA vs PBS (285 gènes ; graphique de gauche) et

les gènes communs à PLA vs PBS et PLA+EC vs PBS (414 gènes). La sur-régulation et la sous-régulation des gènes sont représentés en rouge et vert respectivement.

4 Altération de la réponse T_{FH} par les monocytes inflammatoires dans les souris déficientes en CCR2

4.1 Introduction

L'inflammation joue un rôle important dans la coordination de la réponse immunitaire. La nature des molécules pro-inflammatoires présentes dans le micro-environnement local influence directement la qualité de la réponse immunitaire [299]. Les monocytes se développent à partir de progéniteurs de la moelle osseuse avant de rejoindre la circulation sanguine et se différencient en macrophages ou en DC inflammatoires dans les tissus [317]. Chez la souris, ils peuvent être séparés en deux sous-populations sur la base de leur phénotype ainsi que de leurs fonctions. La sous-population Ly6C^{low} ; CX3CR1^{high} ; CCR2^{low}, appelée « patrolling monocytes » est recrutée dans le tissu inflammé où ils produisent des médiateurs pro-inflammatoires puis ils se différencient en macrophages activés [317]. La seconde sous-population comprend des cellules Ly6C^{high} ; CX3CR1^{low} ; CCR2^{high} qui sont appelées « monocytes inflammatoires ». Ces cellules sont recrutées à des sites d'infection avec une cinétique légèrement retardée par rapport aux monocytes patrolling et se différencient en DC inflammatoires et en macrophages [141, 175, 317]. Il est possible d'interférer avec la migration de ces cellules en utilisant des modèles murins inactivés pour ces gènes. Les modèles *Ccr2*^{-/-} et *Cx3cr1*^{-/-} permettent d'abolir la migration cellulaire des monocytes vers le site d'inflammation. CCR2 est un récepteur de la chimiokine CCL2 qui est principalement impliqué dans l'infiltration monocyttaire. CX3CR1 est quant-à-lui le récepteur de CX3CL1 ou « fractalkine » qui existe sous deux formes : une forme membranaire et une forme soluble après clivage par les metalloprotéinases [318]. C'est une chimiokine impliquée dans la migration (forme soluble) et l'adhérence cellulaire (forme membranaire).

Les études montrent que les monocytes CCR2⁺ ainsi que les DC dérivés des monocytes sont impliqués dans la défense contre les infections fongiques [319] et les parasites [320]. W.Peters et ses collaborateurs ont montré que CCR2 permet de créer un lien entre la réponse immunitaire innée et adaptative [321]. L'inactivation du gène CCR2 induit l'altération de la migration des cellules présentatrices d'antigènes capables d'induire la production d'IFN- γ par les LT et produisent nettement moins d'IFN- γ dans les ganglions drainants. À l'opposé, il a été montré que la co-injection d'un agoniste de CCR2 amplifie la réponse immunitaire en réponse à une vaccination [307]. Le rôle exact des monocytes CCR2⁺ dans la réponse immunitaire est encore débattu.

Afin d'étudier les mécanismes de l'induction des réponses cellulaires T_{FH} par les DC myéloïdes, nous avons utilisé un modèle particulière à base de VLP injecté par voie i.d. Les VLP ont suscité un intérêt croissant en raison de leur nature particulière à agir comme immunogène capable d'induire des réponses immunitaires humorales et cellulaires [322, 323]. Cubas et ses collaborateurs concluent après la vaccination HSIV-VLP par différentes voies, que la vaccination i.d. a permis d'induire une meilleure réponse cellulaire et humorale en comparaison des routes s.c. et i.m.[324].

Le but de ce projet est de connaître l'implication des monocytes inflammatoires $CCR2+$ et $CX3CR1+$ dans la polarisation des LT $CD4+$ en T_{FH} ainsi que la formation des centres germinatifs en réponse à une immunisation i.d. avec des VLP exprimant la protéine gp140 du VIH-1. Pour cela, nous avons utilisé des modèles murins transgéniques inactivés pour chaque gène indépendamment ou doubles knock-out. Ces travaux ont été principalement réalisés par L.Chonco durant son post-doctorat au sein de notre laboratoire. J'ai cependant, participé à la mise en place des techniques et des analyses des données.

4.2 Résultats

Induction de la polarisation des T_{FH} et du développement des centres germinatifs en réponse à une immunisation i.d. par gp140-VLP

La capacité des VLP à initier une réponse humorale a été évaluée en utilisant des VLP qui expriment la protéine gp140 du VIH-1 à leur surface. L'injection i.d. de 2 fois 20 ug de VLP-gp140, séparée par 24 heures, a permis d'induire la polarisation du T_{FH} dans les ganglions drainants à 3 jours après la vaccination avec un maximum à 7 jours (figure 1.A). Les T_{FH} (CD3 + , ICOS +) sont correctement localisés dans le cortex du follicule B à 7 jours après l'injection, ce qui permet d'interagir avec les LB (figure 1.B). Les anticorps de haute affinité étant sécrétés par les LB du centre germinatif (GC), leur développement a été évalué par le nombre de LB engagés dans cette voie. Les résultats montrent une augmentation progressive qui atteint un maximum à 7 jours après l'immunisation (figure 1.C), ainsi que pour le nombre de LB exprimant IgA (figure 4.D). Ensemble, ces résultats démontrent la capacité des VLP-gp140 à initier le développement de réponse humorale par la stimulation des T_{FH} et le développement des centres germinatifs.

Figure 1: Intradermal immunization with gp140-VLP stimulate TFH polarization and germinal center formation in skin draining LN

(A) C57BL/6 mice were immunized with 2 x 20ug one day apart by i.d. injection of VLP-gp140 in the ear and auricular dLN were collected at indicated times after injection. Cells were homogenized and stained for CD4+ ; CXCR5+ ; PD-1+ T follicular helper cells (T_{FH}). (B) Histological section of auricular dLN at 7 day after VLP-gp140 immunization. T_{FH} cells were stained using CD3 (red) and ICOS (green) and the T-B border were delimited by the cell density area and CD3+ cell localization. (C-D) C57BL/6 mice were immunized with 2 x 20ug one day apart by i.d. injection in the ear and auricular dLN were collected at indicated times after injection. Cells were homogenized and stained for B220+ ; IgD- ; GL7+ ; FAS+ germinal center B cells (GC B cells) (C) or B220+ ; IgA+ for IgA expressing B cells (D). Statistical significance is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ using Mann-Whitney t -test ; 6<n<9.

Augmentation du nombre de T_{FH} chez les souris déficientes pour CCR2

Pour étudier le rôle des monocytes inflammatoires dans le mécanisme de polarisation des T_{FH}, nous avons utilisé des modèles murins transgéniques inactivés pour le gène *Ccr2* ou *Cx3cr1* ainsi qu'un modèle inactivé pour les 2 gènes. *Ccr2* est exprimé principalement par la population de monocytes inflammatoires Ly6C^{high} ; CX3CR1^{low} ; CCR2^{high}, et *Cx3cr1* par la population de « patrolling monocytes » Ly6C^{low} ; CX3CR1^{high} ; CCR2^{low}. Les résultats montrent une augmentation du nombre de T_{FH} de 310,8 % ± 65,8 pour le modèle *Ccr2*^{-/-} et 311,2 ± 14,1 pour le modèle *Ccr2*^{-/-} *Cx3cr1*^{-/-}. En revanche, le nombre T_{FH} n'est pas différent pour le modèle *Cx3cr1*^{-/-} par rapport au contrôle (C57bl/6) (figure 2.A). L'étude des LB engagés dans les centres germinatifs montre une augmentation similaire (figure 2.B). En revanche, le nombre de LB exprimant IgA est plus élevé dans les modèles *Ccr2*^{-/-} et *Cx3cr1*^{-/-} (figure 2.C). Ces résultats suggèrent que les monocytes CCR2⁺ interfèrent dans le processus de polarisation des T_{FH}.

Figure 2: CCR2 but not CX3CR1 deficiency enhance TFH polarization in draining LNs

(A-C) CX3CR1 and CCR2 single knockout or double knockout mouse models were immunized with 2 x 20 ug of gp140-VLP one day apart by i.d. route and dLNs were collected. The number of TFH (A), GC B cells (B) and IgA expressing B cells (C) were evaluated by flow cytometry and compared to wild type (WT) C57/black6 mice. Statistical significance is indicated by *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using Mann-Whitney t-test; 3<n<9.

4.3 Discussion

De façon analogue aux particules fines de PLA, l'injection i.d. de VLP induit la polarisation des LT CD4⁺ en T_{FH} ainsi que la génération de centres germinatifs 7 jours après immunisation. Les résultats montrent que l'inactivation du gène *Ccr2* dans un modèle murin augmente le nombre de T_{FH} et de LB du centre germinatif. Nos résultats vont dans le même sens que les études qui montrent que l'inactivation de *Ccr2* et l'injection d'anticorps anti-CCR2 amplifient la réponse immunitaire lors de la vaccination [307]. En revanche, l'inactivation de *Cx3cr1* ne semble pas avoir eu d'impact. Ceci suggère que les monocytes CCR2⁺ affectent négativement l'initiation de la réponse humorale. Cependant, d'autres cellules expriment CCR2 en plus de la population de monocytes inflammatoire. La population de CD11b⁺ DCs semble également l'exprimer [325]. Dans le modèle transgénique *Ccr2*^{-/-}, l'incapacité des monocytes inflammatoires CCR2⁺ à migrer dans les tissus inflammatoires a été démontrée mais semble dépendre de l'antigène utilisé. Aucune étude n'a étudié la population de CD11b⁺ DC dans le modèle *Ccr2*^{-/-}, ce qui ne nous permet pas de conclure sur le rôle des monocytes inflammatoires. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle exact de ces populations.

Les DC inflammatoires se développent dans les tissus à partir des monocytes inflammatoires CCR2⁺ [141, 175]. Nous n'avons pas vérifié la perte de cette population dans le modèle *Ccr2*^{-/-} dans notre contexte d'immunisation i.d. par les VLP. Si la perte de la population est avérée, ceci suggèrera que cette population n'est pas impliquée dans la polarisation des T_{FH}. Il convient maintenant d'identifier le rôle exact des monocytes inflammatoires dans ce mécanisme. L'inflammation est cruciale pour l'activation des DC cutanées. L'inflammation au niveau du site d'injection est donc indirectement liée à la polarisation des LT CD4⁺ en T_{FH}, via la nature des DC activées. Les monocytes et DC inflammatoires sont également capables de migrer dans le ganglion drainant depuis le tissu cutané. Il est donc possible que ces cellules participent à la génération du micro-environnement inflammatoire du ganglion. En revanche, nous aurions dû nous attendre à ce que l'absence de DC inflammatoires, productrices de TNF, réduise le nombre de T_{FH} ainsi que la génération des centres germinatifs, ce qui n'est pas le cas dans nos résultats. Nos résultats préliminaires démontrent l'implication de la population de monocytes inflammatoires dans l'interférence de la réponse T_{FH}. Cependant, il convient de réaliser des expériences supplémentaires pour identifier le rôle précis de cette population dans le processus de polarisation des T_{FH}.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Résumé des objectifs et résultats obtenus
2. Le rôle de la diffusion passive de l'antigène
3. Implication des cellules cutanées dans la réponse IgA localisée au niveau du ganglion
4. La répartition de l'antigène dépend du modèle particulière utilisé
5. Comment l'inflammation module la réponse humorale ?
6. La migration des plasmocytes vers les muqueuses
7. Conclusion générale

1 Résumé des objectifs et résultats obtenus

L'objectif de ma thèse était d'identifier les mécanismes cellulaires précoces qui permettent d'initier la réponse immunitaire humorale lors de la vaccination i.d. Je me suis particulièrement intéressé à la génération de T_{FH} , un sous-type de T_H nécessaire au développement des LB à longue durée de vie et des LB mémoires. La particularité de l'immunité adaptative repose sur la présentation des antigènes exogènes par les APC aux LT et LB via les CMH de classe I et II. Les DC représentent une population cellulaire spécialisée dans la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes. De plus, il a été démontré que la nature des DC engagées lors d'une vaccination conditionne la qualité de la réponse immunitaire [12]. J'ai fait l'hypothèse qu'une population de DC cutanée serait principalement impliquée dans la polarisation des LT CD4+ naïfs en T_{FH} lors de l'immunisation i.d. J'ai utilisé un modèle antigénique à base de particules fines de PLA biodégradables sur lesquelles est adsorbée la protéine p24 du VIH-1. Ces particules possèdent une taille adaptée à la prise en charge par les DC ce qui permet ainsi de mieux les cibler [14, 15, 326] et ont déjà largement démontré leurs capacités à stimuler une réponse cellulaire et humorale [10, 300, 326-328]. En utilisant un modèle de souris transgéniques Langerin-DTR, les résultats précédemment obtenus dans le laboratoire ont démontré que les LC sont partiellement impliquées dans la génération de LT CD8+. En revanche, la réponse humorale n'a jamais été étudiée.

Pour identifier les mécanismes sous-jacents à l'initiation de la réponse humorale, mon travail de thèse a été divisé en trois axes :

(1) Le premier était d'étudier la distribution spatiale et temporelle de particules fines de PLA lors d'une injection i.d.

(2) Le second était d'identifier l'implication des différentes sous-populations de DC de la peau dans l'induction de T_{FH} , le développement des centres germinatifs ainsi que le développement de plasmocytes sécrétant des IgA.

(3) Le troisième était de déterminer le rôle de la réponse inflammatoire générée dans le ganglion drainant dans la modulation de la réponse T_{FH} .

Les résultats démontrent le potentiel des particules fines de PLA injectées par voie i.d. dans l'induction de la polarisation des LT CD4+ naïfs en T_{FH} , la formation de centres germinatifs ainsi que le développement de plasmocytes sécrétant des IgG et IgA dans le ganglion drainant. Nous avons mis en évidence l'implication des LC dans ce mécanisme.

Il est intéressant de noter que seules les LC situées dans le tissu cutané lors de l'immunisation ont été capables d'induire cette réponse, suggérant que l'activation des LC au niveau du site d'injection est une condition nécessaire. Cependant, la déplétion des LC ne diminue que de ~40% le nombre de T_{FH} . Une seconde population cellulaire semble donc également impliquée dans le mécanisme de génération des T_{FH} .

En réalisant l'ablation du site d'injection 1 heure après l'immunisation, nous avons démontré que la majorité des particules injectées diffusent vers le ganglion drainant lors de l'immunisation i.d. et sont capturées par les DC résidentes du ganglion. En revanche, l'absence du développement de T_{FH} et de plasmocytes sécrétant des IgG et IgA spécifiques de l'antigène nous indique que ces DC ne sont pas capables à elles seules d'initier la réponse humorale. Ceci confirme l'origine cutanée des DC impliquées dans la réponse humorale. Nos expériences ont également exclu le rôle des CD207+ DC dermiques mais n'ont pas permis d'identifier la ou les populations également impliquées dans la polarisation des T_{FH} . Néanmoins, la déplétion de LC réduit de ~71% le nombre de plasmocytes sécrétant des IgA. Les LCs sont donc majoritairement impliquées dans le processus global du développement des plasmocytes sécrétant des IgA.

La biodistribution spatiale et temporelle des particules fines de PLA a révélé une infiltration importante de neutrophiles et de monocytes inflammatoires au niveau du site d'injection et dans le ganglion drainant. Pour évaluer l'implication des monocytes inflammatoires CCR2+, nous avons utilisé un modèle de souris inactivé pour ce gène. Les résultats montrent que l'inactivation du gène CCR2+ augmente l'induction de T_{FH} . Ces résultats suggèrent que l'inflammation permet de moduler la réponse immunitaire humorale. En réalisant une analyse transcriptomique, nous avons cherché à définir une signature ganglionnaire favorisant la polarisation des LT CD4+ en T_{FH} , dont les résultats préliminaires suggèrent une implication de TNF.

Ensemble, ces résultats démontrent l'importance des DC cutanées ainsi que le rôle de l'inflammation locale dans le mécanisme d'initiation de la réponse immunitaire humorale après immunisation i.d.

2 Le rôle de la diffusion passive de l'antigène

L'étude de la biodistribution de l'antigène associé aux particules fines a permis de mettre en évidence leur diffusion massive et passive (non associée aux cellules) vers les ganglions drainants des tissus cutanés. Ce phénomène se produit très rapidement après l'injection et semble être le résultat de la pression exercée par le volume injecté. Le flux d'antigène libre a déjà été démontré avec un antigène soluble également injecté par voie i.d. [179]. Dans cette étude, l'antigène a diffusé dans le ganglion dès 3 minutes et 30 secondes après l'immunisation. Pape et ses collaborateurs démontrent que l'antigène est capturé par les DC présentes dans le ganglion (résidente du ganglion ou non) ainsi que par les LB. Ces deux populations cellulaires sont également capables de présenter des fragments d'antigène via leur MHC de classe II. Les auteurs concluent que la réponse humorale est initiée par les antigènes solubles qui sont capables de diffuser depuis le sinus sous capsulaire vers les follicules B sous-jacents et permettent d'activer les LB spécifiques mais naïfs. Dans une analyse de ce mécanisme, D.Tarlinton et A.Lew proposent que l'activation des LB est faite par la forme libre et non dégradé de l'antigène et l'activation des LT par le fragment antigénique présenté par les DC [329]. Cependant, les particules fines de PLA sont de taille beaucoup plus importante qu'un antigène soluble ce qui les rend moins aptes à diffuser librement à travers les tissus denses du ganglion drainant. La migration passive des particules fines et ultrafines (20-200nm) ainsi que les VLP (30nm) vers les ganglions drainants a déjà été démontrée [157], mais leurs capacités à traverser la barrière de macrophages sous capsulaire n'a pas été étudiée. En étudiant la distribution à des temps précoces, nous avons observé la présence de particules fines 15 minutes après l'injection (résultats non présentés) ainsi que la localisation des particules libres dans le follicule B dès 1 heure, suivie par une irradiation à l'intérieur du follicule au cours du temps. De plus, nous avons observé l'adsorption de particules à la surface des LB (Biodistribution - figure 5.C). Ces résultats montrent que les LB ont accès à l'antigène qui migre de façon passive à des temps précoces après injection. Cependant, nous n'avons pas étudié leur activation ainsi que leur capacité de présentation antigénique. Il serait nécessaire de le confirmer pour démontrer que les particules libres permettent l'activation précoce des LB naïfs. L'étude de V.Manolova souligne que les particules de diamètre plus important (500-2000nm) sont principalement associées avec les DC résidentes du site d'injection et sont moins aptes à migrer passivement [157]. La taille des particules est donc un élément extrêmement important pour autoriser leur migration passive vers le ganglion drainant via le réseau lymphatique et permettre l'activation des LB naïfs.

Pour connaître la proportion d'antigènes qui migre passivement et celle transportée par le flux cellulaire, nous avons injecté les particules fines de PLA dans les oreilles puis nous les avons coupé 1 heure après injection pour interrompre la migration cellulaire. Les résultats montrent un nombre similaire de cellules ayant capturé des particules en comparaison du groupe contrôle, sans ablation (Biodistribution - figure 4.C). Cependant, ces résultats se basent sur le nombre de cellules ayant capturé des particules et ne permettent pas une quantification du nombre absolue de particules dans le ganglion. Pour étudier cela, nous avons réalisé la même expérience à l'exception que les cellules ont été lysées par ultra-sonication dans le but de libérer les particules endocytées. Le lysat a été analysé par cytométrie à fluorescence en utilisant un détecteur particulaire (Small Particle Detector, Fortessa, BD). Aucune différence n'a été mise en évidence entre le groupe avec ablation et le groupe contrôle (résultats non présentés). Ces résultats montrent que la proportion des particules transportée par les cellules provenant de l'oreille est négligeable en comparaison à la proportion qui migre passivement. De plus, nous avons mis en évidence qu'un nombre important de sous-populations cellulaires différentes du ganglion drainant prennent en charge ces particules. Parmi elles, les DC résidentes du ganglion ainsi que les DC cutanées présentent dans le ganglion lors de l'injection sont capables de prendre en charges les particules (Biodistribution - figure 4.D). Pour vérifier si les DC du ganglion étaient capables d'induire une réponse immunitaire, nous avons réalisé l'ablation du site d'injection à 1 heure après immunisation i.d. pour autoriser le flux de particules libres, mais interrompre le flux cellulaire. Avec un certain étonnement, seule une faible réponse T_{FH} a été observée à 7 jours et aucun développement de plasmocytes sécrétant des IgG ou IgA spécifiques à l'antigène (article - figure 4). Nous avons vérifié ces résultats en étudiant la réponse à 14 jours après injection ainsi qu'en analysant la quantité d'anticorps spécifiques sur 1 mois (article - suppl.3 et figure 5). Aucune réponse humorale n'a été détectée sans migration cellulaire depuis le site d'injection. Ces résultats soulignent deux mécanismes : (1) les cellules de la peau sont responsables de l'initiation de la réponse et (2) les DC résidentes du ganglion sont incapables d'induire une réponse humorale.

L'idée qu'une grande quantité d'antigènes ne soit pas capable d'induire une réponse humorale nous laisse cependant perplexe. Les résultats montrent une faible réponse T_{FH} induite lors de l'ablation du site d'injection qui est significativement supérieure à la condition d'injection de PBS (article - figure 4.D). Cependant, aucun développement de plasmocytes n'est associé à cette réponse T_{FH} . Les LB présentent des fragments d'antigènes par leur MHC II, mais il a été démontré qu'ils ne sont pas capables d'induire

la polarisation des LT CD4+ [330]. En revanche, les pDC et DC CD8+ du ganglion sécrètent de l'IL-12, impliqué dans la polarisation des T_{FH}, en réponse à une infection par le cytomegalovirus murin [331, 332]. Nous pouvons donc nous poser la question : est-ce qu'une faible réponse T_{FH} est initiée par les cellules du ganglion ? Et serait-elle inhibée par un environnement inflammatoire du ganglion non propice due à l'absence de la migration des cellules inflammatoires et DC de la peau ?

L'antigène libre joue probablement un rôle dans l'initiation précoce de réponse humorale dans le ganglion en activant les LB. Les résultats transcriptomique montrent que l'antigène qui diffuse passivement active une quantité importante de gènes dans le ganglion. Il est donc impliqué dans la mise en place d'un environnement inflammatoire spécifique. Les cellules résidentes sont capables de produire un nombre important de cytokines et chimiokines [333] qui permettent de réguler le flux cellulaire ainsi que de créer un environnement spécifique. Il n'est néanmoins pas clair de savoir si cette primo-réponse dans le ganglion est favorable à la polarisation des T_{FH}. On pourrait faire l'hypothèse que l'antigène libre induit un phénomène de tolérance avant l'arrivée des APC cutanées.

3 Implication des cellules cutanées dans la réponse IgA localisée au niveau du ganglion

De nombreuses publications démontrent l'implication des LCs, *in vitro* [132, 334] et *in vivo* [128] ainsi que les cellules CD103+ chez la souris (CD207+ dermal DCs) [140] et CD141+ chez l'homme [143] dans l'induction des réponses CD8+ cytotoxiques, par leur capacité de présentation croisée via des molécules du MHC de classe I. En revanche, peu de travaux se sont intéressés aux mécanismes d'initiation de la réponse humorale après vaccination par la peau.

Il a été démontré que la vaccination cutanée permet d'induire une réponse humorale au niveau de différentes muqueuses [8-10, 335]. Cependant, ces résultats sont issus d'un modèle antigénique utilisant comme adjuvant la toxine cholérique (CT) ou la lymphotoxine d'E.coli, connue pour favoriser l'induction de réponses immunes dans les muqueuses. Plus récemment, notre groupe a montré que l'immunisation par voie t.c et i.d. avec des particules fines de PLA est capable d'induire une sécrétion d'IgA spécifique dans les sécrétions vaginales [10]. Le lien entre la vaccination par la peau et une réponse

effectrice au niveau des muqueuses est donc clairement établi. La conceptualisation de l'ensemble de ces mécanismes aboutissant à la réponse finale demande un nombre d'étapes intermédiaires important dont la première correspond à la capture de l'antigène particulaire par les différentes cellules de la peau. Nous nous sommes donc naturellement intéressés à leur implication dans l'initiation de la réponse humorale.

Nos résultats montrent que la déplétion des LC réduit de ~40% le nombre de T_{FH} dans le ganglion en utilisant des particules de PLA (article - figure 3.C). Il semble donc évident que d'autres types cellulaires soient également capables d'induire leur polarisation. Comme nous l'avons montré précédemment, le rôle des DC résidentes du ganglion semble limité, car nous n'observons qu'un très faible nombre de T_{FH} lors de l'ablation du site d'injection et aucun développement de LB sécrétant des IgA spécifique. Ces cellules favorisant le développement de T_{FH} sont donc issues du site d'injection. Nos résultats ont clairement exclu la population CD207+ DC du derme (article - figure 3.C). Nos analyses montrent une infiltration massive de cellules inflammatoires au niveau du site d'injection. La population de DC inflammatoires se développe à partir des monocytes inflammatoires CCR2+. Dans le modèle de souris *Ccr2*^{-/-}, la proportion de T_{FH} augmente en réponse à une immunisation avec des VLP (article en préparation - figure 2.A). Bien que l'absence de la population de DC inflammatoires ne soit pas été encore vérifiée dans ce modèle transgénique, ce résultat laisse supposer que les monocytes inflammatoires et les DC inflammatoires ne soient pas impliqués dans la polarisation des T_{FH} . Ensemble, ces résultats suggèrent que ces cellules inflammatoires ne soient pas directement impliquées dans la présentation antigénique et la polarisation des LT CD4+ en T_{FH} . En revanche, ceci n'exclut pas leur implication dans le mécanisme global, dont l'inflammation joue un rôle important.

Nous n'avons pas pu définir quelles autres populations sont impliquées dans la polarisation des T_{FH} . Parmi les populations de DC cutanées, il a été démontré récemment que la population de CD301b+ DC dermiques n'est pas impliquée dans la polarisation de T_{FH} dans un modèle OVA co-injecté avec CpG2216 par voie s.c. [305]. Si cette population est distincte des LC et CD207+ dDC, les auteurs n'indiquent pas de correspondance avec une population précise de DC cutanée décrites [336]. Cependant, ils estiment que cette population représente 88% des DC dermiques, correspondant à la proportion attendu de CD11b+ DC et CD11b- DC décrites par S.Henri [140]. Il serait intéressant d'utiliser leur modèle murin MGL2 (CD301b)-DTR afin d'étudier le rôle de cette population dans l'initiation de la réponse humorale dans notre modèle antigénique. La capacité des DC à

induire la polarisation en T_{FH} semble principalement due à la sécrétion des cytokines IL-6, IL-12 et IL-21 [281]. L'étude de la sécrétion de ces cytokines par les différentes populations de DC cutanées sera réalisé prochainement.

4 La répartition de l'antigène dépend du modèle particulaire utilisé

Nous avons utilisé les particules fines de PLA pour tirer avantage de leur capacité à être capturées par les DCs [337, 338]. L'étude de leur biodistribution dans un modèle d'injection i.d. a confirmé la capacité des DC résidentes de la peau à prendre en charge les particules (article 1 - figure 1.B). Les LCs et les DC CD207+ dermiques ont montré une meilleure capacité en comparaison des sous-populations hétérogènes CD11b+ DC et CD11b- DCs (article 1 - figure 1.C). Nous pouvons imaginer que l'implication des LC dans la réponse T_{FH} provient en partie de leur capacité à capturer une quantité plus importante de particules que les populations CD207-. En utilisant un modèle antigénique MVA, C.Liard et ses collaborateurs ont mis en évidence la capacité des LCs situées dans l'épiderme à migrer vers le derme, à proximité des zones d'injections [122]. Cette capacité des LCs explique en partie l'augmentation du nombre de LCs PLA+ observée dans les résultats (article 1 - figure 1.B). En revanche, il est difficile d'expliquer pourquoi les LCs et CD207+ DCs capturent plus de particules que les autres cellules dendritiques. Il serait intéressant d'en connaître les raisons dans le but d'améliorer les propriétés physico-chimiques des particules afin de cibler plus spécifiquement les LC pour augmenter la réponse T_{FH} .

En étudiant la distribution spatiale et temporelle de l'antigène fixé sur des particules de PLA, nous avons voulu modéliser le flux d'antigènes à travers les différentes sous-populations cellulaires pour supposer leurs degrés d'implication dans le mécanisme de présentation antigénique. En comparant les données de biodistribution entre les PLA et les VLP (données préliminaires non publiées), nous observons des différences évidentes dans la prise en charge des particules ainsi que dans le recrutement de cellules inflammatoires. Lors de l'injection de particules de PLA, les DC cutanées PLA+ représentent 30% des cellules totales PLA+ à 2 heures et 48 heures après injection. En comparaison, elles représentent 5% et 8% respectivement pour le modèle particulaire VLP. Ceci démontre une meilleure capacité des DCs à capturer les particules de PLA en comparaison des VLP. Cependant, les résultats des VLP ne sont issus que d'une unique

expérience. De plus, les résultats n'ont pas été obtenus au sein de la même expérience et présentent donc certains biais expérimentaux. Parmi eux, les volumes utilisés sont différents : 50 μ L pour les particules de PLA en une injection contre 2 fois 40 μ L pour les VLP en 2 injections séparées par 24 heures. Cependant, ceci ne semble pas pouvoir expliquer une différence aussi importante dans la répartition de prise en charge cellulaire. Nous nous sommes donc intéressés à l'induction de l'infiltration inflammatoire qui est stimulée par l'antigène particulaire. Les résultats montrent l'importance des neutrophiles dans la capture des particules, car ils représentent 80% et 60% des cellules ayant absorbé des particules à 8 heures après injection pour les VLP et les particules de PLA respectivement. Dans les 2 cas, nous observons la présence de monocytes inflammatoires dans le tissu cutané à des temps très précoces. Cette population représente 18% des cellules ayant absorbé des particules pour les PLA contre 38% pour les VLP. De même, les macrophages représentent 15% pour les particules de PLA contre 44% pour les VLP. Il semble que les VLP induisent une infiltration plus importante de cellules inflammatoires. Il est possible que cette différence de biodistribution précoce se traduise par une réponse immunitaire modifiée et des mécanismes différents.

Il est de ce fait évident que l'inflammation locale joue un rôle prépondérant dans l'initiation de la réponse immunitaire. Aujourd'hui, les recherches se focalisent principalement sur l'implication des DC car leurs capacités à présenter les antigènes exogènes en font la cible idéale des vaccins. De nombreuses études utilisent donc des antigènes couplés à des anticorps spécifiques de certaines populations de DC pour adresser l'antigène spécifiquement à ces cellules [339, 340]. Cependant, peu s'intéressent à l'inflammation induite en parallèle. Pourtant, il a été montré que les macrophages et les monocytes inflammatoires modulent la réponse immunitaire dans certaines conditions [341-343].

5 Comment l'inflammation module la réponse humorale ?

Pour déterminer quelles seraient les molécules favorisant l'induction des T_{FH} , nous avons réalisé une étude transcriptomique du ganglion dans le but d'identifier une signature moléculaire caractéristique. Les résultats préliminaires montrent que le TNF semble être un élément important dans la polarisation des LT CD4⁺ en T_{FH} . Le TNF est impliqué dans de nombreux mécanismes associés au T_{FH} . Nous devons donc étudier plus précisément le rôle du TNF dans notre modèle pour déterminer son implication dans le

mécanisme d'initiation de la réponse humorale. Le but serait de favoriser la production de TNF au niveau du ganglion par les cellules inflammatoires. Les DC inflammatoires, les macrophages et les neutrophiles produisent du TNF- α . Il convient donc d'étudier l'impact de leurs migrations dans les ganglions dans la génération de l'environnement TNF.

En utilisant les VPL (article en préparation, figure 2.A), nos résultats montrent que l'absence de cellules CCR2⁺ augmente le nombre de T_{FH}. Dans une publication récente de A. Mitchell, les auteurs démontrent également l'impact d'un antagoniste de CCR2 dans l'augmentation de la réponse immunitaire [307], ce qui confirme nos résultats. En revanche la qualité de la réponse n'a pas été étudiée. Notre hypothèse est que l'inflammation est essentielle, tant au niveau du site d'injection pour l'activation des DC qu'au niveau du ganglion drainant, pour induire un micro-environnement inflammatoire favorable à la polarisation des LT CD4⁺ en T_{FH}.

6 La migration des plasmocytes vers les muqueuses

Lors de nos expériences, nous avons étudié la réponse humorale dans la muqueuse vaginale en évaluant la quantité d'anticorps IgG et IgA anti-p24 présents dans les sécrétions vaginales (article - figure 5). Nous avons observé la présence d'IgG après l'immunisation i.d. mais l'absence de sécrétion d'IgA. Cependant, il est possible que le niveau soit non détectable par la méthode ELISA utilisée. Dans la publication de Liard et coll, la sécrétion d'IgA dans les sécrétions vaginales est observée en utilisant 2 injections réalisées à 1 mois d'intervalle, qui a pour effet de restimuler la réponse humorale et ainsi d'obtenir un niveau détectable d'IgA [10]. La co-injection de CT avec un antigène permet également de stimuler la réponse anticorps dans un site distal lors d'une immunisation i.d [9]. Cependant, les mécanismes permettant ce lien entre les tissus ne sont pas clairs. L'étude du GALT montre l'implication de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et de la chimiokine CCR9 dans la relocalisation des LB des plaques de Peyer vers la muqueuse digestive [344, 345]. En revanche, la relocalisation vers les muqueuses génitales semble être dépendante de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ et de la chimiokine CCR10 [346, 347]. Il est donc nécessaire d'étudier dans notre modèle la capacité de la première immunisation à induire l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ et CCR10 par les plasmocytes IgA⁺ générés, ainsi que d'évaluer si la nature des DC engagées dans l'initiation de la réponse est déterminante dans l'expression des intégrines et des chimiokines. Cette étape de

migration des LB vers les muqueuses représente la dernière étape du mécanisme et nécessite d'être étudié pour savoir si les différentes populations de DC, ou le contexte inflammatoire du ganglion permet d'induire l'expression des intégrines par les LB, et donc de participer au contrôle de la migration des LB vers la muqueuse vaginale.

7 Conclusion générale

La muqueuse génitale représente le site d'entrée principal des virus sexuellement transmissibles tels que le VIH. Il est maintenant largement admis que la génération d'anticorps neutralisants muqueux réduit considérablement le risque de transmission. Il est donc essentiel de développer un vaccin capable d'induire une réponse humorale localisée aux niveaux des muqueuses vaginal et rectal. L'administration d'un antigène par la voie cutanée permet d'induire la production d'anticorps sécrétoires IgA et IgG dans des muqueuses distantes ainsi que la production d'Ig systémiques, contrairement à la vaccination i.m et s.c. qui induit une réponse restreinte à la sécrétion d'IgG systémiques. Cependant, la relation immunitaire entre la réponse effectrice dans une muqueuse distale et le site d'immunisation est encore mal décrite. Ma thèse s'est directement inscrite dans cette thématique en montrant le potentiel des LC de l'épiderme à induire la polarisation des T_H en T_{FH} et générer des plasmocytes IgA dans les ganglions drainants. Ces résultats permettent de repenser le modèle antigénique et la voie d'injection utilisée en vaccination dans le but d'orienter et de contrôler la réponse immunitaire.

Mon travail de thèse est basé sur des études *in vivo* chez la souris ce qui a permis d'étudier les mécanismes de présentation antigénique en prenant en compte toute la complexité du système immunitaire, dont l'implication des cellules inflammatoires, ce que ne permettent pas les modèles *in vitro*. En revanche, l'immunité cutanée humaine présente de légères différences comparées au modèle murin. Nous pouvons donc nous poser la question de savoir si les mécanismes décrits chez la souris seront similaires chez l'homme.

Le rôle principal de la vaccination étant de générer une mémoire immunitaire, il serait intéressant pour la suite de ce projet d'étudier non plus l'initiation de la réponse, mais la génération de LB mémoires et T_{FH} mémoires. Bien que l'existence de cette population soit débattue, il semblerait que le potentiel des T_{FH} mémoires leur permettrait de jouer un rôle décisif dans le rappel de l'immunité humorale lors d'une infection. Contrôler la réponse immunitaire lors de la vaccination est une nécessité pour concevoir de nouveaux vaccins efficaces contre le VIH. Pour cela, il est important de continuer nos efforts sur la compréhension du système immunitaire et le développement de nouvelles technologies améliorant la distribution de la préparation vaccinale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
2. UNAIDS, *Global Reports*. 2013: p. 198.
3. Girard, M.P., S.K. Osmanov, and M.P. Kieny, *A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV)*. Vaccine, 2006. **24**(19): p. 4062-81.
4. Rerks-Ngarm, S., et al., *Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand*. N Engl J Med, 2009. **361**(23): p. 2209-20.
5. Fowke, K.R., et al., *Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya*. Lancet, 1996. **348**(9038): p. 1347-51.
6. Bomsel, M., et al., *Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges*. Immunity, 2011. **34**(2): p. 269-80.
7. Hessel, A.J., et al., *Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 951-4.
8. Belyakov, I.M., et al., *Transcutaneous immunization induces mucosal CTLs and protective immunity by migration of primed skin dendritic cells*. J Clin Invest, 2004. **113**(7): p. 998-1007.
9. Hervouet, C., et al., *Sublingual immunization with an HIV subunit vaccine induces antibodies and cytotoxic T cells in the mouse female genital tract*. Vaccine, 2010. **28**(34): p. 5582-90.
10. Liard, C., et al., *Targeting of HIV-p24 particle-based vaccine into differential skin layers induces distinct arms of the immune responses*. Vaccine, 2011. **29**(37): p. 6379-91.
11. Leroux-Roels, G., et al., *Randomized Phase I: Safety, Immunogenicity and Mucosal Antiviral Activity in Young Healthy Women Vaccinated with HIV-1 Gp41 P1 Peptide on Virosomes*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55438.
12. Palucka, K. and J. Banchereau, *Human dendritic cell subsets in vaccination*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(3): p. 396-402.
13. Segura, E. and S. Amigorena, *Cross-presentation by human dendritic cell subsets*. Immunol Lett, 2014. **158**(1-2): p. 73-78.
14. Barth, H., et al., *Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells*. Blood, 2005. **105**(9): p. 3605-14.

15. Rancan, F., et al., *Particle-based transcutaneous administration of HIV-1 p24 protein to human skin explants and targeting of epidermal antigen presenting cells*. J Control Release, 2014. **176**: p. 115-22.
16. Brandtzaeg, P., *Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions*. Scand J Immunol, 2009. **70**(6): p. 505-15.
17. Neutra, M.R., E. Pringault, and J.P. Kraehenbuhl, *Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 275-300.
18. Peeters, M., C. Toure-Kane, and J.N. Nkengasong, *Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials*. AIDS, 2003. **17**(18): p. 2547-60.
19. Gallo, R.C., et al., *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 500-3.
20. Briggs, J.A., et al., *Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores*. EMBO J, 2003. **22**(7): p. 1707-15.
21. Welker, R., et al., *Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1168-77.
22. Engelman, A. and P. Cherepanov, *The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(4): p. 279-90.
23. Bailey, R.C., et al., *Male circumcision for HIV prevention in young men in Kisumu, Kenya: a randomised controlled trial*. Lancet, 2007. **369**(9562): p. 643-56.
24. Grant, R.M., et al., *Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men*. N Engl J Med, 2010. **363**(27): p. 2587-99.
25. Cohen, M.S., et al., *Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy*. N Engl J Med, 2011. **365**(6): p. 493-505.
26. Smith, D.K., et al., *Antiretroviral postexposure prophylaxis after sexual, injection-drug use, or other nonoccupational exposure to HIV in the United States: recommendations from the U.S. Department of Health and Human Services*. MMWR Recomm Rep, 2005. **54**(RR-2): p. 1-20.
27. Sagar, M., *HIV-1 transmission biology: selection and characteristics of infecting viruses*. J Infect Dis, 2010. **202** Suppl 2: p. S289-96.

28. Howell, A.L., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 infection of cells and tissues from the upper and lower human female reproductive tract*. J Virol, 1997. **71**(5): p. 3498-506.
29. McCoombe, S.G. and R.V. Short, *Potential HIV-1 target cells in the human penis*. AIDS, 2006. **20**(11): p. 1491-5.
30. Dinh, M.H., et al., *No difference in keratin thickness between inner and outer foreskins from elective male circumcisions in Rakai, Uganda*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41271.
31. Gupta, P., et al., *Memory CD4(+) T cells are the earliest detectable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system*. J Virol, 2002. **76**(19): p. 9868-76.
32. Zhu, T., et al., *Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission*. J Virol, 1996. **70**(5): p. 3098-107.
33. Maher, D., et al., *HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(32): p. 11504-9.
34. Wu, Z., Z. Chen, and D.M. Phillips, *Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ Cells: implications for mechanisms of sexual transmission*. J Infect Dis, 2003. **188**(10): p. 1473-82.
35. Stoddard, E., et al., *gp340 expressed on human genital epithelia binds HIV-1 envelope protein and facilitates viral transmission*. J Immunol, 2007. **179**(5): p. 3126-32.
36. Hu, J., M.B. Gardner, and C.J. Miller, *Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells*. J Virol, 2000. **74**(13): p. 6087-95.
37. Johansson, E.L., et al., *Distribution of lymphocytes and adhesion molecules in human cervix and vagina*. Immunology, 1999. **96**(2): p. 272-7.
38. Hladik, F., et al., *Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1*. Immunity, 2007. **26**(2): p. 257-70.
39. Kawamura, T., et al., *Candidate microbicides block HIV-1 infection of human immature Langerhans cells within epithelial tissue explants*. J Exp Med, 2000. **192**(10): p. 1491-500.

40. Kawamura, T., et al., *Significant virus replication in Langerhans cells following application of HIV to abraded skin: relevance to occupational transmission of HIV*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3297-304.
41. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells*. Cell, 2000. **100**(5): p. 587-97.
42. Cummins, J.E., Jr., et al., *Preclinical testing of candidate topical microbicides for anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and tissue toxicity in a human cervical explant culture*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(5): p. 1770-9.
43. Bhoopat, L., et al., *In vivo identification of Langerhans and related dendritic cells infected with HIV-1 subtype E in vaginal mucosa of asymptomatic patients*. Mod Pathol, 2001. **14**(12): p. 1263-9.
44. Spira, A.I., et al., *Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques*. J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 215-25.
45. Collins, K.B., et al., *Development of an in vitro organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 475-9.
46. Meng, G., et al., *Lamina propria lymphocytes, not macrophages, express CCR5 and CXCR4 and are the likely target cell for human immunodeficiency virus type 1 in the intestinal mucosa*. J Infect Dis, 2000. **182**(3): p. 785-91.
47. Sharova, N., et al., *Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans*. EMBO J, 2005. **24**(13): p. 2481-9.
48. Haase, A.T., *Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions*. Annu Rev Med, 2011. **62**: p. 127-39.
49. Finzi, D., et al., *Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy*. Nat Med, 1999. **5**(5): p. 512-7.
50. Rambaut, A., et al., *The causes and consequences of HIV evolution*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(1): p. 52-61.
51. Flynn, N.M., et al., *Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection*. J Infect Dis, 2005. **191**(5): p. 654-65.
52. Pitisuttithum, P., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein*

- 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand.* J Infect Dis, 2006. **194**(12): p. 1661-71.
53. Buchbinder, S.P., et al., *Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial.* Lancet, 2008. **372**(9653): p. 1881-93.
 54. Benlahrech, A., et al., *Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(47): p. 19940-5.
 55. Schmitz, J.E., et al., *Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes.* Science, 1999. **283**(5403): p. 857-60.
 56. Stephenson, K.E., et al., *Gag-specific cellular immunity determines in vitro viral inhibition and in vivo virologic control following simian immunodeficiency virus challenges of vaccinated rhesus monkeys.* J Virol, 2012. **86**(18): p. 9583-9.
 57. Liu, J., et al., *Immune control of an SIV challenge by a T-cell-based vaccine in rhesus monkeys.* Nature, 2009. **457**(7225): p. 87-91.
 58. Goonetilleke, N., et al., *The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection.* J Exp Med, 2009. **206**(6): p. 1253-72.
 59. Sacha, J.B., et al., *Gag- and Nef-specific CD4+ T cells recognize and inhibit SIV replication in infected macrophages early after infection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9791-6.
 60. Bonsignori, M., et al., *HIV-1 antibodies from infection and vaccination: insights for guiding vaccine design.* Trends Microbiol, 2012. **20**(11): p. 532-9.
 61. Wyatt, R., et al., *The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein.* Nature, 1998. **393**(6686): p. 705-11.
 62. Zhou, T., et al., *Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120.* Nature, 2007. **445**(7129): p. 732-7.
 63. Walker, L.M. and D.R. Burton, *Rational antibody-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions.* Curr Opin Immunol, 2010. **22**(3): p. 358-66.
 64. Walker, L.M., et al., *Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target.* Science, 2009. **326**(5950): p. 285-9.

65. Cerutti, A., *The regulation of IgA class switching*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 421-34.
66. Eriksson, K., et al., *Specific-antibody-secreting cells in the rectums and genital tracts of nonhuman primates following vaccination*. Infect Immun, 1998. **66**(12): p. 5889-96.
67. Kozlowski, P.A., et al., *Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle*. J Immunol, 2002. **169**(1): p. 566-74.
68. Veazey, R.S., et al., *Prevention of virus transmission to macaque monkeys by a vaginally applied monoclonal antibody to HIV-1 gp120*. Nat Med, 2003. **9**(3): p. 343-6.
69. Moog, C., et al., *Protective effect of vaginal application of neutralizing and nonneutralizing inhibitory antibodies against vaginal SHIV challenge in macaques*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(1): p. 46-56.
70. Pillai, S., A. Cariappa, and S.T. Moran, *Marginal zone B cells*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 161-96.
71. Lopes-Carvalho, T. and J.F. Kearney, *Development and selection of marginal zone B cells*. Immunol Rev, 2004. **197**: p. 192-205.
72. Cerutti, A., M. Cols, and I. Puga, *Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 118-32.
73. Tarlinton, D. and K. Good-Jacobson, *Diversity among memory B cells: origin, consequences, and utility*. Science, 2013. **341**(6151): p. 1205-11.
74. Tangye, S.G. and D.M. Tarlinton, *Memory B cells: effectors of long-lived immune responses*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2065-75.
75. 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.
76. Slifka, M.K., et al., *Humoral immunity due to long-lived plasma cells*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 363-72.
77. Sze, D.M., et al., *Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival*. J Exp Med, 2000. **192**(6): p. 813-21.
78. Shaffer, A.L., et al., *Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program*. Immunity, 2002. **17**(1): p. 51-62.

79. Cassese, G., et al., *Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals.* J Immunol, 2003. **171**(4): p. 1684-90.
80. Tangye, S.G., et al., *Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses.* J Immunol, 2003. **170**(2): p. 686-94.
81. Williams, M.B., et al., *The memory B cell subset responsible for the secretory IgA response and protective humoral immunity to rotavirus expresses the intestinal homing receptor, alpha4beta7.* J Immunol, 1998. **161**(8): p. 4227-35.
82. Hauser, A.E., et al., *Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response.* J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1277-82.
83. Kunkel, E.J. and E.C. Butcher, *Plasma-cell homing.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 822-9.
84. Lazarus, N.H., et al., *A common mucosal chemokine (mucosa-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasmablasts.* J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3799-805.
85. Abonia, J.P., et al., *Alpha-4 integrins and VCAM-1, but not MAdCAM-1, are essential for recruitment of mast cell progenitors to the inflamed lung.* Blood, 2006. **108**(5): p. 1588-94.
86. Sciammas, R. and M.M. Davis, *Modular nature of Blimp-1 in the regulation of gene expression during B cell maturation.* J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5427-40.
87. Kanazawa, T., et al., *Local gene expression and immune responses of vaginal DNA vaccination using a needle-free injector.* Int J Pharm, 2010. **396**(1-2): p. 11-6.
88. Wegmann, F., et al., *A novel strategy for inducing enhanced mucosal HIV-1 antibody responses in an anti-inflammatory environment.* PLoS One, 2011. **6**(1): p. e15861.
89. Buge, S.L., et al., *An adenovirus-simian immunodeficiency virus env vaccine elicits humoral, cellular, and mucosal immune responses in rhesus macaques and decreases viral burden following vaginal challenge.* J Virol, 1997. **71**(11): p. 8531-41.
90. Chang, S.Y., et al., *Cutting edge: Langerin+ dendritic cells in the mesenteric lymph node set the stage for skin and gut immune system cross-talk.* J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4361-5.

91. Bergquist, C., et al., *Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina*. Infect Immun, 1997. **65**(7): p. 2676-84.
92. Berry, L.J., et al., *Transcutaneous immunization with combined cholera toxin and CpG adjuvant protects against Chlamydia muridarum genital tract infection*. Infect Immun, 2004. **72**(2): p. 1019-28.
93. Sumida, S.M., et al., *Recruitment and expansion of dendritic cells in vivo potentiate the immunogenicity of plasmid DNA vaccines*. J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1334-42.
94. Torres, C.A., et al., *Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations*. J Immunol, 1997. **158**(10): p. 4529-32.
95. Kupper, T.S. and R.C. Fuhlbrigge, *Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 211-22.
96. Dakappagari, N., et al., *Internalizing antibodies to the C-type lectins, L-SIGN and DC-SIGN, inhibit viral glycoprotein binding and deliver antigen to human dendritic cells for the induction of T cell responses*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 426-40.
97. Ni, L., et al., *Concomitant activation and antigen uptake via human dectin-1 results in potent antigen-specific CD8⁺ T cell responses*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3504-13.
98. Flacher, V., et al., *Targeting of epidermal Langerhans cells with antigenic proteins: attempts to harness their properties for immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(7): p. 1137-47.
99. Streilein, J.W., *Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions*. J Invest Dermatol, 1983. **80** Suppl: p. 12s-16s.
100. Bos, J.D., et al., *The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin*. J Invest Dermatol, 1987. **88**(5): p. 569-73.
101. Van den Broeck, W., A. Derore, and P. Simoons, *Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice*. J Immunol Methods, 2006. **312**(1-2): p. 12-9.

102. Kubo, A., et al., *External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 2937-46.
103. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. Exp Dermatol, 2008. **17**(12): p. 1063-72.
104. Iozzo, R.V., *Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(8): p. 646-56.
105. Breitkreutz, D., N. Mirancea, and R. Nischt, *Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions?* Histochem Cell Biol, 2009. **132**(1): p. 1-10.
106. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 978-85.
107. Nestle, F.O. and B.J. Nickoloff, *Dermal dendritic cells are important members of the skin immune system*. Adv Exp Med Biol, 1995. **378**: p. 111-6.
108. Nicolas, J.F. and B. Guy, *Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice*. Expert Rev Vaccines, 2008. **7**(8): p. 1201-14.
109. Platt, A.M., et al., *Normal dendritic cell mobilization to lymph nodes under conditions of severe lymphatic hypoplasia*. J Immunol, 2013. **190**(9): p. 4608-20.
110. Gudjonsson, J.E., et al., *Mouse models of psoriasis*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(6): p. 1292-308.
111. Girard, J.P., C. Moussion, and R. Forster, *HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(11): p. 762-73.
112. Ohmann, H.B., *Electron microscopic study of the paracortical postcapillary "high endothelial venules" in lymph nodes of the normal calf*. Cell Tissue Res, 1980. **212**(3): p. 465-74.
113. Forster, R., A.C. Davalos-Missslitz, and A. Rot, *CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 362-71.
114. Bajenoff, M., et al., *Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 989-1001.
115. Tomura, M., et al., *Monitoring cellular movement in vivo with photoconvertible fluorescence protein "Kaede" transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): p. 10871-6.

116. Carrasco, Y.R. and F.D. Batista, *B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 160-71.
117. Gray, E.E. and J.G. Cyster, *Lymph node macrophages*. J Innate Immun, 2012. **4**(5-6): p. 424-36.
118. Guillemins, M., et al., *From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets*. Eur J Immunol, 2010. **40**(8): p. 2089-94.
119. Schlitzer, A. and F. Ginhoux, *Organization of the mouse and human DC network*. Curr Opin Immunol, 2014. **26C**: p. 90-99.
120. Liu, K., et al., *Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 578-83.
121. Udey, M.C., *Langerhans cells on guard in the epidermis: poised to dSEARCH and ...?* J Invest Dermatol, 2006. **126**(4): p. 705-7.
122. Liard, C., et al., *Intradermal immunization triggers epidermal Langerhans cell mobilization required for CD8 T-cell immune responses*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(3 Pt 1): p. 615-25.
123. Hoeffel, G., et al., *Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages*. J Exp Med, 2012. **209**(6): p. 1167-81.
124. Merad, M., et al., *Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1135-41.
125. Kaplan, D.H., et al., *Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells*. J Exp Med, 2007. **204**(11): p. 2545-52.
126. Ginhoux, F., et al., *Langerhans cells arise from monocytes in vivo*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 265-73.
127. Dieu-Nosjean, M.C., et al., *Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors*. J Exp Med, 2000. **192**(5): p. 705-18.
128. Kissenpfennig, A., et al., *Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 643-54.
129. Bennett, C.L., et al., *Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity*. J Cell Biol, 2005. **169**(4): p. 569-76.

130. Allan, R.S., et al., *Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells*. Science, 2003. **301**(5641): p. 1925-8.
131. Jones, C.A., et al., *Herpes simplex virus type 2 induces rapid cell death and functional impairment of murine dendritic cells in vitro*. J Virol, 2003. **77**(20): p. 11139-49.
132. Klechevsky, E., et al., *Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 497-510.
133. Geissmann, F., et al., *Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin*. J Exp Med, 2002. **196**(4): p. 417-30.
134. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
135. van der Aar, A.M., et al., *Vitamin D3 targets epidermal and dermal dendritic cells for induction of distinct regulatory T cells*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(6): p. 1532-40 e7.
136. Ginhoux, F., et al., *Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state*. J Exp Med, 2007. **204**(13): p. 3133-46.
137. Bedoui, S., et al., *Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(5): p. 488-95.
138. Elnekave, M., et al., *Directly transfected langerin+ dermal dendritic cells potentiate CD8+ T cell responses following intradermal plasmid DNA immunization*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3463-71.
139. Furmanov, K., et al., *The role of skin-derived dendritic cells in CD8+ T cell priming following immunization with lentivectors*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 4889-97.
140. Henri, S., et al., *CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells*. J Exp Med, 2010. **207**(1): p. 189-206.
141. Tamoutounour, S., et al., *Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin*. Immunity, 2013. **39**(5): p. 925-38.
142. Collin, M., N. McGovern, and M. Haniffa, *Human dendritic cell subsets*. Immunology, 2013. **140**(1): p. 22-30.

143. Haniffa, M., et al., *Human tissues contain CD141^{hi} cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103⁺ nonlymphoid dendritic cells*. Immunity, 2012. **37**(1): p. 60-73.
144. Reizis, B., et al., *Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 163-83.
145. Baranek, T., N. Zucchini, and M. Dalod, *Plasmacytoid dendritic cells and the control of herpesvirus infections*. Viruses, 2009. **1**(3): p. 383-419.
146. Mikszta, J.A. and P.E. Laurent, *Cutaneous delivery of prophylactic and therapeutic vaccines: historical perspective and future outlook*. Expert Rev Vaccines, 2008. **7**(9): p. 1329-39.
147. Combadiere, B. and C. Liard, *Transcutaneous and intradermal vaccination*. Hum Vaccin, 2011. **7**(8): p. 811-27.
148. Jiang, W., et al., *Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(3): p. 391-410.
149. Shive, M.S. and J.M. Anderson, *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. Adv Drug Deliv Rev, 1997. **28**(1): p. 5-24.
150. Wilschut, J., *Influenza vaccines: the virosome concept*. Immunol Lett, 2009. **122**(2): p. 118-21.
151. Akahata, W., et al., *A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection*. Nat Med, 2010. **16**(3): p. 334-8.
152. Schellenbacher, C., et al., *Efficacy of RG1-VLP vaccination against infections with genital and cutaneous human papillomaviruses*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(12): p. 2706-13.
153. Lamalle-Bernard, D., et al., *Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity*. J Control Release, 2006. **115**(1): p. 57-67.
154. Guillon, C., et al., *Formulation of HIV-1 Tat and p24 antigens by PLA nanoparticles or MF59 impacts the breadth, but not the magnitude, of serum and faecal antibody responses in rabbits*. Vaccine, 2007. **25**(43): p. 7491-501.
155. Standardization, I.O.f., *Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplate*, 1998.

156. Xiang, S.D., et al., *Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter?* Methods, 2006. **40**(1): p. 1-9.
157. Manolova, V., et al., *Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size.* Eur J Immunol, 2008. **38**(5): p. 1404-13.
158. Nixon, D.F., et al., *Synthetic peptides entrapped in microparticles can elicit cytotoxic T cell activity.* Vaccine, 1996. **14**(16): p. 1523-30.
159. Bachmann, M.F. and G.T. Jennings, *Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(11): p. 787-96.
160. Tabata, Y. and Y. Ikada, *Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage.* Biomaterials, 1988. **9**(4): p. 356-62.
161. Koppolu, B. and D.A. Zaharoff, *The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells.* Biomaterials, 2013. **34**(9): p. 2359-69.
162. He, C., et al., *Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles.* Biomaterials, 2010. **31**(13): p. 3657-66.
163. Blander, J.M. and R. Medzhitov, *Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors.* Science, 2004. **304**(5673): p. 1014-8.
164. Romani, N., et al., *Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells.* J Exp Med, 1989. **169**(3): p. 1169-78.
165. Nestle, F.O., et al., *Human dermal dendritic cells process and present soluble protein antigens.* J Invest Dermatol, 1998. **110**(5): p. 762-6.
166. Cunningham, A.L., et al., *Viruses and Langerhans cells.* Immunol Cell Biol, 2010. **88**(4): p. 416-23.
167. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
168. Cumberbatch, M., R.J. Dearman, and I. Kimber, *Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 beta for migration.* Adv Exp Med Biol, 1997. **417**: p. 125-8.

169. Abadie, V., et al., *Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after Mycobacterium bovis BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1843-50.
170. Duffy, D., et al., *Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8+ T cells*. Immunity, 2012. **37**(5): p. 917-29.
171. Sunderkotter, C., et al., *Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4410-7.
172. Langlet, C., et al., *CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization*. J Immunol, 2012. **188**(4): p. 1751-60.
173. Wollenberg, A., et al., *Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(2): p. 327-34.
174. Segura, E. and S. Amigorena, *Inflammatory dendritic cells in mice and humans*. Trends Immunol, 2013. **34**(9): p. 440-5.
175. Serbina, N.V., et al., *TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 59-70.
176. Dominguez, P.M. and C. Ardavin, *Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 90-104.
177. Leon, B., M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin, *Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania*. Immunity, 2007. **26**(4): p. 519-31.
178. Le Borgne, M., et al., *Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 191-201.
179. Pape, K.A., et al., *The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles*. Immunity, 2007. **26**(4): p. 491-502.
180. Sixt, M., et al., *The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node*. Immunity, 2005. **22**(1): p. 19-29.
181. Itano, A.A. and M.K. Jenkins, *Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node*. Nat Immunol, 2003. **4**(8): p. 733-9.

182. Ouwehand, K., et al., *CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis*. Eur J Immunol, 2008. **38**(11): p. 3050-9.
183. Randolph, G.J., G. Sanchez-Schmitz, and V. Angeli, *Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances*. Springer Semin Immunopathol, 2005. **26**(3): p. 273-87.
184. Ioffreda, M.D., D. Whitaker, and G.F. Murphy, *Mast cell degranulation upregulates alpha 6 integrins on epidermal Langerhans cells*. J Invest Dermatol, 1993. **101**(2): p. 150-4.
185. Ratzinger, G., et al., *Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4361-71.
186. Johnson, L.A., et al., *An inflammation-induced mechanism for leukocyte transmigration across lymphatic vessel endothelium*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2763-77.
187. Braun, A., et al., *Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration*. Nat Immunol, 2011. **12**(9): p. 879-87.
188. Lammermann, T., et al., *Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 51-5.
189. Bajenoff, M., S. Granjeaud, and S. Guerder, *The strategy of T cell antigen-presenting cell encounter in antigen-draining lymph nodes revealed by imaging of initial T cell activation*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 715-24.
190. Lindquist, R.L., et al., *Visualizing dendritic cell networks in vivo*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1243-50.
191. Shklovskaya, E., B. Roediger, and B. Fazekas de St Groth, *Epidermal and dermal dendritic cells display differential activation and migratory behavior while sharing the ability to stimulate CD4+ T cell proliferation in vivo*. J Immunol, 2008. **181**(1): p. 418-30.
192. Kissenpfennig, A. and B. Malissen, *Langerhans cells--revisiting the paradigm using genetically engineered mice*. Trends Immunol, 2006. **27**(3): p. 132-9.
193. Davis, M.M., *T cell receptor gene diversity and selection*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 475-96.

194. Jenkins, M.K., et al., *In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 23-45.
195. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 445-89.
196. Tangye, S.G., et al., *The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(6): p. 412-26.
197. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. **100**(6): p. 655-69.
198. Kaplan, M.H., et al., *Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice*. Nature, 1996. **382**(6587): p. 174-7.
199. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 549-57.
200. Milpied, P.J. and M.G. McHeyzer-Williams, *High-affinity IgA needs TH17 cell functional plasticity*. Nat Immunol, 2013. **14**(4): p. 313-5.
201. Smith, K.M., et al., *In vivo generated Th1 cells can migrate to B cell follicles to support B cell responses*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1640-6.
202. Fazilleau, N., et al., *Follicular helper T cells: lineage and location*. Immunity, 2009. **30**(3): p. 324-35.
203. Cyster, J.G., *B cell follicles and antigen encounters of the third kind*. Nat Immunol, 2010. **11**(11): p. 989-96.
204. Junt, T., et al., *Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells*. Nature, 2007. **450**(7166): p. 110-4.
205. Suzuki, K., et al., *Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells*. J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1485-93.
206. Qi, H., et al., *Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells*. Science, 2006. **312**(5780): p. 1672-6.
207. Clark, S.L., Jr., *The reticulum of lymph nodes in mice studied with the electron microscope*. Am J Anat, 1962. **110**: p. 217-57.
208. Batista, F.D. and N.E. Harwood, *The who, how and where of antigen presentation to B cells*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(1): p. 15-27.

209. Harwood, N.E. and F.D. Batista, *Early events in B cell activation*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 185-210.
210. Lankar, D., et al., *Dynamics of major histocompatibility complex class II compartments during B cell receptor-mediated cell activation*. J Exp Med, 2002. **195**(4): p. 461-72.
211. Yuseff, M.I., et al., *Polarized secretion of lysosomes at the B cell synapse couples antigen extraction to processing and presentation*. Immunity, 2011. **35**(3): p. 361-74.
212. Le Roux, D., et al., *Syk-dependent actin dynamics regulate endocytic trafficking and processing of antigens internalized through the B-cell receptor*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(9): p. 3451-62.
213. Pereira, J.P., et al., *EBI2 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1122-6.
214. Kelly, L.M., et al., *EBI2 guides serial movements of activated B cells and ligand activity is detectable in lymphoid and nonlymphoid tissues*. J Immunol, 2011. **187**(6): p. 3026-32.
215. Reif, K., et al., *Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position*. Nature, 2002. **416**(6876): p. 94-9.
216. Shapiro-Shelef, M., et al., *Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells*. Immunity, 2003. **19**(4): p. 607-20.
217. Lin, K.I., et al., *Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(13): p. 4771-80.
218. Dubois, B., et al., *Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2223-31.
219. Luther, S.A., et al., *Viral superantigen drives extrafollicular and follicular B cell differentiation leading to virus-specific antibody production*. J Exp Med, 1997. **185**(3): p. 551-62.
220. Cunningham, A.F., et al., *Salmonella induces a switched antibody response without germinal centers that impedes the extracellular spread of infection*. J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6200-7.
221. Ho, F., et al., *Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations*. Eur J Immunol, 1986. **16**(10): p. 1297-301.
222. MacLennan, I.C., et al., *Extrafollicular antibody responses*. Immunol Rev, 2003. **194**: p. 8-18.

223. McHeyzer-Williams, L.J., D.J. Driver, and M.G. McHeyzer-Williams, *Germinal center reaction*. Curr Opin Hematol, 2001. 8(1): p. 52-9.
224. Dent, A.L., et al., *Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6*. Science, 1997. 276(5312): p. 589-92.
225. Toyama, H., et al., *Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells*. Immunity, 2002. 17(3): p. 329-39.
226. Shaffer, A.L., et al., *BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control*. Immunity, 2000. 13(2): p. 199-212.
227. Fujita, N., et al., *MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell fate during B lymphocyte differentiation*. Cell, 2004. 119(1): p. 75-86.
228. Lin, L., A.J. Gerth, and S.L. Peng, *Active inhibition of plasma cell development in resting B cells by microphthalmia-associated transcription factor*. J Exp Med, 2004. 200(1): p. 115-22.
229. Horcher, M., A. Souabni, and M. Busslinger, *Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis*. Immunity, 2001. 14(6): p. 779-90.
230. Vitorica, G.D., et al., *Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter*. Cell, 2010. 143(4): p. 592-605.
231. Allen, C.D., T. Okada, and J.G. Cyster, *Germinal-center organization and cellular dynamics*. Immunity, 2007. 27(2): p. 190-202.
232. Tarlinton, D., et al., *Plasma cell differentiation and survival*. Curr Opin Immunol, 2008. 20(2): p. 162-9.
233. Allman, D., et al., *BCL-6 expression during B-cell activation*. Blood, 1996. 87(12): p. 5257-68.
234. Niu, H., B.H. Ye, and R. Dalla-Favera, *Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor*. Genes Dev, 1998. 12(13): p. 1953-61.
235. Schliephake, D.E. and A. Schimpl, *Blimp-1 overcomes the block in IgM secretion in lipopolysaccharide/anti-mu F(ab')₂-co-stimulated B lymphocytes*. Eur J Immunol, 1996. 26(1): p. 268-71.

236. Turner, C.A., Jr., D.H. Mack, and M.M. Davis, *Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells*. Cell, 1994. **77**(2): p. 297-306.
237. Piskurich, J.F., et al., *BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 526-32.
238. Ozaki, K., et al., *Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5361-71.
239. Breitfeld, D., et al., *Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production*. J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1545-52.
240. Laurent, C., N. Fazilleau, and P. Brousset, *A novel subset of T-helper cells: follicular T-helper cells and their markers*. Haematologica, 2010. **95**(3): p. 356-8.
241. Chtanova, T., et al., *T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells*. J Immunol, 2004. **173**(1): p. 68-78.
242. Iyer, S.S., et al., *Identification of novel markers for mouse CD4 T follicular helper cells*. Eur J Immunol, 2013.
243. 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. 1006-10.
244. Nurieva, R.I., et al., *Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells*. Science, 2009. **325**(5943): p. 1001-5.
245. Avery, D.T., et al., *B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans*. J Exp Med, 2010. **207**(1): p. 155-71.
246. Ma, C.S., et al., *Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells*. Blood, 2012. **119**(17): p. 3997-4008.
247. 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.
248. Tsuji, M., et al., *Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches*. Science, 2009. **323**(5920): p. 1488-92.

249. 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.
250. Stavnezer, J., *Regulation of antibody production and class switching by TGF-beta*. J Immunol, 1995. **155**(4): p. 1647-51.
251. Hollister, K., et al., *Insights into the role of Bcl6 in follicular Th cells using a new conditional mutant mouse model*. J Immunol, 2013. **191**(7): p. 3705-11.
252. Good-Jacobson, K.L. and M.J. Shlomchik, *Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3117-25.
253. 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.
254. 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.
255. Kim, C.H., et al., *Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells*. J Exp Med, 2001. **193**(12): p. 1373-81.
256. Butch, A.W., et al., *Cytokine expression by germinal center cells*. J Immunol, 1993. **150**(1): p. 39-47.
257. 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.
258. Cannons, J.L., K.T. Lu, and P.L. Schwartzberg, *T follicular helper cell diversity and plasticity*. Trends Immunol, 2013. **34**(5): p. 200-7.
259. Crotty, S., *Follicular helper CD4 T cells (TFH)*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 621-63.
260. O'Shea, J.J. and W.E. Paul, *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells*. Science, 2010. **327**(5969): p. 1098-102.
261. Liu, X., et al., *Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo*. J Exp Med, 2012. **209**(10): p. 1841-52, S1-24.
262. Hirota, K., et al., *Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses*. Nat Immunol, 2013. **14**(4): p. 372-9.

263. Baumjohann, D., T. Okada, and K.M. Ansel, *Cutting Edge: Distinct waves of BCL6 expression during T follicular helper cell development*. J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2089-92.
264. Dienz, O., et al., *The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 69-78.
265. Eto, D., et al., *IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17739.
266. Poholek, A.C., et al., *In vivo regulation of Bcl6 and T follicular helper cell development*. J Immunol, 2010. **185**(1): p. 313-26.
267. Yi, J.S., M. Du, and A.J. Zajac, *A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection*. Science, 2009. **324**(5934): p. 1572-6.
268. 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.
269. Deenick, E.K., et al., *Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen presentation that is independent of unique B cell signaling*. Immunity, 2010. **33**(2): p. 241-53.
270. 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.
271. Yu, D., et al., *The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment*. Immunity, 2009. **31**(3): p. 457-68.
272. Lee, S.K., et al., *B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells*. J Exp Med, 2011. **208**(7): p. 1377-88.
273. Durant, L., et al., *Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 605-15.
274. Kwon, H., et al., *Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors*. Immunity, 2009. **31**(6): p. 941-52.
275. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.

276. Spolski, R. and W.J. Leonard, *Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 57-79.
277. Bauquet, A.T., et al., *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*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 167-75.
278. Goenka, R., et al., *Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation*. J Immunol, 2011. **187**(3): p. 1091-5.
279. Gatto, D. and R. Brink, *The germinal center reaction*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(5): p. 898-907; quiz 908-9.
280. Akiba, H., et al., *The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo*. J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2340-8.
281. Karnowski, A., et al., *B and T cells collaborate in antiviral responses via IL-6, IL-21, and transcriptional activator and coactivator, Oct2 and OBF-1*. J Exp Med, 2012. **209**(11): p. 2049-64.
282. Crotty, S., et al., *SAP is required for generating long-term humoral immunity*. Nature, 2003. **421**(6920): p. 282-7.
283. Qi, H., et al., *SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 764-9.
284. Chevalier, N., et al., *CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses*. J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5556-68.
285. Fazilleau, N., et al., *Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(7): p. 753-61.
286. Cucak, H., et al., *Type I interferon signaling in dendritic cells stimulates the development of lymph-node-resident T follicular helper cells*. Immunity, 2009. **31**(3): p. 491-501.
287. Jegu, G., et al., *Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6*. Immunity, 2003. **19**(2): p. 225-34.
288. Ogata, M., et al., *Plasmacytoid dendritic cells have a cytokine-producing capacity to enhance ICOS ligand-mediated IL-10 production during T-cell priming*. Int Immunol, 2013. **25**(3): p. 171-82.

289. Ma, C.S., et al., *Early commitment of naive human CD4(+) T cells to the T follicular helper (T(FH)) cell lineage is induced by IL-12*. Immunol Cell Biol, 2009. **87**(8): p. 590-600.
290. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 821-52.
291. 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.
292. Ballesteros-Tato, A., et al., *Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation*. Immunity, 2012. **36**(5): p. 847-56.
293. Fukao, T. and S. Koyasu, *Expression of functional IL-2 receptors on mature splenic dendritic cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(5): p. 1453-7.
294. Schmitt, N., et al., *Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12*. Immunity, 2009. **31**(1): p. 158-69.
295. Igyarto, B.Z., et al., *Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses*. Immunity, 2011. **35**(2): p. 260-72.
296. Zhan, Y., et al., *Resident and monocyte-derived dendritic cells become dominant IL-12 producers under different conditions and signaling pathways*. J Immunol, 2010. **185**(4): p. 2125-33.
297. Botond Igyarto, E.J., Sandra Zurawski, Gerard Zurawski, and Daniel Kaplan, *Langerhans cell and CD103+ dermal dendritic cell promote Tfh in the steady-state*. Langerhans cell meeting, 2013.
298. Chappell, C.P., et al., *Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses*. J Exp Med, 2012. **209**(10): p. 1825-40.
299. Kasturi, S.P., et al., *Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity*. Nature, 2011. **470**(7335): p. 543-7.
300. Pavot, V., et al., *Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties*. J Control Release, 2013. **167**(1): p. 60-7.
301. Sallusto, F. and M. Baggiolini, *Chemokines and leukocyte traffic*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 949-52.

302. Maletto, B.A., et al., *Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice*. Blood, 2006. **108**(9): p. 3094-102.
303. Agrawal, N.G. and J.J. Linderman, *Mathematical modeling of helper T lymphocyte/antigen-presenting cell interactions: analysis of methods for modifying antigen processing and presentation*. J Theor Biol, 1996. **182**(4): p. 487-504.
304. Klein, P., *Mathematical models of antibody response*. Folia Microbiol (Praha), 1980. **25**(5): p. 430-8.
305. Kumamoto, Y., et al., *CD301b(+) dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity*. Immunity, 2013. **39**(4): p. 733-43.
306. Joffre, O., et al., *Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 234-47.
307. Mitchell, L.A., et al., *Optimized dosing of a CCR2 antagonist for amplification of vaccine immunity*. Int Immunopharmacol, 2013. **15**(2): p. 357-63.
308. Ballesteros-Tato, A. and T.D. Randall, *Priming of T follicular helper cells by dendritic cells*. Immunol Cell Biol, 2014. **92**(1): p. 22-7.
309. Kastenmuller, W., et al., *A spatially-organized multicellular innate immune response in lymph nodes limits systemic pathogen spread*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1235-48.
310. Roskoski, R., Jr., *ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation*. Pharmacol Res, 2012. **66**(2): p. 105-43.
311. Lu, Z. and S. Xu, *ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis*. IUBMB Life, 2006. **58**(11): p. 621-31.
312. Croft, M., *Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134)*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 57-78.
313. Flynn, S., et al., *CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 297-304.
314. Walker, L.S., et al., *Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers*. J Exp Med, 1999. **190**(8): p. 1115-22.
315. Crotty, S., *Follicular helper CD4 T cells (TFH)*. Annual review of immunology, 2011. **29**: p. 621-663.

316. Naik, S.H., *Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(5): p. 439-52.
317. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 669-92.
318. Jones, B.A., M. Beamer, and S. Ahmed, *Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases*. Mol Interv, 2010. **10**(5): p. 263-70.
319. Espinosa, V., et al., *Inflammatory monocytes orchestrate innate antifungal immunity in the lung*. PLoS Pathog, 2014. **10**(2): p. e1003940.
320. Quinones, M.P., et al., *CCL2-independent role of CCR2 in immune responses against Leishmania major*. Parasite Immunol, 2007. **29**(4): p. 211-7.
321. Peters, W., M. Dupuis, and I.F. Charo, *A mechanism for the impaired IFN-gamma production in C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout mice: role of CCR2 in linking the innate and adaptive immune responses*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 7072-7.
322. Wagner, R., et al., *Cytotoxic T cells and neutralizing antibodies induced in rhesus monkeys by virus-like particle HIV vaccines in the absence of protection from SHIV infection*. Virology, 1998. **245**(1): p. 65-74.
323. Boisgerault, F., G. Moron, and C. Leclerc, *Virus-like particles: a new family of delivery systems*. Expert Rev Vaccines, 2002. **1**(1): p. 101-9.
324. Cubas, R., et al., *Virus-like particle (VLP) lymphatic trafficking and immune response generation after immunization by different routes*. J Immunother, 2009. **32**(2): p. 118-28.
325. Tamoutounour, S., et al., *Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin*. Immunity, 2013. **39**(5): p. 925-938.
326. Li, K., et al., *Antigen incorporated in virus-like particles is delivered to specific dendritic cell subsets that induce an effective antitumor immune response in vivo*. J Immunother, 2013. **36**(1): p. 11-9.
327. Ataman-Onal, Y., et al., *Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models*. J Control Release, 2006. **112**(2): p. 175-85.

328. Garrone, P., et al., *A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques*. Sci Transl Med, 2011. **3**(94): p. 94ra71.
329. Tarlinton, D. and A. Lew, *Antigen to the node: B cells go native*. Immunity, 2007. **26**(4): p. 388-90.
330. Pelletier, N., et al., *Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program*. Nat Immunol, 2010. **11**(12): p. 1110-8.
331. Dalod, M., et al., *Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo*. J Exp Med, 2002. **195**(4): p. 517-28.
332. Dalod, M., et al., *Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta*. J Exp Med, 2003. **197**(7): p. 885-98.
333. Piqueras, B., et al., *Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2613-8.
334. Ueno, H., et al., *Harnessing human dendritic cell subsets for medicine*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 199-212.
335. Glenn, G.M., T. Scharton-Kersten, and C.R. Alving, *Advances in vaccine delivery: transcutaneous immunisation*. Expert Opin Investig Drugs, 1999. **8**(6): p. 797-805.
336. Kumamoto, Y., et al., *MGL2 Dermal dendritic cells are sufficient to initiate contact hypersensitivity in vivo*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5619.
337. Aline, F., et al., *Dendritic cells loaded with HIV-1 p24 proteins adsorbed on surfactant-free anionic PLA nanoparticles induce enhanced cellular immune responses against HIV-1 after vaccination*. Vaccine, 2009. **27**(38): p. 5284-91.
338. Cruz, L.J., et al., *Targeting nanoparticles to dendritic cells for immunotherapy*. Methods Enzymol, 2012. **509**: p. 143-63.
339. Flamar, A.L., et al., *Noncovalent assembly of anti-dendritic cell antibodies and antigens for evoking immune responses in vitro and in vivo*. J Immunol, 2012. **189**(5): p. 2645-55.
340. Caminschi, I. and K. Shortman, *Boosting antibody responses by targeting antigens to dendritic cells*. Trends Immunol, 2012. **33**(2): p. 71-7.

341. Mitchell, L.A., A.J. Henderson, and S.W. Dow, *Suppression of vaccine immunity by inflammatory monocytes*. J Immunol, 2012. **189**(12): p. 5612-21.
342. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
343. Martino, A., et al., *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin vaccination mobilizes innate myeloid-derived suppressor cells restraining in vivo T cell priming via IL-1R-dependent nitric oxide production*. J Immunol, 2010. **184**(4): p. 2038-47.
344. Holmgren, J. and C. Czerkinsky, *Mucosal immunity and vaccines*. Nat Med, 2005. **11**(4 Suppl): p. S45-53.
345. Anjuere, F. and C. Czerkinsky, *[Mucosal immunity and vaccine development]*. Med Sci (Paris), 2007. **23**(4): p. 371-8.
346. Iwasaki, A., *Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(10): p. 699-711.
347. Czerkinsky, C. and J. Holmgren, *Topical immunization strategies*. Mucosal Immunol, 2010. **3**(6): p. 545-55.