



**HAL**  
open science

# Mécanismes moléculaires et cellulaires dans l'induction des réponses T helper folliculaires après vaccination cutanée

Clément Levin

► **To cite this version:**

Clément Levin. Mécanismes moléculaires et cellulaires dans l'induction des réponses T helper folliculaires après vaccination cutanée. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066480 . tel-01508851

**HAL Id: tel-01508851**

**<https://theses.hal.science/tel-01508851>**

Submitted on 14 Apr 2017

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

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

# THÈSE DE DOCTORAT

PRÉSENTÉE À  
**L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

**ÉCOLE DOCTORALE 394 : PHYSIOLOGIE, PHYSIOPATHOLOGIE, ET  
THÉRAPEUTHIQUE**

Présentée par  
**Clément LEVIN**

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie  
Spécialité : Immunologie

**Mécanismes moléculaires et cellulaires dans l'induction  
des réponses T helper folliculaires après vaccination cutanée**

Directeur de recherche : Dr. Béhazine COMBADIÈRE  
Laboratoire INSERM U1135 – CIMI-Paris  
Université Pierre et Marie Curie  
91 Boulevard de l'Hôpital – 75013 PARIS

Soutenue le : 12 décembre 2016

Devant la commission d'examen formée de :

|            |                                |                           |
|------------|--------------------------------|---------------------------|
| Président  | Dr. Benoit SALOMON             | INSERM U1135              |
| Rapporteur | Dr. Nicolas FAZILLEAU          | INSERM U1043              |
| Rapporteur | Dr. Jean-Claude SIRARD         | Institut Pasteur de Lille |
| Examineur  | Dr. Stéphane LEUNG-THEUNG-LONG | TRANSGENE SA              |



*“Ce n’est pas parce qu’ils sont nombreux à avoir tort qu’ils ont raison.”*

Bernard Werber







# Remerciements

---



# Table des matières

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abréviations</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>Avant-propos</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>Etat de l'art</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>1. Potentiel de la peau en vaccination et mécanismes immunitaires</b> .....                           | <b>5</b>  |
| 1.1 Structure de la peau humaine et murine .....   | 5         |
| 1.2 Ganglions drainants de la peau.....  | 8         |
| 1.3 Caractérisation et fonctions des cellules présentatrices d'antigène de la peau .....                 | 9         |
| 1.3.1 Epiderme .....   | 10        |
| 1.3.2 Derme .....  | 14        |
| 1.4 Caractérisation et fonctions des cellules présentatrices d'antigène du ganglion.....                 | 19        |
| 1.5 Modification de l'environnement cutané au cours de l'inflammation .....                              | 21        |
| 1.5.1 Acquisition et présentation de l'antigène par les cellules dendritiques résidentes du ganglion ... | 21        |
| 1.5.2 Recrutement des cellules inflammatoires du sang .....  | 23        |
| 1.5.3 Activation des cellules dendritiques de la peau et migration vers le ganglion lymphatique .....    | 24        |
| 1.6 Cibler les cellules dendritiques en vaccination cutanée .....  | 26        |
| 1.6.1 Ciblage spatial .....  | 26        |
| 1.6.2 Ciblage physique .....   | 28        |
| 1.6.3 Ciblage spécifique .....   | 31        |
| <b>2. Cellules T<sub>FH</sub>, acteur clé de la réponse immunitaire adaptative</b> .....                 | <b>35</b> |
| 2.1 Définition.....  | 35        |
| 2.1.1 Identification des T <sub>FH</sub> .....   | 35        |
| 2.1.2 Facteurs de transcription et molécules associés .....  | 37        |
| 2.2 Modèle séquentiel de différenciation des T <sub>FH</sub> .....                                       | 40        |
| 2.2.1 Du lymphocyte T CD4 <sup>+</sup> naïf au pré-T <sub>FH</sub> .....                                 | 41        |
| 2.2.2 Migration à la bordure T/B et interaction avec le lymphocyte B.....                                | 43        |
| 2.2.3 Phase germinative .....  | 44        |
| 2.2.4 T <sub>FH</sub> mémoire.....   | 44        |
| 2.3 Cellules dendritiques impliquées dans la différenciation des T <sub>FH</sub> .....                   | 45        |
| 2.3.1 Cellules dendritiques pro-T <sub>FH</sub> .....  | 46        |
| 2.3.2 Cellules dendritiques anti-T <sub>FH</sub> .....   | 48        |
| 2.4 Cellules T <sub>FH</sub> et réponse humorale.....  | 49        |
| 2.4.1 Molécules impliquées.....  | 50        |
| 2.4.2 Sélection des lymphocytes B de haute affinité dans le centre germinatif.....                       | 50        |
| 2.4.3 Sortie du centre germinatif : Plasmocytes ou lymphocytes B mémoire .....                           | 52        |

|   |            |
|---|------------|
| 2.4.4 Régulation du centre germinatif et des T <sub>FH</sub> .....  | 53         |
| 2.5 Optimiser la réponse T <sub>FH</sub> et humorale en vaccination.....  | 56         |
| 2.5.1 Paramètres physiques de l'antigène et adjuvants non immunomodulateurs.....  | 56         |
| 2.5.2 Immunomodulateurs et cellules dendritiques pro-T <sub>FH</sub> .....  | 57         |
| 2.5.3 Molécules de costimulation et cytokines.....  | 58         |
| 2.5.4 Diminution de la suppression du centre germinatif.....  | 59         |
| <b>Projets de recherche.....</b>  | <b>61</b>  |
| <b>Résultats.....</b>   | <b>63</b>  |
| <b>Article 1 : « Critical role for skin-derived migratory DCs and Langerhans cells in T<sub>FH</sub> and GC responses after intradermal immunization ».....</b>                           | <b>65</b>  |
| Contexte de l'étude.....  | 65         |
| Article.....  | 67         |
| Résumé des résultats et discussion.....   | 98         |
| <b>Article 2 : « IFA emulsion promotes sustained T follicular helper response for the generation of mucosal and systemic neutralizing antibodies against the HIV-gp41 3S motif ».....</b> | <b>101</b> |
| Contexte de l'étude.....  | 101        |
| Article.....  | 104        |
| Résumé des résultats et discussion.....   | 121        |
| <b>Revue Bibliographique : « Tailored immunity by skin antigen-presenting cells ».....</b>  | <b>125</b> |
| <b>Conclusion des travaux et perspectives.....</b>  | <b>137</b> |
| <b>Bibliographie.....</b>   | <b>141</b> |

# Table des illustrations

---

|   |     |
|---|-----|
| Figure 1 : Organisation des différentes couches de la peau.   | 7   |
| Figure 2 : Architecture et organisation d'un ganglion lymphatique.  | 9   |
| Figure 3 : Cellules présentatrices d'antigène de la peau chez la souris à l'état basal.                               | 10  |
| Figure 4 : Modèle de développement des cellules de Langerhans en conditions basales ou inflammatoires.                | 12  |
| Figure 5 : Séparation microanatomique des différentes populations de cellules dendritiques dans le ganglion.          | 20  |
| Figure 6 : Différentes approches de vaccination par la peau.  | 28  |
| Figure 7 : Taille des composés de transport de l'antigène et des agents pathogènes.                                   | 29  |
| Figure 8 : Mécanismes d'action supposés des adjuvants immunomodulateurs et non immunomodulateurs.                     | 31  |
| Figure 9 : Principe de ciblage des cellules dendritiques avec des anticorps dirigés contre des récepteurs de surface. | 33  |
| Figure 10 : Dynamique des cellules $T_{FH}$ et B au sein du ganglion lymphatique.                                     | 35  |
| Figure 11 : Identification des cellules $T_{FH}$ en tant que programme de différenciation distinct.                   | 37  |
| Figure 12 : Régulation transcriptionnelle du programme $T_{FH}$ .   | 38  |
| Figure 13 : Modèle séquentiel de différenciation des cellules $T_{FH}$ .  | 40  |
| Figure 14 : Molécules impliquées dans l'interaction entre la cellule dendritique et la cellule $T_{FH}$ .             | 41  |
| Figure 15 : Interaction du $T_{FH}$ avec la cellule dendritique et le lymphocyte B à la frontière T/B.                | 43  |
| Figure 16 : Différents types d'aide apportée par les cellules $T_{FH}$ aux lymphocytes B.                             | 49  |
| Figure 17 : Dynamique des lymphocytes B au sein du centre germinatif et sélection des mutants de haute affinité.      | 52  |
| Figure 18 : Mécanismes proposés de régulation des lymphocytes B et des cellules $T_{FH}$ par les cellules $T_{FR}$ .  | 55  |
| Figure 19 : Motif 3S de la protéine gp41 du VIH-1 et mécanisme de déplétion des LT CD4+.                              | 103 |
| Figure 20 : Synthèse des principaux résultats de l'étude 1 (1).   | 139 |
| Figure 21 : Synthèse des principaux résultats de l'étude 1 (2).   | 140 |
| Tableau 1 : Phénotype des cellules dendritiques de la peau humaine et murine.   | 15  |
| Tableau 2 : Combinaisons d'antigènes et d'adjuvants promouvant la réponse $T_{FH}$ .                                  | 58  |



# Abréviations

---

## A

AID : « Activation-induced cytidine deaminase »

## C

CD : Cluster de Différenciation

CCL : « Chemokine Ligand »

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CXCL : « C-X-C motif Ligand »

## D

DC : Cellule Dendritique

dSEARCH : « Dendrite Surveillance Extension and Retraction Cycling Habitude »

## F

FDC : Cellule Dendritique Folliculaire

## G

GC : Centre Germinatif

## H

HEV : « High Endothelial Venule »

HLA : « Human Leukocyte Antigen »

HSV : Virus Herpes Simplex

## I

ICOS : « Inducible T Cell Costimulator »

ID : Intradermique

IFA : « Incomplete Freund's Adjuvant »

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IM : Intramusculaire

## L

Lang : Langérine

LC : Cellule de Langerhans

LS-DC : Cellule Dendritique du Sinus

Lymphatique

LPS : Lipopolysaccharide

## M

moDC : DC dérivée de monocyte

MOG : « Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein »

MVA : « Modified Vaccinia Ankara »

## N

Nabs : Anticorps neutralisants

NK : « Natural Killer »

NP : Nanoparticule

## O

OVA : Ovalbumine

## P

PLA : Acide poly-lactique

PRR : « Pattern Recognition Receptor »

## S

SALT : « Skin-Associated Lymphoid Tissues »

SC : Sous cutanée

## T

TC : Transcutanée

T<sub>FH</sub> : Lymphocyte T « Helper » Folliculaire

T<sub>FC</sub> : Lymphocyte T Folliculaire Cytotoxique

T<sub>FR</sub> : Lymphocyte T Folliculaire Régulateur

TGF- $\beta$  : « Transforming Growth Factor  $\beta$  »

T<sub>H</sub> : Lymphocyte T « Helper »

TNF : « Tumor Necrosis Factor »

T<sub>REG</sub> : Lymphocyte T Régulateur

TLR : « Toll-Like Receptor »

TSLP : « Thymic Stromal Lymphopoietin »

## V

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VLP : « Virus-Like Particles »





# Avant-propos

---

La peau représente la première ligne de défense face aux agressions physiques et/ou biologiques provenant de l'extérieur. Sa structure et les cellules qui la compose sont dédiées à la protection de l'organisme. L'épiderme et le derme qui la constitue sont caractérisés par la présence d'un grand nombre et d'une grande diversité de cellules présentatrices d'antigènes (CPAs), qui contribuent à la surveillance et au maintien de l'homéostasie de la peau. D'autre part, la peau étant un organe fortement irrigué, elle permet le recrutement de cellules inflammatoires qui jouent aussi un rôle lors de la réponse immunitaire.

Le principe de la vaccination repose en grande partie sur le ciblage de l'antigène aux CPAs, et à l'induction d'un microenvironnement inflammatoire favorable à leur recrutement et leur activation. **De ce fait, la peau représente un site privilégié pour la vaccination**, car elle permet le ciblage de populations cellulaires uniques et spécialisées, retrouvées en nombre supérieur dans le derme par rapport au tissu sous-cutané ou au muscle. Le succès majeur de l'éradication du virus de la variole a confirmé le fort potentiel que représente la vaccination par la peau. Après une période d'abandon, les méthodes de vaccination cutanées suscitent de nouveaux intérêts. La meilleure compréhension du potentiel immunologique des cellules inflammatoires et des cellules résidentes de la peau, ainsi que la nécessité d'améliorer l'immunogénicité des vaccins contre les maladies infectieuses et les cancers sont des moteurs au développement de nouvelles stratégies innovantes ciblant le tissu cutané.

Pour autant, certains mécanismes clés de la vaccination méritent d'être approfondis : (1) La nature et la fonction des CPAs capables de favoriser l'initiation de la réponse immunitaire ; (2) Les réseaux moléculaires et cellulaires impliqués dans l'immunisation de la peau ; (3) L'orientation et l'optimisation des réponses cellulaires pour une immunité adaptée au pathogène. Ces paramètres sont importants pour assurer une initiation optimale de la réponse innée, et un maintien de la réponse adaptative. Les CPAs, et plus particulièrement les cellules dendritiques (DCs) sont des acteurs clés de l'immunité, faisant le lien entre l'immunité innée et adaptative. **Les défis actuels consistent à comprendre comment cibler les DCs de la peau pour accroître l'efficacité vaccinale.**

Lors d'une infection ou d'une vaccination, les DCs présentes dans les tissus capturent l'antigène et migrent vers les ganglions drainants où elles interagissent avec les cellules T naïves et promeuvent leur différenciation et leurs fonctions effectrices. Parmi les différentes sous-populations de lymphocytes T « helper » ( $T_H$ ), les T helper folliculaires ( $T_{FH}$ ) sont au cœur de nombreuses publications depuis leur découverte dans les années 2000. Ces cellules sont spécifiquement dédiées au développement et à la maturation des cellules B spécifiques de l'antigène, et jouent donc un rôle crucial dans l'établissement de la réponse humorale. Alors que de nombreuses études s'intéressent

désormais au rôle potentiel que peuvent jouer ces cellules dans diverses pathologies, **les interactions cellulaires et moléculaires qui gouvernent leur induction dans un contexte de vaccination restent à élucider**. La compréhension de ces mécanismes pourrait être la clé au développement de vaccins encore largement espérés, tel qu'un vaccin contre le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), dont l'objectif principal serait l'établissement d'une réponse humorale spécifique, neutralisante, et à large spectre.

Mon projet de thèse a eu pour but de mieux comprendre les mécanismes immunitaires par lesquels la vaccination intradermique favoriserait l'induction des réponses cellulaires de type  $T_{FH}$  et humorales, par l'étude des événements précoces ayant lieu aux sites d'immunisation et d'induction de l'immunité adaptative. Afin d'étudier ces phénomènes, j'ai utilisé différents antigènes modèles étudiés dans l'équipe et par nos collaborateurs, pertinents dans le cadre du développement d'un candidat vaccin anti-VIH.

Les conclusions apportées par mes travaux permettent de dégager des pistes de réflexion sur des stratégies d'amélioration des réponses  $T_{FH}$  et humorales induites après vaccination.

# Etat de l'art

---

## 1. Potentiel de la peau en vaccination et mécanismes immunitaires

Avec une surface allant jusqu'à 2 m<sup>2</sup> et un poids moyen de 5 kg chez l'homme, la peau représente l'organe le plus étendu et le plus lourd du corps humain. Elle assure de nombreuses fonctions essentielles telles que la protection contre les agressions externes, la thermorégulation, l'excrétion, la synthèse de la vitamine D ou encore un rôle sensoriel (mécanique, douleur, température).

Pour assurer son rôle protecteur de l'organisme, la peau a développé un environnement immunitaire particulier et spécialisé, initialement décrit sous le nom de « Skin-Associated Lymphoid Tissues » ou SALT (Streilein, 1983). Cet environnement est peuplé de nombreux acteurs, chargés à la fois de tolérer les cellules du soi et les organismes commensaux de l'épiderme, tout en étant capables de répondre aux menaces biologiques extérieures. Ils s'intègrent dans un réseau dense et structuré de vaisseaux lymphatiques et sanguins, établissant une connexion avec les organes lymphoïdes ainsi qu'avec le reste de l'organisme. La vaccination cutanée regroupe un ensemble de techniques à la fois anciennes (scarification) ou récemment développées (vaccination transcutané, etc.) qui ont toutes pour but de cibler l'antigène aux populations de cellules présentatrices d'antigène de la peau.

Afin de mieux comprendre le potentiel que représente la vaccination par la peau dans le développement de futurs vaccins, il est nécessaire d'étudier en profondeur les particularités structurelles et biologiques du réseau cutané, ainsi que les processus de mise en place de la réponse immunitaire après vaccination par la peau.

### 1.1 Structure de la peau humaine et murine

Chez l'homme et la souris, la peau est organisée en couches de compositions et d'épaisseurs différentes : **l'épiderme, la jonction dermo-épidermique, le derme, et l'hypoderme** (Figure 1).

**L'épiderme** forme la couche superficielle de la peau. Il est peuplé à 90 % par des kératinocytes, dont les différentes positions et morphologies permettent de diviser l'épiderme en 4 strates, qui sont, en partant de l'extérieur : (1) La couche cornée, qui est composée de kératinocytes morts mais biochimiquement actifs, anucléés et remplis de kératine nommés cornéocytes. Ils constituent la principale barrière physique entre l'organisme et l'extérieur (Proksch et al., 2008). (2) La couche granuleuse, composée de keratinocytes dont le noyau est en voie de dégénérescence, qui contribuent au remplissage des espaces intercellulaires. (3) La couche épineuse, ou couche de Malpighi, contenant des kératinocytes ainsi que des mélanocytes et des cellules immunocompétentes (cellules de

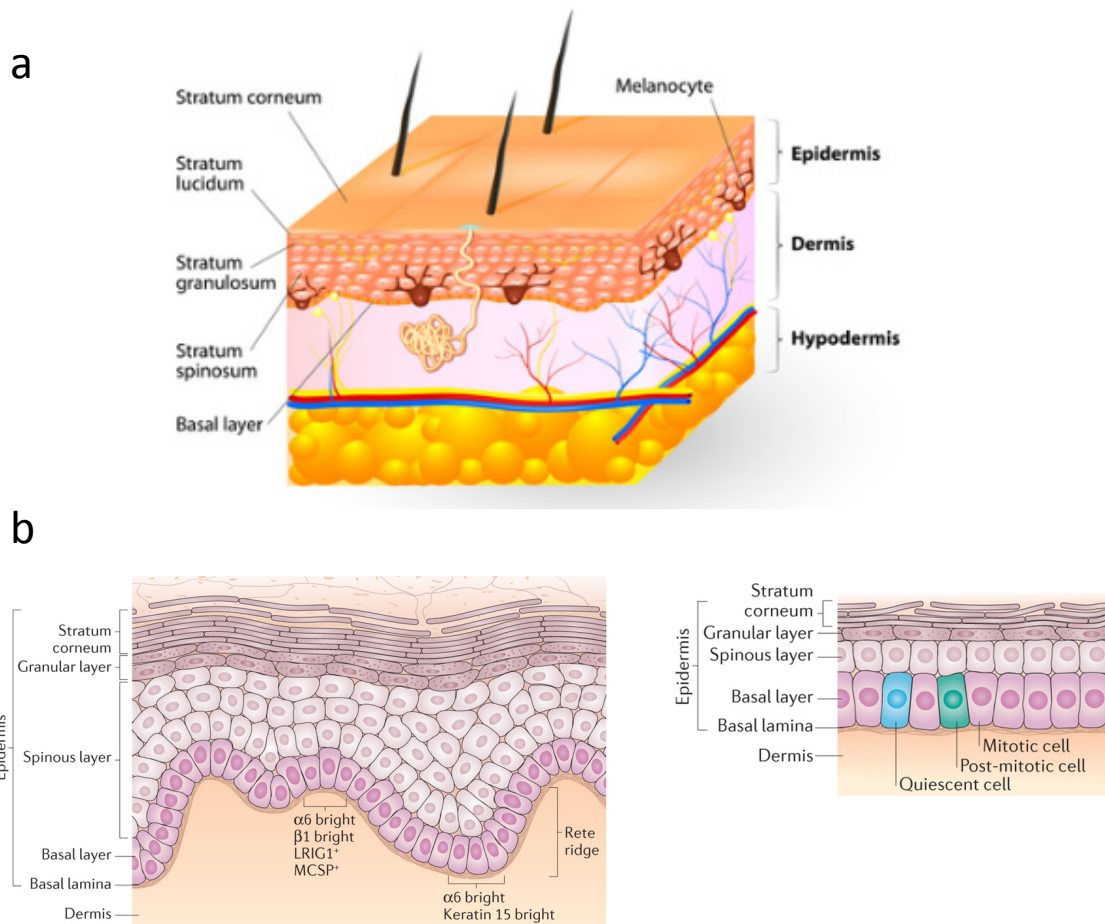
Langerhans et lymphocytes T). (4) La couche basale, ou couche germinative, siège du renouvellement de l'épiderme. Les kératinocytes y forment une seule assise de cellules en division, d'où la cellule fille migre vers les couches extérieures pour atteindre la partie terminale de l'épiderme en environ 28 jours chez l'homme (Kolarsick et al., 2011).

**La membrane basale** (ou jonction dermo-épidermique) sépare l'épiderme du derme et est constituée d'une fine couche poreuse constituée de fibres (protéoglycane, collagène IV et glycoprotéines de structure). Cette interface est dynamique et permet des échanges chimiques et cellulaires entre le derme et l'épiderme. Ce dernier n'étant pas vascularisé, l'apport en nutriments est dépendant du derme et se fait à la membrane basale (Breitkreutz et al., 2013).

**Le derme** est un tissu de type conjonctif formé principalement de fibres élastiques et de collagène, conférant à la peau sa souplesse et son assise. Les principales cellules qui le composent sont des fibroblastes (participant à la synthèse de la matrice extracellulaire) (Kolarsick et al., 2011). Contrairement à l'épiderme, de nombreuses populations de cellules immunitaires peuplent le derme, telles que différentes populations de DCs, ainsi que des macrophages, lymphocytes T CD4+ et CD8+, lymphocytes B, etc., (Heath and Carbone, 2013). Le derme est vascularisé par de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques permettant notamment le recrutement de cellules inflammatoires du sang et la migration des cellules de la peau vers le ganglion drainant. Le derme contient également de nombreuses fibres sensorielles dont le rôle dans l'immunité innée a été démontré récemment (Riol-Blanco et al., 2014; Kashem et al., 2015).

**L'hypoderme**, ou tissu sous-cutané est, comme son nom l'indique, une couche située sous le derme. C'est un tissu adipeux richement irrigué, peuplé principalement d'adipocytes assurant des fonctions de réserve énergétique et des fonctions endocrines (sécrétion de leptine et d'aromatase) (Kolarsick et al., 2011). Malgré sa faible teneur en cellules immunitaires résidentes (principalement des macrophages), le tissu sous-cutané reste l'une des voies de vaccination les plus utilisées avec la voie intramusculaire.

**Les follicules pileux** produisent les poils, contribuent à la sécrétion de sébum, et constituent un réservoir pour plusieurs cellules souches de l'épiderme. Leur nombre est constant et invariable dans l'espèce humaine, les différences inter-individus résultent des variations de type de poil. Longtemps pensé comme étant dénué de rôle immunologique, il a été montré que les follicules pileux servent de porte d'entrée aux progéniteurs des cellules de Langerhans, via la sécrétion de chimiokines par les kératinocytes (Nagao et al., 2012).



**Figure 1 : Organisation des différentes couches de la peau.**

(a) Représentation schématique d'une coupe de peau humaine. (b) Agencement des cellules dans l'épiderme humain (gauche) et murin (droite). D'après (Solanas and Benitah, 2013).

### Aparté 1 | Différences entre peau humaine et murine

En plus de certaines différences immunologiques (Mestas and Hughes, 2004), les peaux humaines et murines présentent des particularités structurelles et physiologiques propres à chaque espèce. De façon générale, la peau de souris est plus souple et plus dense en follicules pileux que la peau humaine. Son épiderme est plus fin et constitué de moins de couches cellulaires (2 à 3 couches de kératinocytes contre une dizaine pour l'homme), tout comme son derme (environ 100µm chez la souris contre plusieurs mm chez l'homme). La peau de souris ne possède pas de glandes sudoripares apocrines ni de papille dermique (extensions du derme dans l'épiderme). De plus, les mécanismes de la cicatrisation diffèrent entre la souris et l'homme (Wong et al., 2011)

## 1.2 Ganglions drainants de la peau

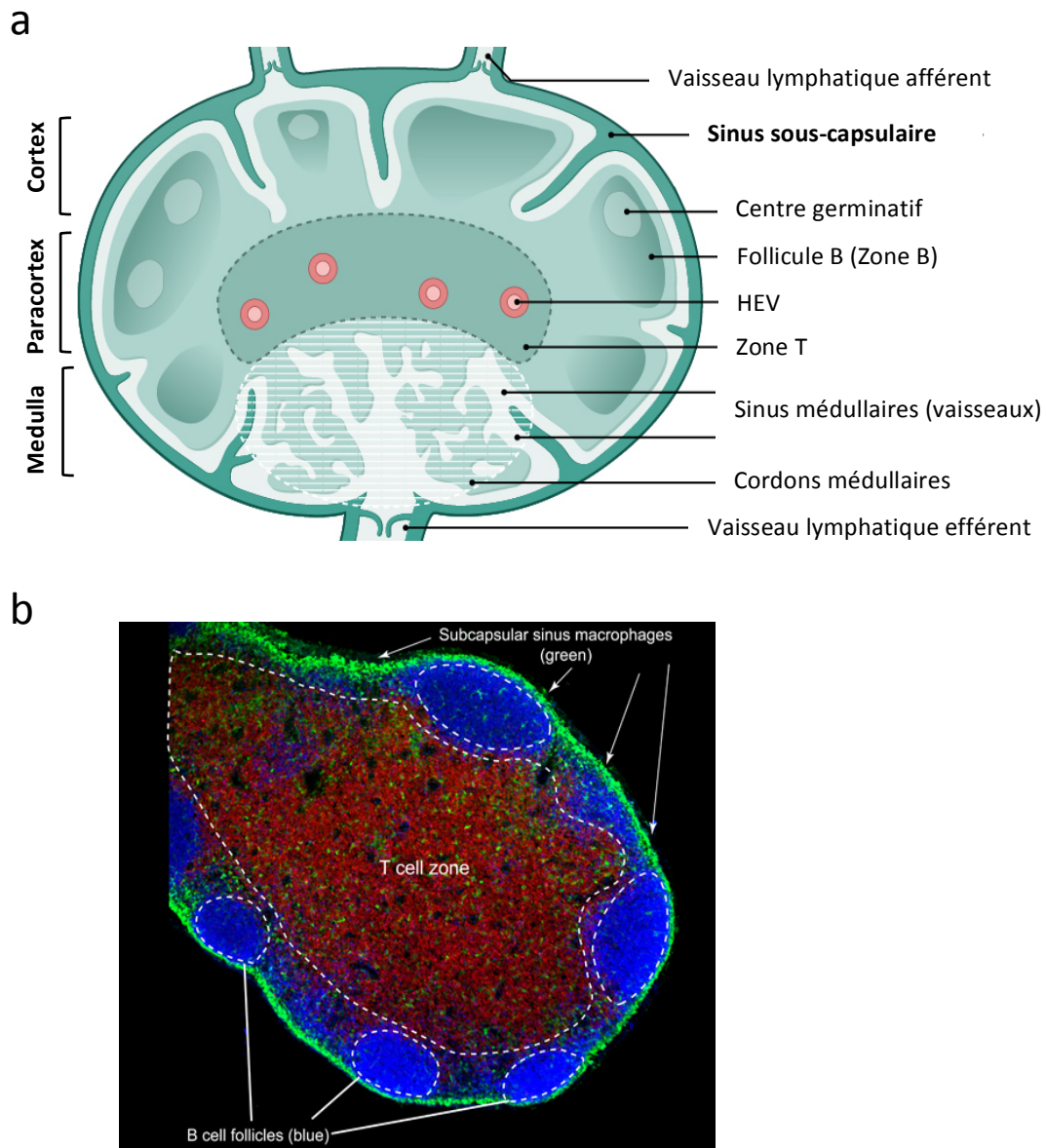
Le ganglion lymphatique est un composant essentiel de l'immunité adaptative en permettant la rencontre des CPA avec les lymphocytes T et B naïfs (Willard-Mack, 2006). Il est relié à la peau par des vaisseaux lymphatiques afférents, qui transportent l'antigène et les cellules des tissus vers le ganglion. Il est également relié au sang, par les veinules à endothélium épais (HEV), qui permettent l'entrée des lymphocytes naïfs et des précurseurs de DCs résidentes. Enfin, il est relié à d'autres ganglions avec lesquels il forme une chaîne, connectée par des vaisseaux lymphatiques efférents, dont la lymphe fini par rejoindre le conduit thoracique (Förster et al., 2012; Girard et al., 2012).

Le ganglion lymphatique est un organe complexe et structuré, entouré d'une capsule fibreuse riche en collagène, et divisé en trois parties distinctes : **Le cortex**, **le paracortex**, et **la médulla**. La lymphe récoltée par les vaisseaux lymphatiques afférents se déverse dans le **sinus sous-capsulaire**, un espace situé sous la capsule, composé de cellules endothéliales lymphatiques (LYVE1+) et de macrophages (CD169+, F4/80-). La lymphe traverse ensuite les différentes zones du ganglion en empruntant les sinus corticaux avant de se jeter dans les sinus médullaires puis de quitter le ganglion par les vaisseaux lymphatiques efférents (Figure 2).

**Le cortex** est situé sous le sinus sous-capsulaire et contient principalement des follicules B primaires (« zones B ») constitués de cellules B et de cellules dendritiques folliculaires. Les follicules secondaires formés lors de la reconnaissance de l'antigène par les cellules B sont appelés centres germinatifs, et permettent la génération et la sélection des lymphocytes B sécrétant des anticorps de haute affinité (Victoria and Nussenzweig, 2012). L'espace situé entre les follicules B est appelé zone interfolliculaire.

**Le paracortex** constitue la « zone T » du ganglion. Il est principalement composé de lymphocytes T et de cellules dendritiques et constitue le site de la présentation antigénique. On y trouve également les HEV permettant un apport constant en lymphocytes T naïfs.

**La médulla** est un labyrinthe constitué de sinus drainant la lymphe et de cordons médullaires contenant des cellules B différenciées et des macrophages (CD169-, F4/80+). De la médulla part le vaisseau lymphatique efférent, rejoignant d'autres ganglions ou directement le conduit thoracique.



**Figure 2 : Architecture et organisation d'un ganglion lymphatique.**

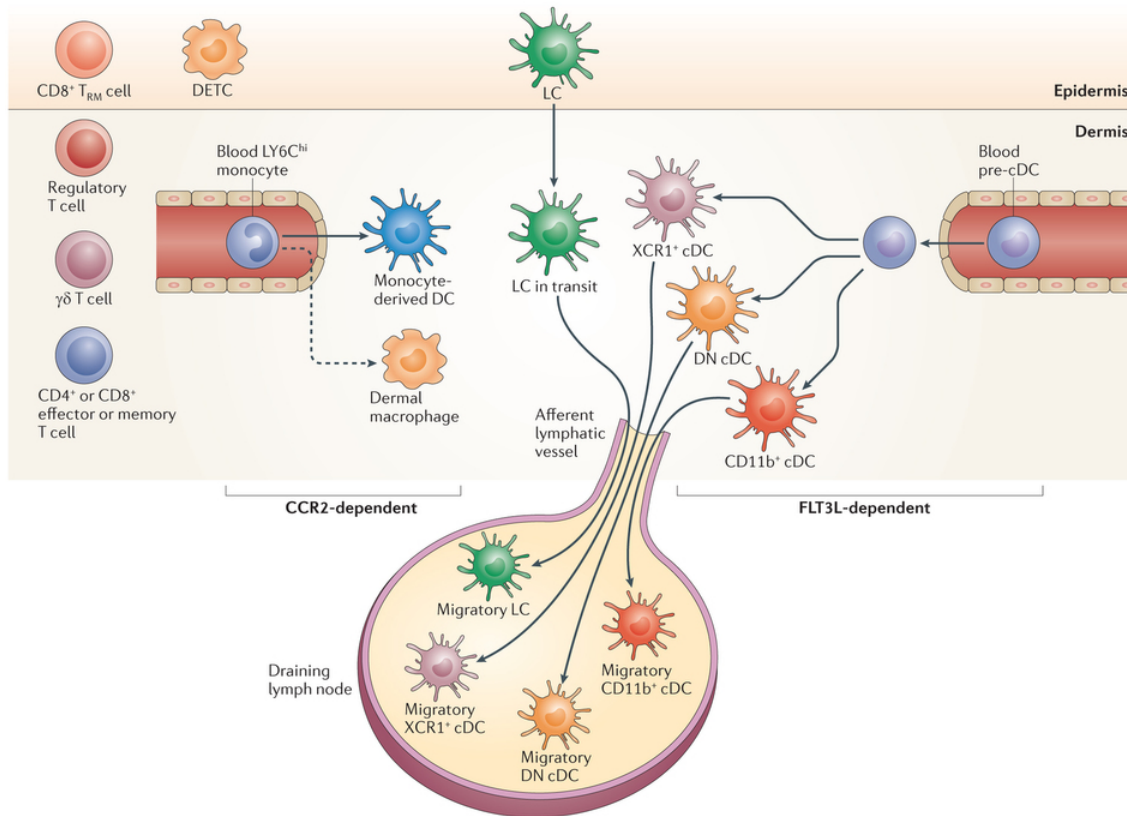
(a) Représentation schématique d'un ganglion (b) Coupe d'un ganglion de souris. Vert : CX3CR1; rouge : CD3; Bleu : B220. Adapté d'après (Immunity Image Resource).

### 1.3 Caractérisation et fonctions des cellules présentatrices d'antigène de la peau

La peau est un organe très riche en cellules présentatrices d'antigène (CPAs). Ces cellules forment le lien entre l'immunité innée et adaptative, en permettant la capture des pathogènes, la présentation de l'antigène aux lymphocytes T, et la spécialisation de l'immunité adaptative. La diversité des populations et des fonctions des CPAs présentes dans la peau traduit un besoin du système



immunitaire à être capable de répondre à tout type d'infection. Cette partie décrit de manière détaillée le phénotype et les fonctions attribuées aux différentes populations de CPAs de la peau (Figure 3).



**Figure 3 : Cellules présentatrices d'antigène de la peau chez la souris à l'état basal.**  
D'après (Malissen et al., 2014).

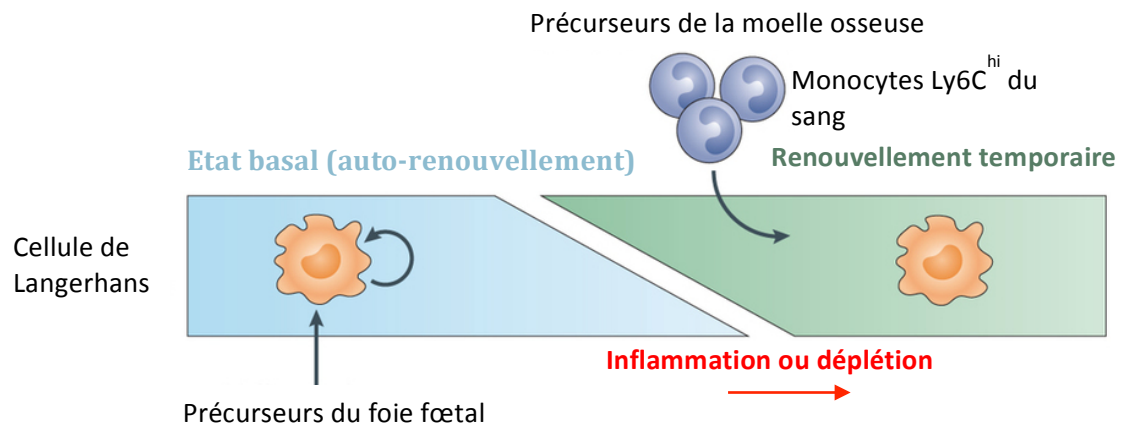
### 1.3.1 Epiderme

**Les cellules de Langerhans (LCs)** sont les seules CPAs présentes dans l'épiderme humain et murin et représentent 1 à 5 % des cellules épidermiques. Elles sont principalement localisées dans la couche épineuse de l'épiderme, où elles forment un réseau autour des kératinocytes, mais se retrouvent également dans le derme et les ganglions drainants la peau. Leurs caractéristiques principales sont leur radorésistance, leur origine développementale, leur longévité, et leur rôle d'immuno-surveillance de la peau (Merad et al., 2008). Les LCs sont identifiables par leur expression constitutive de la langérine (CD207) et la présence d'organelles intracytoplasmiques uniques appelés granules de Birbeck, jouant un rôle dans la prise en charge de l'antigène. La langérine est un récepteur appartenant à la famille des lectines transmembranaire de type II exprimé de façon homogène à la surface des LCs humains et murins qui, après activation par son ligand, est internalisée dans les granules de Birbeck. Cette internalisation de la langérine est caractéristique de l'activation des LCs (Valladeau et al., 2000,

2003). Comme la langérine est également exprimée par une sous population de DC du derme, elle ne représente pas à elle seule un marqueur fiable pour l'identification des LC dans d'autres tissus que l'épiderme (Valladeau et al., 2002). Les LCs humaines et murines expriment également les molécules cadhérine-E, permettant l'adhésion aux kératinocytes, EpCAM, CD205, et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Tableau 1). De plus, les LCs humaines mais pas murines expriment fortement la molécule CD1a, permettant la présentation d'antigènes non peptidiques aux cellules T (Hunger et al., 2004), ainsi que les molécules CD1c, DC-SIGN (CD209) et HLA-DR.

L'origine développementale des LCs a été sujette à de nombreuses études, motivées par l'observation initiale que le repeuplement de cette population n'est pas dépendante des cellules de la moelle osseuse après irradiation létale chez la souris (Merad et al., 2002). Cette étude a également révélée que chez des animaux parabiotiques, dont la circulation sanguine est reliée chirurgicalement, les LCs des deux animaux ne se mélangent pas, contrairement aux autres cellules myéloïdes. Ainsi, cette première étude suggère qu'à l'état basal, les LCs se maintiennent dans la peau de façon indépendante de la circulation à partir de progéniteurs locaux. De façon similaire, les LCs d'un patient ayant reçu une allogreffe de peau gardent l'origine du donneur, même 10 ans après chirurgie (Kanitakis et al., 2011). L'utilisation de modèle murins de « fate mapping » a récemment permis d'élucider l'origine des progéniteurs locaux des LCs, des monocytes dérivés du foie fœtal en grande majorité, avec une contribution mineure de macrophages dérivés du sac vitellin (Hoeffel et al., 2012) (Figure 4).

De façon intéressante, il a été montré qu'en conditions inflammatoires, après exposition de la peau avec de la lumière UV, une autre population de LCs appelée « LCs à courte durée de vie » se différencie à partir de monocytes inflammatoires et repeuple l'épiderme. Ces cellules sont ensuite remplacées par des « LCs à longue durée de vie » dont l'origine et le phénotype sont plus proche des LCs résidents de l'épiderme au niveau basal (Ginhoux et al., 2006; Seré et al., 2012) (Figure 4). Nagao et al. ont élégamment démontré que le recrutement de ces monocytes précurseurs de LCs s'effectue via les follicules pileux, sources de facteurs chimioattractants, tel que la chimiokine CCL2, sécrétés par les kératinocytes (Nagao et al., 2012). Chez l'homme, les monocytes CD14<sup>+</sup> du sang peuvent se différencier en « DCs de type LCs » lorsqu'ils sont cultivés *in vitro* avec du GM-CSF et du TFG-β1. Ces « mo-LCs » sont phénotypiquement proches des LCs de l'épiderme et possèdent des granules de Birbeck (Picarda et al., 2016).



**Figure 4 : Modèle de développement des cellules de Langerhans en conditions basales ou inflammatoires.**  
Adapté d'après (Malissen et al., 2014)

Conformément à leur rôle « d'immuno-surveillants » de la peau, les LCs sont des cellules relativement mobiles. A l'état basal, il a été estimé que 2 à 3% des LCs circulent naturellement de la peau vers les ganglions drainants, en passant par le derme où elles peuvent être identifiées comme étant « en route » (Kissenpfennig et al., 2005). Contrairement aux cellules dendritiques du derme dont la migration vers les ganglions dépend uniquement de l'expression de CCR7, il a été montré que la migration des LCs vers les ganglions se fait en deux temps. Leur migration de l'épiderme jusqu'au derme est régulée par l'expression de CXCR4 et de son ligand CXCL12 sécrété par les fibroblastes, puis la migration jusqu'aux ganglions dépend de CCR7 (Ouweland et al., 2008). Leur relative mobilité est associée à une activité intense de recherche et de collecte de l'antigène, caractérisée par l'extension et la rétractation de leurs dendrites de façon cyclique à travers les jonctions serrées de kératinocytes, décrite sous le nom de dSEARCH (Nishibu et al., 2006; Kubo et al., 2009).

De part leur positionnement stratégique, les LCs possèdent deux principales fonctions : (1) En absence de signaux de danger, leur rôle consiste à surveiller l'environnement cutané et à tolérer les nombreux organismes commensaux qui peuplent naturellement la peau ainsi que les antigènes du soi. De ce fait, les LCs possèdent des propriétés immunosuppressives et tolérogènes uniques (Shklovskaya et al., 2011). Dans un modèle murin d'hypersensibilité de contact, la déplétion sélective des LCs conduit à une augmentation du nombre de cellules T spécifiques de l'antigène, indiquant une fonction régulatrice de la réponse immunitaire par les LCs (Igyarto et al., 2009; Bobr et al., 2010). Cette fonction passe principalement par l'induction de cellules T régulatrices (T<sub>REG</sub>) spécifiques de l'antigène, comme démontré dans le cadre d'une infection par *Leishmania* (Kautz-Neu et al., 2011), de la dermatite de contact (Gomez de Agüero et al., 2012), ou du ciblage de l'auto-antigène MOG aux LCs (Idoyaga et al., 2013) chez la souris. Chez l'homme, les LCs promeuvent de façon constitutive la prolifération et l'activation des T<sub>REG</sub> mémoires résidents de la peau en absence d'antigène étranger,

alors que suite à une infection par *C. Albicans*, elles permettent l'établissement de réponses non régulatrices (Seneschal et al., 2012).

(2) A la suite d'une infection et/ou d'une vaccination cutanée, les LCs doivent être capable de répondre rapidement et d'assurer leur fonction de cellule présentatrice d'antigène en migrant vers les ganglions drainant et en initiant la réponse adaptative. Ainsi, plusieurs études ont démontré que les LCs sont capables de présenter l'antigène aux cellules T naïves et d'induire leurs fonctions auxiliaires (T CD4+) ou cytotoxiques (T CD8+) (Igyártó and Kaplan, 2013). Igyártó et al. ont montré que les LCs sont nécessaires et suffisantes pour induire une immunité contre les champignons (*C. albicans*) et contre les bactéries extracellulaires (*S. aureus*) via l'induction de cellules T<sub>H</sub>17 (Igyártó et al., 2011). De façon similaire, les LCs sont capables de promouvoir des réponses de type T<sub>H</sub>2 après sensibilisation de la peau par des antigènes protéiques, et des LCs humaines isolées de la peau misent en culture avec des cellules T CD4+ allogéniques favorisent leur différenciation en T<sub>H</sub>2 *in vitro* (Nakajima et al., 2012; Segura et al., 2012).

La capacité des LCs à présenter l'antigène de façon croisée aux cellules T CD8+ cytotoxiques a longtemps été sujette à débat. En effet les principales études se sont révélées contradictoires, mais ne prenaient pas en compte l'existence de la population de DC du derme exprimant la langérine (DC Langerin+ du derme). Or cette population est particulièrement compétente en présentation croisée. Plus tard, Henri et al. ont habilement démontré que les cellules Langérine+ du derme sont les seules cellules capables de présentation croisée d'antigènes issus du soi, en utilisant un modèle murin dans lequel les kératinocytes expriment constitutivement l'antigène ovalbumine à la membrane (Henri and Poulin, 2010). D'autres études ont cependant démontré que les LCs sont capables de présenter l'antigène aux cellules T CD8+ et d'induire leurs fonctions effectrices dans le cas d'une inflammation cutanée induite par les récepteurs de type Toll (TLR). De même, les LCs jouent un rôle primordial dans l'établissement des réponses T CD8+ spécifiques de l'antigène après vaccination cutanée contre le virus MVA (Liard et al., 2012). Ces différentes études suggèrent que les LCs sont compétentes dans la présentation croisée d'antigènes exogènes en conditions inflammatoires, mais que leur compétence est limitée lorsqu'il s'agit de présenter des antigènes du soi à l'état basal, où leur fonction tolérogène et inductrice de T<sub>REG</sub> est privilégiée.

La contribution des LCs à l'immunité humorale n'a été que peu étudiée. L'intérêt croissant pour les cellules T folliculaires auxiliaires (T<sub>FH</sub>), un sous-type de cellule T CD4+ indispensable à la génération d'une immunité humorale, a permis de montrer que les LCs sont capables d'induire la différenciation des cellules T<sub>FH</sub> après ciblage de l'antigène directement aux LCs, ainsi qu'après infection cutanée par *C. albicans* (Yao et al., 2015).

Chez l'homme, la plupart des études se rapportent à la capacité des LCs à activer et induire la différenciation de cellules T naïves *in vitro*. Il a ainsi été montré que les LCs humains induisent préférentiellement la différenciation des T<sub>H</sub>2 (Furio et al., 2010; Klechevsky et al., 2008), T<sub>H</sub>17

(Mathers et al., 2009), T<sub>H</sub>22 (Fujita et al., 2009), et sont capables de présentation croisée aux T CD8<sup>+</sup> (Banchereau et al., 2012; Klechevsky et al., 2008).

Ces études, prises dans leur ensemble, suggèrent que les LCs sont des cellules très plastiques capables de s'adapter au type de menace auquel elles font face. La combinaison de signaux qu'elles reçoivent de leur environnement, que ce soit en condition non-inflammatoires ou en présence d'un antigène étranger, ainsi que la nature même de l'antigène rencontré et sa localisation, ont la capacité de spécialiser les LCs vers l'immunogénicité ou la tolérance.

**Les kératinocytes** représentent plus de 90 % des cellules totales de l'épiderme, et bien que leur fonction principale soit structurale, elles possèdent des caractéristiques immunologiques bien particulières qui font de ces cellules un acteur clé de l'immunité cutanée. Les kératinocytes expriment de nombreux récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PRR), tels que des récepteurs de type NOD, ainsi que les TLR 3, 4, 5, 9, et des lectines de type-C. La reconnaissance de ces motifs par ces sentinelles de l'immunité innée déclenche une cascade de production de molécules pro-inflammatoires, telles que les chimiokines CXCL8, 9, 10, 11, CCL2, CCL20, le TNF- $\alpha$ , l'interféron de type I, et les interleukines IL-1, 6, 10, 18 et 33 (Di Meglio et al., 2011; Heath and Carbone, 2013; Lebre et al., 2006). Sugita et al. ont montré que chez la souris, ces signaux innés permettent d'augmenter les fonctions de présentation de l'antigène par les LCs (Sugita et al., 2006). De plus, l'expression de molécule de CMH de classe II par les kératinocytes permet dans certaines circonstances de présenter l'antigène aux lymphocytes T et de stimuler leur prolifération (Nestle et al., 2009; Nickoloff and Turka, 1994).

### *1.3.2 Derme*

Le derme est un composant essentiel de l'immunité cutanée. Sa richesse en cellules immunitaires et son réseau dense et structuré de vaisseaux sanguins et lymphatiques constituent un environnement propice à l'établissement de réponses immunitaires fortes et adaptées au pathogène.

Caractériser les différentes sous-populations de CPAs du derme s'avère difficile, car leurs phénotypes peuvent varier selon la souche de souris étudiée, selon le contexte inflammatoire de la peau, et selon le panel de marqueur utilisé pour les distinguer. Néanmoins, en conditions non inflammatoires dans la peau humaine et murine, on peut distinguer 3 à 4 sous-populations principales de DC du derme qui se différencient par leurs niveaux d'expression de certains marqueurs (Tableau 1), ainsi que par leurs origines et leurs fonctions. Les modifications de l'environnement cellulaire qui surviennent pendant l'inflammation seront détaillées dans la prochaine section de ce chapitre.

| Etat basal                     |                            |            |           |        |                        | Inflammation      |
|--------------------------------|----------------------------|------------|-----------|--------|------------------------|-------------------|
| Marqueur phénotypique (souris) | XCR1+ DC / Lang+ CD103+ DC | CD11b+ DC  | CD11b- DC | LC     | moDCs                  | DC inflammatoires |
| CD45                           | +                          | +          | +         | +      | +                      | +                 |
| CD11c                          | +                          | +          | +         | +      | faible                 | faible            |
| MHC class II                   | ++                         | ++         | ++        | ++     | +                      | +                 |
| CD11b                          | faible                     | ++         | -         | faible | ++                     | ++                |
| CD8                            | -                          | -          | -         | -      | -                      | -                 |
| CD103                          | +                          | -          | -         | -      | -                      | -                 |
| Langerin                       | +                          | -          | -         | ++     | -                      | -                 |
| EpCAM                          | -                          | -          | -         | ++     | ND                     | ND                |
| CD24                           | +                          | faible     | -         | +      | -                      | -                 |
| XCR1                           | +                          | -          | -         | -      | -                      | -                 |
| Clec9A                         | +                          | -          | -         | -      | -                      | -                 |
| CD205                          | -                          | +          | ND        | +      | ND                     | ND                |
| CCR2                           | -                          | +          | +         | -      | +                      | +                 |
| CX3CR1                         | -                          | +          | ++        | -      | -                      | -                 |
| F4/80                          | -                          | +          | +         | +      | +                      | +                 |
| CD172a (Sirpa)                 | -                          | +          | faible    | +      | -                      | -                 |
| CD64                           | -                          | -          | -         | -      | +                      | ++                |
| Ly6C                           | -                          | -          | -         | -      | +                      | +                 |
| CD301b                         | -                          | population | -         | -      | -                      | -                 |
| Marqueur phénotypique (homme)  | CD141+ DC                  | CD1c+ DC   | /         | LC     | CD14+ moMac / CD14+ DC | DC inflammatoires |
| CD1c (BDCA-1)                  | faible                     | +          |           | +      | +                      | +/-               |
| CD141 (BDCA-3)                 | +                          | -          |           | -      | faible                 | -                 |
| CD1a                           | faible                     | +          |           | ++     | -                      | faible            |
| CD11c                          | faible                     | +          |           | +      | +                      | +                 |
| Langerin                       | -                          | population |           | ++     | -                      | -                 |
| CD14                           | -                          | -          |           | -      | +                      | +/-               |
| Marqueurs supplémentaires      | Clec9A, XCR1               |            |           |        | CD209                  | TNFa, INOS        |

**Tableau 1 : Phénotype des cellules dendritiques de la peau humaine et murine.**

D'après (Henri and Poulin, 2010; Malissen et al., 2014; Merad et al., 2013; Tamoutounour et al., 2013). « + » et « - » symbolisent l'expression du marqueur ou son absence, respectivement. « Faible » indique une faible expression du marqueur. « Population » indique l'expression du marqueur par une sous-population. Les cellules grisées symbolisent les marqueurs clés utilisés pour identifier une population. ND : Non déterminé.

### DCs Langerin+ du derme / XCR1+ du derme

L'utilisation de souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente EGFP sous le contrôle du promoteur de la langérine (Langerin-EGFP) a révélée qu'en plus des LCs « en route » retrouvées dans le derme, une autre sous-population de DC exprime la langérine et possède des origines développementales ainsi que des fonctions différentes (Ginhoux et al., 2007; Nagao et al., 2009; Poulin et al., 2007). Contrairement aux LCs, les DCs langérine+ du derme sont radiosensibles, et par

conséquence sont remplacées par des précurseurs sanguins après déplétion. Leur développement est dépendant de la molécule FLT3 ligand (FLT3L), ainsi que du facteur de transcription Batf3, ce qui les rapproche des DCs CD8<sup>+</sup> résidentes des organes lymphoïdes (Merad et al., 2013). Au niveau phénotypique, les DC langérine<sup>+</sup> du derme se distinguent des LCs par leur faible expression des marqueurs CD11b et EpCAM. L'étude pionnière de Henri et al. a démontré qu'environ la moitié des DC langérine<sup>+</sup> du derme expriment le marqueur CD103 (Henri and Poulin, 2010). Néanmoins, il s'avère relativement difficile de différencier les LCs « en route » retrouvées dans le derme (Lang<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup>) de la population de DC langérine<sup>+</sup> du derme qui n'exprime pas CD103. Ainsi, la grande majorité des études qui portent sur la population de DC langérine<sup>+</sup> du derme se focalise sur les cellules exprimant CD103 (identifiées comme Lang<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup>) (Merad et al., 2013). Récemment, il a été montré que cette population exprime également le marqueur XCR1, partagé de façon uniforme par les DCs CD103<sup>+</sup> tissulaires et les DCs CD8<sup>+</sup> des organes lymphoïdes, et il a été proposé que cette population soit ainsi renommée « XCR1<sup>+</sup> DC du derme » (Bachem et al., 2012; Crozat et al., 2011). Tout comme ces dernières, les DCs langérine<sup>+</sup> du derme sont particulièrement compétentes en présentation croisée de l'antigène. Elles expriment notamment le TLR3, qui reconnaît l'ARN double brin, et Clec9A, qui reconnaît des composés présents à la surface des cellules nécrotiques (Zhang et al., 2012). Conformément à ce phénotype, les DCs Langerin<sup>+</sup> du derme induisent des réponses T CD8<sup>+</sup> contre des auto-antigènes (Henri and Poulin, 2010), contre le virus de la vaccine (Seneschal et al., 2013), ainsi que dans un modèle expérimental de leishmaniose (Brewig et al., 2009). Contrairement aux DCs CD8<sup>+</sup> des organes lymphoïdes, les DCs langérine<sup>+</sup> du derme sont également capables de promouvoir la différenciation et la fonction des T CD4<sup>+</sup> ; en T<sub>H</sub>1 après infection cutanée par *C. albicans* (Igyártó et al., 2011), après induction d'encéphalomyélite allergique expérimentale (King et al., 2010), et en T<sub>H</sub>17 après infection cutanée par le virus herpès simplex (Jiao et al., 2014).

La biologie des systèmes a permis d'identifier un homologue humain aux DCs XCR1<sup>+</sup> du derme murin, appelé DCs CD141<sup>+</sup> du derme du fait de l'expression exclusive de ce marqueur. Ces dernières expriment XCR1, Clec9A, et sont capables de présentation croisée de l'antigène aux cellules T CD8<sup>+</sup> *in vitro* (Haniffa et al., 2012), et induise la différenciation des T<sub>REG</sub> en produisant de l'IL10 (Chu et al., 2012). Cependant, les DCs CD141<sup>+</sup> du derme humain n'expriment pas la langérine, qui est par contre retrouvée dans une population de DC du derme proche des DCs CD1c<sup>+</sup> (Bigley et al., 2015). Cette différence inter-espèce notable pose la question du rôle fonctionnel de la langérine chez les différentes populations de cellules dendritiques du derme.

### **DCs CD11b<sup>+</sup> du derme**

La majorité des DCs du derme n'expriment pas la langérine, ni CD103 ou XCR1, mais expriment fortement CD11b. Cette population de DC CD11b<sup>+</sup> du derme a longtemps été considérée comme hétérogène car d'autres populations cellulaires expriment ce marqueur, notamment les DCs issues de

monocytes (moDCs) et les macrophages résidents du derme (Hashimoto et al., 2011). Récemment, l'hétérogénéité de la population CD11b<sup>+</sup> du derme a été analysée et sous-divisée en DC CD11b<sup>+</sup>, monocytes, moDCs, et macrophages sur la base de l'expression des marqueurs MerTK, CD64, et CCR2 et de leurs profils transcriptomiques (Tamoutounour et al., 2013). Les monocytes exprimant fortement le marqueur Ly6C (Ly6C<sup>hi</sup>) constituent un pool générant de façon continue des monocytes du derme ainsi que des moDCs, alors que les DCs CD11b<sup>+</sup> se développent de façon Flt3L-dépendante et CCR2-indépendante. Les fonctions de ces dernières ont été largement étudiées chez la souris, cependant les possibles contaminations par d'autres cellules CD11b<sup>+</sup> du derme rendent l'interprétation des résultats délicate. De façon notable, une proportion de DCs CD11b<sup>+</sup> produit de l'acide rétinoïque de façon constitutive dans le derme et les ganglions drainant en conditions non inflammatoires. Ces cellules sécrétant de l'acide rétinoïque induisent la génération de cellules T<sub>REG</sub> *in vitro* (Guilliams et al., 2010). Les DCs CD11b<sup>+</sup> du derme peuvent également promouvoir la différenciation des T auxiliaires. Après sensibilisation de la peau chez la souris dans un modèle d'hypersensibilité de contact de type II, une sous-population de DC exprimant fortement CD11b et répondant à la cytokine TSLP migre vers les ganglions drainant et promeut la différenciation des cellules T<sub>H2</sub> (Kitajima and Ziegler, 2013). Il reste cependant à éclaircir dans quelle mesure les cellules réceptives au TSLP forment une sous-population distincte des cellules non réceptives au sein des DC CD11b<sup>+</sup> du derme. De même, une sous-population de DCs CD11b<sup>+</sup> du derme exprime le marqueur CD301b ainsi que des niveaux élevés de PD-L1 et PD-L2, et est retrouvée dans les ganglions drainants la peau (Murakami et al., 2013). L'utilisation de modèles murins de déplétion conditionnelle (CD301b-DTR) a montré que ces DCs CD301b<sup>+</sup> du derme présentent des fonctions pro-T<sub>H2</sub> et anti-T<sub>FH</sub> (Kumamoto et al., 2013, 2016).

Chez l'homme, les cellules CD1c<sup>+</sup> sont homologues aux DCs CD11b<sup>+</sup> du derme et représentent la majorité des DCs du derme. Elles expriment fortement le marqueur CD1c (BDCA-1) et faiblement le marqueur CD1a en comparaison aux LCs (Tableau 1). Comme dit précédemment, une sous population parmi les DCs CD1c<sup>+</sup> du derme exprime la langérine (Bigley et al., 2015). Cette sous-population est plus proche phénotypiquement des DCs CD1a<sup>+</sup> et se distingue des LCs et des DCs CD141<sup>+</sup> du derme. Il n'a cependant pas été montré si cette sous-population exerce des fonctions différentes. La fonction des DCs CD1c<sup>+</sup> du derme n'a été que peu étudiée. Il semblerait que cette population possède des propriétés de présentation croisée aux cellules T CD8<sup>+</sup> et de promotion des T CD4<sup>+</sup> en T<sub>H2</sub> *in vitro* (Banchereau et al., 2012; Segura et al., 2012).

### **DCs CD11b- du derme**

Le derme murin contient une population relativement minoritaire de DC n'exprimant pas ou très peu CD11b, XCR1, ou la langérine (Henri and Poulin, 2010; Mollah et al., 2013). Le développement de ces cellules est dépendant de FLT3L et de KLF4, et elles expriment le facteur de transcription



ZBTB46, spécifique de la lignée « conventionnelle » de DC (en opposition aux DC non-conventionnelles, tel que les DC plasmacytoïdes) (Tussiwand et al., 2015). Cette population est retrouvée dans les ganglions drainant la peau en condition basale et durant l'inflammation. Leurs particularités fonctionnelles restent mal connues, mais cette population s'avère autant compétente en présentation d'un antigène protéique que les autres populations de DCs du derme et résidentes des ganglions *ex vivo* (Mollah et al., 2013). Chez des souris dont les DCs sont spécifiquement déficientes en KLF4, le développement des DC CD11b<sup>-</sup> du derme est particulièrement limité. Ces souris présentent également des défauts de réponse de type T<sub>H2</sub>, révélant un potentiel rôle de ces cellules dans l'immunité contre les parasites et les allergènes (Tussiwand et al., 2015). Aucun équivalent humain à cette population n'a été identifié pour le moment.

### **DCs dérivées de monocytes (moDCs)**

En absence d'inflammation, la peau murine contient une proportion de monocytes exprimant fortement le marqueur Ly6C (Ly6C<sup>hi</sup>) recrutés du sang de façon continue. Ces monocytes se différencient localement en moDCs (Tamoutounour et al., 2013) ou retiennent un phénotype proche des monocytes sanguins et surveillent l'environnement cutané (Jakubzick et al., 2013). Les signaux qui régulent ces deux états du monocyte dans le tissu à l'état basal restent à découvrir. Les moDCs extraites du derme murin sont capables de stimuler *in vitro* la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, cependant à des niveaux inférieurs aux DC CD11b<sup>+</sup> du derme (Tamoutounour et al., 2013).

**Les DCs CD14<sup>+</sup> du derme** ont longtemps été considérées comme l'équivalent humain des moDCs murines à l'état basal, mais une récente étude vient remettre en cause ce paradigme. Les DCs CD14<sup>+</sup> du derme ont initialement été identifiées comme une population migrant de façon spontanée d'explants de peau cultivés *ex vivo* (Nestle et al., 1993). Ces cellules exprimant des molécules du CMH de classe II et étant capables de migrer hors des tissus, elles furent catégorisées comme des DCs (Klechevsky et al., 2008). Récemment, l'équipe de Haniffa et al. a démontré que les cellules CD14<sup>+</sup> du derme sont issues de monocytes sanguins CD14<sup>+</sup> et sont plus proches transcriptionnellement des macrophages résident des tissus et des monocytes sanguins que des DCs (McGovern et al., 2014). Ces moMac (macrophages dérivés de monocytes) se distinguent des macrophages résidents du derme qui sont autofluorescents, possèdent des granules cytoplasmiques, sont adhérents en culture, et dévolus de capacité migratoires *ex vivo* (Haniffa et al., 2015). La mise en relation des données transcriptomiques des cellules CD14<sup>+</sup> du derme avec les cellules murines a permis de mettre en évidence une homologie des moMac humains avec les macrophages du derme murin (identifiés comme CD11b<sup>+</sup> et CD64<sup>+</sup>). En résumé, le derme murin contient à la fois des monocytes, des moDCs, ainsi que des macrophages (non détaillés ici du fait de leur faible capacité de présentation de l'antigène), alors que le derme humain inclus des macrophages « résidents » et des macrophages issus de monocytes (moMac).

## 1.4 Caractérisation et fonctions des cellules présentatrices d'antigène du ganglion

Les ganglions lymphatiques drainants la peau sont composés de plusieurs sous-populations de DCs, qui peuvent être classifiées en deux catégories : Les DCs résidentes du ganglion, et les DCs migratoires de la peau.

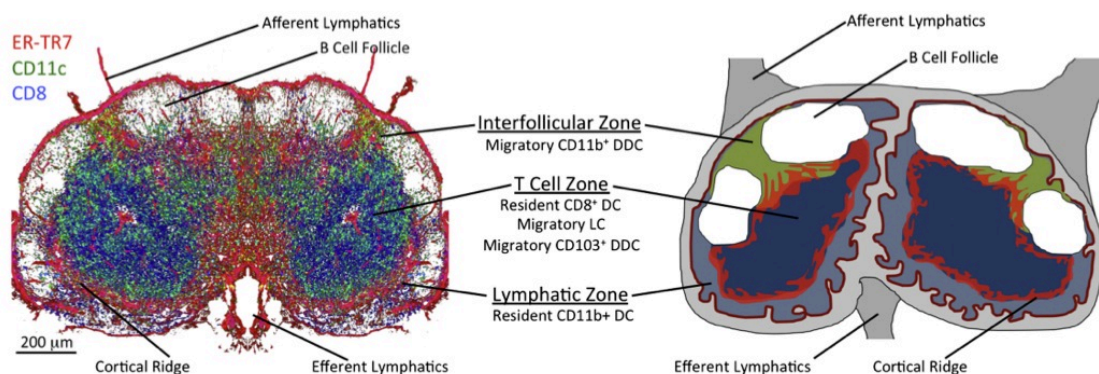
Les DCs résidentes du ganglion sont sous-divisées en DCs CD11b<sup>+</sup> et DCs CD8<sup>+</sup>, respectivement semblables en ontogénie et fonctions aux DCs CD11b<sup>+</sup> et DCs CD103<sup>+</sup> de la peau (Merad et al., 2013).

Les **DCs CD8<sup>+</sup>** n'expriment que très faiblement le marqueur CD11b, et répondent fortement au facteur FLT3L. Chez la souche de souris BALB/c, les DCs CD8<sup>+</sup> sont divisées en deux populations, l'une exprimant la langérine et l'autre non, alors que chez la souris C57BL/6, les DCs CD8<sup>+</sup> n'expriment pas la langérine (Flacher et al., 2008). Tout comme leur homologue tissulaire, elles expriment de façon spécifique le marqueur XCR1. De même, elles assurent principalement des fonctions de présentation croisée de l'antigène aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Hildner et al., 2008), de capture des corps apoptotiques (Zhang et al., 2012) et d'induction de tolérance contre les antigènes du soi (Bonifaz et al., 2002). La question des différences fonctionnelles entre les DCs CD8<sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup> (ou XCR1<sup>+</sup> du derme) est longtemps restée sans réponse. Récemment, Kitano et al. ont démontré *in vivo* qu'après immunisation sous-cutanée, ces deux populations jouent un rôle différent dans la présentation de l'antigène aux LT CD8<sup>+</sup>. En effet, les DCs XCR1<sup>+</sup> migratoires interagissent préférentiellement, et en plus grand nombre, avec les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène par rapport à leur homologue résident du ganglion (Kitano et al., 2016). Ces différences seraient dues à une plus forte expression de molécules de costimulation telles que CD80 et CD86, ainsi qu'à une plus forte concentration d'antigène présenté par les DCs migratoires.

Les **DCs CD11b<sup>+</sup>** n'expriment pas CD8, et représentent une population hétérogène probablement constituée de plusieurs sous-populations dont l'identification reste difficile du fait d'un manque de marqueurs exprimés de façon exclusive. L'utilisation de techniques permettant l'analyse spatiale et non destructrice des cellules dans le ganglion, telle que la microscopie bi-photonique, a permis d'identifier une sous-population de DCs CD11b<sup>+</sup> spécifiquement localisée au niveau de l'endothélium du sinus sous-capsulaire, appelée DC résidente du sinus lymphatique (LS-DC) (Gerner et al., 2015). Du fait de leur localisation stratégique, ces cellules sont capables de répondre rapidement (sous 8h) à la présence de particules drainées par la lymphe et d'induire des réponses T bien avant l'arrivée de cellules migratoires des tissus. De même, Gonzalez et al. ont décrit la présence d'une population de DCs CD11b<sup>+</sup> exprimant le marqueur SIGN-R1 localisée au niveau de la médulla et capable de répondre rapidement à l'infection par le virus influenza (Gonzalez et al., 2010).

Les DCs migratoires du ganglion sont présentes en faible nombre à l'état basal et correspondent aux cellules de la peau ayant migrées de façon continue. Leur nombre augmente après infection ou immunisation cutanée, et leur phénotype est caractéristique de leur état d'activation (forte expression de molécules de CMH II notamment) et du type de pathogène rencontré dans le tissu. Ces cellules peuvent être différenciées des DCs résidentes du ganglion par différentes méthodes (**Aparté 2**).

En utilisant une méthode innovante combinant l'histologie et la cytométrie (« histo-cytométrie »), Gerner et al. ont pu observer de façon précise le positionnement des différentes populations de DCs au sein du ganglion. Plus précisément, leurs travaux ont permis de révéler des différences importantes dans la ségrégation spatiale des DCs résidentes et migratoires au sein de micro-domaines spécialisés du ganglion (Gerner et al., 2012). Ainsi, les DCs CD11b<sup>+</sup> résidentes sont préférentiellement situées dans la zone lymphatique (médulla), les DCs CD8<sup>+</sup> dans la zone T, les DCs CD11b<sup>+</sup> migratoires dans la zone interfolliculaire, et les DCs CD103<sup>+</sup> du derme et les LCs dans la zone T (Figure 5). Ces observations rejoignent les travaux de Kissenpfennig et al. basés sur l'utilisation de souris langérine-EGFP et d'histologie plus classique (Kissenpfennig et al., 2005).



**Figure 5 : Séparation microanatomique des différentes populations de cellules dendritiques dans le ganglion.**

D'après (Gerner et al., 2012). ER-TR7 : Marqueur de cellule stromale.

## **Aparté 2 | Différencier les DCs migratoires des DCs résidentes dans le ganglion**

L'analyse des sous-populations de DC dans le ganglion est problématique, car il est difficile de distinguer les DCs tissulaires ayant migrées (à l'état basal ou après inflammation) des DCs résidentes du ganglion. Du fait de leur état d'activation, les DCs migratoires expriment plus fortement les molécules de CMH de classe II et plus faiblement CD11c que les DCs résidentes du ganglion. Lorsque l'inflammation est généralisée aux ganglions, les DCs résidentes peuvent toutefois présenter un phénotype similaire aux DCs migratoires. Il convient ainsi d'identifier les différentes sous-populations à l'aide d'autres marqueurs : Les DCs XCR1+ dépendantes de Batf3 expriment CD8 lorsqu'elles sont résidentes et CD103 lorsqu'elles sont tissulaires. La différenciation des DCs CD11b+ tissulaires ou migratoires est plus complexe et doit faire intervenir d'autres marqueurs.

Certaines techniques comme l'utilisation de « peinture » fluorescente appliquée sur la peau des souris, ou encore la photoconversion de cellules exprimant une molécule fluorescente photoconvertible permettent de distinguer de façon distincte les DCs migratoires des DCs tissulaires, mais présentent également des inconvénients (induction d'inflammation et couplage protéique difficile, respectivement).

## **1.5 Modification de l'environnement cutané au cours de l'inflammation**

Le terme inflammation désigne l'ensemble des événements précoces de la réponse immunitaire innée et adaptative qui surviennent à la suite d'une agression externe, telle qu'une infection ou une immunisation. Ici, l'environnement cutané est étendu aux ganglions lymphatiques drainants de la peau. Au cours de l'inflammation, **plusieurs populations de cellules et de CPAs distinctes phénotypiquement et spatialement accèdent à l'antigène de façon séquentielle** : Les cellules résidentes du ganglion, les cellules inflammatoires recrutées du sang, et les cellules de la peau. Ces événements précoces de la réponse immunitaire seront déterminants pour la mise en place de la réponse adaptative spécifique de l'antigène.

### *1.5.1 Acquisition et présentation de l'antigène par les cellules dendritiques résidentes du ganglion*

Après infection ou vaccination de la peau par des antigènes particuliers (virus, bactéries, protéines, etc.), la présence de vaisseaux lymphatiques permet le drainage rapide de l'antigène vers le ganglion. Ce transport passif peut survenir très vite (moins de 30 min après injection) et constitue la première vague d'arrivée de l'antigène dans le ganglion drainant (Pape et al., 2007; Sixt et al., 2005). La capacité de l'antigène particulier à traverser l'endothélium lymphatique et à être capturé par les cellules résidentes du ganglion est fortement dépendante de sa taille (Bachmann and Jennings, 2010). Les macrophages sous-capsulaires, les LS-DCs, et les cellules B du ganglion sont stratégiquement positionnées à proximité des vaisseaux lymphatiques afin d'assurer une filtration de la lymphe et une capture de l'antigène libre optimale (Carrasco and Batista, 2007; Gerner et al., 2015; Junt et al., 2007).

Alors qu'il est connu que l'acquisition rapide de l'antigène par les cellules B (qu'elle soit directe ou indirecte) est indispensable à leur activation et au développement de la réponse humorale, la capacité des DCs résidentes du ganglion à induire des réponses cellulaires T est moins évidente. En effet, le paradigme de la présentation de l'antigène aux lymphocytes T a longtemps stipulé que les DCs migratoires en provenance des tissus fournissent à elles seules les signaux indispensables à la mise en place de l'immunité cellulaire. Cependant, de nombreuses études suggèrent que dans certaines conditions, les DCs résidentes du ganglion sont capables de présenter l'antigène aux lymphocytes T CD4+ et CD8+ et qu'elles participent étroitement à la mise en place de l'immunité adaptative.

Itano et al. sont les premiers à décrire ce phénomène, en montrant qu'après injection d'un antigène fluorescent dans le derme de l'oreille, celui-ci est retrouvé dans le ganglion dès 30 min, pris en charge par les DCs résidentes du ganglion, et présenté aux cellules T spécifiques de l'antigène sous 24 h, initiant ainsi leur prolifération (Itano et al., 2003). Après 24 h, les DCs migratoires de la peau chargées en antigène sont détectées dans le ganglion et sont indispensables à la génération de cellules T CD4+ fonctionnelles, exprimant le récepteur à l'IL-2. Cette première étude montre que dans le cas de l'injection d'un antigène suffisamment petit pour migrer passivement jusqu'au ganglion, les DCs résidentes sont capables d'initier la réponse adaptative, mais que la migration des DCs de la peau reste indispensable pour la différenciation et la fonction terminale des cellules T CD4+. En plus de leur capacité à présenter rapidement l'antigène aux cellules T naïves, les DCs résidentes du ganglion permettent leur rétention grâce à l'induction de l'expression du récepteur à la sphingosine 1-phosphate (S1P<sub>1</sub>) avant l'arrivée des DCs migratoires (Allenspach et al., 2008).

Après injection cutanée du virus Herpes simplex (HSV), les DCs CD8+ résidentes du ganglion sont capables de présenter l'antigène aux cellules T CD8+ et d'induire leur prolifération, mais ce processus nécessite un apport supplémentaire en antigène de la part de DCs migratoires de la peau à des temps plus tardifs (Allan et al., 2006; Lee et al., 2009).

Cependant, après infection de la peau par des sporozoïtes de la malaria, les DCs CD8+ résidentes du ganglion sont suffisantes et nécessaires pour induire des réponses T CD8+ (Radtke et al., 2015). Après injection cutanée, les DCs CD11b+ SIGN-R1+ et les LS-DCs du ganglion capturent les particules antigéniques et sont capables d'induire la prolifération des cellules T CD4+ spécifiques de l'antigène en quelques heures seulement, bien avant l'arrivée des DCs migratoires de la peau (Gerner et al., 2015; Gonzalez et al., 2010). Enfin, l'ablation de l'oreille des souris à des temps précoces après injection intradermique n'a pratiquement pas d'impact sur l'induction de réponses T CD4+ et B (Iezzi et al., 2006; Tozuka et al., 2015).

Contrairement aux cellules migratoires des tissus, il n'est à ce jour pas possible d'éliminer de manière spécifique et *in vivo* les DCs résidentes des ganglions sans impacter les autres populations de DCs. La capacité des DCs migratoires à induire des réponses cellulaires et humorales en absence des DCs résidentes du ganglion reste donc à démontrer.

Ainsi, les cellules résidentes du ganglion sont les premières à accéder à l'antigène particulaire lors de l'infection ou de la vaccination de la peau. Ce processus très rapide (quelques heures) constitue une première phase dans l'induction des réponses cellulaires T et humorale. Cette réponse peut être suffisante, ou nécessiter l'arrivée des DCs en provenance de la peau chargées en antigènes et aux capacités de présentation et de stimulation de la prolifération accrues. Les connaissances actuelles sur la fonction précise des cellules résidentes du ganglion dans la mise en place de la réponse adaptative restent limitées et méritent d'être approfondies.

### *1.5.2 Recrutement des cellules inflammatoires du sang*

L'inflammation locale générée après vaccination ou infection de la peau va permettre le recrutement des cellules inflammatoires du sang vers le tissu et le ganglion de manière relativement rapide (dès 4 h pour les neutrophiles, entre 8 h et 24 h pour les autres cellules inflammatoires) et constitue la deuxième vague d'acquisition de l'antigène par des cellules de l'immunité innée (Abadie et al., 2009). Lors de l'inflammation, de très nombreuses populations de l'immunité innée produisent la chimiokine CCL2, dont le récepteur CCR2 est exprimé de façon relativement spécifique par les monocytes et les neutrophiles sanguins. La présence d'un gradient de CCL2, allant du tissu inflammé jusqu'au sérum, va permettre de guider les monocytes Ly6C<sup>hi</sup> dits « pro-inflammatoires » vers le site de l'inflammation (Shi and Pamer, 2011). A l'issue de leur recrutement dans la peau, les monocytes inflammatoires vont servir différentes fonctions, la principale étant de se différencier en cellules effectrices et de contribuer à la mise en place d'une réponse adaptée au pathogène.

Suite au départ des LCs de l'épiderme, il a été montré que certains monocytes inflammatoires rejoignent la couche supérieure cutanée via les follicules pileux et se différencient en LCs à courte durée de vie (Ginhoux et al., 2006; Nagao et al., 2012; Seré et al., 2012).

D'autres monocytes, influencés par les signaux du micro-environnement cutané, vont se différencier en macrophages de type M1, aux fonctions inflammatoires et d'élimination des pathogènes, ou en macrophages de type M2, aux fonctions de régulation et de réparation des tissus endommagés (Italiani and Boraschi, 2014).

Enfin, les monocytes inflammatoires ont la capacité de se différencier en mo-DCs inflammatoires (Inf-DCs), identifiées par l'expression de molécules de CMH de classe II, de CD11b, CD11c, et Ly6C (Segura and Amigorena, 2013). La différenciation des monocytes en Inf-DCs a majoritairement lieu au site de l'inflammation, mais peut avoir lieu dans les ganglions drainants après migration des monocytes directement du sang via les veinules à endothélium épais (HEV) (León et al., 2007; Nakano et al., 2009). Ce dernier mode de migration, peu étudié, serait rendu possible par le transport de chimiokines telle que CCL2 via le réseau lymphatique et leur présence à la lumière des HEV, induisant l'arrêt et le recrutement des monocytes sanguins vers les ganglions drainants (Nakano et al., 2009; Palframan et al., 2001). A l'inverse, il a été montré que les Inf-DCs se forment au niveau de la

peau ne dépendent pas de l'expression de CCR2 pour rejoindre les ganglions drainants, mais utilisent plutôt les récepteurs à chimiokine CCR7 et CCR8 (Qu, 2004). L'existence de ces deux modes de migration et de différenciation des monocytes inflammatoires pose la question de leurs rôles et fonctions respectives. León et al. ont démontré que suite à une infection cutanée par *L. major*, ces deux populations de Inf-DCs dérivées de monocytes sont identifiables au niveau du ganglion drainant la peau. Dans cette étude, les Inf-DCs issues de monocytes différenciés localement au niveau de la peau (Inf-DCs tissulaires) produisent plus d'IL-12 et stimulent plus efficacement les LT spécifiques de l'antigène que leur homologue différenciées directement dans le ganglion (Inf-DCs du ganglion) (León et al., 2007). Cependant, en utilisant des souris déficientes pour le couple CCR7/CCL19-CCL21, et donc dépourvues de Inf-DCs tissulaires, Nagao et al. ont démontré que suite à une infection virale, les Inf-DCs du ganglion représentent la principale population sécrétrice d'IL-12 et inductrice de lymphocytes T<sub>H</sub>1 (Nagao et al., 2012). Ces études reposent toutefois sur des modèles murins déficients ou sur des transferts de cellules, ce qui a pu potentiellement biaisé les observations des auteurs. L'analyse de la migration différentielle des populations de monocytes inflammatoires et de leur différenciation en Inf-DCs du ganglion ou du tissu reste limitée par les techniques actuelles. Contrairement aux DCs et à leurs nombreux phénotypes, les monocytes inflammatoires sont relativement homogènes. Ce sont les signaux inflammatoires auxquels ils sont soumis qui guident leur fonction effectrice. C'est pourquoi l'étude du microenvironnement inflammatoire créée aux sites d'immunisation et d'induction de l'immunité adaptative est cruciale pour une meilleure compréhension du rôle de ces cellules.

### *1.5.3 Activation des cellules dendritiques de la peau et migration vers le ganglion lymphatique*

Les DCs possèdent des profils d'expression de PRR qui varient grandement d'une population à une autre (Dalod et al., 2014; Segura et al., 2010). Cette variabilité, couplée à la diversité des populations présentes dans les tissus, permet d'assurer une couverture maximale contre les différents pathogènes susceptibles d'être rencontrés. La peau est constituée d'un réseau de sentinelles de l'immunité innée formé principalement par les LCs, les kératinocytes, les DCs du derme, les cellules « natural killers » (NK) et les fibroblastes (Nestle et al., 2009). Les kératinocytes sont des initiateurs clés de l'inflammation, de part leur positionnement stratégique, leur expression d'une grande variété de PRR, et leur production constitutive de cytokines, chimiokines, et peptides antimicrobiens (Nestle et al., 2009; Pasparakis et al., 2014). La reconnaissance de motifs particuliers en provenance de pathogènes constitue l'élément déclencheur de l'inflammation, avec pour conséquence l'établissement d'un environnement propice à l'activation des CPAs du derme, et à leur migration vers le site d'induction de la réponse adaptative, le ganglion lymphatique.

Les cytokines de la famille de l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, et le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B sont les principaux médiateurs de l'initiation de l'activation des CPAs (Steinman and Hemmi, 2006). Cette activation se traduit par de profondes modifications morphologiques des DCs, une diminution de leur capacité d'endocytose/phagocytose, et une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion, de costimulation, et de présentation de l'antigène (CD80, CD86, CMHII, CD40, etc.) (Dalod et al., 2014).

Les DCs possèdent des propriétés physiques uniques qui leur permettent de migrer à travers des espaces confinés tels que les vaisseaux lymphatiques qui parcourent le tissu cutané (Heuzé et al., 2013). Au cours du processus d'activation, la capacité des DCs à migrer vers le ganglion est régulée par l'expression différentielle de récepteurs à chimiokines, elle-même régulée par l'action locale des cytokines pro-inflammatoires (Randolph et al., 2008). Le récepteur à chimiokine CCR7, dont les ligands CCL19 et CCL21 sont exprimés de manière constitutive par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques, joue un rôle essentiel dans la migration des cellules de la peau vers le ganglion (Ohl et al., 2004). Au cours de l'inflammation, de nombreux facteurs sécrétés par les senseurs de l'immunité innée permettent l'augmentation de l'expression de CCR7 à la surface des cellules, tel que le TNF- $\alpha$ , les cytokines de la famille de l'IL-1, le médiateur lipidique prostaglandine E2, etc., (Förster et al., 2012; Martín-Fontecha et al., 2009). Certains facteurs permettent dans le même temps une augmentation de l'expression de CCL21 par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques (Martín-Fontecha et al., 2003). En plus de CCL19 et CCL21, la chimiokine atypique CCRL1 est sécrétée par les cellules endothéliales du sinus sous-capsulaire où elle forme un gradient guidant la migration des DCs de la peau de façon CCR7-dépendante jusqu'au cœur du ganglion (Ulvmar et al., 2014).

Du fait de leur localisation dans l'épiderme, la migration des LCs vers le ganglion est plus lente que celle des DCs du derme (Kissenpfennig et al., 2005). D'une part, le processus de migration doit surpasser celui de la rétention dans l'épiderme, régulée par la production autocrine de TGF- $\beta$  qui induit la surexpression de la molécule d'adhésion cadhérine-E et la sous-expression de CCR7 (Kel et al., 2010). D'autre part, les LCs doivent migrer de l'épiderme jusqu'au derme pour accéder aux vaisseaux lymphatiques, grâce à l'axe chimiotactique CXCL12/CXCR4 (Ouwehand et al., 2008). L'entrée des LCs et des DCs du derme dans les vaisseaux lymphatiques est aussi dépendante de l'expression des chimiokines CCL5, CCL20, et CXCL5, ainsi que des molécules d'adhésion telles que ICAM-1 et VCAM-1 exprimées fortement par l'endothélium durant l'inflammation (Johnson et al., 2006).

Comme discuté dans la partie 1.4, les DCs migratoires qui rejoignent le ganglion se positionnent différemment par rapport aux DCs résidentes, avec une préférence pour les zones T et interfolliculaires (Gerner et al., 2012) (Figure 5). Ce positionnement préférentiel permet d'optimiser la



rencontre entre la cellule présentatrice d'antigène et la cellule T naïve spécifique (Eickhoff et al., 2015).

L'utilisation de souris transgéniques « Kaede » dont les cellules expriment de façon ubiquitaire une molécule photoconvertible a permis de mettre en évidence le fait que chaque sous-population de DC cutanée possède sa propre dynamique de migration et d'arrivée au ganglion drainant (Tomura et al., 2014). De façon intéressante, la durée de vie des DCs CD103<sup>-</sup> du derme n'excède pas 2 jours suite à leur arrivée dans le ganglion, alors que les LCs et DCs CD103<sup>+</sup> du derme ayant migré restent détectables jusqu'à 4 jours. C'est donc dans cette fenêtre temporelle que la présentation antigénique aux cellules T naïves a lieu dans le ganglion. En plus de leurs différences phénotypiques, la migration différentielle des populations de DCs de la peau impacte probablement leur capacité à présenter l'antigène aux lymphocytes T, en créant une compétition pour l'accès à l'antigène.

Ainsi, l'arrivée de l'antigène dans les tissus et les ganglions est suivie d'une succession d'événements de migration, de différenciation, et d'interaction entre les différentes populations de cellules dendritiques et inflammatoires et les lymphocytes. L'étude des contributions individuelles de ces populations dans la mise en place de réponses immunitaires adaptatives se doit de prendre en compte les paramètres spatio-temporels de l'inflammation et de l'immunité innée.

## **1.6 Cibler les cellules dendritiques en vaccination cutanée**

Pour la grande majorité des vaccins actuels, les voies d'injections intramusculaires (IM) et sous-cutanées (SC) sont utilisées. Cependant, le muscle et le tissu sous-cutané sont relativement pauvres en cellules présentatrices d'antigène, et ne représentent donc pas des sites d'induction optimaux pour la génération de réponses immunitaires (Combadiere and Liard, 2011). Notre compréhension accrue des différentes populations et fonctions des DCs cutanées, de même que le développement de nouvelles technologies, font de la peau un site à fort potentiel vaccinal. De nombreuses études s'intéressent désormais au ciblage des DCs de la peau, dans le but d'induire de meilleures réponses immunitaires au vaccin. Les DCs de la peau peuvent être ciblées spatialement, en injectant l'antigène directement à leur proximité, physiquement, en jouant sur la structure, la taille, le transport de l'antigène, ou encore spécifiquement, en associant l'antigène à des molécules reconnues de manière spécifique par certains types de DC.

### *1.6.1 Ciblage spatial*

Depuis son invention en 1910 par le Docteur Charles Mantoux, la technique d'injection intradermique (ID) utilisant une seringue et un angle adapté (d'environ 45°) reste le moyen le plus efficace et le plus utilisé pour adresser un composé vaccinal directement aux CPAs du derme (Lambert and Laurent, 2008). L'injection ID permet non seulement le ciblage des DCs du derme, mais induit aussi la

mobilisation des LCs de l'épiderme et leur prise en charge de l'antigène (Liard et al., 2012). Cette voie d'injection a depuis prouvé son efficacité à induire des réponses similaires ou supérieures aux voies IM ou SC pour une grande variété de pathogènes, tels que le virus de la rage, de l'hépatite B, ou de l'influenza, à la fois en préclinique et en clinique (Combadiere and Liard, 2011). En outre, l'injection ID requière généralement des volumes moindres pour la même efficacité comparée aux routes conventionnelles (Kenney et al., 2004). Cependant, le mode d'injection ID induit une douleur non négligeable, un grand nombre d'effets secondaires locaux, et reste difficile à réaliser pour un praticien non formé à la technique (Belshe et al., 2004).

Ces dernières années, de nouvelles avancées en matière de biotechnologie ont permis le développement de techniques et d'instruments innovants qui permettrait de s'affranchir des difficultés liées à la vaccination ID (Engelke et al., 2015) (Figure 6). Parmi ces nouvelles technologies, les patchs de nano-aiguilles sont certainement les plus prometteurs (Sullivan et al., 2010). Du fait de leur taille calibrée (jusqu'à 900  $\mu\text{m}$  de longueur), les aiguilles permettent l'injection de l'antigène à la profondeur désirée, sans variation liée à l'utilisateur (Bariya et al., 2012). Les aiguilles peuvent être constituées de sucres ou de polymères tels que les acides poly-lactiques, ce qui les rendent biodégradables et permet la dissolution et la diffusion durable du composé vaccinal directement dans le derme (Yuan et al., 2013). Des études chez la souris ont montrées que cette méthode cible efficacement l'antigène aux LCs et autres DCs du derme, et permet l'induction de forte réponses humorales et cellulaires (Bachy et al., 2013; Sullivan et al., 2010; Zaric et al., 2014). De même, de récentes études cliniques chez l'homme ont montré que les patchs de nano-aiguilles sont bien tolérés et induisent de fortes réponses immunitaires, notamment contre le virus influenza (Hirobe et al., 2015). De plus, l'utilisation de patchs permet de réduire considérablement la douleur ressentie par les sujets vaccinés (Gupta et al., 2011; Jeong et al., 2016; Kaushik et al., 2001).

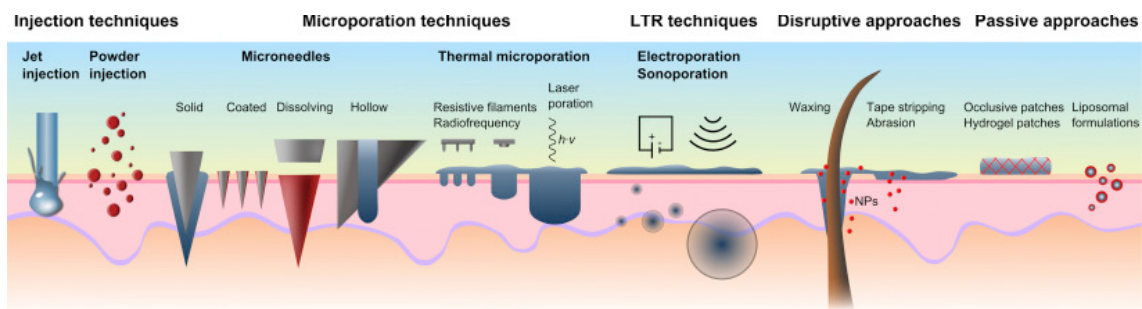
Les limitations liées à l'utilisation d'aiguilles, telles que la transmission de maladies infectieuses dans les pays pauvres, ont motivé le développement d'une méthode alternative de ciblage de l'antigène aux DCs de la peau, la vaccination transcutanée (TC) (Mitragotri, 2005). Le principe de la vaccination TC repose sur l'application topique du composé vaccinal directement sur l'épiderme, prétraité ou non. L'application topique de l'antigène sur la peau non traitée est limitée par la relative imperméabilité de l'épiderme, qui ne laisse passer que de très petites molécules (<500 Da) lipophiles, telles que celle utilisées dans les patchs, gels, ou sprays (nicotine, hormone, etc.) (Bos and Meinardi, 2000). Glenn et al., pionniers de l'utilisation des patchs transcutanés sur peau non traitée, ont démontré l'efficacité de ce système pour immuniser et protéger des souris et des hommes contre des toxines bactériennes (Behrens et al., 2013; Glenn et al., 1998, 2000).

Pour des molécules et des agents vaccinaux plus complexes, la vaccination TC requière le prétraitement de la peau par un agent mécanique ou chimique (crème dépilatoire, abrasion, rasage) permettant d'altérer la structure de la couche cornée. La vaccination TC par les follicules pileux représente une méthode relativement non-invasive et efficace pour le ciblage de l'antigène aux LCs

(Vogt et al., 2006). L'utilisation d'une bande recouverte de colle (cyanoacrylate) permet de vider les follicules de leurs poils et de laisser migrer passivement des molécules et particules (<300nm de diamètre), qui sont ensuite prises en charge par les DCs de la peau qui les transportent jusqu'au ganglion et induisent des réponses humorales et cellulaires (Mahe et al., 2009; Rancan et al., 2014). Des études chez l'homme ont démontré l'efficacité supérieure de l'immunisation TC à induire des réponses T CD4+ et CD8+ spécifiques du virus de l'influenza par rapport à la vaccination IM (Combadière et al., 2010; Vogt et al., 2008). De même, la vaccination TC avec des peptides associés au mélanome permet la réduction de la taille des tumeurs chez des patients atteints de mélanomes en stade avancé, par l'induction de réponses T CD8+ spécifiques de l'antigène (Yagi et al., 2006).

Plus récemment, Weiss et al. ont démontré l'efficacité d'un système utilisant un laser pour la création de micropores dans la peau, permettant la diffusion de l'antigène dans le derme, sa prise en charge par les DCs du derme, et l'induction de réponses immunitaires (Weiss et al., 2012). Cette technique combinée à l'utilisation d'un antigène couplé à la molécule XCL1 permet de protéger les souris contre le mélanome (Terhorst et al., 2015).

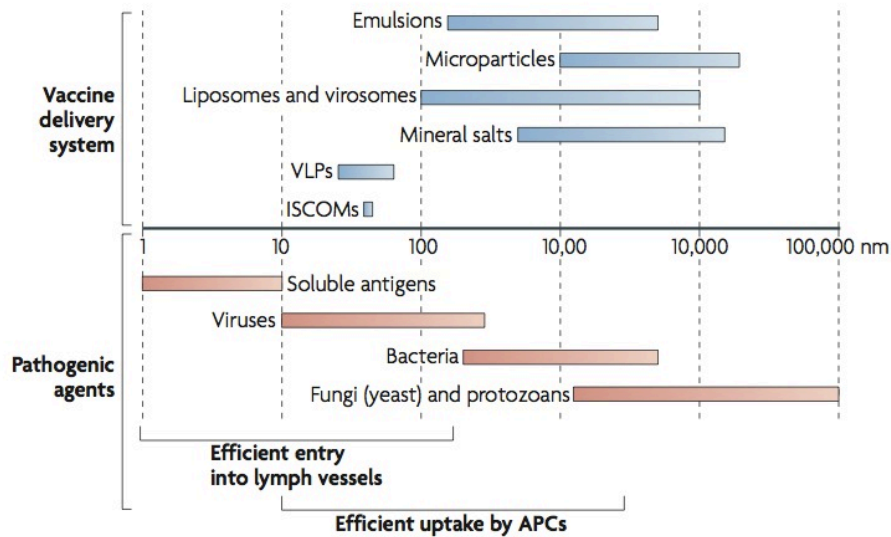
Ainsi, un nombre croissant de méthodes innovantes permet de cibler spatialement les DCs de l'épiderme et du derme. Ces stratégies vaccinales permettent d'induire de fortes réponses immunitaires, de réduire la quantité d'antigène utilisé, de limiter les effets secondaires et les risques de contamination, et sont généralement mieux acceptées par les individus.



**Figure 6 : Différentes approches de vaccination par la peau.**  
D'après (Engelke et al., 2015).

### 1.6.2 Ciblage physique

Les DCs sont spécialisées dans la reconnaissance et la capture des pathogènes, étapes cruciales dans la mise en place de réponses immunitaires adaptatives. Les paramètres physico-chimiques de l'antigène vaccinal peuvent être optimisés pour se rapprocher de la taille, la forme, la structure, et l'organisation moléculaires des pathogènes afin de permettre un ciblage efficace des DCs (Bachmann and Jennings, 2010) (Figure 7).



**Figure 7 : Taille des composés de transport de l'antigène et des agents pathogènes.**  
D'après (Bachmann and Jennings, 2010).

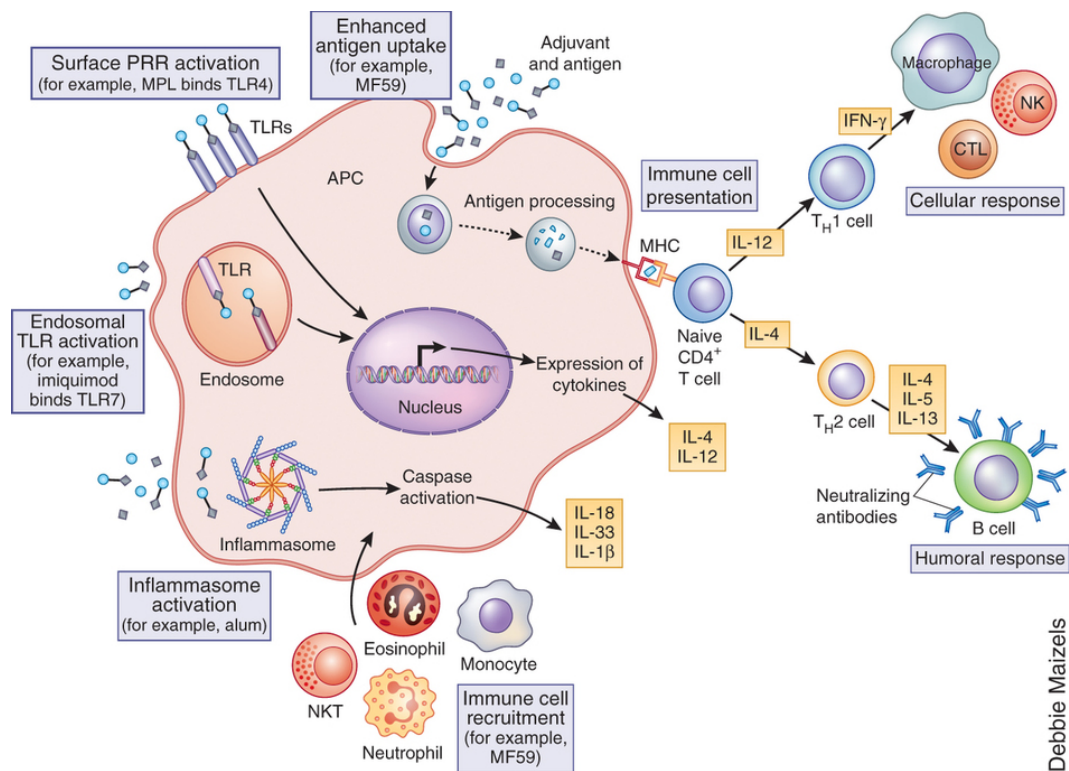
La taille de l'antigène influence grandement sa prise en charge par les DCs (He et al., 2010). L'antigène peut mesurer quelques nanomètres de diamètre (protéines et sous-unités virales), une centaine de nanomètres (20-200 nm pour les VLPs, nanoparticules, liposomes, virosomes) voire se situer à l'échelle du micromètre (100 nm-20 µm pour les particules émulsionnées). Les particules de taille comprise entre 20 et 200 nm sont généralement les mieux capturées par les DCs humaines et murines (Foged et al., 2005; He et al., 2010; Manolova et al., 2008). De façon intéressante, des particules de polymère associées à un antigène mesurant 200 nm sont présentées par les DCs plus longtemps (72 h) par rapport aux particules de 40 nm (48 h) *in vivo* (Benson et al., 2015). Hormis une prise en charge et une durée de présentation plus efficaces, les particules de 20 à 200 nm ont également la capacité de diffuser passivement jusqu'au ganglion et passer à travers les jonctions des cellules endothéliales lymphatiques, où elles sont prises en charge par les macrophages et DCs résidents du ganglion (Manolova et al., 2008; Reddy et al., 2006, 2007). Cette dernière propriété s'avère particulièrement intéressante pour des antigènes contre lesquels une immunité cellulaire T CD8+ cytotoxique est recherchée (tumeurs, virus), car le ganglion contient une population de DCs CD8+ résidentes capables de présentation croisée. Fifis et al. ont ainsi démontré que des particules de polyester de 40 nm de diamètre possèdent une taille optimale pour un drainage vers le ganglion et l'induction d'une immunité T CD8+ contre les tumeurs (Fifis et al., 2004). La capacité des particules à migrer rapidement vers le ganglion favorise également l'acquisition de l'antigène par les cellules B folliculaires, soit directement, soit par transfert par les macrophages sous-capsulaires (Carrasco and Batista, 2007; Junt et al., 2007).

Parmi les vecteurs vaccinaux répondants aux critères de taille et de similarité aux pathogènes, les nanoparticules de polymère (NPs) et les VLPs possèdent un fort potentiel pour le ciblage physique des DCs cutanées.

**Les NPs de polymère** sont généralement constituées d'acide poly-lactique (PLA), d'acide poly-glycolique (PGA), ou d'acide poly-lactique glycolique (PLGA) et leur taille est comprise entre 10 et 200 nm (Yue and Ma, 2015). L'acide poly-lactique est un polymère biocompatible et biodégradable, et permet l'encapsulation ou l'adsorption de l'antigène au sein de sa matrice (Lamalle-Bernard et al., 2006). Les propriétés physiques des NPs permettent ainsi la protection de l'antigène contre la dénaturation, son transport et sa prise en charge par les DCs, et sa libération prolongée dans le temps (Yue and Ma, 2015). Les NPs de PLA ont démontré leur efficacité à être prises en charge par les DCs cutanées humaines (Liard et al., 2012), à induire des réponses humorales et cellulaires chez la souris (Climent et al., 2014; Guillon et al., 2007; Liard et al., 2011; Mahe et al., 2009), et à induire des réponses dans les muqueuses (Pavot et al., 2016).

**Les « Virus-Like Particles »** sont des particules virales sans génome et non répliquatives dont la taille varie de 50 à 100 nm, qui reproduisent la structure et la conformation d'un virus et permettent de véhiculer des antigènes de surface. Les VLPs s'assemblent spontanément à partir des protéines de la capsid et de l'enveloppe du virus choisis, qui peuvent servir d'immunogène (VLPs autologues) ou de transporteur pour d'autres antigènes (VLPs hétérologues). Leur taille permet la diffusion passive jusqu'au ganglion (Manolova et al., 2008). Du fait de la présence d'un grand nombre de motifs répétitifs, les VLPs sont particulièrement efficaces dans l'induction de réponses humorales (Chackerian et al., 2002; Huret et al., 2013). Actuellement, trois vaccins commerciaux utilisent la technologie des VLPs : Vaccin contre l'hépatite B, contre le papillomavirus, et contre l'hépatite E (Zhao et al., 2013).

Ces méthodes de ciblage physique des DCs jouent principalement sur la taille et la structure du système de transport de l'antigène. Ces méthodes peuvent aussi être combinées à d'autres systèmes ayant pour fonction de créer un environnement propice à la capture de l'antigène, telles que les adjuvants non-immunomodulateurs. Ce type d'adjuvant inclus les sels d'aluminium (Alum), les émulsions eau-dans-huile (« Incomplete Freund's Adjuvant », Montanide ISA51) et huile-dans-eau (MF59) (Guy, 2007; Reed et al., 2013). Pour la plupart de ces adjuvants, les modes d'actions sont peu connus. Il était initialement admis qu'ils agissent principalement en créant un dépôt aggloméré de particules antigéniques, permettant une rétention et une stabilité accrue du composé au site d'injection. Cependant, il semble que leur mécanisme d'action repose plutôt sur la création d'un environnement immunocompétent et favorable au recrutement des CPAs, à leur activation, et leur prise en charge de l'antigène (De Gregorio et al., 2013) (Figure 8).



Debbie Maizels

**Figure 8 : Mécanismes d'action supposés des adjuvants immunomodulateurs et non immunomodulateurs.**

D'après (Reed et al., 2013). Les adjuvants non-immunomodulateurs incluent les émulsions et les sels d'aluminium. Les adjuvants immunomodulateurs incluent les ligands de TLRs. Les principaux mécanismes suggérés sont l'augmentation du recrutement des cellules immunitaires, de leur état d'activation, de leur prise en charge et présentation de l'antigène, ou de l'activation de l'inflammasome.

### 1.6.3 Ciblage spécifique

Les cellules dendritiques expriment un large éventail de molécules membranaires, telles que des récepteurs de surface, qui sont plus ou moins spécifiques de certaines sous-populations. Un domaine relativement récent de la vaccination vise à coupler l'antigène à des anticorps ou des ligands reconnaissant de manière spécifique ces récepteurs de surface, afin de cibler spécifiquement des populations de DC d'intérêt (Bonifaz et al., 2002; Cohn and Delamarre, 2014; Kreutz et al., 2013; Macri et al., 2016; Romani et al., 2012) (Figure 9). Cette technique présente l'avantage de pouvoir adresser des quantités importantes d'antigène directement aux DCs, et d'orienter la réponse immunitaire adaptative. Notre connaissance des différentes populations de DCs de la peau et des ganglions drainants s'est considérablement accrue, et avec elle l'identification de molécules spécifiques de certaines populations. Compte tenu du grand nombre d'études sur le sujet, ce chapitre va se focaliser sur le ciblage des DCs de la peau et du ganglion drainant la peau.

Récemment identifiée, la molécule **XCR1** est exprimée spécifiquement par les DCs douées de présentation croisée, les DCs CD103<sup>+</sup> des tissus et CD8<sup>+</sup> des ganglions (Bachem et al., 2012; Crozat et al., 2011). L'injection intradermique de l'antigène OVA couplé au ligand XCL1 induit une prise en

charge de l'antigène uniquement par les DCs XCR1+ du derme, et permet l'induction de forte réponses T CD8+ anti-tumorales dans un modèle murin de mélanome (tumeur exprimant l'antigène OVA) (Terhorst et al., 2015). Dans une autre étude, l'injection intraveineuse d'un anticorps anti-XCR1 couplé à OVA permet l'induction de forte réponses T CD8+ dans la rate et la protection contre la croissance tumorale, mais nécessite l'addition du LPS comme adjuvant (Hartung et al., 2015). Ainsi, le ciblage des DCs XCR1+ de la peau induit de meilleures réponses que le ciblage de leur homologue des tissus lymphoïdes, probablement dû au microenvironnement inflammatoire généré lors de l'injection intradermique.

**La molécule langérine** est exprimée à la fois par les LCs et par les cellules XCR1+ du derme. L'injection ID de OVA couplée à un anticorps anti-langérine (langérine/OVA) combinée à un mélange d'adjuvant contenant le ligand du TLR3 poly(I:C) et un anticorps anti-CD40 induit de forte réponse cytotoxiques T CD8+ (Flacher et al., 2014). Pour déterminer la contribution individuelle des LCs et DCs XCR1+ du derme dans cette réponse, les auteurs ont créé des chimères en irradiant des souris sauvages ou déficientes en LCs et en les reconstituant avec de la moelle de ces mêmes souris. Ainsi, lorsque que seules les DCs XCR1+ du derme sont ciblées par le composé, la réponse T CD8+ est maintenue. En revanche, le ciblage spécifique des LCs diminue fortement la réponse T CD8+, et de façon surprenante, induit leur tolérance. Ces résultats confirment de précédentes observations obtenues en utilisant des explants de peau humaine injectée avec langérine/OVA (Flacher et al., 2010).

Dans une étude récente, Yao et al. ont déposé topiquement un anticorps anti-langérine humaine couplé à l'antigène 2W1S pour cibler spécifiquement les LCs dans des souris où seuls les LCs expriment la langérine humaine. Dans ce modèle, les auteurs ont observés une forte induction de T CD4+ auxiliaires folliculaires (T<sub>FH</sub>) spécifiques de l'antigène (Yao et al., 2015). Après ciblage spécifique des DCs XCR1+ du derme, des réponses T<sub>FH</sub> similaires ont été observées, mais les réponses humorales induites sont plus faibles. Ces résultats sont en accord avec d'autres études démontrant l'induction de réponses T<sub>FH</sub> après injection intraveineuse d'un antigène couplé à un anticorps ciblant **la molécule Clec9A**, exprimée spécifiquement par les DCs XCR1+ (des tissus et des organes lymphoïdes secondaires) (Kato et al., 2015; Lahoud et al., 2011).

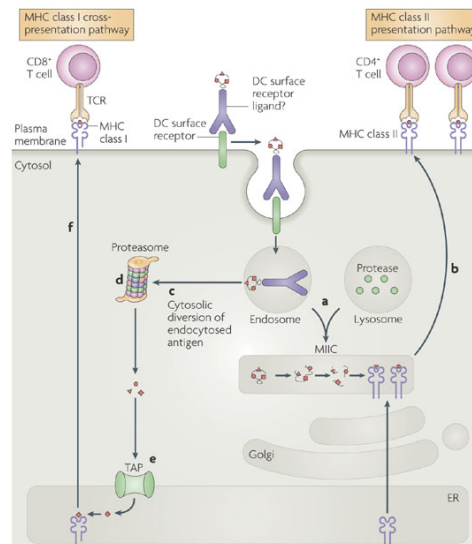
De façon intéressante, le ciblage d'une même population via des récepteurs différents n'induit pas les mêmes réponses. En effet, le ciblage des DCs XCR1+ par un anticorps **anti-DEC205 ou anti-Clec12A** induit de faibles réponses humorales (Lahoud et al., 2011).

De nombreuses études se sont intéressées au ciblage des DCs via le récepteur DEC205, exprimés à la fois par les DCs XCR1+ tissulaires et lymphoïdes, mais aussi par les LCs. Du fait de son expression relativement non-spécifique par rapport à XCR1 et à la langérine, il ne représente aujourd'hui pas une molécule de choix pour le ciblage des DCs de la peau (Macri et al., 2016).

Hormis la spécificité du récepteur, un critère secondaire à prendre en compte dans le choix du récepteur à cibler concerne ses propriétés biologiques, telles que son niveau d'expression, sa vitesse

d'internalisation, et son recyclage à la surface de la cellule. Une étude de Reuter et al. a cependant révélée qu'aucun de ces paramètres n'a d'influence sur la capacité des DCs ciblée à présenter l'antigène par les molécules de CMH de classe I ou II (Reuter et al., 2015). En d'autres termes, la nature même de la molécule ciblée et les voies d'activations qui lui sont liées sont les principaux déterminants de la voie de présentation induite après ciblage.

En résumé, le ciblage spécifique des DCs est une stratégie à fort potentiel, qui peut être combinée avec des modes d'injection (intradermique, micro-perforation, etc.) et des vecteurs particuliers (particules, liposomes, virus) pour optimiser et orienter la réponse adaptative (Kreutz et al., 2013). Cependant, les données de la littérature démontrent de fortes disparités selon que le ciblage soit réalisé en condition non inflammatoire (état basal) ou en présence d'adjuvants (Bonifaz et al., 2002). Des mises au point restent donc nécessaires afin d'évaluer la meilleure combinaison de molécules de ciblage et d'adjuvants pour une réponse hautement spécifique et de forte intensité.



**Figure 9 : Principe de ciblage des cellules dendritiques avec des anticorps dirigés contre des récepteurs de surface.**

Les voies de présentation des peptides associées aux molécules de CMH I ou II sont représentées. D'après (Tacke et al., 2007).



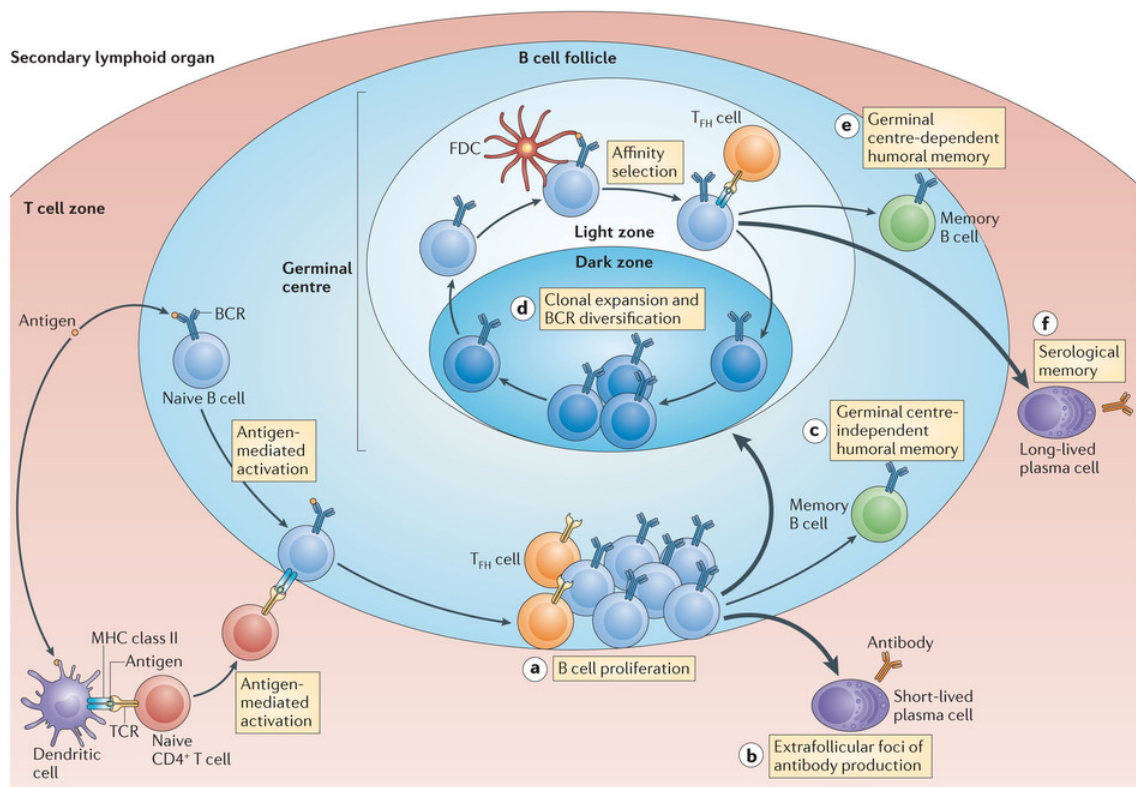
### **Aparté 3 | Ciblage par ligands de TLR**

Bien qu'exprimés par d'autres populations cellulaires que les cellules dendritiques, les TLR constituent des molécules d'intérêt pour le ciblage de l'antigène (Figure 8). Contrairement aux adjuvants basés sur le transport et la rétention de l'antigène et à la plupart des molécules membranaires citées ci-dessus, ces molécules possèdent de fortes propriétés immunomodulatrices. En effet, la ligation du TLR constitue un signal fort de danger, apparu très tôt dans l'évolution du système immunitaire (on retrouve des TLR chez les invertébrés et les plantes). La reconnaissance par le TLR de son ligand entraîne de nombreuses cascades de signalisation et la différenciation et la maturation de la cellule. Actuellement, de nombreux ligands de TLR sont licenciés ou testés en clinique, tels que AS04 (ligand de TLR4), CpG (TLR9), Flagellin (TLR5), Imiquimod (TLR7), et poly(I:C) (TLR3) (Gutjahr et al., 2016; O'Neill et al., 2009). L'utilisation de ligand de TLR comme adjuvant présente toutefois certains inconvénients : Il ne permettent pas de cibler spécifiquement des populations discrètes de DCs, les voies d'activations qu'ils induisent sont multiples, et leur sur-activation peut conduire à une inflammation chronique.

## 2. Cellules $T_{FH}$ , acteur clé de la réponse immunitaire adaptative

### 2.1 Définition

Les cellules T « helper » folliculaires ( $T_{FH}$ ) constituent une sous-population de T  $CD4^+$  spécialisée dans l'induction des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires, et apportent une aide critique aux lymphocytes B pour l'induction et le maintien de l'immunité humorale de haute affinité (Figure 10). Le succès de la vaccination repose sur la génération de cellules sécrétrices d'anticorps, elles mêmes sélectionnées par les cellules  $T_{FH}$  pour leur affinité à l'antigène. Ainsi, la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui gouvernent la génération des cellules  $T_{FH}$  est centrale pour l'élaboration de meilleures stratégies vaccinales.

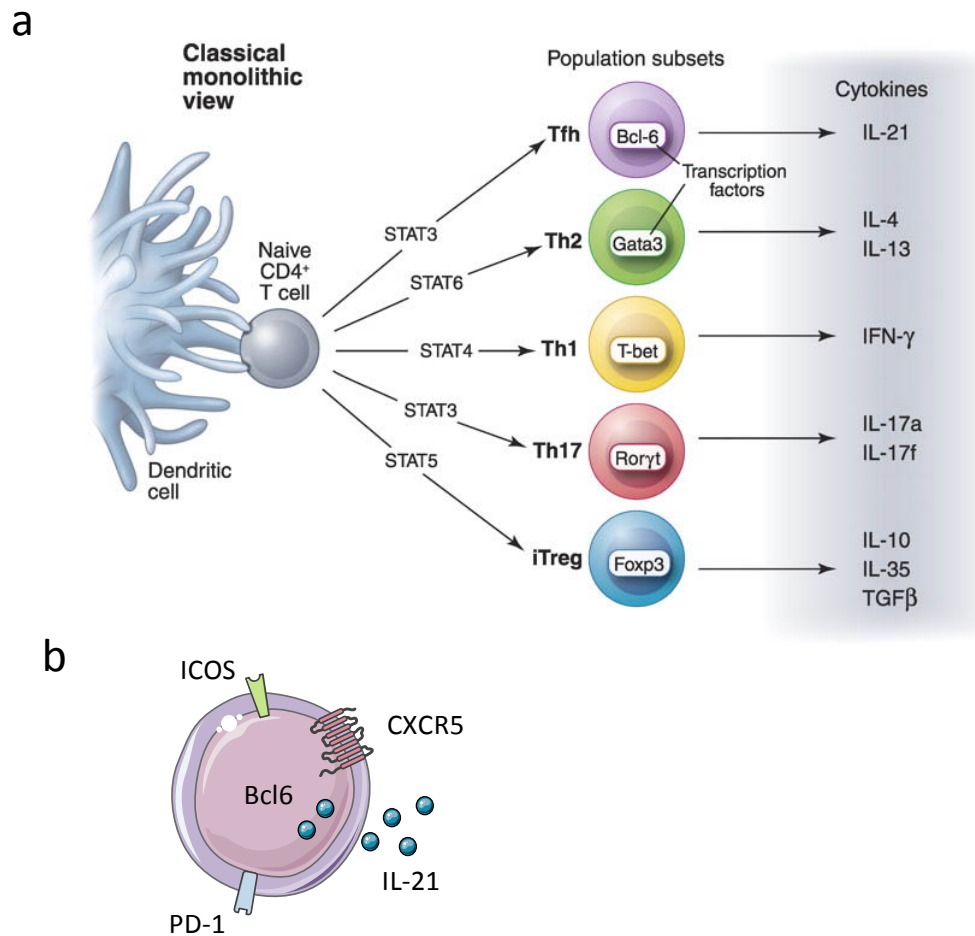


**Figure 10 : Dynamique des cellules  $T_{FH}$  et B au sein du ganglion lymphatique.**  
D'après (Kurosaki et al., 2015).

#### 2.1.1 Identification des $T_{FH}$

Le concept selon lequel les lymphocytes B requièrent une aide en provenance d'une population d'origine thymique a été établi par Miller et al. il y a plus de 50 ans, par l'observation que des souris

thymectomisées sont incapables de générer des anticorps après immunisation avec des globules rouges de mouton (Miller, 1965). Au début des années 2000, trois groupes ont permis l'identification formelle des cellules  $T_{FH}$  en analysant des amygdales humaines, dans lesquelles une population de  $T\ CD4^+$  exprime le récepteur à chimiokine CXCR5, dont le ligand CXCL13 est exprimé spécifiquement dans le follicule B et permet la migration des cellules dans cette zone particulière des organes lymphoïdes secondaires (Breitfeld et al., 2000; Kim et al., 2001; Schaerli et al., 2000). Contrairement aux cellules  $T\ CD4^+ CXCR5^-$ , les  $LT\ CD4^+ CXCR5^+$  expriment fortement les molécules de stimulation CD40L et ICOS, et induisent la production d'anticorps par les cellules B (Breitfeld et al., 2000). Il faudra cependant attendre l'année 2009 et la publication de 3 études pour convaincre la communauté scientifique que les cellules  $T_{FH}$  représentent une lignée de différenciation distincte, qui au même titre que les lymphocytes  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$ , et  $T_{REG}$ , possède un facteur de transcription « signature » (T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t et Foxp3 respectivement) appelé Bcl6 (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). De façon similaire à l'IFN- $\gamma$  pour les  $T_H1$ , l'IL-4 pour les  $T_H2$ , l'IL-17 pour les  $T_H17$  et l'IL-10 pour les  $T_{REG}$ , les  $T_{FH}$  expriment spécifiquement une cytokine signature, l'IL-21, qui assure leur fonction d'aide aux lymphocytes B (Linterman et al., 2010; Zotos et al., 2010) (Figure 11a). L'expression intracellulaire de Bcl6 et d'IL-21, l'expression membranaire de CXCR5, PD-1, et ICOS, et la localisation dans la zone B restent les indicateurs les plus efficaces pour identifier les cellules  $T_{FH}$  chez l'homme et la souris, mais ne constituent pas des marqueurs exclusifs lorsqu'ils sont utilisés individuellement (Baumjohann and Ansel, 2013) (Figure 11b). Récemment, Dan et al. ont mis au point une méthode permettant de détecter les cellules  $T_{FH}$  du sang spécifiques de l'antigène chez l'homme sans marquage intracellulaire de cytokine, basée sur les niveaux d'expression d'un panel de marqueurs membranaires, dont OX40 et PD-L1 (Dan et al., 2016).



**Figure 11 : Identification des cellules T<sub>FH</sub> en tant que programme de différenciation distinct.**

(a) Facteurs de transcription et cytokines signatures des différents sous-types de lymphocytes T « helper ». D'après (O'Shea and Paul, 2010). (b) Principales molécules pour l'identification des cellules T<sub>FH</sub> *ex vivo*.

### 2.1.2 Facteurs de transcription et molécules associés

Depuis l'identification de Bcl6 comme régulateur du programme T<sub>FH</sub>, une multitude d'autres facteurs de transcription jouant un rôle dans leur développement, leur migration, et leur fonction ont été identifiés. La Figure 12 résume les principaux facteurs connus, et leurs voies de régulation. Ici, seuls les principaux facteurs et molécules associés aux T<sub>FH</sub> seront brièvement décrits.

#### Facteurs de transcription

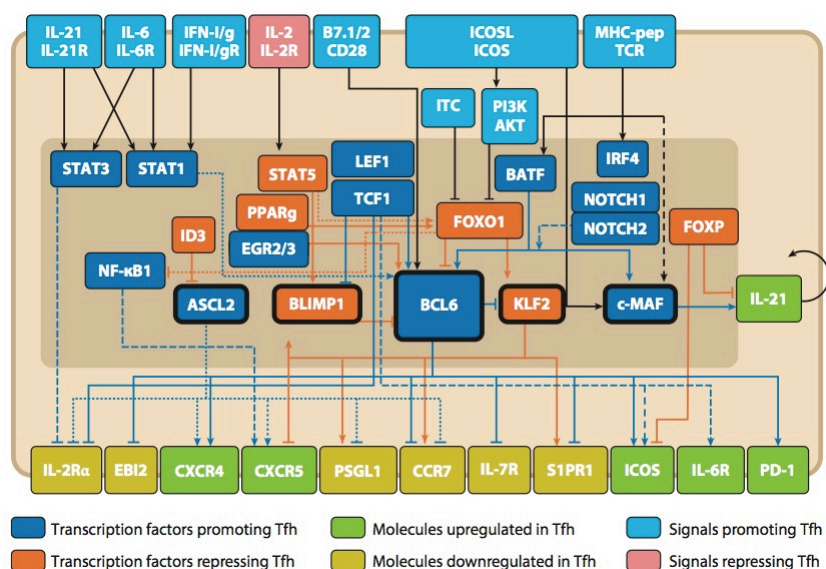
**Bcl6** est une molécule centrale qui contribue à l'initiation et au maintien du programme T<sub>FH</sub>. Les souris dont les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont déficients en Bcl6 (Bcl6<sup>fl/fl</sup>CD4<sup>Cre</sup>) ne possèdent pas de T<sub>FH</sub>, et la seule transduction de cellules T CD4<sup>+</sup> naïves avec Bcl6 permet leur polarisation en T<sub>FH</sub> (Hollister et al., 2013; Johnston et al., 2009). Dans les cellules T<sub>FH</sub> murines et humaines, Bcl6 se fixe sur plusieurs milliers de gènes, et agit uniquement comme répresseur de la transcription (Hatzi et al., 2015; Liu et al., 2016). Ainsi, Bcl6 limite l'expression de protéines impliquées dans la migration et la

sortie de l'organe lymphoïde secondaire (EBI2, CCR7, CCR6, S1PR1, PSGL-1) (Hatzi et al., 2015), dans la différenciation des autres sous-population de T auxiliaires (T-bet, GATA3, ROR $\alpha$ , BLIMP1) (Crotty, 2014; Johnston et al., 2009), et l'axe IL-7R/STAT5, qui permet la séparation précoce entre les T<sub>FH</sub> et les non-T<sub>FH</sub> (Liu et al., 2016; McDonald et al., 2016). Bcl6 réprime également l'expression du facteur Klf2, lui même impliqué dans l'expression de BLIMP1, T-bet, GATA3 et S1PR1 et capable de réguler l'expression de Bcl6 et de CXCR5 (Lee et al., 2015; Weber et al., 2015).

Bien que Bcl6 n'active pas directement la transcription d'autres gènes, sa surexpression augmente indirectement l'expression des molécules pro-T<sub>FH</sub> CXCR5, CXCR4, PD-1, ICOS, IL6-R et SAP.

La nature des signaux situés en amont de l'expression de Bcl6 reste encore à éclaircir. Choi et al. ont initialement proposé que le premier signal nécessaire à l'expression de Bcl6 est dépendent de la ligation de ICOS avec son ligand (ICOSL) (Choi et al., 2011). Plus récemment, Weber et al. ont suggéré que le signal délivré par la ligation de CD28 agit en amont de Bcl6 et de ICOS (Weber et al., 2015). L'IL-6 semble également jouer un rôle majeur dans les étapes initiales de différenciation des T<sub>FH</sub>, notamment en activant Bcl6 via STAT1 et STAT3 (Choi et al., 2013a). Ces étapes initiales seront discutées dans une prochaine section de ce chapitre.

Parmi les autres facteurs de transcription essentiels pour l'induction du programme T<sub>FH</sub>, **Maf** induit l'expression de l'IL-21, CXCR5, CXCR4, PD-1 et ICOS (Kroenke et al., 2012). Chez les personnes atteintes d'une mutation dans le gène *Stat3*, un profond déficit en cellules T<sub>FH</sub> et B mémoire est observé (Ma et al., 2012). Chez la souris, les T CD4<sup>+</sup> déficients en STAT3 présentes des défauts de différenciation en T<sub>FH</sub> (Ray et al., 2014).



**Figure 12 : Régulation transcriptionnelle du programme T<sub>FH</sub>.**  
D'après (Vinuesa et al., 2016).

## Molécules de surface

**CXCR5** est un récepteur à chimiokine dont le ligand CXCL13 exprimé par les cellules stromales et dendritiques folliculaires guide la migration des  $T_{FH}$  et des lymphocytes B dans le follicule (Gunn et al., 1998). Ainsi la présence de T CD4+ dans la zone B permet à elle seule d'identifier les cellules  $T_{FH}$  en histologie. CXCR5 est exprimé précocement par les  $T_{FH}$  suite au signal délivré par la ligation de ICOS, il est directement inhibé par Klf2 et Blimp1, et son expression initiale ne dépend pas de celle de Bcl6 (Liu et al., 2012; Weber et al., 2015). L'expression de CXCR5 par les « pré- $T_{FH}$  » est corrélée avec une diminution de l'expression de CCR7, permettant à la cellule de sortir de la zone T pour se rendre vers la zone B (Haynes et al., 2007).

**ICOS** (Inducible T cell costimulator) est une molécule de la même famille que CD28 et CTLA-4. Son expression est indispensable à la génération des cellules  $T_{FH}$ . Chez des souris déficientes en ICOS, le développement lymphocytaire est normal, mais les réponses adaptatives de type  $T_H2$ ,  $T_{FH}$  et humorales sont sévèrement impactées (Bauquet et al., 2009; Dong et al., 2001). Tout comme CD28, le signal produit lors de la reconnaissance de son ligand constitue l'un des éléments déclencheurs du programme  $T_{FH}$ . L'expression de ICOS est fortement régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Figure 12). L'expression de ICOS est également requise pour le maintien du phénotype  $T_{FH}$ . En effet, le blocage de son ligand ICOSL dans un centre germinatif déjà établi induit le départ des  $T_{FH}$  de la zone B et la perte de leur phénotype, diminuant ainsi la réponse immunitaire (Weber et al., 2015). ICOSL est exprimé par certaines cellules dendritiques et par les lymphocytes B. La liaison du  $T_{FH}$  et de la cellule B via ICOS-ICOSL est cruciale pour le bon positionnement du  $T_{FH}$  à la jonction T/B, son entrée dans le follicule, et sa fonction d'aide aux cellules B, notamment en induisant la sécrétion d'IL-21 (Bauquet et al., 2009; Liu et al., 2014; Xu et al., 2013).

Bien que moins spécifique des  $T_{FH}$  que les molécules ci-dessus, **PD-1** reste un marqueur d'intérêt pour l'identification des  $T_{FH}$ . Ce récepteur inhibiteur est fortement exprimé par les  $T_{FH}$ , et son expression conjointe avec CXCR5 reste le moyen le plus simple d'identifier les  $T_{FH}$  en cytométrie de flux. PD-1 est un marqueur de « fatigue cellulaire » exprimé après stimulation prolongée du TCR et semble être impliqué dans la survie et la fonction des cellules  $T_{FH}$  dans le centre germinatif, et dans la fonction suppressive des T folliculaires régulateurs ( $T_{FR}$ ), un analogue aux  $T_{REG}$  retrouvé dans le follicule B (Good-Jacobson et al., 2010; Sage et al., 2012) (détaillé dans la partie 2.4.4).

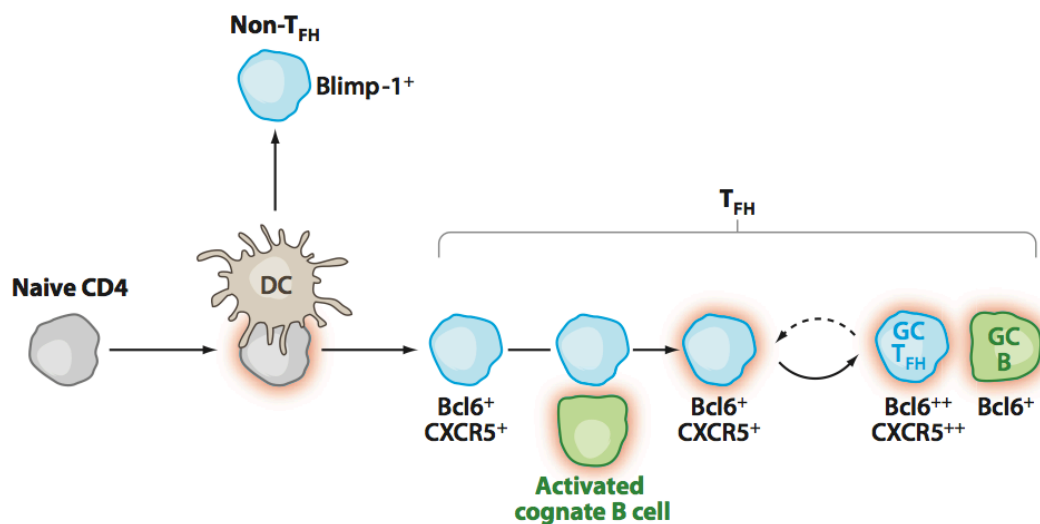
## Facteurs post-transcriptionnels

**Roquin** est une protéine qui se fixe sur l'ARN de *Icos* et *Ox40* et induit leur dégradation, limitant ainsi l'accumulation des cellules  $T_{FH}$  (Glasmacher et al., 2010; Vogel et al., 2013). Chez des souris dont les lymphocytes T sont déficients en Roquin, une génération spontanée de centres germinatifs et un syndrome auto-immun sont observés.

Les microARNs de la famille 17~92 promeuvent la différenciation des  $T_{FH}$  notamment en limitant l'expression de *Rora* (Baumjohann et al., 2013a), et en augmentant l'expression de *Icos* (Kang et al., 2013). Leur induction dépend directement du signal délivré par la stimulation de CD28 (Wang et al., 2014).

## 2.2 Modèle séquentiel de différenciation des $T_{FH}$

La différenciation des  $T_{FH}$  est formée d'une succession d'étapes finement régulées dans le temps et l'espace (Figure 13). Tout comme les autres populations de T auxiliaires, la différenciation des  $T_{FH}$  est initiée par la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques. Malgré notre connaissance des mécanismes par lesquels la DC permet l'induction des  $T_{FH}$ , la nature des DCs impliquées dans cette étape critique du processus de différenciation est peu connue, et sera développée dans une partie séparée (2.3). En fonction des signaux reçus lors de la présentation de l'antigène par la DC, le T  $CD4^+$  naïf évolue vers un état dit de « pré- $T_{FH}$  », qui le conduit à migrer à l'interface entre les zones T et B et à interagir étroitement avec le lymphocyte B. A l'issue de cette rencontre, le  $T_{FH}$  entame sa migration dans la zone B et le centre germinatif où il assure ses fonctions principales d'aide aux cellules B. Enfin, à la résolution de l'inflammation et de la réponse adaptative, le centre germinatif est finement régulé et contrôlé et certaines cellules  $T_{FH}$  s'engagent dans un processus de mémoire immunitaire.

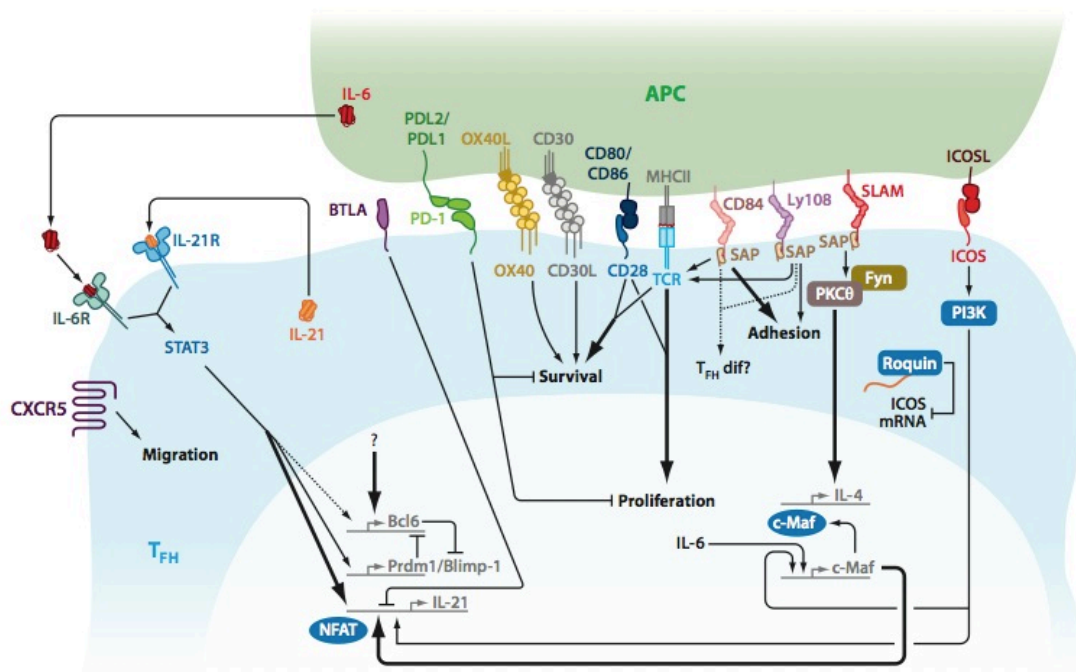


**Figure 13 : Modèle séquentiel de différenciation des cellules  $T_{FH}$ .**  
D'après (Crotty, 2011).

### 2.2.1 Du lymphocyte T CD4+ naïf au pré-T<sub>FH</sub>

Le groupe de Laufer et al. a démontré que les DCs sont à la fois nécessaires et suffisantes pour initier le programme transcriptionnel des T<sub>FH</sub> (expression de CXCR5, ICOS, et Bcl6) (Goenka et al., 2011). Cependant, la présentation de l'antigène par les lymphocytes B est requise pour la différenciation terminale des T<sub>FH</sub> et leur expression de la cytokine IL-21 (Barnett et al., 2014). A l'inverse, les cellules B seules ne sont pas suffisantes pour la génération optimale des T<sub>FH</sub> (Barnett et al., 2014).

**Plusieurs facteurs jouent un rôle clé dans le développement du T CD4+ naïf en pré-T<sub>FH</sub> :** Les cytokines IL-6 et IL-21, le couple ICOS-ICOSL, le signal délivré par le TCR, et la quantité d'antigène présent. A l'inverse, la cytokine IL-2 impacte négativement cette différenciation. Ces facteurs proviennent de l'interaction entre la cellule dendritique et le lymphocyte T naïf et interviennent précocement après immunisation (des premières heures à 72h) (Figure 14).



**Figure 14 : Molécules impliquées dans l'interaction entre la cellule dendritique et la cellule T<sub>FH</sub>.** D'après (Crotty, 2011).

Contrairement aux autres sous-types de T auxiliaires, pour lesquels la présence d'une cytokine clé permet l'initiation de leur programme (par exemple IL-12 pour les T<sub>H1</sub>), aucune cytokine n'est suffisante à elle seule pour l'induction des T<sub>FH</sub>. Bien que l'IL-6 induise l'expression de Bcl6 *in vitro* (Nurieva et al., 2009), les souris déficientes en IL-6 ne sont pas impactées dans leur capacité à générer des cellules T<sub>FH</sub> après infection par le virus LCMV (Eto et al., 2011). En revanche, dans ce dernier modèle d'infection ou après infection par le virus influenza, la déficiente combinée en IL-6 et IL-21 impacte de façon critique la réponse T<sub>FH</sub> et B du centre germinatif (Eto et al., 2011; Karnowski et al.,



2012). Ainsi l'IL-6 reste une cytokine particulièrement cruciale dans l'initiation du programme TFH et agit de façon redondante avec l'IL-21 sur STAT3 et STAT1 (Crotty, 2014).

Comme décrit précédemment, l'expression de ICOS se fait précocement et, avec l'expression de Bcl6 et CXCR5, marque la transition du T CD4+ naïf en pré-T<sub>FH</sub>. ICOSL est exprimé par certaines populations de cellules dendritiques, et après reconnaissance de son récepteur induit l'expression de CXCR5 et de Bcl6 (Choi et al., 2011; Shin et al., 2015).

La liaison du TCR de la cellule T avec le complexe formé par le CMH de classe II et le peptide antigénique de la DC est une étape indispensable à la polarisation du T CD4+ naïf en T effecteur. En transférant dans des souris des cellules T naïves exprimant des TCR transgéniques de différentes affinités pour l'antigène PCC, Fazilleau et al. ont démontré que les lymphocytes T possédant un TCR de haute affinité pour l'antigène se développent préférentiellement en cellules T<sub>FH</sub> (CXCR5+) après immunisation (Fazilleau et al., 2009). Ces résultats sont confirmés par Tubo et al., qui suggère que c'est la durée d'interaction entre le TCR et le complexe CMH II-peptide qui influe sur la polarisation différentielles des T naïfs en T<sub>H1</sub> ou en T<sub>FH</sub>, mais que d'autres facteurs influencent également ce phénomène (Tubo et al., 2013). De même, des expériences de microscopie bi-photonique *in vivo* ont démontré que la différenciation des T<sub>FH</sub> requière des contacts longs (>10 min) et prolongés (jusqu'à 72 h après immunisation) entre la DC et le T CD4+ (Benson et al., 2015), et que la disponibilité et la persistance de l'antigène sont des facteurs cruciaux dans l'induction des T<sub>FH</sub> (Baumjohann et al., 2013b; Deenick et al., 2010).

L'IL-2 est un puissant inhibiteur de la polarisation des T<sub>FH</sub>, en activant la voie STAT5 et l'expression de Blimp1 (Ballesteros-Tato et al., 2012; Johnston et al., 2012). Récemment, Li et al. ont démontré que les DCs situées à proximité de la limite T/B de la rate sur-expriment le récepteur à l'IL-2, permettant ainsi « l'extinction » du signal négatif délivré par l'IL-2 et la promotion du phénotype T<sub>FH</sub> (Li et al., 2016).

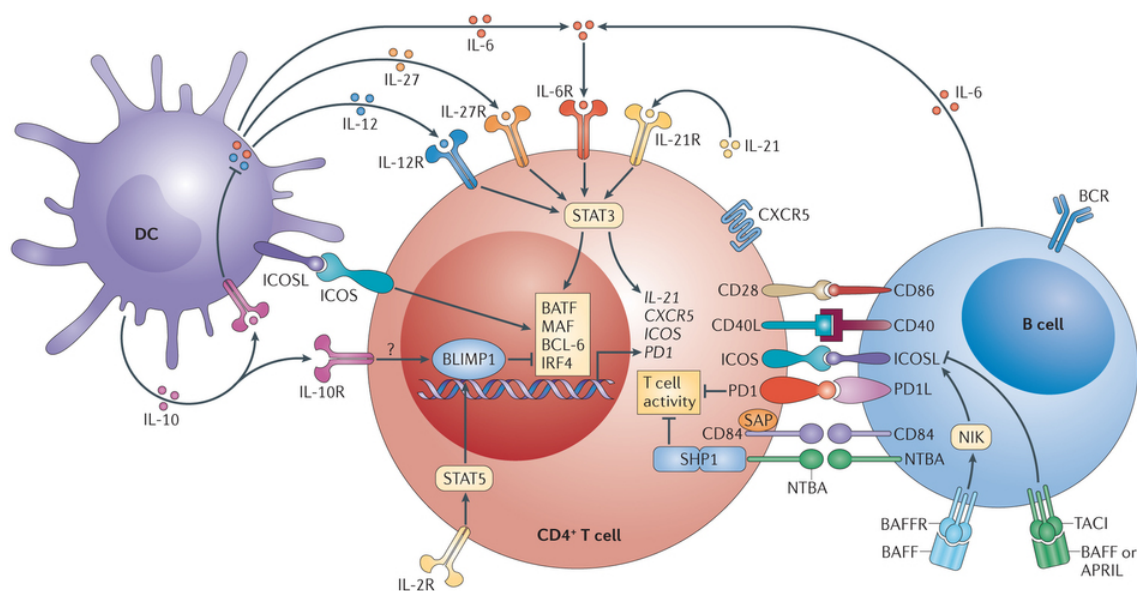
Ainsi, chez la souris, les étapes initiales de la différenciation des T<sub>FH</sub> entre « pré-T<sub>FH</sub> » dépendent des DCs et de leur niveau d'expression de molécules de costimulation (CD80, CD86, ICOSL, OX40L), de leur balance cytokinique (plus d'IL-6 et moins d'IL-2), et de leur capacité à présenter l'antigène de façon continue, mais sont aussi fortement influencées par un facteur intrinsèque à chaque cellule T, l'affinité du TCR pour l'antigène.

Chez l'homme, plusieurs études ont révélé le rôle crucial de l'IL-12 et du TGF- $\beta$  dans la différenciation des cellules T<sub>FH</sub>, alors que l'IL-6 ne semble pas jouer de rôle prépondérant (Ma et al., 2012; Schmitt et al., 2009a, 2013, 2014a). De façon intéressante, l'IL-12 induit également la production de T-bet, et donc la différenciation des T<sub>H1</sub>. Une récente étude a confirmée la proximité des TH1 et T<sub>FH</sub> humains, en démontrant que T-bet induit l'expression de CXCR5 et que le facteur IRF4 est déterminant dans la promotion du phénotype T<sub>FH</sub> contre le phénotype T<sub>H1</sub> (Schmitt et al., 2016).

### 2.2.2 Migration à la bordure T/B et interaction avec le lymphocyte B

A l'issue de ses interactions répétées avec les cellules dendritiques dans la zone T, le pré- $T_{FH}$  possède un phénotype intermédiaire caractérisé par l'expression de Bcl6, ICOS, et CXCR5. Le placement des  $T_{FH}$  à la frontière des zones T et B est dépendant de l'expression de CXCR5 et de EBI2, dont le ligand  $7\alpha,25$ -dihydroxycholesterol est fortement exprimé dans la région interfolliculaire (Li et al., 2016). En revanche, l'entrée du  $T_{FH}$  dans le follicule B requière en plus de CXCR5 l'expression de ICOS (Xu et al., 2013).

A partir de cette étape, la présence d'antigène devient limitée par la localisation des cellules et la durée de vie des DCs, et la présence de lymphocytes B est requise pour le processus de maturation final des  $T_{FH}$  car elles constituent les uniques cellules présentatrices d'antigène. Les lymphocytes B présents à la bordure T/B forment des contacts durables et répétés avec le pré- $T_{FH}$ , via les axes ICOS-ICOSL et SAP-SLAM (Qi et al., 2008) (Figure 15). A la bordure des zones T et B, certains lymphocytes B se différencient en plasmocytes extra-folliculaires, sécrétrices d'anticorps de faible affinité et à courte durée de vie, notamment sous l'action des molécules CD40L et SAP exprimées par les  $T_{FH}$  et délivrant un signal de maturation (MacLennan et al., 2003; Qi, 2016). De façon intéressante, il a été montré que les cellules B dont le BCR possède une forte affinité pour l'antigène se dirigent préférentiellement vers une réponse extra-folliculaire, alors que les cellules ayant un BCR de faible affinité pour l'antigène se dirige vers une réponse du centre germinatif (Paus et al., 2006).



**Figure 15 : Interaction du  $T_{FH}$  avec la cellule dendritique et le lymphocyte B à la frontière T/B.**  
D'après (Tangye et al., 2013).

### 2.2.3 Phase germinative

Une fois dans le follicule B, la tâche principale des  $T_{FH}$  est de sélectionner les cellules B de haute affinité dans le centre germinatif (GC), de favoriser leur division cyclique, leur maturation, et leur export en cellules B mémoire ou en plasmocytes (fonctions détaillées dans la partie 2.4). Le GC est composé de  $T_{FH}$ , de cellules B, de cellules dendritiques folliculaires (FDCs) et de macrophages (Mesin et al., 2016). Dans le GC, les  $T_{FH}$  possèdent un phénotype de différenciation « terminal » caractérisé par de forts niveaux d'expression de CXCR5, PD-1, Bcl6, Maf, et SAP et une faible expression de PSGL1 et CCR7 (Crotty, 2014). Weinstein et al. ont récemment identifié chez la souris deux niveaux supplémentaires de différenciation des  $T_{FH}$  au sein du GC : Au jour 5 après infection, les  $T_{FH}$  du GC de la rate qui se sont divisés 3 fois sécrètent la cytokine IL-21 et sont préférentiellement situés à proximité des B en division, dans la zone sombre du GC. En revanche, dès la 6<sup>ième</sup> division, les  $T_{FH}$  expriment en plus de l'IL-21 la cytokine IL-4, et s'éloignent du site de division des B (Weinstein et al., 2016). Cette étude montre qu'au sein du GC, les  $T_{FH}$  adaptent leur phénotype, leur niveau de maturation, leur localisation et leur fonction d'aide aux cellules B.

Contrairement aux interactions qui ont lieu entre le  $T_{FH}$  et la DC en zone T, ou entre le  $T_{FH}$  et le B à la bordure T/B, les contacts entre le  $T_{FH}$  et le B dans le GC sont courts et transitoires, mais font intervenir de grandes surfaces cellulaires, appelés « enchevêtrements » (entanglement en anglais) (Liu et al., 2014). Ces contacts sont dépendants de l'expression de ICOS et CD40L par le  $T_{FH}$ , de la quantité de complexes CMH II-peptide exprimés par le lymphocyte B, et font intervenir des cascades de signalisation liées au calcium  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans le  $T_{FH}$  (Liu et al., 2014; Shulman et al., 2014). Il a été suggéré que la nature transitoire de ces contacts permet une meilleure compétition au sein des cellules B individuelles pour obtenir les signaux cruciaux délivrés par les  $T_{FH}$  (Allen et al., 2007; Qi, 2016).

A l'issue de leurs interactions dans le GC, les  $T_{FH}$  peuvent transiter jusqu'à un GC voisin (Shulman et al., 2013), ou sortir du GC et se développer en  $T_{FH}$  mémoire.

### 2.2.4 $T_{FH}$ mémoire

Dû à leur forte expression du marqueur de « fatigue cellulaire » PD-1, il a été initialement suggéré que les  $T_{FH}$  du GC possédaient un phénotype terminal, ne pouvant pas sortir du GC, et condamnés à mourir à la fin de la phase effectrice de la réponse immunitaire, lorsque l'antigène est rare (Crotty, 2011; Good-Jacobson et al., 2010). Désormais, de nombreuses études réalisées chez la souris et chez l'homme ont démontré l'existence de  $T_{FH}$  mémoire (Hale and Ahmed, 2015). Après infection avec le virus LCMV, les  $T_{H1}$  et  $T_{FH}$  spécifiques sont maintenus jusqu'à 150 jours après la résolution de l'infection. De façon intéressante, le transfert de cellules  $T_{FH}$  mémoires (CXCR5+) dans une souris naïve et son infection par LCMV induit une réponse effectrice secondaire des  $T_{FH}$  et la génération de

centres germinatifs, même en absence de cellules B (Hale et al., 2013). Ces observations sont confirmées dans une étude de Ise et al., démontrant que les cellules mémoires CXCR5+ sont bien dérivées de T<sub>FH</sub> effectrices, et que ces cellules mémoires se redifférencient préférentiellement en T<sub>FH</sub> lors d'une réponse mémoire après réinfection. En revanche dans cette dernière étude, la présence de lymphocytes B est indispensable pour la réexpression de Bcl6 par les T<sub>FH</sub>, elle même nécessaire pour la maintenance et la fonction de ces cellules (Ise et al., 2014). Les auteurs suggèrent que les différences observées avec l'étude de Hale et al. sont probablement dues à l'existence de mécanismes de compensation chez les souris déficientes en lymphocytes B. Les T<sub>FH</sub> mémoires ont des modes de migration distincts par rapport à leur homologue effecteur : Lors de la réponse secondaire, ils se placent préférentiellement dans la région sous-capsulaire du ganglion et scannent les macrophages pour la présentation de l'antigène (Suan et al., 2015).

Dès leur sortie du GC, les T<sub>FH</sub> diminuent progressivement l'expression de Bcl6, et les cellules CXCR5+ « mémoires » n'expriment ni Bcl6 ni ICOS (Choi et al., 2013b; Hale et al., 2013; Liu et al., 2012). Le meilleur moyen d'identifier les cellules T<sub>FH</sub> mémoires chez l'homme et la souris reste donc l'expression de CXCR5 (Morita et al., 2011; Schmitt et al., 2014b). Les cellules T<sub>FH</sub> mémoires résident principalement dans la rate, les ganglions lymphatiques, la moelle, et sont fréquemment observés recirculant dans le sang, notamment chez l'homme (Hale et al., 2013; Schmitt et al., 2014b).

#### **Aparté 4 | Modèle alternatif de différenciation et plasticité cellulaire**

Le modèle intégré et séquentiel de différenciation des T<sub>FH</sub> ne permet pas d'expliquer l'existence de plasticité parmi les T auxiliaires : En effet la littérature contient un certain nombre d'études démontrant la capacité de cellules T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, ou T<sub>H17</sub> à se convertir en T<sub>FH</sub> et à se localiser dans le follicule B, ou à l'inverse de T<sub>FH</sub> capable d'exprimer des facteurs de transcriptions et des cytokines propres aux autres sous-populations de T auxiliaires (Cannons et al., 2013; DuPage and Bluestone, 2016). Par exemple, en réponse à un environnement pauvre en IL-2, des T<sub>H1</sub> déjà différenciés peuvent exprimer les récepteurs à l'IL-7 et à l'IL-6 sous l'influence de Bcl6. La présence respective de l'une ou l'autre de ces cytokines permet ensuite la conversion totale de ces cellules en T mémoire ou en T<sub>FH</sub> (McDonald et al., 2016). Ces observations ne remettent toutefois pas en cause le modèle de différenciation séquentiel, et il est clairement établi que les T<sub>FH</sub> peuvent être identifiés dès la présentation de l'antigène par les DCs, et dès les premières divisions cellulaires après infection. De part leur nature – être capable de répondre de manière spécifique à la diversité des pathogènes – les lymphocytes T CD4+ auxiliaires sont hétérogènes et adaptables. Ainsi, il convient de définir les cellules T<sub>FH</sub> non pas par leur phénotype et les molécules qu'elles sécrètent, mais plutôt par leur fonction stricte d'aide à la maturation du GC et des lymphocytes B.

## **2.3 Cellules dendritiques impliquées dans la différenciation des T<sub>FH</sub>**

Les facteurs impliqués dans la différenciation des T CD4+ naïfs en T<sub>FH</sub> (IL-6, IL-21, ICOSL, OX40L, TCR de forte affinité) sont désormais relativement bien connus. En revanche, relativement peu d'études se sont focalisées sur l'identification des sous-populations de cellules dendritiques impliquées

dans ce processus, que leur fonction soit pro- ou anti- $T_{FH}$ . Pourtant cette question est loin d'être triviale, car l'identification de telles populations serait d'un grand intérêt pour le design de meilleures stratégies vaccinales, notamment pour l'induction de fortes réponses humorales.

L'identification des populations de DC impliquées dans la différenciation des  $T_{FH}$  est problématique, car leur phénotype dépend fortement du contexte antigénique et inflammatoire auquel elles sont soumises. Dans le même temps, l'identification formelle de l'implication d'une population de DC dans l'induction des  $T_{FH}$  ne peut être rendue possible que par deux moyens : La suppression de cette population *in vivo*, ou son ciblage spécifique. Compte tenu de la diversité des populations de DCs et de la difficulté de générer des souris déficientes d'un sous-type particulier, la majorité des études se focalise sur le ciblage des DCs et leur influence sur la différenciation des  $T_{FH}$ .

Il convient ainsi de différencier les résultats obtenus après infection ou vaccination sans adjuvants, lorsque l'ensemble du système immunitaire inné a l'opportunité de participer à l'induction de la réponse adaptative, de ceux obtenus par l'utilisation d'adjuvants ou de méthodes particulières de ciblage des DCs, qui par leur nature conditionnent les populations qui prendront part à la mise en place des réponses immunitaires.

### *2.3.1 Cellules dendritiques pro- $T_{FH}$*

Est considérée ici comme « pro- $T_{FH}$  » toute population de cellule dendritique dont l'ablation ou le ciblage spécifique module fortement la présence ou l'absence de cellule  $T_{FH}$ , quelque soit le contexte inflammatoire. Dans la majorité des études, la sécrétion d'IL-6 et/ou l'expression de marqueurs spécifiques comme ICOSL et OX40L constituent une indication supplémentaire de la fonction pro- $T_{FH}$  des DCs étudiées.

Cucak et al. sont les premiers à identifier le rôle d'une population particulière de DC dans l'induction de réponses  $T_{FH}$  (Cucak et al., 2009). Dans cette étude, l'ablation spécifique du récepteur à l'interféron de type I dans les cellules CD11c+ (souris IFNAR1<sup>fl/fl</sup>CD11c<sup>Cre</sup>) induit une diminution du nombre de cellules  $T_{FH}$  générées après injection intrapéritonéale d'OVA combinée au LPS (ligand de TLR4) comme adjuvant. Dans ces cellules, la présence d'interféron de type I stimule la production d'IL-6 et l'expression de CD86 mais pas de ICOSL. La faible diminution du nombre de  $T_{FH}$  observée dans cette étude suggère toutefois que d'autres populations de DCs n'exprimant pas le récepteur IFNAR1 sont impliquées dans la différenciation des  $T_{FH}$ . Une étude du même groupe s'est intéressée aux conséquences d'une déplétion totale en cellules dendritiques conventionnelles (souris CD11c-DTR) dans l'induction de cellules  $T_H1$  et  $T_{FH}$  après injection de l'antigène OVA et de l'adjuvant Poly(I:C) (ligand de TLR3) (Dahlgren et al., 2015). De façon surprenante, alors que dans ce modèle l'induction des cellules  $T_H1$  est complètement abolie, les cellules  $T_{FH}$  et B du centre germinatif se développent normalement. Dans cette étude, les auteurs ne sont pas capables d'identifier le phénotype de la

population pro-T<sub>FH</sub>, mais suggèrent qu'il s'agit soit de mo-DCs soit de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs).

Toujours en utilisant des adjuvants, Fazilleau et al. ont démontré que l'injection de l'antigène émulsionné avec l'IFA (« Incomplete Freund's Adjuvant ») et combiné avec du CpG (ligand de TLR9) induit une polarisation supérieure des cellules T<sub>FH</sub> en comparaison à l'injection de l'antigène émulsionné seul (Chakarov and Fazilleau, 2014). Cet effet « booste » de la réponse T<sub>FH</sub> est dû à l'action du CpG sur le TLR9 exprimé par les moDCs recrutées, qui en retour sécrètent de l'IL-6. Cette étude démontre que même si les mo-DCs ne sont pas nécessaires pour la différenciation des T<sub>FH</sub>, les cibler spécifiquement permet de booster cette différenciation après vaccination.

Le groupe d'Irina Caminschi a démontré que le ciblage spécifique des DCs exprimant Clec9A par l'injection intraveineuse d'un anticorps anti-Clec9A couplé à l'OVA induit spécifiquement la différenciation des T CD4<sup>+</sup> OT-II en T<sub>FH</sub> dans la rate (Kato et al., 2015; Lahoud et al., 2011). Ces résultats sont surprenants car la population de DC Clec9A<sup>+</sup> est principalement connue comme étant dédiée à la présentation croisée et l'induction de réponses T CD8<sup>+</sup>. Le ciblage de ces DCs n'induisant pas leur activation (pas d'augmentation de l'expression des molécules de CMHII, de CD40, CD80, ou CD86), les auteurs suggèrent que cette induction de T<sub>FH</sub> est liée à une rétention de l'antigène supérieure (jusqu'à 4 jours après injection) par les DCs Clec9A<sup>+</sup> comparativement aux autres DCs ciblées (DEC205 et Clec12A).

Dans un autre modèle de ciblage des DCs de la peau exprimant la langérine, Yao et al. ont démontré que les LCs et les DCs langérine<sup>+</sup> du derme sont capables d'induire la différenciation de T<sub>FH</sub> spécifiques de l'antigène par un mécanisme indépendant de l'IL-6 et de IFNAR (Yao et al., 2015). Prise individuellement, les contributions respectives des LCs et DCs langérine<sup>+</sup> du derme à cette différenciation s'avèrent similaires, avec toutefois un plus grand nombre de T<sub>FH</sub> induit lorsque seules les LCs sont ciblées. D'autre part, ces deux populations cellulaires induisent également la différenciation des T CD4<sup>+</sup> naïfs en T<sub>H1</sub> dans des nombres similaires aux T<sub>FH</sub>, et en T<sub>H2</sub> et T<sub>REG</sub> dans des nombres inférieurs, suggérant que la capacité de ces cellules à induire la polarisation des T<sub>FH</sub> n'est pas exclusive et est potentiellement « forcée » par la restriction de l'antigène à une population particulière. Ces observations sont néanmoins confirmées par mes travaux de thèse (Levin et al., soumis pour publication) et par une étude démontrant qu'après déplétion spécifique des LCs et infection cutanée par *Leishmania*, l'induction de centre germinatif et de conjugués formés par les cellules T et B est diminuée (Zimara et al., 2014).

L'étude des populations favorisant la différenciation des T<sub>FH</sub> chez l'homme repose essentiellement sur l'utilisation de modèles *in vitro*. Des DCs différenciées à partir de monocytes en présence de GM-CSF et d'IL-4 et activées en présence de LPS et CD40L promeuvent la différenciation de T CD4<sup>+</sup> en cellules sécrétrices d'IL-21 et capable de stimuler la production d'anticorps par des cellules B

autologues (Schmitt et al., 2009b). De façon surprenante, le principal médiateur de cette différenciation est l'IL-12, et non pas l'IL-6. En revanche dans ce modèle, l'absence du marqueur Bcl6 et la présence d'une fraction de cellules exprimant T-bet parmi les cellules sécrétrices d'IL-21 ne permet pas de déterminer s'il s'agit de  $T_{FH}$  ou d'un type cellulaire intermédiaire. Le derme humain comprend une population de macrophages résidents CD14<sup>+</sup> longtemps identifiés comme des DCs. La mise en culture de ces cellules avec des lymphocytes T pré-activés induit leur production de CXCL13 et leur fonction d'aide à la production d'anticorps par les cellules B autologues (Klechevsky et al., 2008). Ici encore, bien que les cellules possèdent une fonction d'aide aux cellules B, leur phénotype précis n'est pas caractérisé.

Enfin, chez les individus atteints de Lupus érythémateux disséminé, une grave maladie auto-immune caractérisée par une différenciation incontrôlée de cellules  $T_{FH}$ , il a été montré que des complexes contenant de l'ARN sont reconnus par les monocytes sanguins via l'expression du TLR7, ce qui induit leur surexpression de OX40L et la différenciation des cellules  $T_{FH}$  (Jacquemin et al., 2015). Bien qu'observés dans le cadre d'une pathologie, ces résultats montrent que les cellules myéloïdes sont capables d'induire la différenciation des  $T_{FH}$  sous certaines conditions inflammatoires.

Ces différentes études suggèrent ainsi que la différenciation des  $T_{FH}$  n'est pas gouvernée par une sous-population unique de cellule dendritique, mais qu'elle dépend plutôt du contexte antigénique et inflammatoire. Les molécules et cytokines requises pour la différenciation des  $T_{FH}$  peuvent être induites de manière redondante par plusieurs facteurs externes chez les DCs.

### 2.3.2 Cellules dendritiques anti- $T_{FH}$

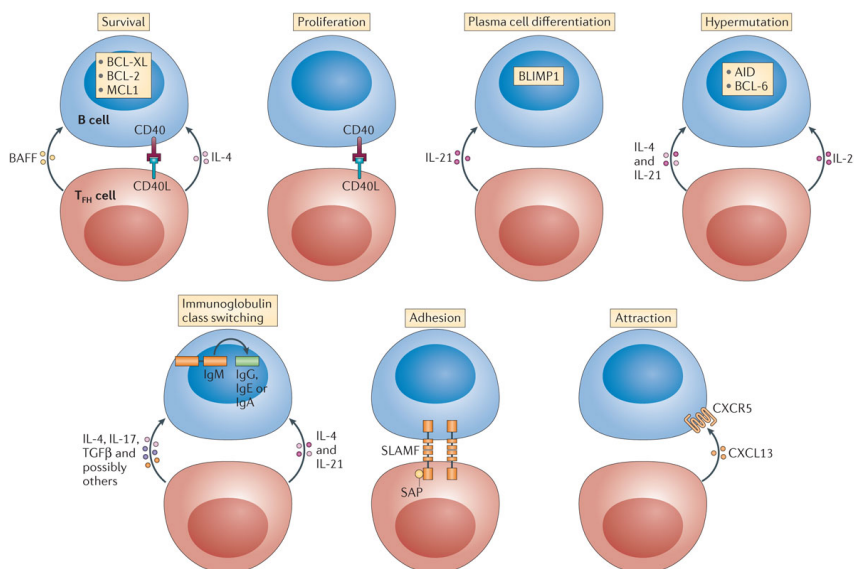
A ce jour, une seule étude a formellement démontré qu'il est possible d'augmenter les réponses  $T_{FH}$  induites après vaccination en supprimant de manière spécifique et *in vivo* une population particulière de DC (Kumamoto et al., 2016). Dans cette étude, l'ablation spécifique des DCs CD301b<sup>+</sup> du derme (souris Mgl2-DTR) après immunisation sous-cutanée avec OVA adjuvanté par papaïne (allergène induisant une réponse de type  $T_H2$ ) conduit à une augmentation significative de la proportion de cellules  $T_{FH}$  parmi les cellules T CD4<sup>+</sup> et une augmentation des titres d'anticorps spécifiques contre l'OVA une semaine après injection. Cet effet régulateur des DCs CD301b<sup>+</sup> est contrôlé par l'expression des ligands PD-L1 et PD-L2 reconnaissant le récepteur PD-1 à la surface des cellules T en cours de différenciation (jour 2 après immunisation). Comme les DCs CD301b<sup>+</sup> présentent la plus forte expression de ces ligands parmi les DCs du derme (Kumamoto et al., 2013), il est concevable que cet effet suppresseur des  $T_{FH}$  soit relativement spécifique de cette population de DC.

De part les effets qu'exerce l'IL-2 sur les facteurs de transcription anti- $T_{FH}$  (Blimp1, STAT5), toute DC sécrétrice d'IL-2 aurait la capacité de limiter le développement des cellules  $T_{FH}$  (Ballesteros-Tato

and Randall, 2013). Bien que principalement sécrétée par les cellules T activées, la production d'IL-2 peut être induite par les DCs après reconnaissance de complexes microbiens (Granucci et al., 2001). En revanche, l'IL-2 exerce des effets positifs sur la prolifération et la différenciation des T effecteurs en induisant l'expression de Blimp1, et par conséquent son action inhibitrice de la différenciation des  $T_{FH}$  n'est pas aussi spécifique que celle exercée par les ligands de PD-1. A ce jour aucune population particulière de DC n'a été identifiée comme préférentiellement sécrétrice d'IL-2, et la sécrétion de cette cytokine est probablement très finement régulée durant la présentation antigénique. De plus, l'IL-2 a la capacité d'agir sur les DCs elles mêmes, du fait de leur expression de l'IL-2R. Comme Blimp1 diminue la production d'IL-6, il est envisageable que l'action inhibitrice de l'IL-2 sur les  $T_{FH}$  passe par une inhibition des DCs pro- $T_{FH}$  sécrétrices d'IL-6. Conformément, les DCs déficientes en Blimp1 promeuvent l'expansion des centres germinatifs et la production d'auto-anticorps chez la souris (Chan et al., 2009; Kim et al., 2011).

## 2.4 Cellules $T_{FH}$ et réponse humorale

La fonction des cellules  $T_{FH}$  est dédiée aux cellules B. Elles leur fournissent des signaux nécessaires à leur survie, leur prolifération, leur différenciation en plasmocytes, à la mutation et la commutation isotypique de leurs immunoglobulines, leur adhésion et leur attraction au sein du centre germinatif (Crotty, 2015) (Figure 16). Dans le microenvironnement du GC, les  $T_{FH}$  et les lymphocytes B se livrent à de multiples échanges, dont la finalité est la génération de plasmocytes sécréteurs d'anticorps de haute affinité, ou de lymphocytes B mémoire.



**Figure 16 : Différents types d'aide apportée par les cellules  $T_{FH}$  aux lymphocytes B.**  
D'après (Crotty, 2015).



### 2.4.1 Molécules impliquées

**L'IL-21** est une cytokine caractéristique des  $T_{FH}$ , qui agit de façon autocrine sur leur différenciation et la maintenance de leur phénotype, mais qui est également essentielle à la génération du centre germinatif et des plasmocytes à longue durée de vie (Zotos et al., 2010). Sa présence n'est pas nécessaire à l'induction d'une réponse extra folliculaire (Linterman et al., 2010). D'un point de vue mécanistique, l'IL-21 induit directement l'expression de Bcl6 et de Blimp1 dans les cellules B (Ozaki et al., 2004). Bcl6 agit en limitant l'incidence de mutations délétères lors du processus de mutation hypersomatique, et en régulant une sortie du GC et une différenciation trop rapide (Basso and Dalla-Favera, 2012). Blimp1 agit sur de nombreux gènes et est indispensable pour la différenciation des B en cellules sécrétrices d'anticorps (Nutt et al., 2015).

**L'IL-4** est sécrétée à la fois par les cellules  $T_{H2}$  et  $T_{FH}$ , mais est régulé et sécrétée différemment entre ces deux populations. En effet Reinhardt et al. ont démontré que les  $T_{FH}$  sont les seules cellules sécrétrices d'IL-4 dans le ganglion et possèdent un phénotype distinct des  $T_{H2}$  sécrétrices d'IL-4 dans les tissus périphériques (Reinhardt et al., 2009). D'autre part, alors que la production d'IL-4 par les  $T_{H2}$  requière l'expression du facteur de transcription GATA-3, sa production par les  $T_{FH}$  dépend des signaux délivrés par les cellules B via l'axe SLAM-SAP (Yusuf et al., 2010). L'IL-4 est impliquée dans de nombreux processus et fonctions du lymphocyte B, notamment la survie, l'hypermutation, la commutation isotypique des immunoglobulines (IgM vers IgG1) et la différenciation en plasmocyte (Fairfax et al., 2015; Weinstein et al., 2016). Chez la souris, l'acquisition de la production de l'IL-21 et de l'IL-4 est séquentielle : Les  $T_{FH}$  du GC expriment d'abord l'IL-21 seule, puis en combinaison avec l'IL-4, et enfin l'IL-4 seule, de manière spatio- et tempo-dépendante (Weinstein et al., 2016).

**CD40L** est une molécule cruciale pour la formation du centre germinatif. Son récepteur CD40 exprimé à la surface des B forme avec le BCR la charnière indispensable à la génération d'une immunité humorale (Elgueta et al., 2009). CD40L agit de concert avec l'IL-4 pour l'induction de AID (« Activation-induced cytidine deaminase »), une molécule mutagène indispensable pour la commutation isotypique et l'hypermutation des lymphocytes B (Dedeoglu, 2004; Muramatsu et al., 2000). De plus, la ligation de CD40L sur son récepteur induit la survie et la prolifération des B du GC qui sont fortement pro-apoptotiques.

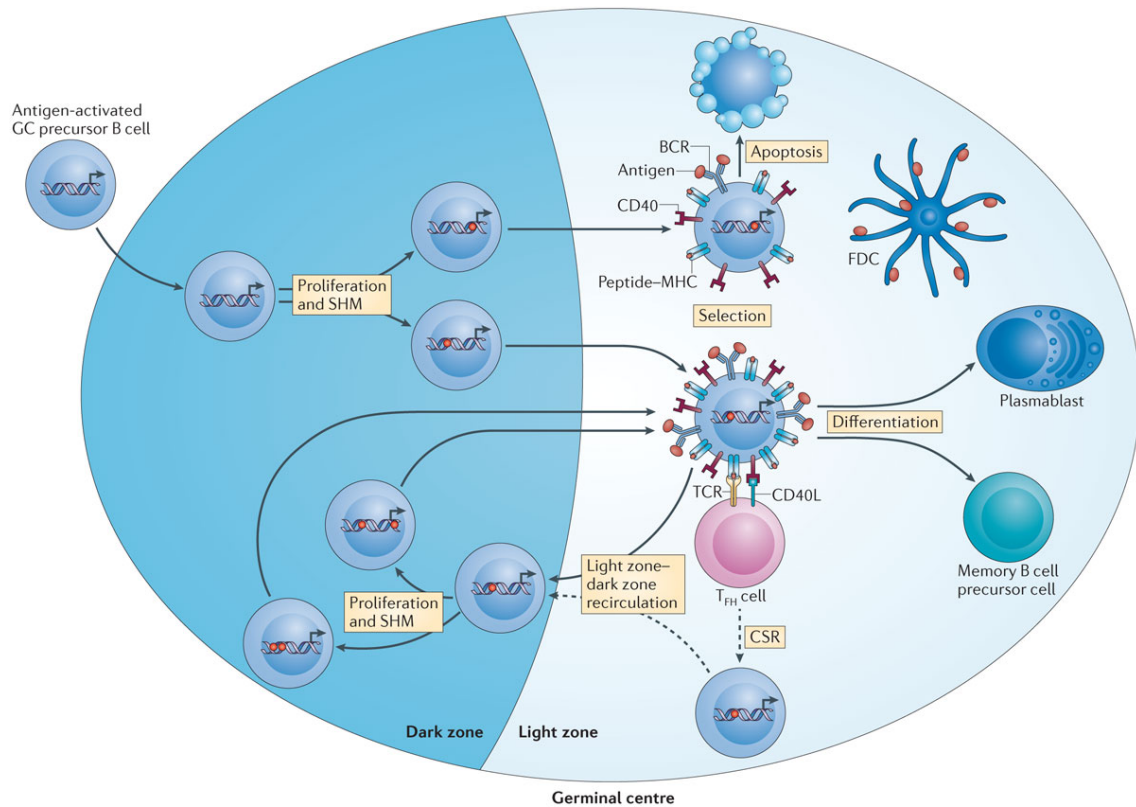
### 2.4.2 Sélection des lymphocytes B de haute affinité dans le centre germinatif

Les premiers centres germinatifs apparaissent dès le quatrième jour après immunisation dans les follicules B et sont initialement formés par les lymphocytes B prolifératifs et les FDCs. Au jour 7, les

GC sont matures et constitués de deux microenvironnements distincts, la zone claire et la zone sombre (De Silva and Klein, 2015) (Figure 17).

La zone sombre est constituée de lymphocytes B en division et de cellules stromales sécrétant la chimiokine CXCL12. Cette cytokine est reconnue par le récepteur CXCR4 exprimé à la surface de certains lymphocytes B, et agit en opposition avec CXCR5 pour guider les lymphocytes vers la zone sombre (Allen et al., 2004). Cette zone est le siège de l'hypermutation somatique et de la commutation isotypique, deux processus clés dans la diversification et la maturation d'affinité des immunoglobulines. La zone claire est moins dense en cellule, et est constituée de FDCs exposant l'antigène natif à leur surface, de cellules T<sub>FH</sub>, et de macrophages.

Des expériences de microscopie biphotonique ont notamment permis de montrer que le processus de sélection et de maturation des lymphocytes B est constitué de plusieurs cycles, où la cellule recircule de la zone sombre à la zone claire, et vice-versa, jusqu'à l'obtention d'un BCR suffisamment affiné pour l'antigène pour permettre la sortie du GC (Allen et al., 2007; Shulman et al., 2014; Victora et al., 2010). Dans la zone sombre, l'introduction de mutations ponctuelles dans les chaînes lourdes et légères du BCR permet aux lymphocytes B d'augmenter leur affinité pour l'antigène. Après migration dans la zone claire, les lymphocytes B possédant un BCR de forte affinité ont plus de chance de reconnaître l'antigène présenté par les FDCs, de l'exposer à leur surface via les molécules de CMH de classe II, et donc de recevoir des signaux de survie et de prolifération supplémentaires de la part des T<sub>FH</sub> spécifiques de l'antigène (Gitlin et al., 2015; Shulman et al., 2013; Victora et al., 2010). Dans ce processus de compétition, les cellules incapables de recevoir ces signaux meurent par apoptose et sont nettoyées par les macrophages du GC (Allen et al., 2007). Dans la zone claire, les contacts entre la cellule B et le T<sub>FH</sub> sont relativement courts, ce qui permet aux T<sub>FH</sub> de « scanner » de multiples cellules. Les signaux délivrés à la cellule B par les T<sub>FH</sub> dans la zone claire déclenchent la réintégration de la cellule dans le cycle zone claire/sombre, et augmente le nombre de division et la vitesse du cycle cellulaire de manière proportionnelle à l'intensité de l'interaction (Gitlin et al., 2015). Ainsi, c'est la force de l'interaction avec la cellule T<sub>FH</sub> qui détermine la durée et le nombre de cycles effectués par la cellule B dans le GC. Ces interactions dépendent principalement de l'expression de ICOSL par les B et de CD40L par les T<sub>FH</sub>, formant une boucle de régulation vertueuse, dans laquelle un signal alimente l'autre (Liu et al., 2014).



**Figure 17 : Dynamique des lymphocytes B au sein du centre germinatif et sélection des mutants de haute affinité.**

D'après (De Silva and Klein, 2015).

### 2.4.3 Sortie du centre germinatif : Plasmocytes ou lymphocytes B mémoire

A l'issue des étapes de sélection dans la zone claire, la majorité des lymphocytes B acquiert un phénotype terminal de plasmocyte à longue durée de vie, et rejoint la moelle osseuse pour y sécréter des anticorps (Nutt et al., 2015). D'autres lymphocytes B « mémoire » restent dans le ganglion, ou migrent vers la rate et la moelle osseuse en attente d'une future rencontre avec l'antigène dont elles sont spécifiques pour l'induction d'une réponse secondaire (Kurosaki et al., 2015).

Les mécanismes qui déterminent la différenciation des lymphocytes B du GC en plasmocytes ou en B mémoire commencent seulement à être identifiés. L'affinité du BCR pour l'antigène semble être un facteur déterminant dans la sélection vers l'un ou l'autre des phénotypes. Les cellules de haute affinité pour l'antigène se destinent principalement à un phénotype de plasmocyte (Phan et al., 2006), alors que les cellules de faible affinité forment préférentiellement le pool de B mémoire (Shinnakasu et al., 2016). Plus que les signaux délivrés par le BCR lui-même, il semble que l'aide apportée par les cellules T<sub>FH</sub> lors de la compétition dans la zone claire est suffisante pour déclencher la différenciation en plasmocyte. En effet, dans un modèle de ciblage de l'antigène aux cellules B de façon indépendante du BCR (par un anticorps anti-DEC205 couplé à l'OVA), les cellules exprimant DEC205 sont plus prônes à sortir du GC et se différencier en plasmocyte que les cellules déficientes en DEC205,

démontrant le rôle du signal fourni par les  $T_{FH}$  après leur reconnaissance du complexe CMH II-peptide à la surface des cellules B (Victoria et al., 2010).

En plus du facteur affinité, le facteur temps influence également le devenir des lymphocytes B du GC. Weisel et al. ont démontré que l'émergence de cellules B mémoires  $IgM^+$  se fait très tôt dans la réaction du GC, et est suivie de l'apparition de B mémoire  $IgG1^+$ , et enfin de plasmocytes  $IgG1^+$  (Weisel et al., 2016). Dans une autre étude, Gitlin et al. ont dissocié les phénomènes d'hypermutation et de commutation de classe isotypique à l'aide de souris transgéniques pour démontrer que les cellules B ayant commuté leur  $IgM$  en  $IgG1$  indépendamment de l'hypermutation somatique se convertissent préférentiellement en plasmocytes, alors que les cellules  $IgM^+$  constituent préférentiellement le réservoir mémoire (Gitlin et al., 2016). La commutation de classe isotypique permet également d'accroître l'affinité des immunoglobulines pour l'antigène,

Etant donné que l'affinité des immunoglobulines augmente également dans le temps et après commutation de classe isotypique, ces observations représentent probablement plusieurs versants d'un même mécanisme à l'issue duquel une faible proportion de cellules de faible affinité entre rapidement dans le pool mémoire, alors que la majorité des autres cellules poursuivent leur cycle de maturation jusqu'à devenir des plasmocytes de haute affinité (Mesin et al., 2016).

#### *2.4.4 Régulation du centre germinatif et des $T_{FH}$*

La génération incontrôlée de cellules  $T_{FH}$  peut avoir de graves répercussions sur l'organisme, notamment par l'induction d'une auto-immunité caractérisée par la présence d'anticorps dirigés contre des molécules du soi ou de l'ADN (Ueno et al., 2015). C'est pourquoi les cellules  $T_{FH}$  et la réaction du centre germinatif doivent être finement régulés pour éviter la dégénération de la réponse humorale.

Les T folliculaires régulateur ( $T_{FR}$ ) constituent une population cellulaire distincte aux  $T_{REG}$  et aux  $T_{FH}$ , qui nécessite et exprime des marqueurs caractéristiques des deux populations (Foxp3, Bcl6, Blimp1, CXCR5, CTLA-4) pour exercer leur fonction de régulation du centre germinatif et des cellules  $T_{FH}$  (Chung et al., 2011; Linterman et al., 2011; Wollenberg et al., 2011).

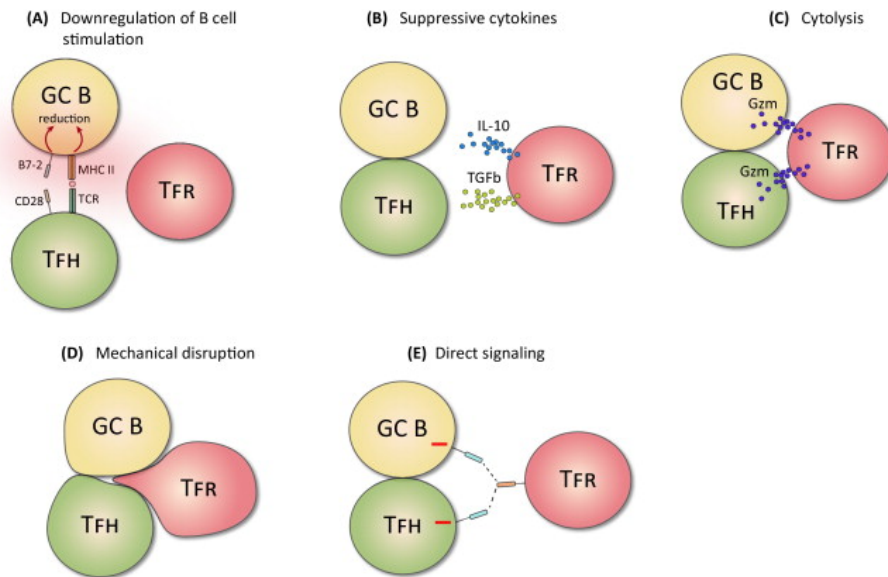
Les cellules  $T_{FH}$  se différencient dans les organes lymphoïdes secondaires à partir de cellules T  $CD4^+$  naïves périphériques. En revanche, après immunisation des souris avec des globules rouges de mouton (Linterman et al., 2011), avec l'antigène KLH + CFA (« Complete Freund's Adjuvant ») (Chung et al., 2011), ou avec OVA + Alum (Wollenberg et al., 2011), il a été montré que les  $T_{FR}$  se différencient essentiellement à partir de  $T_{REG}$  thymiques ( $tT_{REG}$ ) exprimant Foxp3. Cependant, une récente étude par Aloulou et al. a démontré qu'après immunisation avec un peptide adjuvantée en IFA, les  $T_{FR}$  peuvent se différencier à partir de  $T_{REG}$  périphérique ( $pT_{REG}$ ) eux même générés de façon thymo-indépendante à partir de cellules T  $CD4^+$  naïves (Foxp3-) (Aloulou et al., 2016). En résumé, ces résultats suggèrent que le contexte inflammatoire induit par la formulation antigénique (c'est à dire l'antigène et son

adjuvant) influence l'ontogénie des  $T_{FR}$ . Le mécanisme responsable de ce processus différentiel semble impliquer la surexpression de PD-L1 par les moDCs recrutées dans les ganglions drainants après immunisation adjuvantée par IFA (Aloulou et al., 2016).

Comme suggéré par l'étude ci dessus, l'axe PD-1/PD-L1 contrôle fortement le phénotype  $T_{FR}$ . Dans des conditions où les  $T_{FR}$  se différencient à partir de  $tT_{REG}$ , les souris déficientes en PD-1 présentent une augmentation du nombre de  $T_{FR}$ , suggérant un rôle inhibiteur de cette molécule (Sage et al., 2012). La molécule CTLA-4 inhibe également la différenciation des  $T_{FR}$  après immunisation ou à l'état basal (Sage et al., 2014; Wing et al., 2014). En revanche, de façon similaire aux  $T_{FH}$ , les molécules de costimulation ICOS et CD28, ainsi que le facteur de transcription Bcl6, sont indispensables à la génération des  $T_{FR}$ , démontrant un modèle de développement commun entre ces deux populations (Sage and Sharpe, 2016).

Les  $T_{FR}$  régulent la réponse humorale dans le centre germinatif en inhibant directement la fonction des lymphocytes B ou en limitant l'aide apportée par les cellules  $T_{FH}$  (Figure 18). Les cellules  $T_{FH}$  et B ainsi inhibées conservent leur programme transcriptionnel à l'exception des gènes codants pour leurs molécules effectrices (Sage et al., 2016). La suppression par les  $T_{FR}$  repose principalement sur l'expression de la molécule CTLA-4, dont les ligands CD80 et CD86 sont exprimés par les lymphocytes B et les DCs. Lorsque l'expression de CTLA-4 est bloquée après la différenciation des  $T_{FR}$ , leur fonction suppressive est amoindrie *in vivo* (Sage et al., 2014). Etant donné la forte affinité de CTLA-4 pour les récepteurs CD80 et CD86, il a été suggéré que cette interaction pourrait potentiellement empêcher la cellule  $T_{FH}$  d'interagir avec la cellule B, limitant ainsi l'aide apportée (Sage and Sharpe, 2015). CTLA-4 limite l'expression de CD80 et CD86 par les DCs (Qureshi et al., 2011), diminuant ainsi la force du signal reçu et délivré par CD28 et la cascade de signalisation pro- $T_{FH}$  qui en découle (Wang et al., 2014).

Les  $T_{FR}$  expriment également les cytokines IL-10 et TGF- $\beta$  aux propriétés inhibitrices de la fonction des T effecteurs et des  $T_{FH}$ . Ainsi, les  $T_{FR}$  présentent des caractéristiques communes aux  $T_{REG}$  de part leur fonction suppressive, et aux  $T_{FH}$  par leur capacité à migrer dans le follicule B.



**Figure 18 : Mécanismes proposés de régulation des lymphocytes B et des cellules  $T_{FH}$  par les cellules  $T_{FR}$ .** D'après (Sage and Sharpe, 2015).

De façon intéressante, les lymphocytes B du GC ont également la capacité de contrôler la réaction du centre germinatif. En effet, des plasmocytes ayant commuté leur classe isotypique obtenus 10 jours après immunisation chez la souris ont la capacité de limiter l'expression de Bcl6 et de l'IL-21 par des cellules  $T_{FH}$  différenciées *in vitro* (Pelletier et al., 2010). *In vivo*, l'ablation du compartiment plasmocyte (souris déficientes en Blimp-1 dans les cellules B) induit une augmentation du nombre de cellules  $T_{FH}$  dans les ganglions. Les cellules  $T_{FH}$  expriment fortement la molécule PD-1, et l'ablation spécifique de cette molécule ou de ses ligands PD-L1 et PD-L2 engendre une différenciation accrue des  $T_{FH}$  (Good-Jacobson et al., 2010). Récemment, une population de lymphocytes B appelée «  $B_{REG}$  » et exprimant fortement PD-L1 a été décrite chez l'homme et la souris. De part leur forte expression de PD-L1, ces cellules sont capables de réguler la prolifération de cellules  $T_{FH}$  issues du sang *in vitro* (Khan et al., 2015). L'origine développementale de ces cellules particulières reste cependant inconnue.

Les lymphocytes T  $CD8^+$  sont également capables de contrôler la réponse  $T_{FH}$  sous certaines conditions. L'expression par certaines cellules B et  $T_{FH}$  de la molécule Qa-1 permet leur reconnaissance par le TCR d'une population de T  $CD8^+ CXCR5^+ ICOSL^+$  aux propriétés régulatrices du centre germinatif après vaccination ou infection virale (Kim et al., 2010). Chez des primates infectés par le SIV ou des patients porteurs du VIH de façon chronique, ces cellules «  $T_{FR} CD8^+$  » régulent négativement la réponse humorale antivirale et  $T_{FH}$ , et contribuent à l'établissement d'un sanctuaire viral dans le follicule B, inaccessible au T  $CD8^+$  cytotoxiques conventionnels (Miles et al., 2015). Ces cellules diffèrent des T  $CD8^+$  cytotoxiques folliculaires ( $T_{FC}$ ) récemment décrites chez l'homme et la souris par leur expression de ICOSL et du facteur de transcription Helios.

## **Aparté 5 | Lymphocytes T CD8+ cytotoxiques folliculaires**

Récemment, deux études ont démontré l'existence d'une population de lymphocyte T CD8+ cytotoxiques exprimant CXCR5 et capables de migrer dans le follicule B afin d'y éliminer les cellules T<sub>FH</sub> et B infectées par le VIH chez l'homme et le LCMV chez la souris (He et al., 2016; Leong et al., 2016). Ces cellules T<sub>FC</sub> se différencient à partir de T CD8+ naïfs sous l'action de la cytokine IL-6 *in vitro*, produisent de l'IL-21, et favorisent la sécrétion d'anticorps anti-influenza et la commutation de classe isotypique après infection chez la souris (Yang et al., 2016). Cette population semble donc jouer un rôle majeur dans la promotion de réponses humorales et cytotoxiques dans le follicule B. Leur relation développementale et leur similarité avec les cellules T<sub>FR</sub> CD8+ dépendantes de Qa-1 reste toutefois à éclaircir.

## **2.5 Optimiser la réponse T<sub>FH</sub> et humorale en vaccination**

Les cellules T<sub>FH</sub> interviennent à différentes étapes de la réponse humorale, qu'ils initient, renforcent, diversifient, et régulent. Le principe de la vaccination repose notamment sur l'induction d'anticorps de haute affinité pour l'antigène et d'une mémoire cellulaire, générées dans le centre germinatif. Après vaccination, la réponse T<sub>FH</sub> est prédictive de la qualité de la réponse humorale (Herati et al., 2014). Ainsi, le ciblage et l'optimisation des réponses T<sub>FH</sub> et humorales représente une stratégie à fort potentiel pour le développement de vaccin plus efficaces.

### *2.5.1 Paramètres physiques de l'antigène et adjuvants non immunomodulateurs*

Les premiers paramètres à prendre en compte pour l'optimisation d'une stratégie vaccinale sont la quantité d'antigène injecté, et la fréquence d'injection. Ces paramètres peuvent être modulés de façon à favoriser la génération de réponses T<sub>FH</sub> et humorales. A formulation équivalente, la quantité d'antigène injecté et sa persistance dans l'organisme sont directement corrélés avec l'induction de réponses T<sub>FH</sub> supérieures (Baumjohann et al., 2013b; Benson et al., 2015; Deenick et al., 2010). Les T<sub>FH</sub> requièrent une présentation antigénique continue et soutenue. Les stratégies de type « prime/boost » ont longtemps été utilisées de façon empirique chez l'homme, avec pour but de stimuler la réponse mémoire induite après l'injection initiale de l'antigène. McHeyzer-Williams et al. ont récemment démontré que ce type de stratégie permet la diversification de la réponse humorale au sein des centres germinatifs secondaires, apportant ainsi un rationnel à l'utilisation de cette stratégie vaccinale (McHeyzer-Williams et al., 2015). Enfin, Tam et al. ont testé différentes cinétiques d'injection d'un même composé, et ont démontré que parmi les injections de type bolus (toute la dose en une fois), exponentielle croissante (doses espacées de plus en plus grandes), exponentielle décroissante, ou constante, l'injection exponentielle croissante induit une plus forte réponse humorale du centre germinatif et T<sub>FH</sub> (Tam et al., 2016). Ce dernier type d'injection favorise la rétention de

l'antigène par les cellules dendritiques folliculaires, et donc une stimulation continue des lymphocytes B au sein du GC.

L'injection de grandes quantités d'antigènes ainsi que les injections répétées restent cependant problématiques chez l'homme. Ainsi, les adjuvants non-immunomodulateurs (ou adjuvants de « véhiculage »), capables d'induire la rétention et une meilleure prise en charge de l'antigène, apparaissent comme des outils d'intérêt pour stimuler la réponse  $T_{FH}$ . L'adjuvant MF59 est constitué de squalène et forme une émulsion huile-dans-eau avec l'antigène. L'utilisation de MF59 augmente la réponse B du GC, la différenciation des cellules  $T_{FH}$ , et l'activation des DCs prenant en charge l'antigène chez la souris (Lofano et al., 2015; Mastelic Gavillet et al., 2015). Comme les effets adjuvant de MF59 dépendent de l'émulsion de ses composés, plutôt que d'un effet intrinsèque des composés eux mêmes (Calabro et al., 2013), ces résultats suggèrent que l'utilisation d'autres adjuvants de type émulsion permettrait l'induction de réponses  $T_{FH}$  supérieures. Les résultats de mes travaux suggèrent en effet que l'adjuvant IFA, une autre émulsion, favorise la réponse  $T_{FH}$  et neutralisante chez la souris (article 2 de cette thèse).

### 2.5.2 Immunomodulateurs et cellules dendritiques pro- $T_{FH}$

Les cellules dendritiques sont des acteurs essentiels de la différenciation des cellules  $T_{FH}$ . Leur ciblage après vaccination reste le moyen le plus efficace et spécifique pour l'induction de fortes réponses humorales. Comme décrit dans les parties 1.6 et 2.3, les DCs peuvent être ciblées de plusieurs façons pour l'induction de réponses  $T_{FH}$ . L'utilisation d'adjuvants immunomodulateurs ou de molécules de ciblage a permis l'identification de populations cellulaires et de facteurs « pro- $T_{FH}$  ». Cependant, il reste difficile de dissocier la contribution individuelle des différents composants utilisés par rapport à leur effet combiné dans l'adjuvantation de la réponse  $T_{FH}$ . Le Tableau 2 résume les principales combinaisons et formulations vaccinales ayant démontré un effet stimulateur de la réponse  $T_{FH}$  chez la souris.

| Combinaison antigène + adjuvant             | Voie d'administration | TLR impliqué | DC impliquées | Effets observés sur la population $T_{FH}$             | Référence                       |
|---|-----------------------|--------------|---------------|--|---------------------------------|
| OVA + LPS                                   | IM                    | TLR4         | IFNAR+ DCs    | Moins de $T_{FH}$ lorsque les DCs IFNAR+ sont absentes | (Cucak et al., 2009)            |
| ICMV (nanoparticules lipidiques)-OVA + MPLA | SC                    | TLR4         | -             | ICMV-OVA + MPLA > OVA + MPLA = 10x<br>OVA + Alum       | (Moon et al., 2012)             |
| NP-CGG + CpG                                | SC                    | TLR9         | -             | NPCGG + CpG > NPCGG                                    | (Rookhuizen and DeFranco, 2014) |
| 1W1K + LPS + CpG                            | SC                    | TRL9         | Mo-DCs        | 1W1K + LPS + CpG > 1W1K + LPS                          | (Chakarov and Fazilleau, 2014)  |



|                 |    |      |                |  |                         |
|-----------------|----|------|----------------|--|-------------------------|
| OVA + Poly(I:C) | IM | TLR3 | pDCs ou mo-DCs | Nombre de T <sub>FH</sub> non impacté en absence de DCs conventionnelles (modèle souris CD11c-DTR) | (Dahlgren et al., 2015) |
| VLP + Poly(I:C) | IM | TLR3 | -              | VLP + Poly(I:C) > VLP + CpG = VLP + MPLA > VLP seules  | (Martins et al., 2016)  |

**Tableau 2 : Combinaisons d'antigènes et d'adjuvants promouvant la réponse T<sub>FH</sub>.**

A ce jour, seules deux études ont démontré la possibilité de potentialiser la réponse T<sub>FH</sub> en ciblant des populations spécifiques de DC (DCs Clec9a+ et DCs langérine+) (Kato et al., 2015; Yao et al., 2015). Bien que le rôle d'autres populations de DCs dans la différenciation des T<sub>FH</sub> ait été démontré dans plusieurs contextes antigéniques (partie 2.3), cibler spécifiquement ces cellules reste difficile du fait d'un manque de marqueurs spécifiques. L'identification de tels marqueurs permettrait toutefois d'induire de meilleures réponses T<sub>FH</sub> sans utiliser d'immunomodulateurs, aux effets potentiellement délétères.

### 2.5.3 Molécules de costimulation et cytokines

La ligation des molécules de costimulation OX40L et ICOSL exprimées par les DCs et les lymphocytes B induit un fort signal de différenciation des T CD4+ naïfs vers un phénotype T<sub>FH</sub>. L'utilisation d'un agoniste du TLR2 induit la surexpression de ICOSL chez les DCs et une plus forte réponse cellulaire de type 2 et humorale après vaccination chez la souris (Redecke et al., 2004). Chez l'homme, la ligation de molécules d'ARN double brin par le TLR9 exprimé à la surface des DCs d'origine myéloïde induit leur surexpression de la molécule OX40L et la différenciation des cellules T<sub>FH</sub> *in vitro* (Jacquemin et al., 2015). Ces deux études suggèrent que l'utilisation d'adjuvants capables de stimuler l'expression des molécules de costimulation constituerait une stratégie d'intérêt pour améliorer les réponses T<sub>FH</sub> après vaccination. Par ailleurs, il a été démontré que la transfection de cellules avec des plasmides codants pour des molécules de costimulation et leur injection *in vivo*, ou bien l'injection d'un vaccin à ADN codant pour de telles molécules sont capables de stimuler différents bras de la réponse adaptative (Bukczynski et al., 2004; Du et al., 2007). La faisabilité de cette technique pour l'induction de réponses T<sub>FH</sub> reste toutefois à démontrer.

Une autre stratégie potentielle pour l'augmentation des réponses T<sub>FH</sub> serait d'utiliser des cytokines pour moduler la différenciation des lymphocytes T naïfs. L'IL-6 et l'IL-21 induisent la différenciation des T<sub>FH</sub> chez la souris, mais leur rôle chez l'homme semble marginal et dépend plutôt des cytokines IL-12, IL-23 et TGF-β (Schmitt et al., 2009a, 2014a). Cependant, l'utilisation d'un plasmide exprimant l'IL-12 comme adjuvant n'améliore pas la réponse humorale chez l'homme (Kalams et al., 2013). Chez la souris et le macaque, l'injection d'un vaccin influenza trivalent auquel est ajouté la

cytokine IL-7 couplée à un anticorps induit de meilleures réponses  $T_{FH}$  et anticorps antiviraux que l'injection du vaccin non adjuvanté (Seo et al., 2014).

#### *2.5.4 Diminution de la suppression du centre germinatif*

Chez un individu sain, le rôle des cellules  $T_{FR}$  est de réguler la réponse du centre germinatif contre des antigènes du soi (Linterman et al., 2011). En revanche, les  $T_{FR}$  générés après immunisation peuvent être spécifiques de l'antigène, limitant ainsi la réponse humorale dirigée contre le pathogène d'intérêt (Aloulou et al., 2016). Diminuer la suppression du GC par les  $T_{FR}$  permettrait ainsi d'augmenter la réponse humorale après vaccination. La molécule CTLA-4 est le principal médiateur de la suppression du GC par les  $T_{FR}$  (Sage et al., 2014; Wing et al., 2014). Chez la souris, l'inhibition de CTLA-4 conduit à une augmentation de la réponse  $T_{FH}$  et humorale spécifique de l'antigène. Chez l'homme, l'anticorps monoclonal ipilimumab est utilisé pour inhiber CTLA-4 chez des patients atteints de mélanome. Cependant, les coûts et les effets secondaires associés à ce traitement rendent peu probable son utilisation en vaccination.



# Projets de recherche

---

Le principe de la vaccination repose sur l'induction d'une réponse immunitaire forte, durable, et ciblée contre des antigènes susceptibles d'être rencontrés lors d'une infection par un pathogène. En dépit des connaissances accumulées dans les domaines de l'immunologie, de la vaccination, et des maladies infectieuses, certains pathogènes sont toujours responsables de millions de morts chaque année. Parmi ceux-ci, le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) cristallise le chemin qu'il nous reste à parcourir dans la compréhension des mécanismes par lesquels un vaccin est efficace.

Les cellules  $T_{FH}$  sont essentielles à la génération de l'immunité humorale, dont le rôle dans la neutralisation de l'infection virale est clairement établi. Lors d'une infection ou d'une vaccination, les DCs présentes dans les tissus collectent l'antigène et migrent vers les ganglions drainants où elles interagissent avec les cellules T naïves et promeuvent leur différenciation et leurs fonctions effectrices. Cependant, la dynamique et la nature des cellules qui gouvernent l'induction des cellules  $T_{FH}$  dans un contexte de vaccination restent à élucider.

Notre équipe de recherche possède une grande expertise dans l'immunologie de la peau et des nouvelles techniques de vaccination cutanée. De part sa richesse en cellules présentatrices d'antigène, la peau est un tissu à fort potentiel pour la vaccination.

**C'est pourquoi l'objectif principal** de mon projet de thèse a été d'identifier les mécanismes d'induction et d'amélioration des réponses  $T_{FH}$  et humorales après vaccination intradermique contre différents modèles antigéniques du VIH.

**Dans un premier projet**, j'ai voulu comprendre le rôle des différentes populations de DCs de la peau et du sang dans la mise en place des réponses  $T_{FH}$  et B du centre germinatif dans un modèle murin de vaccination intradermique avec des nanoparticules véhiculant l'antigène p24 du VIH. La peau possède un environnement immunitaire très riche, constitué de plusieurs populations de DCs résidentes, auxquelles s'ajoutent d'autres populations de cellules inflammatoires en provenance du sang après vaccination. Le rôle et la dynamique de ces différentes populations dans l'établissement de la réponse  $T_{FH}$  et humorale après vaccination sont peu connus. Ici, l'utilisation d'un modèle antigénique non adjuvanté constitué de nanoparticules biodégradables permet d'évaluer la mise en place de réponses  $T_{FH}$  non biaisées par des modèles de ciblage ou d'immunomodulation du système immunitaire. Mes résultats confirment le potentiel des DCs de la peau et des antigènes particuliers dans la mise en place de réponse  $T_{FH}$  après vaccination.

**Dans un deuxième projet**, j'ai évalué la capacité de deux formulations vaccinales adjuvantée à promouvoir et améliorer les réponses  $T_{FH}$  et neutralisantes contre un antigène de l'enveloppe du VIH à fort potentiel vaccinal. La génération d'anticorps neutralisants à large spectre constitue un pré requis indispensable pour tout vaccin dédié à la prévention de l'infection par le VIH. Cependant, les mécanismes associés à la génération de tels anticorps sont relativement peu connus dans un contexte de vaccination. Les adjuvants à base de sels d'aluminium et les émulsions constituent la grande majorité des formulations vaccinales actuelles et sont utilisés de façon empirique pour améliorer les réponses humorales. Dans cette étude, j'ai évalué la capacité de ces deux formulations d'adjuvants à induire la production d'anticorps neutralisants, à promouvoir la différenciation des cellules  $T_{FH}$ , et à favoriser le recrutement des cellules de l'immunité innée dans le ganglion après vaccination sous-cutanée avec le peptide m3S du VIH.

Les conclusions apportées par mes travaux permettent de dégager des pistes de réflexion sur des stratégies d'amélioration des réponses  $T_{FH}$  et humorale induites après vaccination.

# Résultats

---

## Articles présentés :

**Article 1** : « Critical role for skin-derived migratory DCs and Langerhans cells in T<sub>FH</sub> and GC responses after intradermal immunization ». Soumit à *The Journal of Immunology*.

**Article 2** : « IFA emulsion promotes and sustains T follicular helper cells for the generation of mucosal and neutralizing antibodies against the HIV-gp41 3S motif ». Manuscrit en préparation.

**Revue Bibliographique** : « Tailored immunity by skin antigen-presenting cells ». Publié dans *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 11:1, 1–10; January 2015.



# **Article 1 : « Critical role for skin-derived migratory DCs and Langerhans cells in T<sub>FH</sub> and GC responses after intradermal immunization »**

## **Contexte de l'étude**

Les cellules T helper folliculaires (T<sub>FH</sub>) forment une sous-population particulière de lymphocytes T CD4+ qui est cruciale pour la génération des centres germinatifs dans les ganglions. Les T<sub>FH</sub> apportent des signaux essentiels à l'expansion, la sélection, et la maturation d'affinité des lymphocytes B spécifiques de l'antigène (Vinuesa et al., 2016). En dépit de nos connaissances actuelles sur les cellules T<sub>FH</sub>, les cellules de l'immunité innée capables d'initier leur différenciation dans un contexte de vaccination restent peu connues.

Après reconnaissance de l'antigène, les cellules dendritiques (DCs) des tissus s'activent et migrent vers les ganglions lymphatiques drainants les tissus (DLN), où elles interagissent avec les cellules T naïves pour promouvoir leur prolifération et leur différenciation en cellules T auxiliaires spécialisées (Steinman and Hemmi, 2006). Dans le même temps, l'inflammation locale générée dans les tissus entraîne le recrutement de cellules du sang, principalement des monocytes, leur différenciation en macrophages ou en DCs dérivées du monocytes (mo-DCs), et leur contribution à la réponse immunitaire (Segura and Amigorena, 2013; Shi and Pamer, 2011). Les contributions individuelles et/ou synergiques des cellules tissulaires et inflammatoires du sang dans la différenciation des cellules T<sub>FH</sub> restent à éclaircir. Les mo-DCs sont plus efficaces que les DCs conventionnelles dans l'induction de cellules T<sub>FH</sub> après immunisation sous-cutanée, et la déplétion des DCs conventionnelles après immunisation intra péritonéale n'impacte pas la réponse T<sub>FH</sub> chez la souris (Chakarov and Fazilleau, 2014; Dahlgren et al., 2015). Cependant, dans certaines conditions inflammatoires, telles que l'infection par le virus influenza, les DCs tissulaires sont indispensables à la génération des cellules T<sub>FH</sub> (Yoo et al., 2012).

Prises dans leur ensemble, ces observations illustrent le fait que le ciblage initial de l'antigène et le site d'immunisation influencent fortement les populations de DCs qui prendront part à la différenciation des cellules T<sub>FH</sub>. En ce sens, notre équipe a précédemment démontrée que l'injection de l'antigène dans différentes couches de la peau influence la qualité et la diversité de la réponse immunitaire adaptative qui en découle (Duffy et al., 2012; Liard et al., 2011).

La vaccination intradermique (ID) a démontré son potentiel dans l'induction de fortes réponses humorales et cellulaires chez l'homme. Cependant, la capacité de la vaccination ID à générer des réponses T<sub>FH</sub> reste à élucider. La peau est constituée d'un microenvironnement unique et spécialisé de DCs, et son architecture favorise le recrutement de cellules du sang lors de l'inflammation (Heath and Carbone, 2013; Levin et al., 2015).



Dans cette étude, nous avons cherché à décrypter la dynamique et les contributions relatives des DCs du sang et de la peau dans la mise en place de réponses de type  $T_{FH}$  et B du centre germinatif après vaccination cutanée avec des nanoparticules biodégradables d'acide poly-lactique. L'ablation du site d'immunisation à des temps précoces après injection nous a permis de séquestrer l'antigène à différentes populations de cellules inflammatoires recrutées du sang et de cellules résidentes du ganglion. Nos résultats ont ainsi révélé un rôle central des cellules migratoires de la peau dans l'induction des cellules  $T_{FH}$ . En utilisant un modèle murin de déplétion des cellules exprimant la langérine, nous avons démontré le rôle crucial joué par les cellules de Langerhans après vaccination cutanée.

## Article

### **Critical role for skin-derived migratory DCs and Langerhans cells in TFH and GC responses after intradermal immunization**

Clément Levin<sup>1</sup>, Olivia Bonduelle<sup>1</sup>, Charles Nuttens<sup>1</sup>, Charlotte Primard<sup>2</sup>, Bernard Verrier<sup>2</sup>, Alexandre Boissonnas<sup>1</sup>, Béhazine Combadière<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, U1135, CNRS, ERL 8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), 91 Boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, Unité Mixte de Recherche 5305, Université Lyon 1, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP)-Lyon, France.

**\*Corresponding author:** Dr Béhazine Combadière, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses CIMI-Paris, 91 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Phone: +33140779888, Fax: +33140779734, E-mail: behazine.combadiere@upmc.fr

**Running title:** Skin migratory DCs are critical for TFH cell induction

## **Abstract**

Intradermal (ID) delivery of antigen represents a potent route of immunization that involves multiple blood- and skin-derived DC sub-populations endowed with specialized functions and dynamics in their ability to prime naïve CD4<sup>+</sup> T cells in the draining lymph node (DLN). Yet, their individual contributions to the generation of CD4<sup>+</sup> T follicular helper (T<sub>FH</sub>) cells and germinal centers (GCs) remain to be understood. We found that ID immunization with p24-coated poly(lactic acid) nanoparticles (NPs) induced robust T<sub>FH</sub> and GC B cell responses in skin DLNs, which were completely abrogated when skin cell emigration was prevented. However, in this later condition, both LN-resident and blood-derived inflammatory cells access the antigen in the DLN, but are not able to induce T<sub>FH</sub> cell differentiation. Rather, only skin-derived DCs up-regulated key genes related to T<sub>FH</sub> cell development such as IL-21 and IL-6 in the DLN. Depletion of Langerhans cells partially abrogated T<sub>FH</sub> and GC B cell responses, confirming their crucial role in the induction of T<sub>FH</sub> cell responses. Thus, after ID immunization, only skin-derived migratory DCs and particularly Langerhans cells permit the generation of T<sub>FH</sub> cells and GCs. Identifying the relative contributions of the various DC subsets that populate tissues and lymphoid organs in generating humoral immune responses is of great importance for the development of tailored vaccines.

## **Introduction**

T follicular helper ( $T_{FH}$ ) cells form a particular subset of  $CD4^+$  T cell that is crucial for the establishment of germinal centers (GC). They provide help for expansion, selection, and affinity maturation of antigen-specific B cells (1). Despite extensive research over the past decade, the innate cells that initiate  $T_{FH}$  cell differentiation remain unknown, particularly in vaccination.

After antigen encounter, tissue-resident dendritic cells (DCs) activate and migrate to the draining lymph node (DLN), where they interact with naive  $CD4^+$  T cells and initiate their expansion and differentiation into functionally specialized, pathogen-specific T helper cells (2). This process is accompanied by recruitment of blood cells (primarily monocytes), which sense the inflammation and reach the tissue, where they differentiate into macrophages and inflammatory DCs which further amplify the adaptive immune responses (3, 4). However, little is known about the individual and/or synergic contribution of these two arms of the innate immune system - blood and tissue resident cells - in  $T_{FH}$  cell differentiation. Monocyte-derived DCs are more efficient in  $T_{FH}$  cell priming than conventional DCs post-subcutaneous immunization, and specific depletion of conventional  $CD11c^+$  DCs has no impact on  $T_{FH}$  cell differentiation after intraperitoneal immunization in mice (5, 6). However, in influenza infection, respiratory DCs are potent inducers of  $T_{FH}$  cells (7).

Altogether, these discrepancies illustrate the fact that both initial targeting of APCs and site of immunization will influence  $T_{FH}$  cell differentiation by DC subpopulations. We previously reported that targeting of antigen into differential skin layers modulates and diversifies the quality of the adaptive immune responses (8, 9). Intradermal immunization has shown its potency in humans for the induction of both humoral and cellular responses; yet the induction of  $T_{FH}$  cell differentiation by ID route is a key point in vaccination that has not been addressed. The skin possesses unique and specialized DCs populations, and its vasculature enables fast recruitment of inflammatory blood cells (10, 11). In this current study, we sought to decipher the dynamics and relative contributions of skin and blood-derived APCs in  $T_{FH}$  and GC B cells responses after intradermal immunization with HIV p24-coated poly-lactic acid nanoparticles (NPs). Removal of the injection site enabled sequestration of the antigen to blood and tissue-resident cells in the DLNs, and revealed a central role for skin DCs in

the induction of  $T_{FH}$  cells and GC responses. Using a conditional depletion model, we further highlight that LCs are one of the main contributors in  $T_{FH}$  and GC responses to vaccination.

## **Materials and Methods**

### **Mice**

Female C57Bl/6 mice (6–8 week old) were purchased from Charles River Laboratories. Langerin–DTR C57Bl/6 mice were obtained from the Transgenesis, Archiving and Animal Models (CNRS laboratory) and were bred and housed in a specific pathogen free animal facility (Centre d'Experimentation Fonctionnelle (CEF), Pitié-Salpêtrière, France). Mice were anesthetized prior to immunization with 3 % isoflurane gas (Virbac) and maintained under 1.5 % isoflurane gas. Langerin–DTR mice received 1 µg of diphtheria toxin (Sigma-Aldrich) intraperitoneally 2 or 13 days before intradermal (ID) vaccination to deplete langerin-expressing cells, as previously described (12). All animals were handled in strict accordance with good animal practice and complied with local animal experimentation and ethics committee guidelines.

### **Poly-d l-lactic acid (PLA) nanoparticles**

Poly-d l-lactic acid (PLA) nanoparticles of 200 nm were prepared by solvent diffusion as previously described (13). Protein antigens were passively adsorbed onto PLA nanoparticles. Recombinant HIV-1 p24 protein (endotoxin <10 EU/mg) produced in *E. coli* by PX Therapeutics 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 2 h at room temperature (RT) under gentle agitation. After incubation, formulations were centrifuged for 10 min at 1000 × g. Non-adsorbed proteins that were collected in the supernatant were quantified using BCA Protein assay (Pierce).

Nanoparticle pellets were suspended in PBS at a concentration of 0.4 mg/mL of p24 protein.

To prepare green fluorescent particles, Coumarin-6 (C6) was dissolved in acetone together with PLA at a concentration of 0.2 % (w/v). During the precipitation process in the aqueous phase, Coumarin-6 was encapsulated in PLA nanoparticles (C6-NPs) (14).

### **Immunization protocols**

Intradermal (ID) administration of nanoparticles (NPs) was performed in the dorsal side of the ear using insulin specific needles (U-100, 29GX1/2' ' -0,33X12 mm, Terumo). Each animal received a priming dose of HIV-1 p24 PLA NPs, corresponding to 40  $\mu$ g of p24 coated onto PLA NPs, which represented a total amount of  $2-3 \times 10^{11}$  NPs per mouse injected in each ear (20  $\mu$ g per ear in 50  $\mu$ L in 3 micro-injections). Control mice were injected with PBS with the same procedures. At indicated time points, auricular DLNs or non-draining LN were harvested and dissociated through a 70-mm nylon mesh (cell strainer, BD Falcon) and washed with PBS supplemented with 1 % of fetal calf serum (FCS). For dendritic cell analysis, DLN were treated for 30 min at 37°C with collagenase IV (Sigma), 400 U ml/L in RPMI 1640 medium (Invitrogen) prior to cell separation on cell strainer.

### **Flow cytometry**

Prior to staining, cell suspensions were incubated with appropriate concentration of anti-CD16/32 (clone 2.4G2) in PBS 1 % FCS for 5 min at 4°C to block Fc-mediated binding. After washing, cells were stained for surface markers and viability (Live/Dead staining, Thermofisher) for 20 min at 4°C in PBS 1 % FCS, except for CXCR5 staining for which cells were incubated with a biotinylated anti-CXCR5 antibody for 45 min at 4°C in PBS 1 % FCS after which streptavidin-APC was used for detection. For T<sub>FH</sub> and GC B cell staining, the antibodies used were as follow: anti-CD19 (clone 1D3), anti-GL7 (clone GL7), anti-FAS (clone Jo2), anti-CD4 (clone RM4-5), anti-PD-1 (clone J43), anti-CD8 $\alpha$  (clone 53-6.7), anti-CXCR5 (clone 2G8), anti-IgD (clone 11-26c.2a). For inflammatory cell staining: anti-CD11c (clone N418, Affymetrix eBioscience), anti-F4/80 (clone Cl:A3-1, BIO-RAD), anti-I-A[b] (clone AF6-120.1), anti-CD11b (clone M1/70), anti-Ly6C (clone AL-21), anti-Ly6G (clone 1A8). For dendritic cell staining: anti-CD103 (clone M290), anti-CD8a, anti-I-A[b], anti-CD11b, anti-CD11c, anti-EpCAM (clone G8.8, Affymetrix eBioscience). Unless stated otherwise, all antibodies were purchased from BD Biosciences.

Cells were sequentially fixed with 4 % paraformaldehyde for 10 min at 4°C and rinsed. Fluorescence was analyzed on a minimum of  $2 \times 10^5$  cells of each population per sample with a FACS Fortessa (BD Bioscience) flow cytometer and analyzed using FlowJo software. For gene expression experiments, a minimum of 50,000 cells was sorted using a FACS ARIA II (BD Bioscience) cytometer.

### **p24-specific IgG and IgA ELISPOT assay**

ELISPOT plates were coated with either 50  $\mu$ l/well of 4 $\mu$ g/ml recombinant HIV-1 p24 protein produced in *E. coli* by PX Therapeutics diluted in PBS or coated with PBS alone. DLN were collected at day 7 after immunization and cells were seeded in duplicate (300,000 cells/well for IgA and 100,000 cells/well for IgG). Cells were incubated for 24 hours at 37°C. IgG or IgA antibody-secreting cells were detected with alkaline phosphatase conjugated-goat anti-mouse IgG or IgA antibodies (Abcam), followed by BCIP/NBT substrate for visualization (Sigma-Aldrich). Spots were counted with an automated plate reader (EliSpot Reader classic, AID). Results are represented as number of HIV-p24-specific IgG or IgA spots forming units (SFU) per mice (2 DLN).

### **Immunofluorescence microscopy**

Histology studies were performed on skin and DLNs at indicated times after ID immunization. Tissues were removed and immediately embedded in O.C.TTM wax (Tissue-Tek) for cryopreservation. Frozen tissues were sequentially cryosectioned (5 $\mu$ m sections) with a Microm HM550 cryostat (Thermo Scientific). Prior to staining, tissue sections were rehydrated and fixed for 10 min with PFA 4 % and then washed for 10 min in PBS 1 % bovine serum albumin (BSA) (Euromedex) followed by 30 min blocking incubation in PBS 3 % BSA at room temperature (RT). Endogenous biotin was blocked using the avidin/biotin blocking kit (Vector Laboratories) for 30 min at RT (15 min avidin, 15 min biotin). Slides were sequentially incubated for 1 h 30 at room temperature with surface markers. Slides were carefully washed in PBS 1X and then incubated for 1 h at room temperature with secondary chicken anti-rat IgG- Alexafluor 350; goat anti-rat IgG-Alexafluor 594 or goat anti-rat IgG-Alexafluor 633 (Invitrogen). For germinal centre staining, saturation and antibody incubations were done in PBS 0.05 % Tween 20 1 % FCS with anti-IgD, anti-GL7 and anti-CD4 directly coupled to V450, FITC and PE-cf594 respectively (BD Biosciences). After three washes in PBS, slides were mounted with Vectashield mounting medium containing DAPI (Vector Laboratories) or Fluoromont-G mounting medium (SouthernBiotech) according to secondary antibody used. Slides were analysed with a fluorescence microscope (BX51; Olympus) equipped with Qimaging image processing and analysis



system (Media Cybernetics Inc) or confocal microscope (FV-1000, Olympus) using the Olympus acquisition software. All images were analysed using ImageJ software.

### **Antibody dosage in sera**

Blood was collected prior to skin immunization and 28 days after immunization. Sera were recovered using 2 successive spin centrifugations. Sera were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until testing. Antibodies were measured by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Briefly, 96 well MaxiSorp-plates (Nunc, Thermofisher Scientific) were coated with  $50\ \mu\text{L}$  recombinant HIV-1 p24 (PX-Therapeutics) at  $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS and incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . After washing, plates were blocked for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$  with  $300\ \mu\text{L}$  blocking buffer (PBS, 1 % sterile BSA, Euromedex). Serial dilutions of 1/10 were performed and  $45\ \mu\text{L}$  of sera were diluted in assay buffer (PBS 1 %, BSA 0.05 %, Tween-20) and incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . All samples were tested in duplicates. After washing,  $100\ \mu\text{L}$  detection antibody Horse Radish Peroxydase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (1/10,000) (Southern Biotech) was added for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Enzymatic activity was measured by adding  $50\ \mu\text{L}$  of tetramethylbenzidine (TMB) (Clinisciences). After 5 min in the dark, the enzymatic reaction was stopped by addition of  $50\ \mu\text{L}$  of stop solution (1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ). Optical density (OD) of each well was monitored at 450 nm with a Multiscan Ex ELISA reader (Thermofisher) and Ascent Software version 2.6.

### **Gene expression analyses**

Three to six 7-week-old C57Bl/6 mice received  $40\ \mu\text{g}$  of p24-NPs intradermally, and DLN were collected 3 days after injection. DLN were pooled per groups and stained as described in the flow cytometry section. A minimum of 50,000 dendritic cells were then sorted on a BD FACS ARIA II and collected in Qiagen RNA later. Cells were then lysed and total RNA extracted using Qiagen RNAeasy micro RNA kit according to manufacturer's instructions. cDNA was made using Vilo superscript (Thermofisher) and used for quantitative PCR. Relative expression of genes was normalized using housekeeping gene HPRT and is shown as  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , where  $\Delta$  stands for  $[(\text{Ct value target gene}) - (\text{Ct value HPRT})]$ . For IL-1 $\beta$ , the sequence of primers was as follows: forward 5'-AAC CTG CTG GTG

TGT GAC GTT C-3'; reverse 5'-CAG CAC GAG GCT TTT TTG TTG T-3'. For IL-6: forward 5'-GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC AGG A-3'; reverse 5'-CCA GGT AGC TAT GGT ACT CCA GAA-3'. For IL-21: forward 5'-AGG ACC CTT GTC TGT CTG GT-3'; reverse 5'-TGC TCA CAG TGC CCC TTT AC-3'.

### **Statistical analysis**

Prism-6 software was used for data handling, analysis, and graphic representations. Data are presented as the mean value  $\pm$  standard error of the mean (SEM). For statistical analyses a Mann Whitney Test was used and significance was set at p-value  $< 0.05$ . A one-way ANOVA test with Bonferroni correction was used for comparison of more than 2 groups of mice, with a 95 % significance interval.

## **Results**

### ***Prevention of skin cell emigration to draining lymph nodes abrogates $T_{FH}$ and germinal center B cell induction after intradermal immunization***

To question the role of skin cells in the induction of  $T_{FH}$  and GC B cells, mice were injected intradermally (ID) with 20  $\mu$ g of p24-PLA nanoparticles (NPs) or control PBS in each ear, which were surgically removed 1 h after injection (Ear Cut, EC). It has previously been suggested that antigen-presenting cell migration from skin to the DLN takes several hours or days (15), thus early removal of the ear (at 1 hour) enables abrogation of skin cell migration.  $CD4^+ CXCR5^+ PD1^+ T_{FH}$  cells and  $B220^+ FAS^+ GL7^+ IgD^-$  germinal center B cell (Supplemental Figure 1A) were then evaluated in skin draining lymph nodes (DLN) at day 7, which corresponded to the peak of the cellular response in normal conditions (Supplemental Figure 1B). Removal of the ear at 1 h after injection completely abrogated the  $T_{FH}$  cell expansion in immunized animals at day 7 (Figure 1A and B,  $p < 0.0001$ ) as well as at later time point, thus excluding a potential delayed induction (Supplemental Figure 2A).  $T_{FH}$  cell differentiation was dependent on the presence of the p24 antigen, as injection of control fluorescent Coumarin6-labelled nanoparticles (C6-NPs) did not induced  $T_{FH}$  and GC B cells expansion (Figure 1C). Cellular responses were restricted to skin DLNs (proximal to the site of injection) and not observed in any other distal LN (Figure 1D). DLN GC B cells and IgA- and IgG-antibody secreting-cells were also dramatically reduced after EC (Figure 1E,  $p = 0.0016$ ). Consequently, anti-p24 IgG titers in the serum of NPs + EC mice at day 28 were at least 100 times lower than those of control NP-injected animals ( $IC_{50} = 69.4 \pm 45.7$  versus  $11628.7 \pm 5440$ ,  $p = 0.021$ ) (Figure 1F).

One could hypothesize that ear removal would have abrogated the transport of antigen to the DLN, consequently reducing T cell responses. To address this point, we injected fluorescent C6-NPs intradermally and tracked their localization in the skin and DLN at four hours post-immunization (Figure 2A). Fluorescent particles were observed in ear dermis and in DLN as early as 4 h after injection (Figure 2A). Interestingly, removal of the ear at 1 h post-injection had no impact on the number of fluorescent NP+ cells in the DLN after 4 h or 1 day as detected by flow cytometry analysis (Figure 2B), indicating that the vast majority of injected NPs are able to flow to the DLN within the

first hour. These results show that despite the presence of high amounts of antigen in the DLN within the first hour after immunization, LN-resident cells do not support  $T_{FH}$  and GC B cell responses. Thus, preventing skin cell migration by EC does not prevent free antigen to flow to the DLN, but completely abrogates  $T_{FH}$  and GC B cell expansion. However it raises the question the cellular mechanisms of T cell priming for  $T_{FH}$  differentiation.

***Blood-derived inflammatory cells bypass the skin to reach the DLN but are not involved in the generation of  $T_{FH}$  and GC B cells***

We then questioned the role of blood and skin resident cell recruitment to the DLN in response to antigen injection in the dermis in the generation of  $T_{FH}$  and GC B cells. Using cell-surface marker staining, we were able to distinguish neutrophils (P1), inflammatory monocytes (P2), inflammatory DCs (P3) and macrophages (P4) in skin DLN (Figure 3A). In skin DLN, the percentage of each population among total CD11b<sup>+</sup> cells was evaluated after PBS injection or 1 h, 4 h, 8 h, and 24 h after NP injection, in EC and control mice (Figure 3B and C). As previously shown (8, 16), the proportion of neutrophils rapidly increased as soon as 4 h after the injection (from 7.49 % to 49.2 % of total CD11b<sup>+</sup> cells) and then decreased progressively to reach basal level after 24 hours (Figure 3B). An increase of the proportion of inflammatory monocytes (from 8.39 % to 27.97 %) and macrophages (from 1.26 % to 9.53 %) was noticed at 8 h after injection, while monocytes-derived inflammatory DCs peaked at 24 h after the injection (from 11.2 % to 26.18 %) (Figure 3B). Surprisingly, removing the ear at 1 h after injection had no impact on the recruitment of all cell types to the DLN at any given time, suggesting that the vast majority of inflammatory cells found in the DLN arise directly from the blood, without migrating through the cutaneous site of antigen delivery (Figure 3C).

Removal of the site of immunization within the first 24 hours (i.e. EC at 8 h, 16 h, or 24 h) significantly abrogates  $T_{FH}$  and GC B cell induction, showing that slow migratory skin cells are critical for  $T_{FH}$  and GC B cells responses (Figure 3D).

***Skin migratory DCs bring key signals to the DLN***

The total absence of cellular responses observed after removing the ear clearly suggest that skin-derived DCs are required for optimal generation of  $T_{FH}$  and GCs. In the lymph nodes, DCs can be segregated into skin-derived migratory DCs or LN-resident DCs according to the level of expression of MHCII and CD11c (17). Skin-derived migratory DCs can be further divided into four subsets: LCs, CD103+ DCs, CD11b+ DCs and CD11b- DCs (Figure 4A). Because skin migratory DCs continuously migrate to the LN at steady state, no differences in absolute numbers of all four subsets were observed at day 1 and 3 after immunization with PBS or NPs in the DLN (Supplemental Figure 3). Therefore, we rather focused on the identification of qualitative differences between skin-migratory and DLN-resident DC subsets after PBS or NPs immunization. These subsets were sorted and total mRNA analyzed for expression of key genes involved in  $T_{FH}$  cell induction. Three days after immunization, we observed a significant increase in the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-21 only in skin-migratory DCs from mice that received p24-NPs (Figure 4B). Thus, one or several slow-migrating skin DC subsets bring key signals for the formation of GC and  $T_{FH}$  cells to the DLN after ID immunization.

#### ***Langerhans cells promote $T_{FH}$ cell polarization and GC induction***

Among slow-migrating skin cells, Langerhans cells are the hallmark of cutaneous immunity. Due to their epidermal localization, their migration to the DLN usually requires several days (15). To investigate the role of epidermal LCs and dermal CD103+ DCs (CD103+ dDCs) in the generation of  $T_{FH}$  cells and GC B cells after ID immunization with p24-PLA NPs, we used Langerin-GFP-diphtheria toxin receptor (Lang-GFP-DTR) transgenic mice. In this model, a single administration of DT depletes Langerin-expressing cells, including LCs and CD103+ dDCs (12). However, LCs remain depleted for more than 2 weeks, whereas CD103+ dDCs recover in 5 to 7 days (18). Mice received DT either 13 days or 2 days prior to ID immunization, thus inducing a lack of LCs only (condition DT1), or both LCs and CD103+ dDCs (condition DT2) respectively (Figure 5A). DT injection efficiently depleted Langerin+ cells and had no impact on Langerin- cells, as shown by flow cytometry analysis (Figure 5B). Analysis of ear DLNs at 7 days post-immunization revealed a severe reduction (47 %) of total  $T_{FH}$  cell numbers in mice lacking LCs only (DT1,  $p=0.0264$ ) as well as in mice lacking both Langerin-expressing subsets (DT2,  $p=0.0062$ ), as compared to positive control (Figure 5C). This suggests that

only LCs had an impact on T<sub>FH</sub> cell development. Accordingly, DLN germinal centre area (GL7+, IgD-) was markedly reduced (76x10<sup>3</sup> μm<sup>2</sup> in untreated mouse and 28x10<sup>3</sup> μm<sup>2</sup> in DT2 mouse) 7 days after p24-NPs injection (Figure 5D). As expected, GC B cells were also reduced by ~56 % in both DT experimental conditions (p=0.015 for DT1 and p=0.025 for DT2 as compared to NPs without DT), while p24-specific IgG and IgA secreting cells were reduced by ~65 % (p=0.0143 for DT1 and p=0.0027 for DT2) and ~75 % (p=0.0293 for DT1 and p=0.0097 for DT2) respectively (Figure 5E). Therefore, LCs, but not CD103+ dDCs, are critical for T<sub>FH</sub> cells induction and generation of germinal centre following intradermal immunization.

## **Discussion**

In this study, we examined the contributions of various DC populations in priming T<sub>FH</sub> and GC B cell responses to p24-coated nanoparticles after intradermal immunization. By removing the site of injection after 1 h, we were able to restrict access of the antigen to LN-resident DCs as well as to recruited blood cells. Surprisingly, our results showed a total absence of T<sub>FH</sub> and GC B cell development in this condition, despite the vast majority of blood inflammatory cells were recruited directly to the DLN. Our findings revealed a critical role for skin-migratory LCs in mounting T<sub>FH</sub> and GC B cell responses.

Particle-based antigen (20-200 nm) can efficiently enter the lymph vessels, be up-taken by APCs, and induce their activation (19, 20). In our experimental setting, passive migration of nanoparticles from the dermis to the DLN occurred very quickly (within the first hour). To our surprise, we did not observe any T<sub>FH</sub> cell differentiation when the antigen was delivered passively to LN-resident DCs. Indeed, several studies have reported induction of humoral or CD4<sup>+</sup> T cell immunity by LN-resident DCs. In non-inflammatory conditions, the DLN microenvironment is filled with several antigen-presenting cell subsets, including CD8a<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> DCs, CD169<sup>+</sup> subcapsular macrophages, and newly described lymphatic sinuses (LS)-associated DCs (21). Moreover, tissue-derived DCs are continuously migrating toward the LN, and represent a minor but non-negligible fraction of total LN-DC at a given time. Accordingly, SIGN-R1<sup>+</sup> LN-resident DC are essential for humoral immunity against influenza, and promote differentiation of CD4<sup>+</sup> T cell as early as 2 h after virus injection (22). Removal of the ear immediately after intradermal immunization with flu HA antigen had no impact on the generation of antibody responses when compared to control animals (23). In this later study, however, T<sub>FH</sub> cell differentiation was not investigated and thus it is possible that the antibody responses observed were T<sub>FH</sub>-independent. Similarly, LN-resident CD11c<sup>+</sup> DCs were not affected in their ability to induce IL-2 production by Leishmania-specific naïve CD4<sup>+</sup> T cells after early removal of the ear following intradermal infection (24). Since IL-2 has been shown to repress the T<sub>FH</sub> cellular program, this might indicate a differential role for LN-resident DCs in inducing T helper, but not T follicular helper cell differentiation.

Interestingly, it has been reported that neither LN-resident nor migratory DCs alone are sufficient to drive proliferation of naïve CD4<sup>+</sup> T cells. Instead, each population sequentially present the antigen and cooperate for effective priming of CD4<sup>+</sup> T cells (25, 26). Therefore, it is highly possible that skin migratory DCs alone would not be sufficient to induce T<sub>FH</sub> cell responses, and that despite being inefficient in T<sub>FH</sub> cell priming, LN-resident DC are participating in this process.

Another interesting feature of our study is that in our setting, blood-derived monocytes were able to reach the DLN directly when the site of antigen injection was removed, and progressively concerted into inflammatory DCs. This phenomenon has been described elsewhere (27, 28), although direct recruitment to the inflamed tissue and subsequent migration to the DLN is thought to be the predominant route by which monocytes contribute to host defense (4). After SC injection with OVA and TLR9-activating adjuvant, monocyte-derived DCs were shown to promote T<sub>FH</sub> cell responses (5). However, using p24-NPs, we observed no T<sub>FH</sub> cell induction despite monocyte-derived DC being detectable 24 h after injection. SC route of injection primarily targets the antigen to a fat layer, which contains few tissue-resident DC, and therefore may heavily rely on blood-cell recruitment for the generation of immune responses.

Finally, our results suggest that Langerhans cells are involved in T<sub>FH</sub> cell differentiation, as complete ablation of these cells resulted in partial loss of T<sub>FH</sub> and GC B cell numbers in the DLN. This is in accordance with a recent study reporting induction of T<sub>FH</sub> and humoral responses after direct targeting of LC using anti-langerin monoclonal antibody coupled with the antigen (29).

Overall, our results provide further understanding on the mechanisms involved in T<sub>FH</sub> and GC B cell induction, and emphasize the role of skin migratory cells after intradermal vaccination. In line with these results and that of others, intradermal delivery of antigen appears to be a promising route for efficient induction of T<sub>FH</sub> differentiation and GC B cells for strong humoral response.



## **Acknowledgements**

This project has received funding from the European Union's Seventh Program for research, technological development and demonstration under grant agreement No 241904, CUT'HIVAC (Cutaneous and mucosal HIV vaccination). B. Combadière is a recipient of Fondation pour la Recherche Médicale "Equipe FRM 2013" funding award. Charles Nuttens is a recipient of Sidaction fellowship. The authors are grateful to Dr. S. Morosan, director of CEF, Pitié-Salpêtrière; to Dormeur Foundation, Vaduz for providing AID EliSpot Reader and Cryostat HM550 apparatus; to Andrew J. Hutton for English editing of the manuscript.

## References

1. Vinuesa, C. G., M. A. Linterman, D. Yu, and I. C. M. MacLennan. 2016. Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 34.
2. Steinman, R. M., and H. Hemmi. 2006. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. In *From Innate Immunity to Immunological Memory. Current Topics in Microbiology and Immunology* vol. 311.
3. Segura, E., and S. Amigorena. 2013. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* 34: 440–445.
4. Shi, C., and E. G. Pamer. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 762–774.
5. Chakarov, S., and N. Fazilleau. 2014. Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation. *EMBO Mol. Med.* n/a-n/a.
6. Dahlgren, M. W., T. Gustafsson-Hedberg, M. Livingston, H. Cucak, S. Alsen, U. Yrlid, and B. Johansson-Lindbom. 2015. T Follicular Helper, but Not Th1, Cell Differentiation in the Absence of Conventional Dendritic Cells. *J. Immunol.* .
7. Yoo, J.-K., E. N. Fish, and T. J. Braciale. 2012. LAPCs promote follicular helper T cell differentiation of Ag-primed CD4<sup>+</sup> T cells during respiratory virus infection. *J. Exp. Med.* 209: 1853–1867.
8. Duffy, D., H. Perrin, V. Abadie, N. Benhabiles, A. Boissonnas, C. Liard, B. Descours, D. Reboulleau, O. Bonduelle, B. Verrier, N. Van Rooijen, C. Combadière, and B. Combadière. 2012. Neutrophils Transport Antigen from the Dermis to the Bone Marrow, Initiating a Source of Memory CD8<sup>+</sup> T Cells. *Immunity* 37: 917–929.
9. Liard, C., S. Munier, M. Arias, A. Joulin-Giet, O. Bonduelle, D. Duffy, R. J. Shattock, B. Verrier, and B. Combadière. 2011. Targeting of HIV-p24 particle-based vaccine into differential skin layers induces distinct arms of the immune responses. *Vaccine* 29: 6379–6391.

10. Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2013. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat. Immunol.* 14: 978–985.
11. Levin, C., H. Perrin, and B. Combadiere. 2015. Tailored immunity by skin antigen-presenting cells. *Hum. Vaccines Immunother.* 11: 22–21.
12. Kissenpfennig, A., S. Henri, B. Dubois, C. Laplace-Builhé, P. Perrin, N. Romani, C. H. Tripp, P. Douillard, L. Leserman, D. Kaiserlian, S. Saeland, J. Davoust, and B. Malissen. 2005. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22: 643–654.
13. Lamalle-Bernard, D., S. Munier, C. Compagnon, M.-H. Charles, V. S. Kalyanaraman, T. Delair, B. Verrier, and Y. Ataman-Önal. 2006. Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. *J. Controlled Release* 115: 57–67.
14. Primard, C., N. Rochereau, E. Luciani, C. Genin, T. Delair, S. Paul, and B. Verrier. 2010. Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. *Biomaterials* 31: 6060–6068.
15. Tomura, M., A. Hata, S. Matsuoka, F. H. W. Shand, Y. Nakanishi, R. Ikebuchi, S. Ueha, H. Tsutsui, K. Inaba, K. Matsushima, A. Miyawaki, K. Kabashima, T. Watanabe, and O. Kanagawa. 2014. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci. Rep.* 4.
16. Abadie, V., O. Bonduelle, D. Duffy, C. Parizot, B. Verrier, and B. Combadière. 2009. Original encounter with antigen determines antigen-presenting cell imprinting of the quality of the immune response in mice. *PLoS One* 4: e8159.
17. Ohl, L., M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning, and R. Förster. 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 21: 279–288.
18. Ginhoux, F., M. P. Collin, M. Bogunovic, M. Abel, M. Leboeuf, J. Helft, J. Ochando, A. Kissenpfennig, B. Malissen, M. Grisotto, H. Snoeck, G. Randolph, and M. Merad. 2007.

- Blood-derived dermal langerin<sup>+</sup> dendritic cells survey the skin in the steady state. *J. Exp. Med.* 204: 3133–3146.
19. Bachmann, M. F., and G. T. Jennings. 2010. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 787–796.
  20. Joshi, V. B., S. M. Geary, and A. K. Salem. 2013. Biodegradable Particles as Vaccine Delivery Systems: Size Matters. *AAPS J.* 15: 85–94.
  21. Gerner, M. Y., P. Torabi-Parizi, and R. N. Germain. 2015. Strategically Localized Dendritic Cells Promote Rapid T Cell Responses to Lymph-Borne Particulate Antigens. *Immunity* 42: 172–185.
  22. Gonzalez, S. F., V. Lukacs-Kornek, M. P. Kuligowski, L. A. Pitcher, S. E. Degn, Y.-A. Kim, M. J. Cloninger, L. Martinez-Pomares, S. Gordon, S. J. Turley, and M. C. Carroll. 2010. Capture of influenza by medullary dendritic cells via SIGN-R1 is essential for humoral immunity in draining lymph nodes. *Nat. Immunol.* 11: 427–434.
  23. Tozuka, M., T. Oka, N. Jounai, G. Egawa, K. J. Ishii, K. Kabashima, and F. Takeshita. 2015. Efficient antigen delivery to the draining lymph nodes is a key component in the immunogenic pathway of the intradermal vaccine. *J. Dermatol. Sci.* .
  24. Iezzi, G., A. Frohlich, B. Ernst, F. Ampenberger, S. Saeland, N. Glaichenhaus, and M. Kopf. 2006. Lymph Node Resident Rather Than Skin-Derived Dendritic Cells Initiate Specific T Cell Responses after *Leishmania major* Infection. *J. Immunol.* 177: 1250–1256.
  25. Allenspach, E. J., M. P. Lemos, P. M. Porrett, L. A. Turka, and T. M. Laufer. 2008. Migratory and Lymphoid-Resident Dendritic Cells Cooperate to Efficiently Prime Naive CD4 T cells. *Immunity* 29: 795–806.
  26. Itano, A. A., S. J. McSorley, R. L. Reinhardt, B. D. Ehst, E. Ingulli, A. Y. Rudensky, and M. K. Jenkins. 2003. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 19: 47–57.
  27. Nakano, H., K. L. Lin, M. Yanagita, C. Charbonneau, D. N. Cook, T. Kakiuchi, and M. D. Gunn. 2009. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat. Immunol.* 10: 394–402.

28. Palfreman, R. T., S. Jung, G. Cheng, W. Weninger, Y. Luo, M. Dorf, D. R. Littman, B. J. Rollins, H. Zweerink, A. Rot, and others. 2001. Inflammatory Chemokine Transport and Presentation in HEV A Remote Control Mechanism for Monocyte Recruitment to Lymph Nodes in Inflamed Tissues. *J. Exp. Med.* 194: 1361–1374.
29. Yao, C., S. M. Zurawski, E. S. Jarrett, B. Chicoine, J. Crabtree, E. J. Peterson, G. Zurawski, D. H. Kaplan, and B. Z. Igyártó. 2015. Skin dendritic cells induce follicular helper T cells and protective humoral immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.*

## **Figure Legends**

**Figure 1: Skin migratory cells are necessary for T<sub>FH</sub> and germinal center B cell induction after intradermal immunization.** (A) Representative gating strategy for the identification of T<sub>FH</sub> cells (PD1<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>) in DLN, after pre-gating on live singlet CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T lymphocytes after intradermal (ID) immunization with PBS or p24-PLA nanoparticles (NPs) in control and ear cut (EC) mice. Unless specified otherwise, ears were removed at 1h after injection. (B) Absolute numbers of T<sub>FH</sub> cells in DLNs 7 days after ID immunization in PBS or NPs or NPs+EC conditions (n=14 to 18 mice per group). (C) T<sub>FH</sub> cell numbers in DLNs 7 days after immunization with PBS or Coumarin-6 nanoparticles (C6-NPs) or p24-NPs (NPs). (D) T<sub>FH</sub> cell numbers in draining and non-draining LNs 7 days after immunization with NPs compared to control PBS injected mice (n=3). (E) Absolute numbers of GC B cells (left), p24-specific IgA (middle) or IgG (right) secreting cells in DLNs 7 days after immunization with NPs in control and ear cut mice. Antibody secreting cells were evaluated by ELISpot assay. B cells were stimulated for 16 hours with HIV-1 p24 overlapping peptides. (F) Anti-p24 IgG titers in serum of mice at 28 days after immunization with NPs in control and EC treated mice as determined by ELISA.

Data are pooled from 3 independent experiments of 3 to 6 mice/group and are shown as mean ± SEM. One-way ANOVA with Bonferonni correction. Statistical significance is indicated by \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001. Ns: not significant. ASC: Antibody-secreting cells. SEM: Standard error of mean.

**Figure 2: Similar amounts of antigen in control and EC animals after injection of fluorescent NPs.** (A) Histological section of the ear (left) and DLN (right) depicting lymphatic vessel network (anti-Lyve-1, red) 4 hours after ID injection of 1.2x10<sup>11</sup> C6-NPs (green). Ears were removed (EC) 1 hour after injection (right, lower panel) or not removed (right, upper panel). Scale bar=100µm. (B) Quantification of total NPs+ cells in DLNs of control and ear cut (EC) mice at 4h and 24h after injection of C6-NPs as determined by flow cytometry. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

**Figure 3: Blood-derived inflammatory cells bypass the skin to reach the DLN but are not involved in the generation of T<sub>FH</sub> and GC B cells.** (A-C) Analysis of inflammatory cells recruitment to the DLN at 1h, 4h, 8h, and 24h after ID injection of NPs in control or EC mice. (A) Gating strategy for identification of neutrophils (CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>), inflammatory monocytes (CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup>, Ia(b)<sup>-</sup>), inflammatory DCs (CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup>, Ia(b)<sup>+</sup>), and monocyte-derived macrophages (CD11b<sup>+</sup>, Ly6Clow, F4/80<sup>+</sup>, SSChi) by flow cytometry. (B) Relative proportions of each inflammatory cell subset among total CD11b<sup>+</sup> cells at indicated times after PBS or NP intradermal injection. (C) Percentages of each subset of inflammatory cells among total CD11b<sup>+</sup> cell fraction in control and ear cut mice. (D) Absolute numbers of T<sub>FH</sub> (upper panel) and GC B cells (lower panel) in DLNs 7 days after immunization with PBS or NPs in control and ear cut mice. Ears were removed at 1h, 8h, 16h, or 24h after injection. One-way Anova with Bonferroni correction was applied to determine statistical significance. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001. Data are compared to PBS-injected mice followed by EC at 8h (b-c) or 1h (d) and represented as mean ± standard error of mean (SEM). Data are pooled from 3 independent experiments of 3 mice/group.

**Figure 4: Skin-migratory DCs produce key signals to the DLN.** (A) Gating strategy for identification of resident DCs and migratory DC subsets. (B) mRNA expression of genes in sorted resident (red) and migratory (blue) DCs of the DLN at day 3 after ID injection of PBS (hollow bars) or p24-NPs (plain bars). Cells from 3 to 6 mice were pooled. Data are representative of two independent experiments.

**Figure 5: Langerhans cells promote T<sub>FH</sub> cell polarization and GC formation.** (A) Langerin-DTR mice were injected intraperitoneally with 1μg of diphtheria toxin (DT) on day -13 (condition DT1: no LCs) or day -2 (condition DT2: no LCs and CD103<sup>+</sup> dDCs) before ID immunization with PBS or NPs. (B) Efficiency of cell depletion after DT treatment. Left panel: Analysis of Langerin-GFP expression among MHCII<sup>+</sup> skin cells 2 days after PBS or DT injection in Langerin-DTR mice. Middle and right panel: Percentage of langerin<sup>+</sup> and langerin<sup>-</sup> cells among MHCII<sup>+</sup> cells 2 days after PBS or DT injection in Langerin-DTR mice. (C) Absolute numbers of T<sub>FH</sub> cells in 2 DLNs 7 days after NPs or

PBS ID immunization in DT1, DT2, or untreated animals. (D) GC staining on histological section of skin DLNs by anti-GL7 (green), anti-IgD (blue) and anti-CD4 (red). Mice were injected with PBS or NPs with or without DT treatment 2 days prior to immunization. GC areas are expressed in  $\mu\text{m}^2$ . Scale bar=50 $\mu\text{m}$ . (e) Absolute numbers of GC B cells (left panel), and p24-specific IgG- (middle panel) or IgA- (right panel) antibody secreting cells in 2 DLNs 7 days after NPs or PBS immunization in DT1, DT2, or untreated animals. Statistical significance is indicated by \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . One-way ANOVA with Bonferonni correction. DT: Diphtheria toxin. Results are representative of 3-5 independent experiments of 3 mice/group.



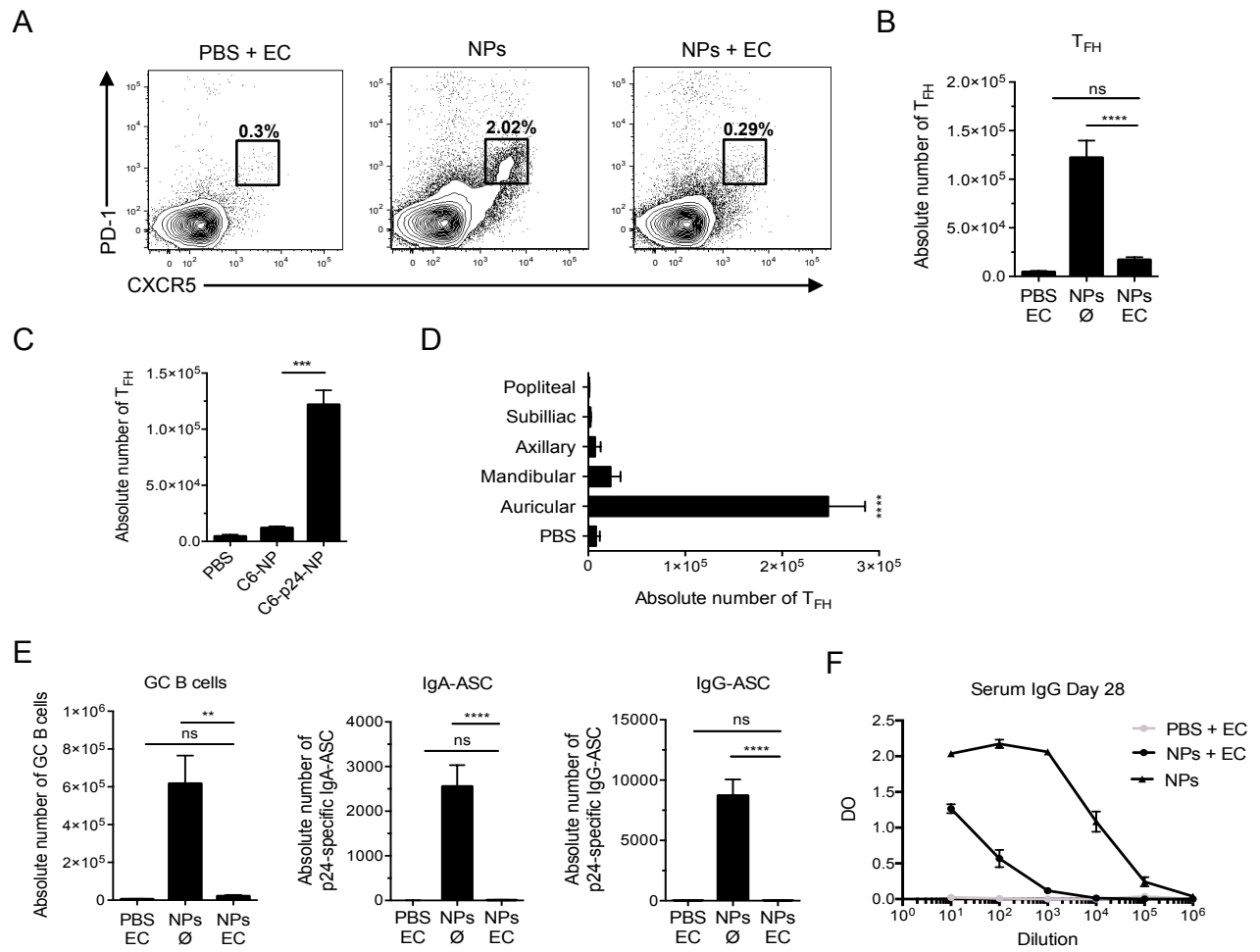


Figure 1

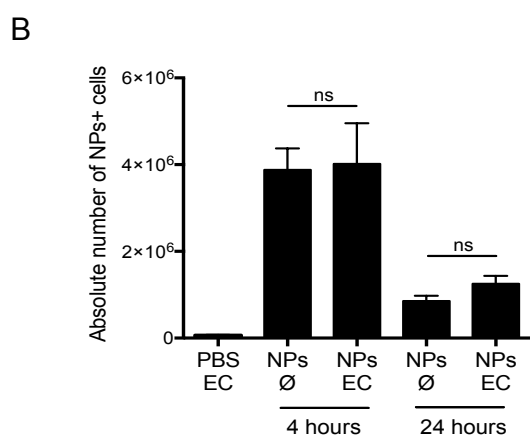
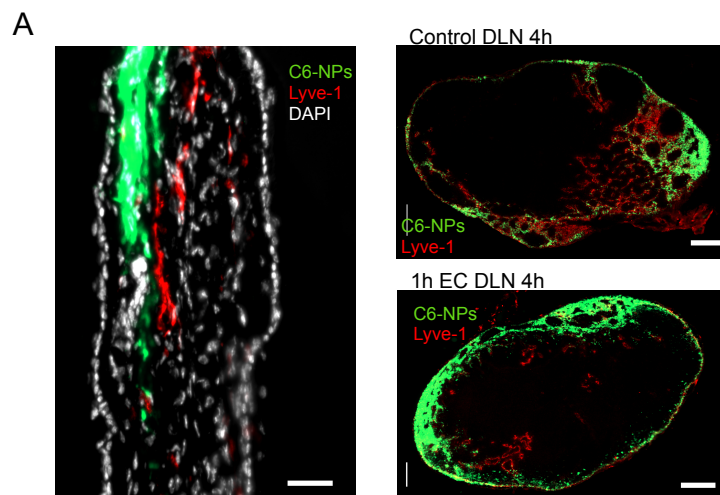


Figure 2

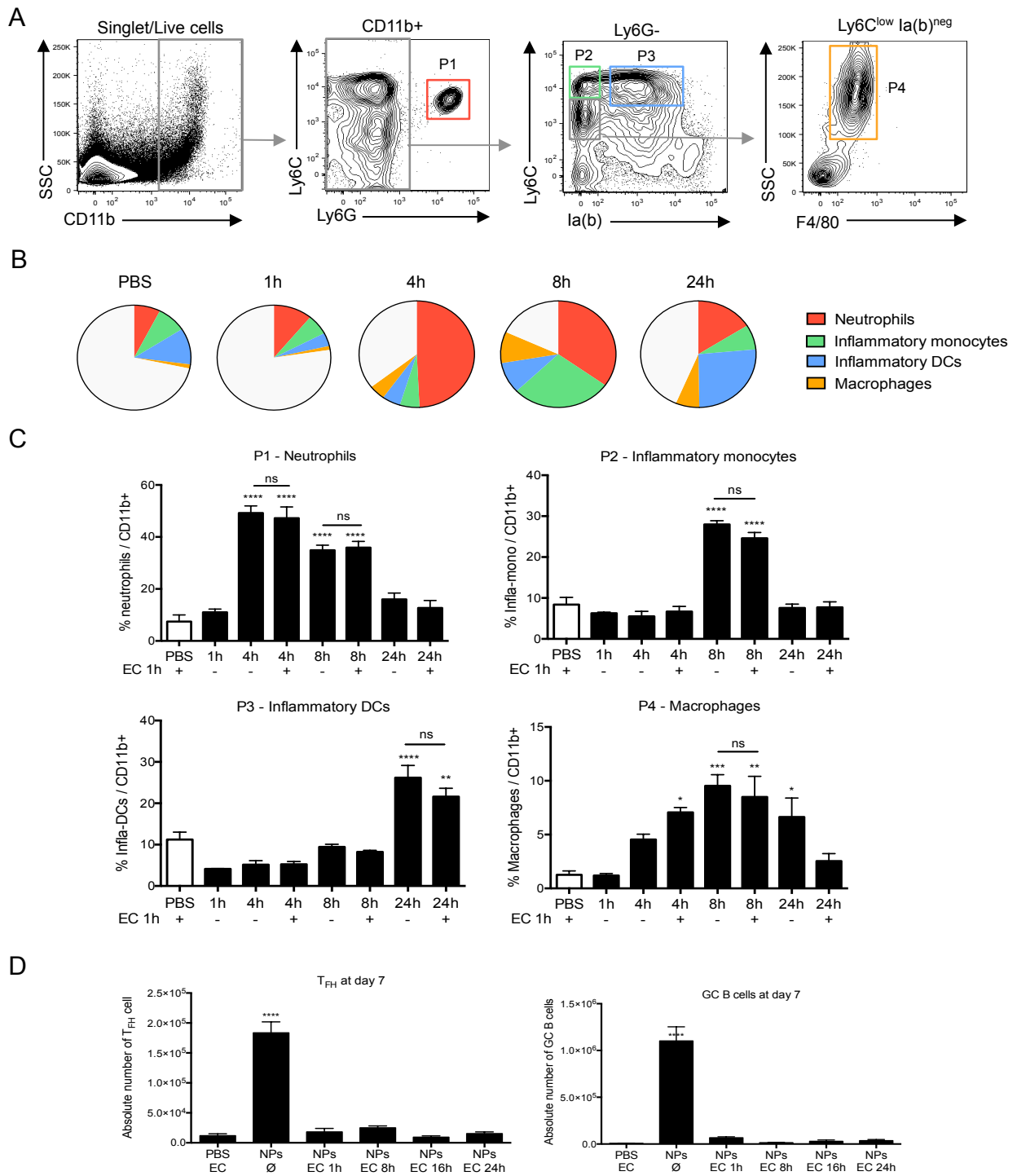


Figure 3

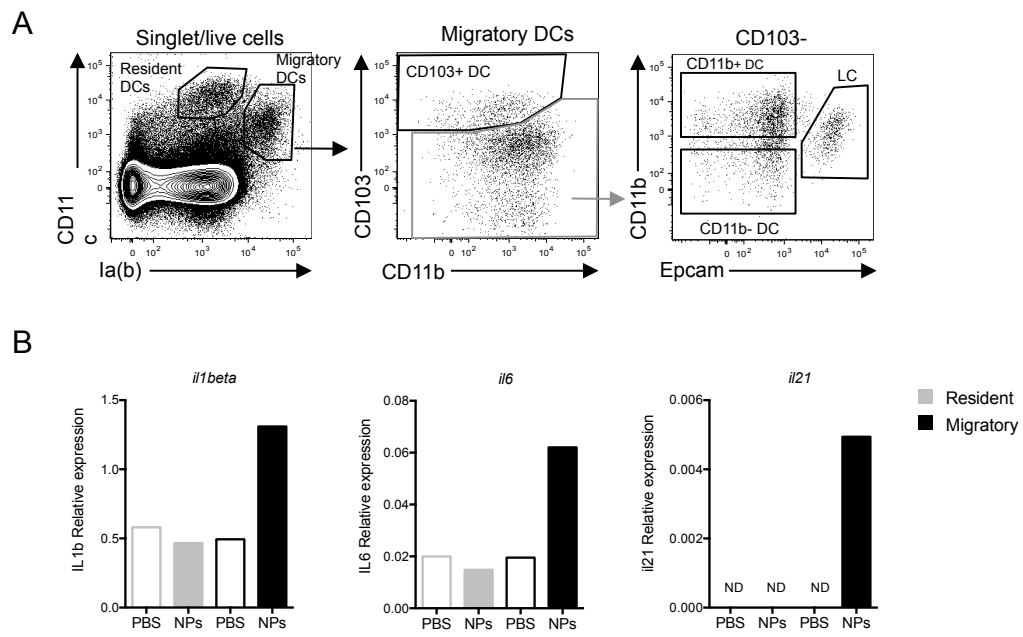


Figure 4

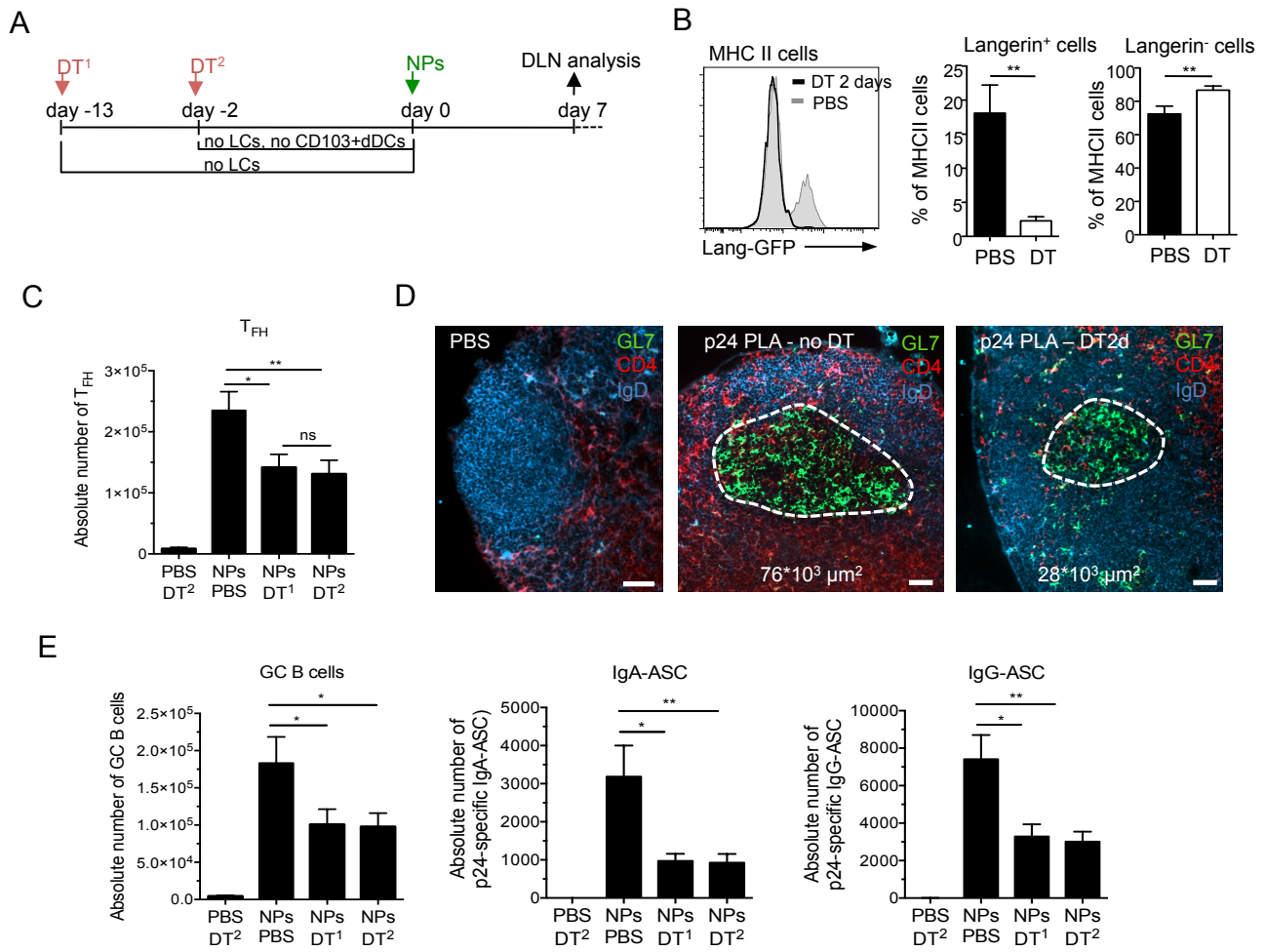
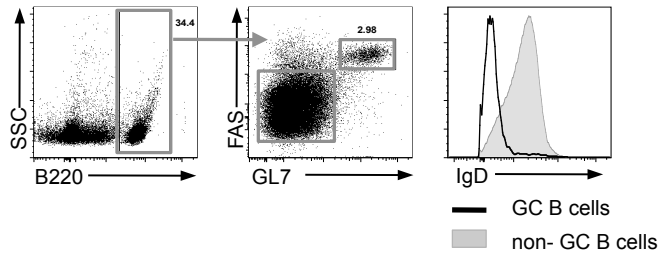
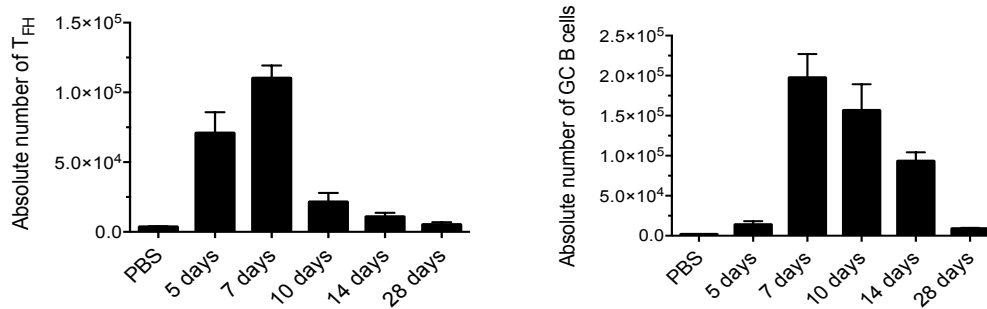


Figure 5

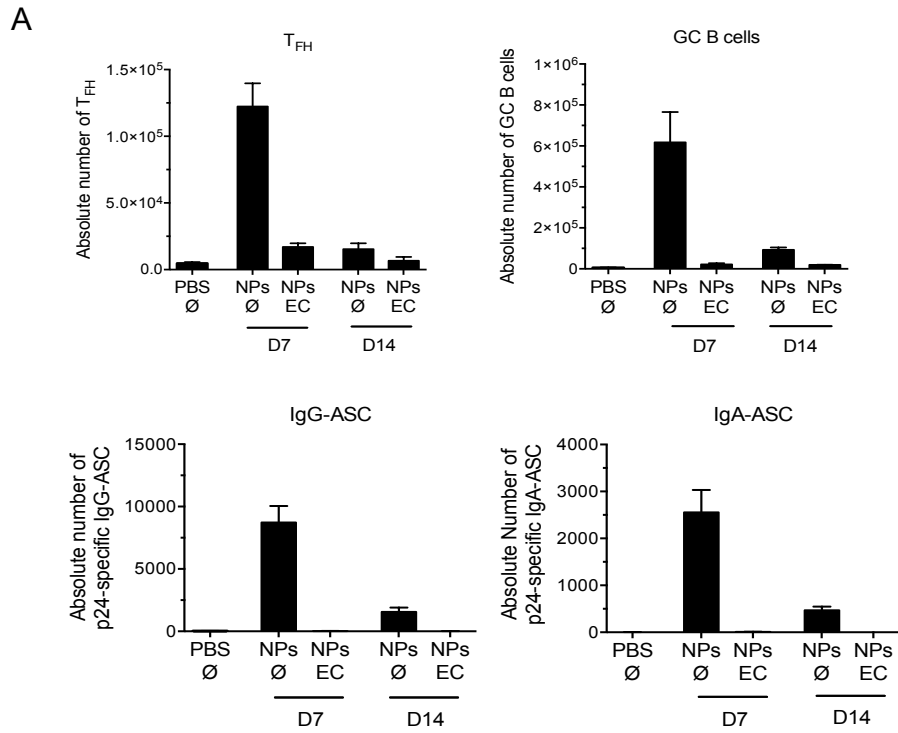
A



B

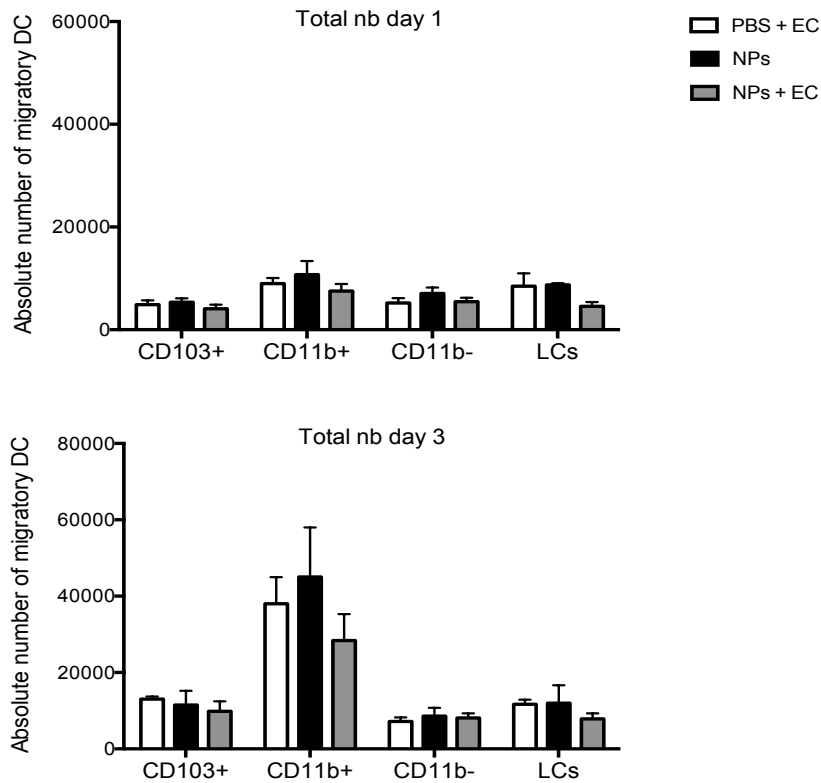


**Supplemental Figure 1:** (A) Representative gating strategy for the identification of GC B cells (B220+, FAS+, GL7+, IgD-) in DLN, after pre-gating on live singlet CD3- lymphocytes. (B) Absolute numbers of  $T_{FH}$  (left) or GC B cells (right) in DLNs at indicated time points after ID immunization with PBS or NPs (n=3 mice per group, representative of two independent experiments).



**Supplemental Figure 2:** (A) Absolute number of T<sub>FH</sub>, GC B cell, anti-p24 IgG and IgA antibody-secreting cells at day 7 or 14 after ID immunization with PBS or NPs in control or EC conditions. EC was performed 1h after ID injection. (n=3 to 18 mice per groups).

A



**Supplemental Figure 3:** (A) Absolute number of migratory DC subsets in the DLN at day 1 (upper panel) or day 3 (lower panel) after ID immunization with PBS or NPs in control or EC conditions. EC was performed 1h after ID injection.

### Supplemental Figure 3



## Résumé des résultats et discussion

La peau est constituée d'au moins 4 sous-populations de DCs, les cellules de Langerhans (LCs), les DCs CD11b<sup>+</sup> du derme, les DCs CD11b<sup>-</sup> du derme, et les DCs XCR1<sup>+</sup>, aussi appelées DCs CD103<sup>+</sup> du derme. Après vaccination, ces populations rejoignent les ganglions drainants à un rythme différent, et rejoignent les DCs résidentes du ganglion (principalement DCs CD8<sup>+</sup> et DCs CD11b<sup>+</sup>) ainsi qu'aux DCs dérivées de monocytes (mo-DCs) recrutées du sang. Analyser les différentes contributions de ces cellules dans la réponse T<sub>FH</sub> induite après vaccination est problématique du fait de la diversité et de la redondance des marqueurs utilisés pour les identifier.

Dans cette étude, l'ablation du site d'injection à différents temps après vaccination nous a permis d'identifier le rôle crucial des cellules en provenance de la peau dans la génération d'une immunité T<sub>FH</sub> et humorale dans le ganglion. Lorsque l'antigène est séquestré dans le ganglion, les cellules résidentes du ganglion et les cellules inflammatoires recrutées du sang à différents temps ne permettent pas l'induction de réponses T<sub>FH</sub>. L'analyse comparative des gènes exprimés par les cellules migratoires ou résidentes dans le ganglion après vaccination a révélé une augmentation de l'expression de *Il21* et *Il6*, codants pour des molécules impliquées dans la différenciation des T<sub>FH</sub>. Enfin, l'utilisation de souris Langérine-DTR, dans lesquels l'injection de toxine diphtérique conditionne la déplétion des cellules exprimant la langérine, nous a permis d'identifier le rôle majeur joué par les LCs dans l'induction des T<sub>FH</sub> et du centre germinatif.

Dans cette étude, nous avons utilisé l'antigène modèle p24 du VIH-1 véhiculé par des nanoparticules (NPs) d'acide poly-lactique développées par notre collaborateur (Climent et al., 2014; Lamalle-Bernard et al., 2006; Rancan et al., 2014). Les antigènes particuliers (20 à 200 nm) sont facilement drainés par les vaisseaux lymphatiques et pris en charge par les DCs, induisant leur activation (Bachmann and Jennings, 2010; Joshi et al., 2013). Après injection intradermique de NPs, nous avons observé un drainage très rapide (1h) de l'antigène jusqu'au ganglion. Le pourcentage d'antigène restant sur le site d'injection n'a pas pu être évalué directement, mais celui-ci est toujours détectable dans la peau dans les premières heures après immunisation.

De façon surprenante, l'ablation du site d'injection 1h après vaccination induit une perte totale des cellules T<sub>FH</sub> dans le ganglion après 7 jours, malgré la présence de DCs résidentes et de mo-DCs. Plusieurs études ont démontré un rôle important des DCs résidentes du ganglion dans la mise en place des réponses humorales contre le virus influenza (Gonzalez et al., 2010), contre la protéine hémagglutinine du virus influenza (Tozuka et al., 2015), et dans l'induction de réponses cellulaires T spécifiques de *Leishmania* (Iezzi et al., 2006). Ces résultats ne sont pas nécessairement contradictoires avec nos observations, car les réponses anticorps peuvent être générées de façon T<sub>FH</sub>-indépendantes (MacLennan et al., 2003). A l'inverse, il reste difficile de restreindre l'antigène aux seules DCs de la peau, car l'antigène migre passivement jusqu'au ganglion. Ainsi, le rôle synergique des DCs

tissulaires et résidentes du ganglion ne peut pas être exclu. En ce sens, il a été montré que la présentation de l'antigène aux cellules T naïves se fait de façon séquentielle par les DCs résidentes et les DCs migratoires, et que prises séparément leurs contributions ne permet pas la génération d'une immunité cellulaire (Allenspach et al., 2008; Itano et al., 2003). Il est donc envisageable que les DCs résidentes du ganglion participent à la mise en place de la réponse  $T_{FH}$ , d'une façon qui reste à démontrer.

Dans notre étude, nous avons également observé un recrutement massif de cellules inflammatoires en provenance du sang dans le ganglion, et cela même après ablation du site d'injection. Ces résultats sont surprenants car le dogme actuel stipule que les cellules inflammatoires sont d'abord recrutées dans les tissus, puis migrent vers les ganglions (Shi and Pamer, 2011). Il a toutefois déjà été observé que les monocytes sont capables de rejoindre directement les ganglions via les HEV (Nakano et al., 2009; Palframan et al., 2001). Nous avons observé des proportions similaires de tous les types cellulaires étudiés (monocytes inflammatoires, macrophages, neutrophiles, et mo-DCs) dans le ganglion après vaccination, que le site d'injection soit maintenu ou enlevé. De façon notable, nous avons observé une diminution progressive dans le temps de la proportion de monocytes dans le ganglion, associée à une augmentation des mo-DCs, conformément à leur capacité à se différencier sous l'influence de stimuli inflammatoires. Dans un contexte d'injection sous cutanée de protéine adjuvantée avec un ligand du TLR9, les mo-DCs sont les principales cellules inductrices de  $T_{FH}$  (Chakarov and Fazilleau, 2014). En revanche dans notre étude, nous n'avons observé aucune différenciation des lymphocytes  $T_{FH}$  malgré la présence de mo-DCs dans le ganglion 24 h après immunisation. La voie d'injection sous-cutanée cible l'antigène dans une couche contenant peu de DCs mais qui est suffisamment irriguée pour permettre le recrutement de cellules inflammatoires. Ainsi, lorsque l'antigène est injecté dans un environnement pauvre en DCs, il est probable que les mo-DCs jouent un rôle plus important dans la présentation antigénique dans le ganglion.

Enfin, notre étude a démontré un rôle important des LCs dans l'induction de réponses  $T_{FH}$ . Cette observation rejoint celle d'une étude publiée récemment, qui a démontré que le ciblage de l'antigène directement aux LCs permet l'induction de fortes réponses T et B, et notamment de cellules  $T_{FH}$  (Yao et al., 2015). Notre étude se démarque toutefois par le fait que l'antigène administré ne cible aucune population particulière, et que les cellules T de nos souris ne possèdent pas de TCR transgéniques spécifiques de l'antigène. Ces résultats sont ainsi plus représentatifs des réponses polyclonales susceptibles d'être induites après vaccination cutanée. Le fait qu'une partie de la réponse  $T_{FH}$  soit maintenu après déplétion des LCs suggère qu'une autre population de DC migratoire de la peau est impliquée dans la réponse du centre germinatif. L'identité de cette population reste difficile à évaluer du fait des outils à notre disposition.

En conclusion, nos résultats démontrent l'efficacité de la vaccination intradermique non adjuvantée dans l'induction de réponses  $T_{FH}$  et humorales, et confirment le rôle crucial des cellules de Langerhans dans ce processus.



## **Article 2 : « IFA emulsion promotes sustained T follicular helper response for the generation of mucosal and systemic neutralizing antibodies against the HIV-gp41 3S motif »**

### **Contexte de l'étude**

Le développement d'un vaccin préventif reste la meilleure stratégie pour bloquer la propagation du Virus de l'Immunodéficience Humain de type 1 (VIH-1). Parmi l'ensemble des paramètres immunologiques corrélés à la protection contre l'infection ou à son contrôle, les anticorps neutralisants à large spectre (Nabs) possèdent l'habileté unique de pouvoir bloquer l'infection des cellules cibles du virus (Burton et al., 2012). Ainsi, le développement d'un vaccin capable d'induire la production de tels anticorps est largement espéré. Les Nabs présentent des caractéristiques communes, telles que la présence d'un grand nombre de mutations hyper-somatiques, et de longues régions déterminant la complémentarité (CDR3) (Haynes and Verkoczy, 2014). Ces anticorps sont produits par des lymphocytes B de haute affinité, générés après un processus de sélection intensif ayant lieu dans les centres germinatifs (Corti and Lanzavecchia, 2013). Les cellules T<sub>FH</sub> sont des acteurs majeurs de ce processus de sélection, en permettant l'établissement du centre germinatif, l'expansion, la différenciation, et la maturation d'affinité des lymphocytes B spécifiques de l'antigène (Vinueza et al., 2016).

Le rôle des cellules T<sub>FH</sub> dans la génération des Nabs reste à démontrer. L'intensité et la durée des contacts T-B dans le centre germinatif, ainsi que la formation de centres germinatifs secondaires après ré-immunisation augmentent l'affinité des cellules B pour l'antigène (McHeyzer-Williams et al., 2015; Shulman et al., 2014). De plus, le nombre de cellules T<sub>FH</sub> circulantes du sang est directement corrélé avec la présence de Nabs chez des personnes infectées par le VIH (Locci et al., 2013). Ces observations suggèrent que les cellules T<sub>FH</sub> jouent un rôle important dans la génération des Nabs dirigés contre le VIH.

La capacité d'un vaccin à générer des Nabs bloquants efficacement la transmission du virus relève aussi du choix de l'immunogène. L'équipe du Dr Vieillard avec laquelle nous collaborons a précédemment identifié le motif 3S de la protéine d'enveloppe gp41 du VIH-1. Lorsque ce motif très conservé reconnaît le récepteur gC1qR (récepteur du domaine globulaire du facteur du complément C1q), cela déclenche la translocation et l'expression de NKp44L à la surface des lymphocytes T (Fausther-Bovendo et al., 2010; Vieillard et al., 2005). Ces cellules NKp44L<sup>+</sup> sont ensuite reconnues par les cellules NK et lysées, contribuant au phénomène de déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> non infectés (Figure 19). L'immunisation de souris avec une forme mutée du domaine 3S (W614A, appelé

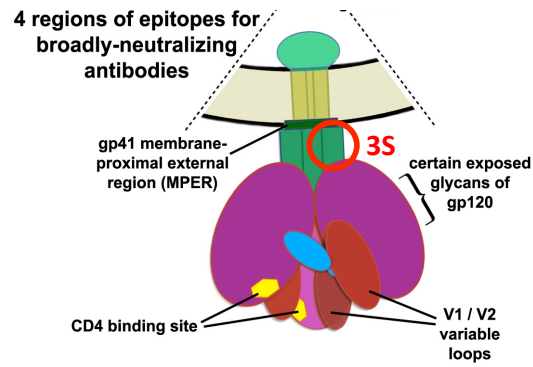
m3S), induit la production de Nabs ayant la capacité de neutraliser efficacement le virus et de bloquer l'infection de cellules cibles (Petitdemange et al., 2013).

Des expériences préliminaires ont comparé différentes formulations du peptide m3S avec des adjuvants et ont révélé que l'émulsion eau-dans-huile IFA permet l'induction de Nabs dirigés contre m3S alors que les sels d'aluminium (Alum) ne le permettent pas. Plusieurs études ont démontré l'efficacité de l'adjuvant MF59 (émulsion huile-dans-eau) à stimuler les réponses  $T_{FH}$  et humorales (Lofano et al., 2015; Mastelic Gavillet et al., 2015). En revanche, une récente étude a démontré que lorsque le candidat vaccin AIDSVAX HIV gp120 est injecté chez le macaque en combinaison avec l'Alum ou le MF59, de meilleurs taux de protection sont observés chez les animaux ayant reçu l'Alum, malgré le fait que MF59 soit plus immunogénique (Vaccari et al., 2016). Ces observations illustrent notre manque de connaissance sur les corrélats associés à l'utilisation d'adjuvants et la protection vaccinale.

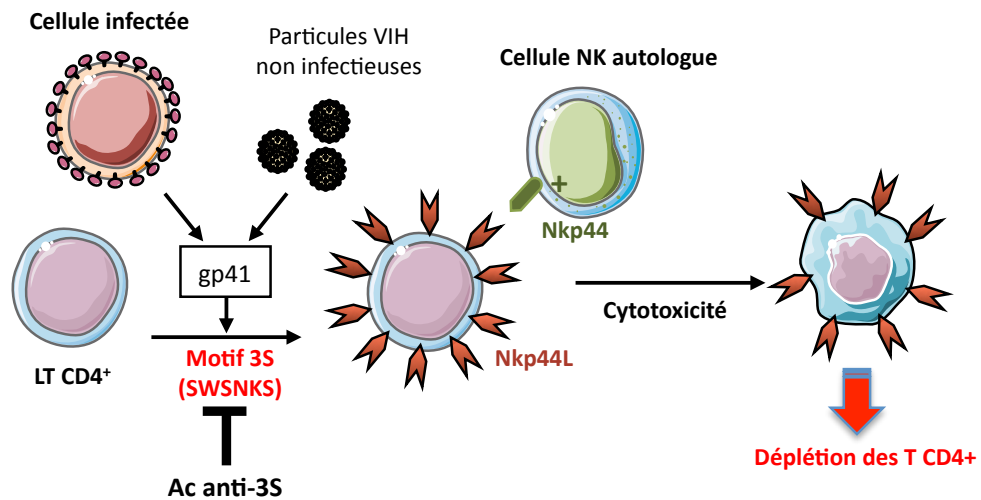
Pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux différences observées après immunisation avec IFA ou Alum, nous avons comparé la qualité et la quantité des réponses  $T_{FH}$  et B du centre germinatif, ainsi que les populations de cellules inflammatoires recrutées dans les ganglions drainants après vaccination avec le peptide m3S lié à la protéine de transport CRM<sub>197</sub> (mutant non toxique de la toxine diphtérique) associés à l'un ou l'autre de ceux deux adjuvants. Nos travaux ont révélé une forte capacité de l'adjuvantation IFA à induire la différenciation des cellules  $T_{FH}$  et B du centre germinatif par rapport à Alum ou sans adjuvant. Cette réponse est associée à un recrutement préférentiel de DCs inflammatoires quelques jours après l'injection initiale ou le booste.

Ces résultats démontrent l'intérêt de l'utilisation d'émulsions pour induire des réponses  $T_{FH}$  et humorales neutralisantes contre le VIH.

a



b



**Figure 19 : Motif 3S de la protéine gp41 du VIH-1 et mécanisme de déplétion des LT CD4+.**

(a) Positionnement schématisé du motif 3S sur la protéine d'enveloppe du VIH-1. (b) Mécanisme de déplétion des lymphocytes T CD4+ par les cellules NK sous l'action du motif 3S.

## Article

### **IFA emulsion promotes and sustains T follicular helper cells for the generation of mucosal and neutralizing antibodies against the HIV-gp41 3S motif**

Clément Levin<sup>1</sup>, Olivier Lucar<sup>1</sup>, Olivia Bonduelle<sup>1</sup>, Dominique Batéjat<sup>2</sup>, Joël Crouzet<sup>2</sup>, Patrice Debré<sup>1</sup>, Vincent Vieillard<sup>1,3</sup>, Béhazine Combadière<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, U1135, CNRS, ERL 8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), 91 Boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris, France

<sup>2</sup>InnaVirVax SA, Evry, France

<sup>3</sup>Co-last author

**\*Corresponding author:** Dr Béhazine Combadière, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses CIMI-Paris, 91 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Phone: +33140779888, Fax: +33140779734, E-mail: behazine.combadiere@upmc.fr

## **Abstract**

Preventive vaccines able to induce cross-reactive neutralizing antibodies (Nabs) are urgently needed against HIV. We previously identified the 3S motif of HIV-1 gp41, a highly conserved domain responsible for NK cell-mediated depletion of bystander CD4<sup>+</sup> T cell in HIV<sup>+</sup> individuals. Immunization of mice with a single-nucleotide mutated form of 3S (W614A, hereafter referred to as “m3S”) induces broadly Nabs against HIV-1, endowed with the ability to block viral infection and subsequent CD4<sup>+</sup> T cell depletion. In an attempt to screen for the best adjuvant combination for m3S peptide, preliminary data revealed differential induction of Nabs versus non-Nabs when using IFA or Alum as adjuvant formulations in mice and rabbits. We further demonstrate that this discrepancy is accompanied with higher induction of T follicular helper (T<sub>FH</sub>) and germinal center (GC) B cells when m3S is adjuvanted with IFA, likely due to increased recruitment of inflammatory dendritic cells to the inflamed lymph nodes in mice. Because T<sub>FH</sub> cells are crucial for expansion, selection, and affinity maturation of antigen-specific B cells, these results provide cues for better design and adjuvant formulations of anti-HIV vaccines.



## **Introduction**

Development of a preventive vaccine remains the most effective strategy to block further spread of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Cross-reactive neutralizing antibodies (Nabs) present the unique ability to block infection of target cells and their induction represents a key to successful vaccination against HIV-1 (1). Nabs characteristics include high numbers of somatic hypermutations and long variable heavy-chain complementarity-determining region 3 (HCDR3s) (2). Such antibodies are produced by high-affinity B cells after intensive T-cell driven selection that occurs in germinal centers (GCs) of draining lymph nodes (DLN) (3). This selection step is conducted by T follicular helper ( $T_{FH}$ ) cells, a particular subset of  $CD4^+$  T cell that is crucial for the establishment of germinal centres, and provides help for expansion, selection, and affinity maturation of antigen-specific B cells (4). The relationship between  $T_{FH}$  cells and Nabs is still unclear. The initial intensity and duration of cell-to-cell contacts between  $T_{FH}$  and B cells, as well as re-exposure to the antigen and formation of secondary GCs increase affinity of B cells (5, 6). The availability and persistence of the antigen strengthen the interaction between  $T_{FH}$  and GC B cells (7). Of interest, circulating human  $T_{FH}$  cell numbers strongly correlate with the presence of Nabs in HIV-infected individuals (8). Altogether, these findings suggest that  $T_{FH}$  cells differentiation and function may be closely associated with the emergence of Nabs in the context of vaccination or persistent HIV infection.

We previously identified the 3SM2 motif of HIV-1 gp41, a highly conserved domain that binds gC1qR (receptor for the globular domain of C1q complement factor) triggering translocation and surface expression of NKp44L in  $CD4^+$  T cells (9, 10). These cells are recognized and lysed by NK cells, a mechanism partially responsible for the depletion of bystander  $CD4^+$  T cell associated with HIV infection. Immunization of mice with a single-nucleotide mutated form of 3SM2 (hereafter referred to as “m3S”) induces broadly Nabs against HIV-1, endowed with the ability to block viral infection and subsequent  $CD4^+$  T cell depletion (11).

Preliminary experiments using different adjuvant formulations in combination with m3S revealed that the water-in-oil (w/o) emulsion Incomplete Freund’s adjuvant (IFA) could induce anti-m3S Nabs in mice, while aluminium salt (Alum) could not. Several reports suggest enhanced  $T_{FH}$  and GC responses

when the antigen is emulsified with the oil-in-water (o/w) adjuvant MF59 (12, 13). However, a recent study comparing Alum and MF59 formulations of AIDSVAX HIV gp120 used in the RV144 HIV-vaccine trial demonstrated that despite being more immunogenic, MF59 was not able to induce the levels of protection observed with alum after SIVmac251 challenges in macaques (14). These observations illustrate the need for a better understanding of the mechanisms by which adjuvant formulations are able to drive and shape the immune response to vaccines.

To further decipher the mechanisms behind the discrepancies observed after Alum of IFA formulation of m3S, we compared the quantity and the quality of  $T_{FH}$  and GC B cells responses, and characterized the recruitment of innate immune cells to the DLN after immunization with m3S alone or in combination with one of the foremost adjuvants. We demonstrate that IFA induces higher induction of T follicular helper ( $T_{FH}$ ) and germinal center (GC) B cells, likely due to increased recruitment of inflammatory dendritic cells to the inflamed lymph nodes in mice. Thus, our work emphasize on the use of w/o adjuvants for boosting humoral and neutralizing immune responses to HIV.

## **Material and methods**

### **Peptides**

Purified unconjugated and CRM197-conjugated m3S synthetic peptides were purchased from Covalabs (Villeurbanne, France). Sequence of the m3S peptide can be found in (11).

### **Immunization, sampling, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay**

Six to 8-week-old Balb/c mice were injected subcutaneously 14 days apart with 100µl of a solution containing 10 µg of CRM-m3S peptide conjugate in PBS 1X, or in Incomplete Freund's adjuvant or Aluminium Hydroxide 2% (alum). Sera and vaginal washes were collected before each immunization and at day 63 and titrated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described previously (15). Inguinal draining lymph nodes were collected at day 63. Alternatively, mice received one or two subcutaneous injection 14 days apart and draining lymph nodes were collected at day 7 after the last injection.

### **Flow cytometry**

Inguinal draining lymph nodes were collected and dissociated through a 70-mm nylon mesh (cell strainer, BD Falcon), and washed with PBS supplemented with 1% of foetal calf serum (FCS). For analysis of dendritic cell subsets, 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.

Cell suspensions were stained for surface markers during 20 minutes at 4°C in PBS 1X, 1% FCS except for CXCR5 staining for which cells were incubated with a biotinylated anti-CXCR5 antibody for 45 minutes at 4°C in PBS 1X, 1% FCS and then streptavidin-APC was used for detection. All antibodies were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Fluorescence was analysed on a minimum of 2x10<sup>5</sup> cells of each population per sample with a FACS Fortessa flow cytometer or a FACS X-20 and analysed using FlowJo software.

### **Neutralization Assays**

Neutralization assays were performed as previously described (11). Briefly, polyclonal immunoglobulin G fractions from mouse antisera were isolated with the Nab Protein A/G Spin kit and then desalted with Zeba spin desalting columns (both from Thermo Scientific). Immunoglobulin fractions were concentrated with Centricon Centrifugal Filter Units (Millipore) and then quantified with the BCA protein assay kit (Thermo Scientific). Purified immunoglobulins were tested at starting concentrations of 20 µg/mL, followed by five 2-fold dilutions.

Neutralization of the purified Abs was tested, as described (11) to compare potency (concentrations required to achieve 50% [IC50] inhibition) of Abs in the presence of 200 median tissue culture infective dose (TCID50) with a standard Tzm-bl reporter cells. At 48 hours after infection luciferase activity in TZM-bl lysates was measured with the Brite-glow reagent (Promega). A cutoff value of 2.5 times background was applied to determine positive values.

### **Statistical analysis**

Prism-6 software was used for data handling, analysis, and graphic representations. Data are presented as the mean value ± standard error of the mean (SEM). For statistical analyses a Mann Whitney Test was used and significance was set at p-value < 0.05. A one-way ANOVA test with Bonferroni correction was used for comparison of more than 2 groups of mice, with a 95 % significance interval.

## **Results**

### ***IFA adjuvant influences titers, localization, and neutralization of anti-m3S antibodies***

To evaluate the ability of IFA and Alum adjuvants to potentiate anti-m3S antibody responses, groups of mice were immunized subcutaneously with 10 µg of m3S-CRM conjugate alone, or in combination with IFA or Alum at day 0 and 3 times every two weeks (Figure 1A). Blood and vaginal washes were collected before each immunization and at day 63. Anti-m3S IgG in serum were detected in all three groups, but titers were at least 10 times superior in mice that receive m3S-CRM conjugate in IFA after 1 injection (Figure 1B). These differences were further increased after boosting, despite all groups reached higher titer levels. Interestingly, no further increase of anti-m3S IgG titers was observed after the second boost, showing that boosting the immune response once is sufficient to reach a plateau, and that low-responding individuals are not recovered by successive boosts. We further extended our observation to vaginal anti-m3S IgG and IgA. Priming of mice induced no detectable antibody titers at day 14 in all tested conditions (Figure 1C). After the first boost, however, high IgG and IgA titers were observed in the IFA group, which remained elevated throughout the immunization schedule, and were significantly superior to Alum or m3S alone groups. Finally, we evaluated the ability of purified serum IgG to neutralize HIV-1 strains (Figure 1D and E). IgG from m3S-CRM + IFA mice showed high levels of neutralization ( $IC_{50} = 6$  for YU-2 strain and  $IC_{50} = 0.85$  for JR-CSF strain) while IgG from m3S-CRM + alum animals failed to neutralize ( $IC_{50} > 10$  for both strains) (Figure 1D). Similar ability of rabbit serum IgG to neutralize different HIV strains after IFA injection was observed (Figure 1E). Thus, IFA formulation enhances both titers and neutralizing ability of specific IgG, and influences vaginal localization of specific IgG and IgA.

### ***IFA induces rapid and persistent expansion of $T_{FH}$ and GC B cells in the DLN.***

High affinity class-switched B cells form in germinal centers (GC) with the help of T follicular helper cells in lymph nodes. We thus questioned whether the adjuvant formulation of m3S-CRM would impact  $T_{FH}$  and GC B cell induction in draining lymph nodes.  $T_{FH}$  cell numbers were investigated at one week after priming (D7) or 7 days after prime plus boost (D21) or at the end of the kinetic (D63).

As shown in Figure 2A, m3S-CRM + IFA induced robust T<sub>FH</sub> and GC B cell induction at all time point, while Alum formulation induced no significant differences as compared to m3S-CRM alone. Paralleled to our observation that one boost is enough to reach a plateau of antibody titers, T<sub>FH</sub> and GC B cell numbers were efficiently boosted after 2 injections, but gradually declined despite two additional boosts in all three groups (Figure 2B). These results highlight the relationship between the antibody titers found in serum and induction of T<sub>FH</sub> cells in the lymph nodes, which is strengthened when the antigen is co-injected with IFA.

***IFA increases monocyte-derived dendritic cells numbers in lymph nodes***

Because IFA adjuvanticity is thought to be primarily mediated by increased inflammatory cell recruitment (16), we evaluated recruitment of inflammatory monocytes (Infl mono; CD11b<sup>+</sup>, Ly6Chi, MHCII<sup>-</sup>), monocyte-derived inflammatory DCs (Infl DCs; CD11b<sup>+</sup>, Ly6Chi, MHCII<sup>+</sup>) and neutrophils (Neutro; CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup>, LY6G<sup>+</sup>) in draining lymph nodes of mice two days after priming (D2) or two days after boosting at day 14 (D16) (Figures 3A and B). Inflammatory monocytes and neutrophils total numbers and proportions were similar in all three groups at day 2 after priming. However, a specific increase was observed for inflammatory DCs in mice that receive m3S-CRM in IFA (Figure 3A). To our surprise, boosting mice once led to further increase of Infl DCs numbers in DLN of mice from IFA group, while other subsets remained at the same levels as observed after priming. Considering the ability of Infl-DCs to present the antigen and secrete pro-T<sub>FH</sub> cytokines (17), we thus speculate that this specific after-boost increase might be responsible for enhanced T<sub>FH</sub> cell differentiation in the LN.

## **Discussion**

In this study, we sought to compare immune responses to two adjuvant formulations of the clinically relevant m3S peptid in mice. Immunization of mice with m3S-CRM in IFA or in Alum led to dramatic differences in the intensity and quality of subsequent humoral and cellular immune responses. Altogether, our results demonstrate that IFA induces higher titers of more functional antibodies compared with alum. Analysis of draining lymph node at early time point revealed increased recruitment of monocyte-derived inflammatory DC (Infl-DCs), likely responsible for generating higher T<sub>FH</sub> and GC B cell responses, when using IFA formulation.

The differences observed with IFA and Alum may reflect their different mechanisms of action regarding the activation of innate immunity. Adjuvanticity of both Alum and IFA was primarily thought to rely on the creation of a depot effect; however, several evidences suggest that it might not be the case, at least for Alum (19). The mode of action of IFA is less clear, but like other emulsions, it is widely assumed to depend on enhancement of antigen uptake by antigen-presenting cells, and induction of a favourable cytokine microenvironment (16, 18).

In this study, we observed a specific increase in total numbers of Infl-DCs in the LN of mice that received the antigen in IFA. Inf-DCs are derived from blood-borne inflammatory monocytes that differentiate in situ or in some cases in the LN (20). Induction of T<sub>FH</sub> cells by Infl-DCs has been described after adjuvantation with a TLR9 agonist in mice (17). Therefore, we speculate that the high and specific increase in T<sub>FH</sub> and GC B cell numbers observed with IFA is likely due to enhanced recruitment and/or differentiation of Inf-DCs as compared to Alum or antigen alone. More surprisingly, we also observed that boosting animal once further increase total numbers of Infl-DCs in the LN, as well as T<sub>FH</sub> and humoral responses. The concept that innate cells such as monocytes, macrophages and NKs could exhibit enhanced responses upon secondary infection or vaccination has been recently recognized as innate immune memory, or “trained memory” (21). While epigenetic modifications seem to play a key role in the induction of innate memory, it is still unclear how short-lived cells such as monocytes could exhibit features of immune memory. One hypothesis is that epigenetically modified innate cells would home and establish a reservoir in the body upon priming, or

that monocyte precursors could be trained in the bone marrow, which would impact their function after differentiation into macrophages (22, 23). Whether our observation is solely due to increased recruitment of monocytes from the blood after rechallenge or is a consequence of a broader immune mechanism remains difficult to assess and requires additional testing.

The importance of neutralizing antibodies (Nabs) in HIV has been largely recognized. However, the fundamental mechanisms by which individual B cells will be prompted to produce Nabs versus non-Nabs remains elusive. It is assumed that the number of divisions of B cells and duration of their exposure to the antigen are key factors for the induction of Nabs. In our study, we did not assess the ability of IFA to create a depot of antigen to the site of injection. Nevertheless, the ability of IFA formulation to induce production of Nabs by B cells underlies the relevance of this adjuvant and other o/w emulsions for future vaccination strategies against HIV.



## References

1. Burton, D. R., P. Poignard, R. L. Stanfield, and I. A. Wilson. 2012. Broadly Neutralizing Antibodies Present New Prospects to Counter Highly Antigenically Diverse Viruses. *Science* 337: 183–186.
2. Haynes, B. F., and L. Verkoczy. 2014. Host Controls of HIV Neutralizing Antibodies. *Science* 344: 586–588.
3. Corti, D., and A. Lanzavecchia. 2013. Broadly Neutralizing Antiviral Antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 31: 705–742.
4. Vinuesa, C. G., M. A. Linterman, D. Yu, and I. C. M. MacLennan. 2016. Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 34.
5. McHeyzer-Williams, L. J., P. J. Milpied, S. L. Okitsu, and M. G. McHeyzer-Williams. 2015. Class-switched memory B cells remodel BCRs within secondary germinal centers. *Nat. Immunol.* 16: 296–305.
6. Shulman, Z., A. D. Gitlin, S. Targ, M. Jankovic, G. Pasqual, M. C. Nussenzweig, and G. D. Victora. 2013. T Follicular Helper Cell Dynamics in Germinal Centers. *Science* 341: 673–677.
7. Baumjohann, D., S. Preite, A. Reboldi, F. Ronchi, K. M. Ansel, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2013. Persistent Antigen and Germinal Center B Cells Sustain T Follicular Helper Cell Responses and Phenotype. *Immunity* 38: 596–605.
8. Locci, M., C. Havenar-Daughton, E. Landais, J. Wu, M. A. Kroenke, C. L. Arlehamn, L. F. Su, R. Cubas, M. M. Davis, A. Sette, E. K. Haddad, P. Poignard, and S. Crotty. 2013. Human Circulating PD-1+CXCR3–CXCR5+ Memory Tfh Cells Are Highly Functional and Correlate with Broadly Neutralizing HIV Antibody Responses. *Immunity* 39: 758–769.
9. Fausther-Bovendo, H., V. Vieillard, S. Sagan, G. Bismuth, and P. Debré. 2010. HIV gp41 Engages gC1qR on CD4+ T Cells to Induce the Expression of an NK Ligand through the PIP3/H2O2 Pathway. *PLoS Pathog.* 6: e1000975.

10. Vieillard, V., J. L. Strominger, and P. Debré. 2005. NK cytotoxicity against CD4<sup>+</sup> T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 10981–10986.
11. Petitdemange, C., A. Achour, S. Dispinseri, I. Malet, A. Sennepin, R. H. T. Fang, J. Crouzet, A.-G. Marcelin, V. Calvez, G. Scarlatti, P. Debre, and V. Vieillard. 2013. A Single Amino-Acid Change in a Highly Conserved Motif of gp41 Elicits HIV-1 Neutralization and Protects Against CD4 Depletion. *Clin. Infect. Dis.* 57: 745–755.
12. Lofano, G., F. Mancini, G. Salvatore, R. Cantisani, E. Monaci, C. Carrisi, S. Tavarini, C. Sammiceli, S. Rossi Paccani, E. Soldaini, D. Laera, O. Finco, S. Nuti, R. Rappuoli, E. De Gregorio, F. Bagnoli, and S. Bertholet. 2015. Oil-in-Water Emulsion MF59 Increases Germinal Center B Cell Differentiation and Persistence in Response to Vaccination. *J. Immunol.* 195: 1617–1627.
13. Mastelic Gavillet, B., C. S. Eberhardt, F. Auderset, F. Castellino, A. Seubert, J. S. Tregoning, P.-H. Lambert, E. de Gregorio, G. Del Giudice, and C.-A. Siegrist. 2015. MF59 Mediates Its B Cell Adjuvanticity by Promoting T Follicular Helper Cells and Thus Germinal Center Responses in Adult and Early Life. *J. Immunol.* 194: 4836–4845.
14. Vaccari, M., S. N. Gordon, S. Fourati, L. Schifanella, N. P. M. Liyanage, M. Cameron, B. F. Keele, X. Shen, G. D. Tomaras, E. Billings, M. Rao, A. W. Chung, K. G. Dowell, C. Bailey-Kellogg, E. P. Brown, M. E. Ackerman, D. A. Vargas-Inchaustegui, S. Whitney, M. N. Doster, N. Binello, P. Pegu, D. C. Montefiori, K. Foulds, D. S. Quinn, M. Donaldson, F. Liang, K. Loré, M. Roederer, R. A. Koup, A. McDermott, Z.-M. Ma, C. J. Miller, T. B. Phan, D. N. Forthal, M. Blackburn, F. Caccuri, M. Bissa, G. Ferrari, V. Kalyanaraman, M. G. Ferrari, D. Thompson, M. Robert-Guroff, S. Ratto-Kim, J. H. Kim, N. L. Michael, S. Phogat, S. W. Barnett, J. Tartaglia, D. Venzon, D. M. Stablein, G. Alter, R.-P. Sekaly, and G. Franchini. 2016. Adjuvant-dependent innate and adaptive immune signatures of risk of SIVmac251 acquisition. *Nat. Med.* 22: 762–770.
15. Liard, C., S. Munier, M. Arias, A. Joulin-Giet, O. Bonduelle, D. Duffy, R. J. Shattock, B. Verrier, and B. Combadière. 2011. Targeting of HIV-p24 particle-based vaccine into

- differential skin layers induces distinct arms of the immune responses. *Vaccine* 29: 6379–6391.
16. Billiau, A., and P. Matthys. 2001. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.* 70: 849–860.
  17. Chakarov, S., and N. Fazilleau. 2014. Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation. *EMBO Mol. Med.* n/a-n/a.
  18. Guy, B. 2007. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 505–517.
  19. De Gregorio, E., E. Caproni, and J. B. Ulmer. 2013. Vaccine Adjuvants: Mode of Action. *Front. Immunol.* 4.
  20. Shi, C., and E. G. Pamer. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 762–774.
  21. Netea, M. G., E. Latz, K. H. Mills, and L. A. O'Neill. 2015. Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense. *Nat. Immunol.* 16: 675–679.
  22. Italiani, P., and D. Boraschi. 2014. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* 5.
  23. Yáñez, A., N. Hassanzadeh-Kiabi, M. Y. Ng, J. Megías, A. Subramanian, G. Y. Liu, D. M. Underhill, M. L. Gil, and H. S. Goodridge. 2013. Detection of a TLR2 agonist by hematopoietic stem and progenitor cells impacts the function of the macrophages they produce: Innate immunity. *Eur. J. Immunol.* 43: 2114–2125.
  24. Lai, R. P. J., M. S. Seaman, P. Tonks, F. Wegmann, D. J. Seilly, S. D. W. Frost, C. C. LaBranche, D. C. Montefiori, A. K. Dey, I. K. Srivastava, Q. Sattentau, S. W. Barnett, and J. L. Heeney. 2012. Mixed Adjuvant Formulations Reveal a New Combination That Elicit Antibody Response Comparable to Freund's Adjuvants. *PLoS ONE* 7: e35083.
  25. Calabro, S., E. Tritto, A. Pezzotti, M. Taccone, A. Muzzi, S. Bertholet, E. De Gregorio, D. T. O'Hagan, B. Baudner, and A. Seubert. 2013. The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect. *Vaccine* 31: 3363–3369.

## **Figure Legends**

### **Figure 1: IFA adjuvant influences titers, localization, and neutralization of anti-m3S antibodies.**

(A) Schedule of immunization and sampling. Balb/c mice were vaccinated subcutaneously four times with 10 $\mu$ g of m3S-CRM197 conjugate or CRM197 alone, either alone or adjuvanted with IFA or Alum. Blood and vaginal washes were collected at indicated times for evaluation of antigen-specific antibody responses. (B) Anti-m3S IgG titers measured by ELISA. (C) Anti-m3S IgA (upper panel) or IgG (lower panel) in vaginal washes measured by ELISA. (D) YU-2 (upper panel) and JR-CSF (lower panel) strains neutralization by purified pools of IgG from m3S-CRM + IFA (orange) or m3S-CRM + Alum (blue) vaccinated mice (n=3 mice per group). (E) Serum neutralization (IC<sub>50</sub>) of purified IgG from rabbit immunized with m3S-CRM + IFA at indicated time points (vertical dotted bars) for the three strains YU-2, JR-CSF and NL4.3. Individual dots represent mean from 2 rabbits. Unpaired Student t test was used for statistical analyses: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001

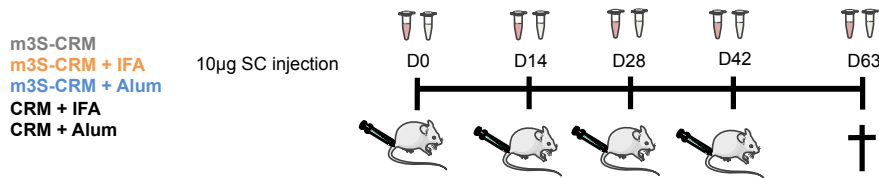
### **Figure 2. IFA induces rapid and persistent expansion of T<sub>FH</sub> and GC B cells in the DLN.**

(A) Absolute numbers of T<sub>FH</sub> and germinal center B cells in the DLN of mice 1 week after a single injection (upper panel), or 1 week after 2 injections (D0+D14) (middle panel), or after 4 injections (D0+D14+D28+D42) (lower panel) of W614A-3S-CRM197 (m3S) alone (grey bars), or adjuvanted with IFA (orange bars) or Alum (blue bars). (B) Kinetic of T<sub>FH</sub> and GC B cells responses after priming (D0) with m3S alone or adjuvanted with IFA or Alum. Dotted vertical lines represent successive boosts (D14, D28, D42).

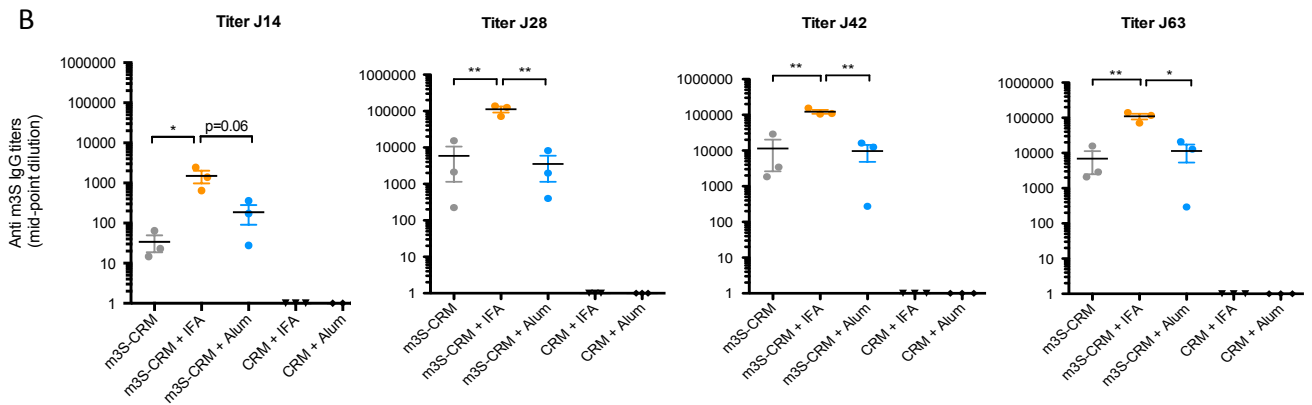
### **Figure 3. IFA increases monocyte-derived dendritic cells differentiation in lymph nodes.**

(A-B) Absolute number and percentage of inflammatory monocytes (infl mono), inflammatory DCs (infl DCs) and neutrophils (neutro) in the DLN of mice 2 days after a single injection (A) or 2 days after boost (B) with m3S-CRM alone or in combination with IFA or Alum.

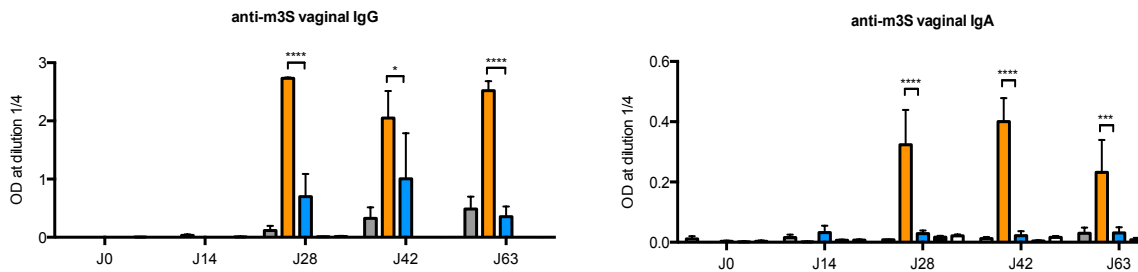
A



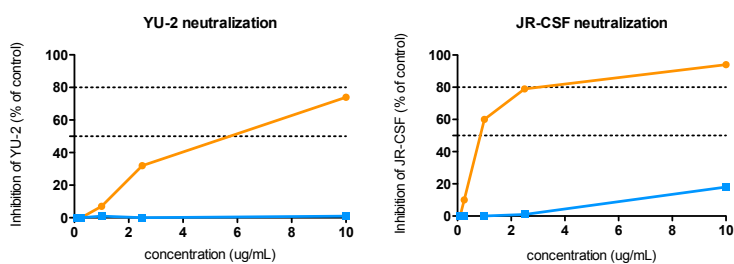
B



C



D



E

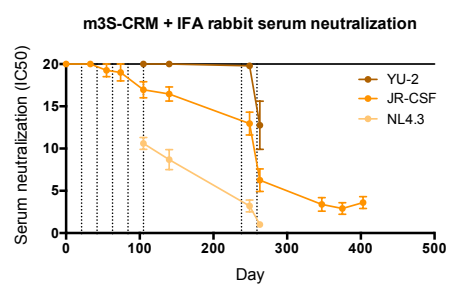
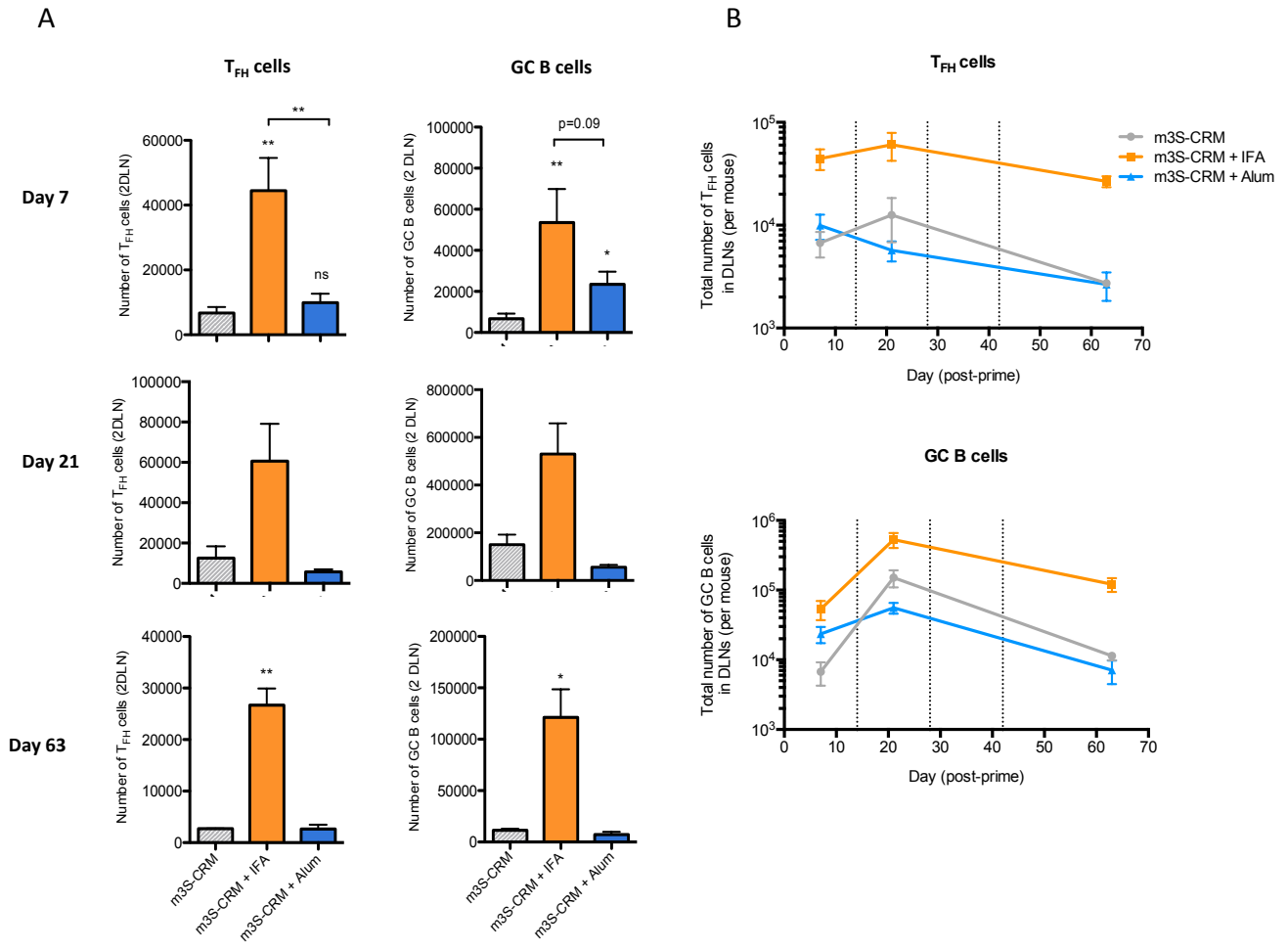
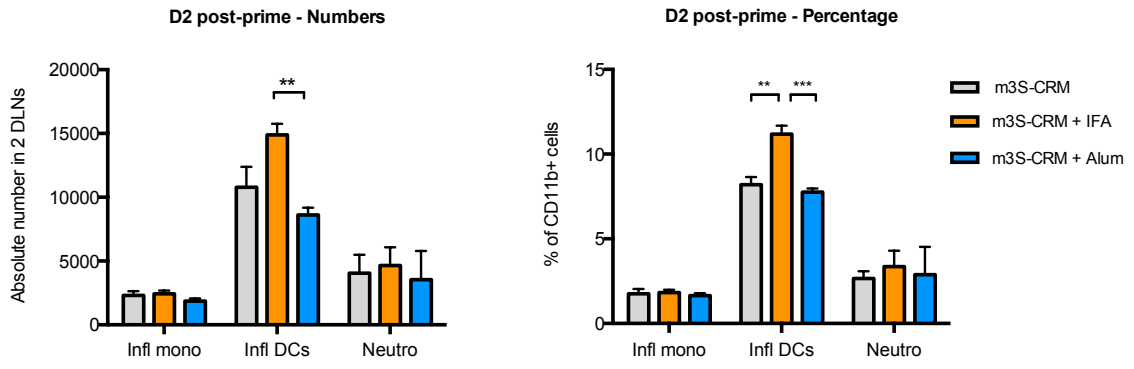


Figure 1



**Figure 2**

A



B

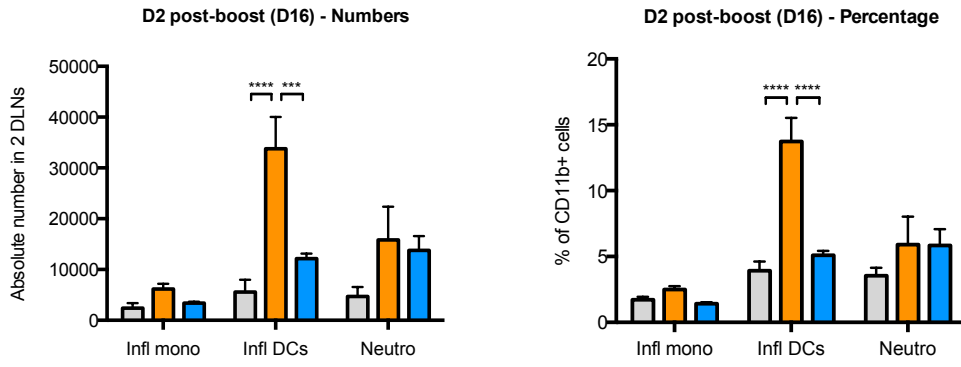


Figure 3

## Résumé des résultats et discussion

Dans cette seconde étude, nous avons comparé les réponses  $T_{FH}$  et humorales induites après injection de deux formulations adjuvantées du peptide m3S. Dans cette étude, la voie sous-cutanée a été utilisée, notamment du fait de la grande viscosité de l'IFA qui ne permet pas l'injection intradermique chez l'animal. L'utilisation de cette voie « conventionnelle » nous a néanmoins permis d'évaluer la capacité des adjuvants en induire de fortes réponses  $T_{FH}$  lorsque l'antigène est injecté dans un tissu pauvre en CPAs.

L'immunisation sous-cutanée des souris avec le peptide m3S associé à la protéine de transport CRM<sub>197</sub> n'induit que peu de réponses  $T_{FH}$  et anticorps dans le sang et la muqueuse vaginale. L'ajout de l'adjuvant Alum à la formulation vaccinal n'a que peu d'effets sur la réponse immunitaire. En revanche, l'adjuvant IFA augmente considérablement les titres d'anticorps spécifiques dans le sérum, induit la présence d'IgG et d'IgA anti-m3S dans la muqueuse vaginale, et influence la capacité neutralisante des IgG du sang. La fonction des lymphocytes B est intimement liée à celle des cellules  $T_{FH}$ . De façon notable, l'ajout de l'IFA à la formulation vaccinale induit une forte polarisation des cellules  $T_{FH}$  et des B du centre germinatif dans le ganglion des souris après une seule injection, après un booste, ou à la fin d'une cinétique de quatre injections. En revanche, l'absence d'adjuvant ou l'ajout d'Alum n'induit pratiquement aucune différenciation des cellules  $T_{FH}$ . Par la suite, nous avons cherché à savoir si l'induction différentielle des cellules  $T_{FH}$  pouvait être liée à une population particulière de DC. Alors que les différentes populations de DC de la peau sont recrutées à des niveaux équivalents quelque soit l'adjuvant (données non montrées), l'analyse des populations de cellules inflammatoires du ganglion a révélé une augmentation du nombre de DCs inflammatoires (dérivées de monocytes) en présence d'IFA. Le nombre de ces cellules augmente d'avantage après la seconde injection de façon très significative, alors que les neutrophiles et les monocytes inflammatoires sont présents dans des proportions similaires à celles observées après une seule injection.

Des expériences complémentaires seront effectuées afin de déterminer si les profils transcriptionnels et la fonction des DCs inflammatoires recrutées après adjuvantation IFA ou Alum sont différents.

La capacité différentielle de l'Alum et de l'IFA à activer l'immunité innée peut être la conséquence de mécanismes d'action différents. Il a été initialement supposé que leur adjuvanticité dépend principalement de la création d'un effet dépôt sur le site d'injection. Cependant, de récentes études ont démontré le contraire, et suggèrent plutôt que l'Alum et l'IFA agissent sur la capacité des DCs à capturer l'antigène, à être recrutées sur le site d'injection, et à activer des voies de réponse au danger de type inflammasome (De Gregorio et al., 2013; Reed et al., 2013). A ce jour, les mécanismes



d'action de ces adjuvants restent flous, et ne permettent pas d'expliquer les différences observées dans cette étude.

De façon intéressante, nous avons observé un fort recrutement de DCs dérivées de monocytes (mo-DCs) dans le ganglion après injection de m3S-CRM adjuvanté en IFA. Cette population de DC est issue de monocytes inflammatoires du sang qui se différencient et se spécialisent sur le site de l'inflammation et/ou dans le ganglion. Après adjuvantation en IFA plus LPS, ces cellules stimulent la différenciation des  $T_{FH}$  *in vivo* chez la souris (Chakarov and Fazilleau, 2014). En prenant en compte ces résultats et nos observations, nous suggérons que la capacité de l'IFA à induire la différenciation de cellules  $T_{FH}$  et des lymphocytes B du centre germinatif dépend du recrutement et/ou de la différenciation des mo-DCs. Des expériences complémentaires chercheront à identifier les molécules impliquées dans ce processus.

Chez l'homme, les protocoles de vaccination sont généralement constitués de plusieurs injections successives (« boost ») qui suivent l'injection initiale (« prime »), avec pour objectif de restimuler le système immunitaire mémoire et d'accroître le maintien de la protection humorale. Dans notre étude, l'injection secondaire du composé vaccinal augmente de façon significative l'étendue de la réponse immunitaire humorale et  $T_{FH}$  quelque soit la formulation utilisée, et permet l'induction d'une réponse humorale localisée dans la muqueuse vaginale (avec IFA seulement). Les troisièmes et quatrièmes injections ne permettent pas d'augmenter cet effet « boost », mais sont requises pour la génération de Nabs. Cette observation confirme l'hypothèse que les Nabs sont générés après un long processus de sélection et de mutation des lymphocytes B dans le centre germinatif, et justifient l'utilisation de protocoles vaccinaux composés de multiples injections.

Dans notre étude, nous avons observé un recrutement ou une différenciation accrue de mo-DCs dans le ganglion après la seconde injection du composé adjuvanté en IFA. Le dogme de la mémoire immunitaire stipule que seul le bras adaptatif de la réponse est capable de répondre de façon supérieure à une infection ou immunisation secondaire. Cependant, le terme de « mémoire innée » a récemment été proposé à la suite de plusieurs observations suggérant que certaines cellules de l'immunité innée, telles que les monocytes, les macrophages, et les cellules NK sont capables de réponses secondaires (Netea et al., 2015, 2016). Ce phénomène est associé à une reprogrammation épigénétique des cellules impliquées. Cependant, le mécanisme par lequel des cellules à courte durée de vie comme les monocytes sont capables de mémoire reste inconnu. Les hypothèses envisagées incluent la rétention des cellules « modifiées » dans des niches après primo-immunisation, ou la modification des cellules précurseurs directement dans la moelle (Italiani and Boraschi, 2014; Yáñez et al., 2013). Le rôle de la mémoire innée dans nos observations reste purement spéculatif et mérite d'être évalué dans des expériences complémentaires.

Notre observation d'un effet différentiel de l'adjuvant sur la présence de Nabs dans le sérum est un point crucial de notre étude. Les mécanismes associés à la production de Nabs sont encore peu connus. Dans nos conditions, l'éventualité d'une modification conformationnelle de l'antigène selon l'adjuvant

n'est pas exclue. Cependant, une étude réalisée dans des conditions similaires a démontré que l'émulsion en IFA ou en MF59 de la protéine gp140 du VIH n'induit pas de modification conformationnelle après immunisation chez le lapin (Lai et al., 2012). Les Nabs sont générés après un long processus de sélection orchestré par les cellules T<sub>FH</sub> dans le centre germinatif des ganglions. Bien que la relation entre le nombre de cellule T<sub>FH</sub> et la présence d'anticorps neutralisant après vaccination reste supposée, nos résultats suggèrent que l'induction de cellules T<sub>FH</sub> par l'utilisation des adjuvants de type émulsion favoriserait la présence de Nabs.

Le peptide m3S présente un fort intérêt vaccinal et a déjà démontré son efficacité à induire des réponses neutralisantes chez la souris, le lapin, et le singe. La compréhension des mécanismes d'amélioration des réponses T<sub>FH</sub> et humorales est centrale dans le développement de stratégies vaccinales efficaces contre le VIH.



**Revue Bibliographique : « Tailored immunity by skin antigen-presenting cells »**



# Tailored immunity by skin antigen-presenting cells

Clement Levin, Helene Perrin, and Behazine Combadiere\*

Sorbonne Universités; UPMC University Paris 06; UMR S CR7; Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses; Paris, France; INSERM U1135; Paris, France

**Keywords:** skin, dendritic cell subsets, Langerhans cell, vaccination, cutaneous route of immunization, immune response

**Abbreviations:** APC, antigen-presenting cell; DC, dendritic cell; DDC, dermal dendritic cell; DLN, draining lymph node; IL, interleukin; IM, intramuscular; InfDC, inflammatory DC; LC, Langerhans cell; moDC, monocyte-derived DC; SC, subcutaneous; TC, transcutaneous

Skin vaccination aims at targeting epidermal and dermal antigen-presenting cells (APCs), indeed many subsets of different origin endowed with various functions populate the skin. The idea that the skin could represent a particularly potent site to induce adaptive and protective immune response emerged after the success of vaccinia virus vaccination by skin scarification. Recent advances have shown that multiple subsets of APCs coexist in the skin and participate in immunity to infectious diseases. Induction of an adaptive immune response depends on the initial recognition and capture of antigens by skin APCs and their transport to lymphoid organs. Innovative strategies of vaccination have thus been developed to target skin APCs for tailored immunity, hence this review will discuss recent insights into skin APC subsets characterization and how they can shape adaptive immune responses.

## Introduction

Each year, vaccination programs across the world prevent between 2 and 3 million needless deaths, protecting children against deadly diseases such as measles, polio, diphtheria, tetanus and pertussis with the ultimate aim to induce immune memory for life-time protection and in all individuals.<sup>1</sup> Vaccine leaders from around the world discuss critical issues surrounding the development of effective—and affordable/acceptable—vaccines. Intramuscular (IM) or subcutaneous (SC) routes, widely used for vaccination, have proven to be successful in inducing systemic humoral immunity toward several pathogens but generally failed to induce efficient and long-term cellular protection. Vaccine development faces difficulties to manipulate the appropriate arms of the immune system in predictable ways for vaccine efficacy. The nature and intensity of the acquired immune protection are variable depending of targeted pathogens and host responses. After a period of abandon that have followed the successful era of vaccinia virus vaccination and eradication of smallpox, the skin routes of vaccination have regained interest during the past two decades.

\*Correspondance to: Behazine Combadiere;  
Email: behazine.combadiere@upmc.fr  
Submitted: 07/05/2014; Accepted: 07/20/2014; Published Online: 08/05/2014  
<http://dx.doi.org/10.4161/hv.34299>

Our increased understanding of the high immune potential of skin resident and inflammatory cells, as well as the urgent need to improve the immunogenicity of vaccines against infectious diseases (HIV, HCV, influenza...) and cancers motivates the development of innovative strategies targeting the cutaneous tissue. Numerous concepts for vaccine delivery to the skin layers have been developed in the past decade. However, some key mechanisms of vaccination remain to be elucidated in more details: (1) the nature and function of antigen-presenting cells (APCs) that can favor the initiation of immune response; (2) the molecular and cellular networks involved in skin immunization. These parameters are important to ensure optimal initiation of both innate and adaptive immunity. The challenge today is to understand how to manipulate skin APCs to increase vaccine efficacy. We propose here an overview of our recent knowledge on skin APC and inflammatory cells and their potential to modulate adaptive immunity for optimal development of vaccination strategies.

## Characterization and Functions of Epidermal Antigen-Presenting Cells

### Langerhans cells

The epidermis of mice and human is composed of stratified layers of squamous and keratinized cells—keratinocytes—that protect the integrity of the skin.<sup>2,3</sup> As the epidermis is not vascularized, nutrient supply is dependent on the dermis. The solely professional APCs that populates the epidermis, namely Langerhans cells (LCs), represent 1–5% of all epidermal cells. LCs are located mainly at the suprabasal layer of the epidermis and form a network around keratinocytes.<sup>4</sup> They can be identified by the constitutive expression of Langerin (CD207), and the presence of unique intracytoplasmic organelles known as Birbeck granules, which have a role in antigen uptake.<sup>5</sup> CD207 is a type II C-type lectin receptor homogeneously expressed at the surface of human and murine LCs that, when triggered by its ligands, is internalized in Birbeck granules, a hallmark of maturation.<sup>6,7</sup> CD207 expression is not exclusive to LCs as other dermal DC populations have been found to express it, as described below. Human and mouse LCs also express E-cadherin, a molecule that mediate adhesion to keratinocytes,<sup>8</sup> epithelial cell adhesion

molecule (EpCAM), CD205 (DC-SIGN), and class-II major histocompatibility complex (MHCII) molecules (Table 1). In addition, human, but not mouse, LCs also express high levels of the CD1a molecule which is able to present non-peptidic antigens to T cells.<sup>9</sup>

LCs key features include radioresistance, longevity and immunosurveillance of the skin.<sup>10</sup> In sharp contrast with other DC subsets, LC repopulation did not depend on transplanted bone-marrow cells after lethal irradiation of mice but rather on skin local precursors.<sup>11</sup> Similarly, LCs from parabiotic mice, which share a common blood circulation, failed to mix, thus supporting the idea that they maintain themselves independently of circulating precursors during steady-state.<sup>11</sup> Conversely, it was shown that in inflammatory conditions, another type of LCs, named short-term LCs, arise from Gr-1<sup>hi</sup> monocytes soon after UV light-induced depletion.<sup>12,13</sup> This subset is progressively replaced by long-term LCs that arise from bone marrow precursors in steady-state. A study by Nagao et al. further described this mechanism and revealed that hair follicles act as entry portals for monocyte-derived LCs in a C-motif chemokine receptor (CCR) 2 and CCR6-dependent manner.<sup>14</sup>

Consistent with their role in skin immunosurveillance, LCs appear to be very motile even at steady-state. Indeed Kissenpennig et al. demonstrated that 2 to 3% of LCs circulate naturally from the skin to the draining lymph nodes (DLNs), passing through the dermis where they can be identified as “en route” LCs.<sup>15</sup> This process involves constitutive expression of chemottractants such as C-motif chemokine ligand (CCL) 20 by lymphatic vessel endothelial cells, hence providing constant source of antigen from the cutaneous environment for the induction of tolerance. Accordingly, migratory LCs have also been found in healthy human skin DLNs.<sup>16</sup>

The differential expression of PRRs between APC subsets probably account for the diversity of the immune responses they can induce.<sup>17</sup> Following TLR engagement, reception of appropriated signals, and capture of antigen, matured, and differentiated APCs migrate to the DLNs where they will promote clonal expansion of antigen-specific naïve T cells (Fig. 1). To do so, they

exhibit unique physical properties that allow them to migrate through confined space such as lymphatics.<sup>18</sup> Upon inflammation, resident LCs drastically change in morphology and motility and increase their expression of CCR7, which ligands CCL19 and CCL21 are constitutively expressed by endothelial cells of the lymphatic vessels.<sup>19</sup> This phenomenon, largely mediated by cytokines of the IL-1 family and TNF- $\alpha$  produced by keratinocytes, has to overcome the autocrine effect of tumor growth factor (TGF)- $\beta$ , which by upregulating E-cadherin and down-regulating CCR7 promotes LC retention in the skin.<sup>20</sup>

The extensive use of Langerin-Diphtheria Toxin Receptor (Lang-DTR) transgenic mice, which can be conditionally depleted of Langerin<sup>+</sup> cells, has unravelled multiple functions of LCs in vivo.<sup>15</sup> Consistent with their role of “gatekeeper” of the skin, LCs appear to have dual functions. First, and because the skin is continuously challenged with non-pathogenic microorganisms such as commensals and auto-antigens, LCs have unique immunosuppressive and tolerogenic properties.<sup>21</sup> D Kaplan’s group demonstrated that targeted depletion of LCs increased antigen-specific T cell counts in a mice model of contact hypersensitivity, showing that LCs act as regulator of immune responses.<sup>22,23</sup> Accordingly, LCs have been shown to promote and activate antigen-specific T regulatory cells (Treg) in the course of Leishmania infection,<sup>24</sup> allergy contact dermatitis,<sup>25</sup> and after targeting with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG).<sup>26</sup> In humans, Seneschal et al. demonstrated that in absence of exogenous antigen, LCs, but not dermal DCs, constitutively promoted local proliferation and activation of skin resident memory CD4<sup>+</sup> Treg.<sup>27</sup> However, after infection with *C. albicans*, the study also demonstrated that LCs were capable to induce effector memory non-regulatory T cells in situ.

The spatial localization of LCs within the skin makes them the first APCs to encounter environmental antigens, and as so, they must be able to induce potent and broad responses to foreign antigens. Indeed several studies suggest that LCs can efficiently prime naïve T cells and induce their helper or cytotoxic functions. Igyarto et al. elegantly demonstrated that LCs are necessary and sufficient to induce immunity to yeast (*C. albicans*) and

**Table 1.** Mouse and human APC subsets and their associated markers in healthy skin

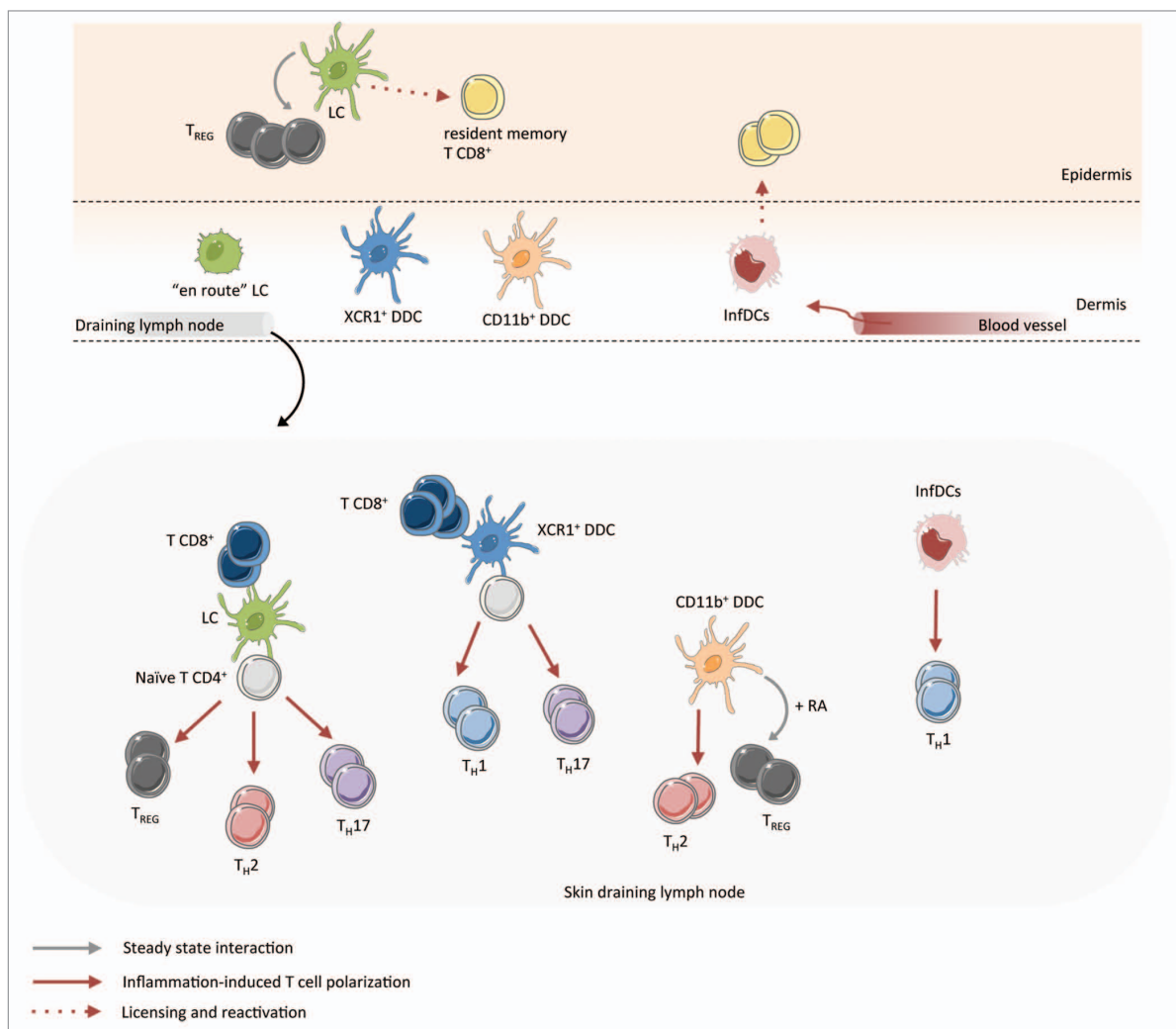
| Mouse subsets            | Phenotype  | Human subsets          | Phenotype   |
|--------------------------|--|------------------------|---|
| Langerhans cell          | CD11b <sup>int</sup> , CD207 <sup>+</sup> , CD205 <sup>+</sup> , CD103 <sup>-</sup> , CD172a <sup>+</sup>                        | Langerhans cell        | CD1a <sup>hi</sup> , CD1c <sup>+</sup> , EpCAM <sup>+</sup>   |
| XCR1 <sup>+</sup> DDC    | CD11b <sup>low</sup> , XCR1 <sup>+</sup> , CD207 <sup>+</sup> , CD103 <sup>+/+</sup> , CLEC9A <sup>+</sup> , CD172a <sup>+</sup> | CD141 <sup>+</sup> DDC | CD1a <sup>+/+</sup> , CD14 <sup>+/+</sup> , CD1c <sup>low/int</sup>                                   |
| CD11b <sup>+</sup> DDC   | CD11b <sup>+</sup> , XCR1 <sup>-</sup> , CD172a <sup>+</sup>   | CD1a <sup>+</sup> DDC  | CD1a <sup>int</sup> , CD1b <sup>+</sup> , CD1c <sup>+</sup> , CD14 <sup>+</sup> , CD208 <sup>+</sup>  |
| CD11b <sup>low</sup> DDC | CD11b <sup>low</sup> , XCR1 <sup>-</sup> , CD172a <sup>+</sup>   | -                      | -   |
| Monocyte-derived DC      | CD11b <sup>+</sup> , Ly6C <sup>+</sup> , CD64 <sup>low/+</sup> , MERTK <sup>/low</sup>   | CD14 <sup>+</sup> DDC  | CD1a <sup>+</sup> , CD14 <sup>+</sup> , CD1c <sup>+</sup> , CD163 <sup>+</sup> , DC-SIGN <sup>+</sup> |
| Dermal Macrophage        | CD64 <sup>+</sup> , MERTK <sup>+</sup>   | Dermal Macrophage      | CD14 <sup>+</sup> , CD1a <sup>-</sup> , CD1c <sup>-</sup> , FXIIIa <sup>+</sup>                       |
| Plasmacytoid DDC         | CD11b <sup>-</sup> , B220 <sup>+</sup> , PDCA1 <sup>+</sup>  | Plasmacytoid DDC       | CD123 <sup>+</sup> , CD303 <sup>+</sup> , CD304 <sup>+</sup>  |

Four conventional DC subsets have been described in mice, which can be identified by their level of expression of a group of markers. In addition, murine skin contains myeloid monocyte-derived DCs and dermal macrophages. Plasmacytoid DCs are almost absent in healthy skin. Human counterpart DCs are identified based on the expression of CD1a, CD1c, CD14, and CD141. High expression of the cellular marker is denoted by <sup>+</sup>, while intermediate, low, and lack of expression are denoted by <sup>int</sup>, <sup>low</sup>, respectively. DDC, dermal dendritic cell.

extracellular bacteria (*S. aureus*) by promoting induction of Th17 cells.<sup>28</sup> Evidences also suggest that LCs can mediate Th2-like cellular responses after epicutaneous sensitization with protein antigens.<sup>29</sup> Similarly, freshly isolated human LCs are endowed with the capacity to stimulate allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells toward a Th2 profile in vitro.<sup>16</sup>

The ability of LCs to cross-prime foreign antigens and initiate cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells responses has long been controversial. Early studies either suggested that LCs were efficient in cross-presentation<sup>30,31</sup> or that they were not involved.<sup>32</sup> However, these studies did not take into account the existence of the CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> dermal subset, as is was not identified at the time. Later on, Henri et al. showed that CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> were the solely skin DC subset able to cross-present self-antigens using a mouse model in which keratinocytes constitutively expressed

membrane-bound ovalbumin.<sup>33</sup> However, another study demonstrated that LCs are involved in the acquisition of effector functions by CD8<sup>+</sup> T cells that infiltrate the skin during TLR-induced inflammation.<sup>34</sup> Thus, rather than being responsible for cross-presentation of self-antigens during steady-state, LCs could be able to interact closely with CD8<sup>+</sup> T cells during an inflammatory response. Accordingly, Liard et al. showed that after intradermal immunization of mice with a particulate antigen, LCs were the main subset responsible for the generation of IFN- $\gamma$ -secreting CD8<sup>+</sup> T cells in DLNs.<sup>35</sup> Interestingly, after intradermal delivery of plasmid DNA, a second wave of LCs from epidermal precursors—reminiscent of long-term LCs described in<sup>13</sup>—was present in DLNs two weeks after immunization and was essential for CD8<sup>+</sup> T cell priming.<sup>36</sup> Conversely, primary LCs residing in the epidermis at the time of vaccination could not prime CD8<sup>+</sup> T



**Figure 1.** Mouse skin APCs shape adaptive immune responses. APC populations of the epidermis and dermis have high propensity for modulation of adaptive immune responses. This figure summarizes published works describing interaction between skin APC and T cell in skin and draining lymph node at steady-state or during inflammatory responses. InfDC, inflammatory dendritic cell; LC, Langerhans cell; T<sub>H</sub>, T helper; T<sub>REG</sub>, regulatory T cell.



cells. Of note, bone marrow-derived CD207<sup>+</sup> dermal DCs also contributed to CD8<sup>+</sup> T cell priming.<sup>36</sup> These findings fits nicely with the view that steady-state, non-inflammatory LCs that are used to encounter skin antigens are tolerogenic and thus enable to efficiently prime naïve CD8<sup>+</sup> T cells, whereas LCs that are newly generated upon inflammation and entry of foreign antigen could prime naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. However, a recent study on skin scarification with Vaccinia Virus showed that LCs are not involved in CD8-mediated immune responses.<sup>37</sup>

The contribution of LCs to humoral immunity has not been much studied. For instance, LCs were shown to induce protective IgG1 in serum after patch immunization with *S. aureus*-derived toxin, which revealed LCs ability to project their dendrites through tight junctions and sample antigens that have not yet breached the epidermal barrier.<sup>38</sup>

In humans, most studies have focused on the ability of LCs to activate and induce differentiation of naïve T cells in vitro. Human LCs preferentially induce Th2,<sup>39,40</sup> Th17,<sup>41</sup> Th22<sup>42</sup> and are able to cross-present antigens to CD8<sup>+</sup> T cells.<sup>40,43</sup>

Overall, these findings suggest a high plasticity of LCs according to the context. That is, the combination of signals they receive from the environment during steady-state or when encountering the antigen, as well as the nature of the antigen itself and its location, would shape their functions toward immunogenicity or tolerance.

#### Keratinocytes

Keratinocytes account for 80% of epidermal cells and although acting as structural cells, they exert key innate immune functions. Keratinocytes express various pattern recognition receptors (PRRs) such as Nod-like receptors (NLRs) 1 and 2, Toll-like receptors (TLRs) 3, 4, 5, and 9, and C-type lectins that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which in turn trigger activation of pro-inflammatory pathways. Recognition of PAMPs by keratinocytes lead to production of various pro-inflammatory signals such as CXC chemokine ligand (CXCL) 8, 9, 10, 11, CCL2, CCL20, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL) 1, 6, 10, 18, and 33.<sup>44-46</sup> Sugita et al. demonstrated that in mice, those innate signals were able to improve Langerhans cell (LCs) presenting functions.<sup>47</sup> Furthermore, the expression of MHC class II molecules on their surface make them non-professional APCs able to present antigen to CD4<sup>+</sup> T cells and stimulate their proliferation in certain conditions such as skin disorders.<sup>48,49</sup>

### Characterization and Functions of Dermal Antigen-Presenting Cells

The dermis, which is mainly composed of fibroblasts, represents the skin connective tissue layer. As blood and lymphatic vessels are present throughout the dermis, it hosts multiple immune cell populations that vary dramatically from steady-state to inflammatory conditions. In mice, four conventional dermal DC subsets can be distinguished based on surface expression markers (Table 1). Analysis of mice transgenic for CD207 (Langerin-EGFP) revealed that in addition to “en route” LC that

transit through the dermis, at least two other dermal DC subsets express CD207 and differ from LCs in origin and function.<sup>15,50-52</sup> These subsets express low amounts of CD11b and can be further characterized by expression of the marker CD103 (Table 1). They develop from a blood-borne pre-DC progenitor and acquire their phenotype and functions through the action of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF).<sup>10,53</sup> It has been recently proposed that these populations should be referred to as a so-called XCR1<sup>+</sup> DC subset, based on the unique expression of this marker.<sup>54</sup>

Other DC subsets include CD11b<sup>+</sup> DCs, lacking CD207, CD103, and XCR1 expression and representing the majority of dermal DCs,<sup>33,55</sup> as well as a minor population of CD11b<sup>low</sup> DCs.<sup>56</sup> The CD11b<sup>+</sup> population was long considered as a heterogeneous population that overlapped with other subpopulations that had not been - or poorly - characterized, including conventional dermal DCs (cDCs), dermal macrophages, monocytes, and monocyte-derived DCs (moDCs).<sup>33,57,58</sup> The recent benchmarking study by Tamoutounour et al. further subdivided steady-state CD11b<sup>+</sup> dermal cells into distinct subsets of cDCs, moDCs, macrophages, and monocytes, using c-mer proto-oncogene tyrosine kinase (MerTK), CD64, and CCR2 markers and gene expression comparison.<sup>59</sup> In this study, blood Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes were found to constitute a pool that continuously generated skin resident monocytes as well as moDCs at steady-state, while cDCs developed on a Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L)-dependent and CCR2-independent manner.<sup>59</sup> The origin of dermal macrophages appears less clear. While some resident dermal macrophages derive from monocytes, another pool seems to seed the dermis before birth from yolk-sac progenitors.<sup>60</sup> Whether these differential origins can be linked to differential functions has not yet been elucidated. At steady-state, resident macrophage function is primarily to survey the skin and react quickly after detection of foreign antigen. Upon inflammation, blood monocytes can further differentiate into specialized macrophage subset such as pro-inflammatory “M1”, regulatory “M2” or wound-healing macrophages.<sup>61</sup> Healthy human dermal DC subsets include “en route” LCs, CD14<sup>+</sup> DCs, CD1a<sup>+</sup> DCs, and CD141<sup>+</sup> DCs, which resemble murine LCs, mo-DCs, CD11b<sup>+</sup> DCs, and XCR1<sup>+</sup> DCs respectively.<sup>62</sup> Their associated markers can be found in Table 1. The overall complexity to segregate dermal APCs by surface markers in line with the development of systems biology approaches fostered the identification of transcriptional signatures of cell subsets.<sup>63-65</sup> The use of transcription factor-deficient mice unravelled developmental relationships and functions of certain subsets.<sup>66</sup> However, the phenotyping of cells based on intracellular markers requires permeabilization, which unable cell sorting by flow cytometry for further uses.

Plasmacytoid DCs (pDCs) are absent from non-inflamed skin and essentially act as contributors of skin wound healing and TLR7-mediated skin inflammation.<sup>67</sup> As members of the innate immune system, their functions will not be further discussed here.

During pathogen- or vaccine-driven inflammation, immune populations of the dermis vary dramatically, with rapid infiltration of inflammatory cells from blood capillaries under the

influence of pro-inflammatory cytokines and chemokines, while skin resident APCs sample foreign antigens and migrate to cutaneous DLNs where they prime naïve T cells (Fig. 1).<sup>68</sup>

Inflammatory DCs (InfDCs) are a hallmark of inflammation induced cell recruitment. InfDCs arise from blood Ly-6C<sup>hi</sup> CCR2<sup>+</sup> monocytes and are thought to differentiate under influence of Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF).<sup>69</sup> It is however not fully understood what are the cellular source for M-CSF neither if other factors contribute to InfDCs differentiation. One feature that differentiates InfDCs from steady-state moDCs is the fact that they can upregulated CCR7 and thus migrate to DLN and present antigens, thought in relatively smaller number than CD11b<sup>+</sup> cDCs.<sup>59</sup> InfDCs have been sometimes referred to as Tip-DCs (for TNF- $\alpha$ /inducible NO synthase (iNOS)-producing-DCs), however monocytes and activated macrophages can also express iNOS and TNF- $\alpha$ . In addition, Tip-DCs were actually found not to express the DC-specific *zbtb46* transcription factor in *Listeria*-infected mice while InfDCs expressed it.<sup>70,71</sup> During inflammation, the massive recruitment of monocytes also helps to repopulate the skin with newly generated LCs<sup>12</sup> as well as dermal DCs,<sup>72</sup> which left the skin to migrate to DLNs. In addition, neutrophils can be found within an hour after skin injury and participate in the production of cytokines and chemokine that help recruitment and activation of monocytes.<sup>73</sup>

### XCR1<sup>+</sup> Dermal DCs

Dermal XCR1<sup>+</sup> DCs comprise two populations of CD11b<sup>low</sup> CD207<sup>+</sup> cells that either express CD103 or not.<sup>54</sup> As this nomenclature is relatively recent, these cell subsets were often referred to as CD207<sup>+</sup> dermal DCs, irrespectively of their expression of CD103. XCR1<sup>+</sup> dermal DCs resemble the XCR1<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs found in lymphoid and non-lymphoid organs, which are particularly efficient in cross-presentation; therefore it was initially assumed that their unique function was to cross-present skin-derived and viral antigens.<sup>74,75</sup> Accordingly, XCR1<sup>+</sup> dermal DCs specifically express TLR3, which recognize double-stranded RNA, and Clec9A, which bind to components of dead cells.<sup>74,76</sup> CD207<sup>+</sup> dermal DCs reportedly induced CD8<sup>+</sup> T cell responses to self-antigen<sup>33</sup> and after vaccinia virus,<sup>37</sup> and leishmaniasis infection in mice.<sup>77</sup> However, in contrast with CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs, CD207<sup>+</sup> dermal DCs have been found to promote differentiation and function of CD4<sup>+</sup> T helper effector cells. Induction of Th1 responses to bacteria<sup>28</sup> and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE),<sup>53</sup> and Th17 responses upon skin infection with herpes simplex virus have been noted in mice.<sup>78</sup> Using a systems biology approach, Haniffa et al. recently identified the human homolog of mice XCR1<sup>+</sup> DCs, namely CD141<sup>+</sup> dermal DCs, which also express XCR1 and Clec9A and efficiently cross-present antigens to CD8<sup>+</sup>T cells in vitro.<sup>79</sup> In addition, vitamin D3 was described as a potent inducer for the generation of CD141<sup>+</sup> DCs-like DCs in vitro, which promoted Treg differentiation and suppression of xeno-graft vs. host disease and tumor alloimmunity in mouse model.<sup>80</sup>

### CD11b<sup>+</sup> Dermal DCs

Multiple myeloid cell subsets of the dermis express CD11b. The expression of the marker CD64 differentiates conventional DCs (CD64<sup>-</sup>) from monocytes and moDCs (CD64<sup>low/+</sup>).<sup>59</sup> Their function has been extensively studied in vivo in mice, however due to possible contamination with other CD11b<sup>+</sup> myeloid cells, previous studies must be interpreted with care. Nevertheless, under steady-state condition, CD11b<sup>+</sup> DCs found in skin and associated DLNs produce retinoic-acid, which is involved in the generation of Treg.<sup>81</sup> This observation was surprising, as retinoic acid production is largely mediated by CD103<sup>+</sup> DCs in other organs such as the gastro-intestinal tract.<sup>82</sup> What mechanisms underlie this functional difference between the skin and the mucosa are not known. Polarization of Th2 cell responses is also a feature of CD11b<sup>+</sup> dermal DCs. The initiation and progression of skin allergic inflammation involve a thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-responsive DC subset expressing high levels of CD11b and able to drive differentiation of Th2 cells in mice.<sup>83</sup> Whether their non-responsive counterpart form a distinct subset with different functions remains to be elucidated. Accordingly, conditional depletion of dermal CD301b<sup>+</sup> DCs, a population of CD11b<sup>+</sup> DCs that do not express CD207, impaired Th2 cell development upon infection with *N. brasiliensis* or with others well-known Th2 cell-inducing adjuvant in mice.<sup>84</sup> Not all CD11b<sup>+</sup> DC express CD301b, therefore this subset may represent a specific population dedicated to Th2 immunity. In humans, the corresponding CD1a<sup>+</sup> dermal DCs represent the major subset of the dermis. They strongly express the CD1c (BDCA-1) marker and low levels of CD1a as compared with human LCs. Both CD1a<sup>+</sup> dermal DCs and LCs are found in T cell-rich areas of skin DLNs and appear to have similar properties of antigen cross-presentation to CD8<sup>+</sup> T cells, as well as capacity to promote differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells into Th2 cells in vitro.<sup>85,86</sup> For a comprehensive review on human dermal DC functions, see ref. 62.

### Monocyte-Derived and Inflammatory DCs

In absence of inflammation, murine and human skins contain low numbers of moDCs that develop from continuously extravasating Ly-6C<sup>hi</sup> or CD14<sup>+</sup> monocytes respectively.<sup>40,59</sup> In mice, steady-state moDCs express Il-10 transcripts, suggesting that these cells could exert immunosuppressive functions. When pulsed with OVA protein, they induced proliferation and IFN- $\gamma$  production by OT-I CD8<sup>+</sup> T cells and OT-II CD4<sup>+</sup> T cells in vitro, though to a minor extend than CD11b<sup>+</sup> dermal DCs.<sup>59</sup> Sorted human CD14<sup>+</sup> dermal DCs produce IL-10 and TGF- $\beta$ , and have been shown to inhibit cytotoxic T lymphocyte responses and preferentially polarize pre-activated CD4<sup>+</sup> T cells into T follicular helper cells and stimulate B cell isotype class-switching.<sup>40,85</sup> Therefore, even in absence of strong inflammatory signals, moDCs are able to present the antigen and stimulate proliferation of naïve T cells in vitro. However, whether these cells exert specific function in vivo remains to be determined.

The ability of inflammatory moDCs (InfDCs) to prime T cell responses is less clear. Following hapten-induced skin inflammation, only few numbers of newly differentiated InfDCs can upregulate CCR7 and migrate to DLNs, and their T cell stimulatory properties are very low.<sup>40,43</sup> In addition, InfDCs were found to overexpress type-I IFN-related transcripts as compared with steady-state moDCs.<sup>59</sup> Thus, under particular inflammatory conditions, InfDCs preferentially remain in the tissue, where they produce pro-inflammatory signals that stimulate the innate arm of immunity. Accordingly, dermal InfDCs have been shown to activate skin natural killer (NK) cells and memory CD8<sup>+</sup> T cells even in the absence of antigen, through secretion of IL-15 and IL-18, after microbial infection.<sup>87</sup> An heterogeneous group of inflammatory cells producing large amounts of TNF- $\alpha$  and iNOS has also been referred to as Tip-DCs. This population appears to have direct microbicide functions but poor T cell inductive properties, mirroring the phenotype of InfDCs that are generated upon sterile inflammation.<sup>88</sup>

López-Bravo et al. demonstrated that subcutaneous infection with *leishmania* induced efficient migration and induction of Th1-biased cellular responses by infected InfDCs.<sup>89</sup> If this infection model may not be representative of what occurs during natural infection, it nonetheless reveals that InfDCs could be able to migrate to DLN and initiate adaptive immunity in the context of skin vaccination. In patients with psoriasis, sorted InfDCs induced allogeneic T cell to differentiate into Th1 and Th17 cells.<sup>90</sup> Likewise, Segura et al. demonstrated that InfDCs isolated from patients suffering from rheumatoid arthritis or untreated inflammatory tumors were able to induce Th17 cell differentiation in vitro.<sup>91</sup> Thus, it seems likely that these cells can exert different functions according to the inflammatory context. In regards to what happens in other tissues, InfDCs would primarily act to stimulate antigen-experienced rather than naïve T cells.<sup>88</sup>

### Targeting of Skin APCs by Vaccination

Intramuscular and subcutaneous vaccinations are the main routes currently used for conventional vaccines. However, the muscle and the subcutaneous tissue represent poor inductive site as they contain few, if any, numbers of APCs.<sup>92</sup> A tremendous body of literature points out the critical role played by APCs in initiating the adaptive immunity, that is required for protection against pathogens.<sup>93</sup> Recent advances in the understanding of skin APC populations and functions, in line with development of new devices make the skin particularly attractive for vaccination. Here we will briefly discuss how skin APCs can be targeted by transcutaneous and intradermal routes of vaccination.

### Spatial Targeting of Skin APCs

Several methods have been developed in the past few years, which enable the targeting of skin immune actors at different depths. Antigen can be directly delivered into the dermis by

conventional intradermal needles, microneedles, or pressure-injector (e.g. gene gun). Several clinical trials have compared intramuscular and intradermal routes of vaccination for a wide array of pathogens, including rabies, hepatitis B virus, and influenza, showing similar or superior immune responses by intradermal route with lower antigen dose.<sup>92</sup> In mice, we showed that intradermal immunization with HIV-p24 protein-loaded particles induced superior humoral and cellular responses in serum and mucosa as compared with subcutaneous and intramuscular routes.<sup>94</sup> This seems to be largely mediated by LCs, as their migration to the dermis and subsequent capture of the antigen was shown to be responsible for CD8<sup>+</sup> T cell responses.<sup>35</sup> Injection of vaccine into the dermis induces strong inflammatory responses even in absence of adjuvant, however it also induces higher local side effects and pain than conventional routes of vaccination.<sup>95</sup>

Passive transcutaneous vaccination consists in a topical application of vaccine compounds. As only small molecules with high lipophilicity can penetrate through intact epidermis,<sup>96</sup> targeting of epidermal LCs and other dermal DCs can be rendered possible by transfollicular penetration through hair follicles.<sup>92</sup> Hair follicle opening allows large molecules and particles (less than 300 nm in diameter) to flow and penetrate the epidermis and the dermis.<sup>97</sup> Recently, Vogt et al. described the penetration and uptake of HIV-p24 protein-loaded particles after cyanoacrylate stripping of human skin explants. More importantly, this process allowed maturation and activation of epidermal LCs that efficiently uptaked the particles.<sup>98</sup> Accordingly, we have shown that transcutaneous anti-influenza vaccination induced both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses in humans, which were superior to that obtained after intramuscular immunization.<sup>99,100</sup> Other methods to target epidermal cells include microneedle and needle-free patches. Standardized micron-scale needles (25  $\mu$ m and 1 mm) can be grouped in microarrays and enable large molecules to enter the epidermis through microperforations.<sup>101</sup> The use of dissolving polymer microneedle patches has been shown to induce robust humoral responses to influenza in mice.<sup>101</sup> Also, antigens such as bacterial toxins can be delivered directly onto the skin<sup>102</sup> or deposited on needle-free patches<sup>103</sup> after disruption of the stratum corneum, which allow their passive transport throughout the epidermis and induce serum and mucosal humoral responses in both mice and humans.<sup>102-104</sup>

Thus, different methods exist that allow spatial targeting of either or both epidermal and dermal APCs, which could be used to potentiate vaccine responses.

### Physical Targeting of Skin APCs

Several classes of vaccines based on micro or nanoparticles could be used to aim vaccine compounds specifically at skin immune cells. Interesting candidates include virus-like particles (VLPs), DNA and attenuated viral vectors, as well as a family of polymeric biodegradable nanoparticles, such as poly-D L-lactide-co-glycolide and poly-D, L-co-glycolic acid (PLGA), poly-D, L-lactic acid (PLA), and others, that can carry proteins, peptides or DNA. It is clear that the nature and size of the antigen have

an impact on its uptake by APCs. Particles of 20 to 200 nm in diameter can be internalized by professional APCs in a clathrin-dependent manner, whereas larger particles (0.5 and 5  $\mu\text{m}$ ) are taken up by phagocytosis (or macropinocytosis) by macrophages. Using antigen-loaded poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) particles of different sizes ranging from 300 nm to 17  $\mu\text{m}$ , Joshi et al. elegantly demonstrated that maximal uptake and activation by DCs were reached with the smallest particles *in vitro*.<sup>105</sup> This is in accordance with our observation that 40 nm particles are found in greater numbers than 200 nm or modified vaccinia Ankara (MVA) particles in DLNs of transcutaneously immunized mice.<sup>97</sup> Therefore, nanoparticles represent an efficient antigen delivery system for optimized targeting of skin APCs.

### Specific Targeting of Skin APCs

There are several ways by which the interaction between antigen and APCs can be improved for vaccination. For example, because DCs express high levels of mannose receptors, mannosylation of the antigen-delivery system has been proposed to improve the targeting and activation of APCs.<sup>106</sup> Another strategy to improve the efficiency of nanoparticle-based vaccines is endocytic pathway targeting, by using C-type lectin receptors. Cruz et al. demonstrated that targeting the DC-SIGN improved antigen processing by human DCs and thus resulted in increased antigen-specific T-cell activation with reduced antigen concentrations 10 to 100-fold.<sup>107</sup> Similarly, several TLR and NOD ligands have been incorporated into PLGA nanoparticles, such as TLR-4 ligand (7-acyl lipid A),<sup>108</sup> TLR-9 ligand (CpG),<sup>109</sup> and NOD 1 and NOD 2 ligands (CL235 and CL365, respectively)<sup>110</sup> which enhances the immunogenicity of particle-based vaccines by increasing APC activation.

More specifically, vaccine-induced immunity could also be tailored by targeting selected APC populations by using antigens that are coupled with antibody specific for surface molecules.<sup>111</sup> For instance, targeting of the XCR1<sup>+</sup> DC-specific C-type lectin receptor Clec9A (also known as DNGR-1) with antibody coupled to antigen induced efficient cross-presentation and induction of

CD8<sup>+</sup> T cells.<sup>112,113</sup> When anti-Clec9A antibody was coupled with a tumor-expressed peptide, development of B16 melanoma lung pseudometastases was prevented, and eradication of tumor cells enhanced.<sup>112</sup> Likewise, targeting of antigen to CD205, which is expressed on the surface of LCs and some dermal DCs, resulted in induction of tolerance.<sup>114</sup> Thus, targeting of CD205<sup>+</sup> skin DCs could induce deletion of pathogenic CD8<sup>+</sup> T cells and improve prognosis of skin allergic inflammatory diseases such as psoriasis and atopic dermatitis, as demonstrated in a murine model of type I diabetes.<sup>115</sup> These few examples clearly illustrate how vaccines could be designed to specifically target distinct subsets of skin APCs, thus tailoring adaptive immunity.

### Conclusion

Skin routes of vaccination have proven high efficacy and efficiency. For instance, intradermal vaccination has achieved protective humoral immunity against major pathogens using lower dose of antigens as compared with conventional intramuscular and subcutaneous routes. It is now clear that this has to do with skin unique and rich immune network, which by its diversity and propensity for modulation can tailor the adaptive arms of immunity. The future of skin vaccination will benefit from our increased knowledge of APC functions and interactions, not only allowing the improvement of immune response intensity, but also its quality, polyfunctionality and persistency. By spatially, physically, and specifically targeting specialized APC subsets, future vaccines might be able to tailor immune responses against infectious diseases and tend toward a personalized medicine that is adapted to the individual.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

### Acknowledgments

This work was supported by EU-FP7 health program CUT<sup>+</sup>HIVAC "Cutaneous and Mucosal HIV Vaccination" and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

### References

- Rappuoli R, Miller HI, Falkow S. The Intangible Value of Vaccination. *Science* 2009; 9:937-9; PMID:12169712; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1075173>
- Callard RE, Harper JL. The skin barrier, atopic dermatitis and allergy: a role for Langerhans cells? *Trends Immunol* 2007; 28:294-8; PMID:17544846; <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2007.05.003>
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008; 17:1063-72; PMID:19043850; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>
- Mulholland WJ, Arbuthnot EA, Bellhouse BJ, Cornhill JF, Austyn JM, Kendall MA, Cui Z, Tirlapur UK. Multiphoton high-resolution 3D imaging of Langerhans cells and keratinocytes in the mouse skin model adopted for epidermal powdered immunization. *J Invest Dermatol* 2006; 126:1541-8; PMID:16645596; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700290>
- Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol Rev* 2010; 234:120-41; PMID:20193016; <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00886.x>
- Valladeau J, Ravel N, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, Duvert-Frances V, Vincent C, Schmitt D, Davoust J, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 2000; 12:71-81; PMID:10661407; [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80160-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80160-0)
- Valladeau J, Clair-Moninot V, Dezutter-Dambuyant C, Pin JJ, Kissenpfennig A, Mattéi MG, Ait-Yahia S, Bates EE, Malissen B, Koch F, et al. Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J Immunol* 2002; 168:782-92; PMID:11777972; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.168.2.782>
- Tang A, Amagai M, Granger LG, Stanley JR, Udey MC. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 1993; 361:82-5; PMID:8421498; <http://dx.doi.org/10.1038/361082a0>
- Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, Sugaya M, Burdick AE, Rea TH, Brennan PJ, Belisle JT, Blauvelt A, Porcelli SA, et al. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest* 2004; 113:701-8; PMID:14991068; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI200419655>
- Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:935-47; PMID:19029989; <http://dx.doi.org/10.1038/nri2455>
- Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I, Weissman IL, Cyster JG, Engleman EG. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 2002; 3:1135-41; PMID:12415265; <http://dx.doi.org/10.1038/ni852>
- Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai XM, Stanley ER, Randolph GJ, Merad M. Langerhans cells arise from monocytes *in vivo*. *Nat Immunol* 2006; 7:265-73; PMID:16444257; <http://dx.doi.org/10.1038/ni1307>



13. Seré K, Baek J-H, Ober-Blobaum J, Müller-Newen G, Tacke F, Yokota Y, Zenke M, Hieronymus T. Two distinct types of Langerhans cells populate the skin during steady state and inflammation. *Immunity* 2012; 37:905-16; PMID:23159228; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.07.019>
14. Nagao K, Kobayashi T, Moro K, Ohyama M, Adachi T, Kitashima DY, Ueha S, Horiuchi K, Tanizaki H, Kabashima K, et al. Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nat Immunol* 2012; 13:744-52; PMID:22729248; <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2353>
15. Kissenpennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, 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; 22:643-54; PMID:15894281; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.004>
16. Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadiou M-H, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 2012; 209:653-60; PMID:22430490; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20111457>
17. Segura E, Kapp E, Gupta N, Wong J, Lim J, Ji H, Heath WR, Simpson R, Villadangos JA. Differential expression of pathogen-recognition molecules between dendritic cell subsets revealed by plasma membrane proteomic analysis. *Mol Immunol* 2010; 47:1765-73; PMID:20347150; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2010.02.028>
18. Heuzé ML, Vargas P, Chabaud M, Le Berre M, Liu Y-J, Collin O, Solanes P, Voituriez R, Piel M, Lennon-Duménil AM. Migration of dendritic cells: physical principles, molecular mechanisms, and functional implications. *Immunol Rev* 2013; 256:240-54; PMID:24117825
19. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiefard Z, Zwirner J, Blankenstein T, Henning G, Förster R. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 2004; 21:279-88; PMID:15308107; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.014>
20. Kel JM, Girard-Madoux MJH, Reizis B, Clausen BE. TGF-beta is required to maintain the pool of immature Langerhans cells in the epidermis. *J Immunol* 2010; 185:3248-55; PMID:20713882; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1000981>
21. Shklovskaya E, O'Sullivan BJ, Ng LG, Roediger B, Thomas R, Weninger W, Fazekas de St Groth B. Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:18049-54; PMID:22006331; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1110076108>
22. Igyarto BZ, Jenison MC, Dudda JC, Roers A, Müller W, Koni PA, Campbell DJ, Shlomchik MJ, Kaplan DH. Langerhans cells suppress contact hypersensitivity responses via cognate CD4 interaction and langerhans cell-derived IL-10. *J Immunol* 2009; 183:5085-93; PMID:19801524; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901884>
23. Bobr A, Olvera-Gomez I, Igyarto BZ, Haley KM, Hogquist KA, Kaplan DH. Acute ablation of Langerhans cells enhances skin immune responses. *J Immunol* 2010; 185:4724-8; PMID:20855870; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1001802>
24. Kautz-Neu K, Noordgraaf M, Dinges S, Bennett CL, John D, Clausen BE, von Stebut E. Langerhans cells are negative regulators of the anti-Leishmania response. *J Exp Med* 2011; 208:885-91; PMID:21536741; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20102318>
25. Gomez de Agüero M, Vocanson M, Hacini-Rachinel F, Taillardet M, Sparwasser T, Kissenpennig A, Malissen B, Kaiserlian D, Dubois B. Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells. *J Clin Invest* 2012; 122:1700-11; PMID:22523067; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI59725>
26. Idoyaga J, Fiorese C, Zbytniuk L, Lubkin A, Miller J, Malissen B, Mucida D, Merad M, Steinman RM. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J Clin Invest* 2013; 123:844-54; PMID:23298832
27. Seneschal J, Clark RA, Gehad A, Baecher-Allan CM, Kupper TS. Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity* 2012; 36:873-84; PMID:22560445; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.018>
28. Igyártó BZ, Haley K, Ortner D, Bobr A, Gerami-Nejad M, Edelson BT, Zurawski SM, Malissen B, Zurawski G, Berman J, et al. Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses. *Immunity* 2011; 35:260-72; PMID:21782478; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.06.005>
29. Nakajima S, Igyártó BZ, Honda T, Egawa G, Otsuka A, Hara-Chikuma M, et al. Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:1048-1055.e6.
30. Stoitzner P, Tripp CH, Eberhart A, Price KM, Jung JY, Bursch L, Ronchese F, Romani N. Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:7783-8; PMID:16672373; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0509307103>
31. Waithman J, Allan RS, Kosaka H, Azukizawa H, Shortman K, Lutz MB, Heath WR, Carbone FR, Belz GT. Skin-derived dendritic cells can mediate deleterious tolerance of class I-restricted self-reactive T cells. *J Immunol* 2007; 179:4535-41; PMID:17878350; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4535>
32. Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, Allan RS, Wojtasiak M, Shortman K, Carbone FR, et al. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 2009; 10:488-95; PMID:19349986; <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1724>
33. Henri S, Poulin LF, Tamoutounour S, Ardouin L, Guillemins M, de Bovis B, Devillard E, Viret C, Azukizawa H, Kissenpennig A, et al. CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med* 2010; 207:189-206; PMID:20038600; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20091964>
34. Bennett CL, Fallah-Arani F, Conlan T, Trouillet C, Goold H, Chorro L, Flutter B, Means TK, Geissmann F, Chakraverty R. Langerhans cells regulate cutaneous injury by licensing CD8 effector cells recruited to the skin. *Blood* 2011; 117:7063-9; PMID:21566096; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-01-329185>
35. Liard C, Munier S, Joulin-Gier A, Bonduelle O, Hadam S, Duffy D, Vogt A, Verrier B, Combadière B. Intradermal immunization triggers epidermal Langerhans cell mobilization required for CD8 T-cell immune responses. *J Invest Dermatol* 2012; 132:615-25; PMID:22170490; <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.346>
36. Elnekave M, Furmanov K, Shaul Y, Capucha T, Eli-Berchoer L, Zelentsova K, Clausen BE, Hovav AH. Second-generation Langerhans cells originating from epidermal precursors are essential for CD8+ T cell priming. *J Immunol* 2014; 192:1395-403; PMID:24420922; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1301143>
37. Seneschal J, Jiang X, Kupper TS. Langerin+ and Dermal DC, but Not Langerhans Cells, Are Required for Effective CD8-Mediated Immune Responses after Skin Scarification with Vaccinia Virus. *J Invest Dermatol* [Internet] 2013 [cited 2014 May 13]; Available from: <http://www.nature.com/jid/journal/vaop/ncurrent/full/jid2013418a.html>
38. Ouchi T, Kubo A, Yokouchi M, Adachi T, Kobayashi T, Kitashima DY, Fujii H, Clausen BE, Koyasu S, Amagai M, et al. Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. *J Exp Med* 2011; 208:2607-13; PMID:22143886; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20111718>
39. Furio L, Briotet I, Journeaux A, Billard H, Péguet-Navarro J. Human langerhans cells are more efficient than CD14(-)CD1c(+) dermal dendritic cells at priming naive CD4(+) T cells. *J Invest Dermatol* 2010; 130:1345-54; PMID:20107482; <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2009.424>
40. Klechevsky E, Morita R, Liu M, Cao Y, Coquery S, Thompson-Snipes L, Briere F, Chaussabel D, Zurawski G, Palucka AK, et al. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity* 2008; 29:497-510; PMID:18789730; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.013>
41. Mathers AR, Janelins BM, Rubin JP, Tkacheva OA, Shufesky WJ, Watkins SC, Morelli AE, Larregina AT. Differential capability of human cutaneous dendritic cell subsets to initiate Th17 responses. *J Immunol* 2009; 182:921-33; PMID:19124735; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.921>
42. Fujita H, Nogralles KE, Kikuchi T, Gonzalez J, Carucci JA, Krueger JG. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:21795-800; PMID:19996179; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0911472106>
43. Banchereau J, Thompson-Snipes L, Zurawski S, Blanck J-P, Cao Y, Clayton S, Gorvel JP, Zurawski G, Klechevsky E. The differential production of cytokines by human Langerhans cells and dermal CD14(+) DCs controls CTL priming. *Blood* 2012; 119:5742-9; PMID:22535664; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-08-371245>
44. Lebre MC, van der Aar AM, van Baarsen L, van Capel TM, Schuitemaker JH, Kapsenberg ML, de Jong EC. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* 2007; 127:331-41; PMID:17068485; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700530>
45. Di Meglio P, Perera GK, Nestle FO. The multitasking organ: recent insights into skin immune function. *Immunity* 2011; 35:857-69; PMID:22195743; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.003>
46. Heath WR, Carbone FR. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat Immunol* 2013; 14:978-85; PMID:24048119; <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2680>
47. Sugita K, Kabashima K, Aharashi K, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y. Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin Exp Immunol* 2007; 147:176-83; PMID:17177977; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03258.x>
48. Nickoloff BJ, Turka LA. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today* 1994; 15:464-9; PMID:7945770; [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90190-2](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(94)90190-2)
49. Nestle FO, Di Meglio P, Qin J-Z, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:679-91; PMID:19763149

50. Poulin LF, Henri S, de Bovis B, Devillard E, Kissenpfennig A, Malissen B. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 2007; 204:3119-31; PMID:18086861; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20071724>
51. Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M, Abel M, Leboeuf M, Helft J, Ochando J, Kissenpfennig A, Malissen B, Grisotto M, et al. Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med* 2007; 204:3133-46; PMID:18086862; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20071733>
52. Nagao K, Ginhoux F, Leitner WW, Motegi S, Bennett CL, Clausen BE, Merad M, Udey MC. Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:3312-7; PMID:19218433; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0807126106>
53. King IL, Kroenke MA, Segal BM. GM-CSF-dependent, CD103+ dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization. *J Exp Med* 2010; 207:953-61; PMID:20421390; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20091844>
54. Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat Rev Immunol* 2014; 14:417-28; PMID:24854591; <http://dx.doi.org/10.1038/nri3683>
55. Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat Rev Immunol* 2014; 14:417-28; PMID:24854591; <http://dx.doi.org/10.1038/nri3683>
56. Mollah SA, Dobrin JS, Feder RE, Tse S-W, Matos IG, Cheong C, Steinman RM, Anandasabapathy N. Flt3L dependence helps define an uncharacterized subset of murine cutaneous dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2014; 134:1265-75; PMID:24288007; <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.515>
57. Denda-Nagai K, Aida S, Saba K, Suzuki K, Moriyama S, Oo-Puthinan S, Tsuiji M, Morikawa A, Kumamoto Y, Sugiura D, et al. Distribution and function of macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2/CD301b): efficient uptake and presentation of glycosylated antigens by dendritic cells. *J Biol Chem* 2010; 285:19193-204; PMID:20304916; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.113613>
58. Hashimoto D, Miller J, Merad M. Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* 2011; 35:323-35; PMID:21943488; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.007>
59. Tamoutounour S, Williams M, Montanana Sanchis F, Liu H, Terhorst D, Malosse C, Poller E, Ardouin L, Luche H, Sanchez C, et al. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 2013; 39:925-38; PMID:24184057; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.004>
60. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010; 327:656-61; PMID:20133564; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1178331>
61. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:958-69; PMID:19029990; <http://dx.doi.org/10.1038/nri2448>
62. Boltjes A, van Wijk F. Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation. *Front Immunol* 2014; 5.
63. Miller JC, Brown BD, Shay T, Gautier EL, Jovic V, Cohain A, Pandey G, Leboeuf M, Elpek KG, Helft J, et al.; Immunological Genome Consortium. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 2012; 13:888-99; PMID:22797772; <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2370>
64. Pandey G, Cohain A, Miller J, Merad M. Decoding dendritic cell function through module and network analysis. *J Immunol Methods* 2013; 387:71-80; PMID:23098840; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.09.012>
65. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 2012; 13:1145-54; PMID:23160217; <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2467>
66. Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 2014; 40:642-56; PMID:24837101; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.016>
67. Gregorio J, Meller S, Conrad C, Di Nardo A, Homey B, Lauerma A, Arai N, Gallo RL, Digiovanni J, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J Exp Med* 2010; 207:2921-30; PMID:21115688; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20101102>
68. Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sánchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* 2008; 26:293-316; PMID:18045026; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090254>
69. Segura E, Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol* 2013; 34:440-5; PMID:23831267; <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2013.06.001>
70. Satpathy AT, Kc W, Albring JC, Edelson BT, Kretzer NM, Bhattacharya D, Murphy TL, Murphy KM. Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J Exp Med* 2012; 209:1135-52; PMID:22615127; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20120030>
71. Zigmund E, Varol C, Farache J, Elmaliyah E, Satpathy AT, Friedlander G, Mack M, Shpigel N, Boneca IG, Murphy KM, et al. Ly6C hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity* 2012; 37:1076-90; PMID:23219392; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.026>
72. Bogunovic M, Ginhoux F, Wagers A, Loubeau M, Isola LM, Lubrano L, Najfeld V, Phelps RG, Grosskreutz C, Scigliano E, et al. Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. *J Exp Med* 2006; 203:2627-38; PMID:17116734; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20060667>
73. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:173-82; PMID:16498448; <http://dx.doi.org/10.1038/nri1785>
74. Crozat K, Tamoutounour S, Vu Manh T-P, Fossum E, Luche H, Ardouin L, Guilliams M, Azukizawa H, Bogen B, Malissen B, et al. Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8 $\alpha$ + type. *J Immunol* 2011; 187:4411-5; PMID:21948982; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1101717>
75. Bachem A, Hartung E, Güttler S, Mora A, Zhou X, Hegemann A, et al. Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol* [Internet] 2012 [cited 2014 Jun 3]; 3. Available from: <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fimmu.2012.00214/full>
76. Zhang J-G, Czabotar PE, Policheni AN, Caminschi I, Wan SS, Kitsoulis S, Tullett KM, Robin AY, Brammanan R, van Delft MF, et al. The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity* 2012; 36:646-57; PMID:22483802; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.009>
77. Brewig N, Kissenpfennig A, Malissen B, Veit A, Bickert T, Fleischer B, Mostböck S, Ritter U. Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *J Immunol* 2009; 182:774-83; PMID:19124720; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.774>
78. Jiao Z, Bedoui S, Brady JL, Walter A, Chopin M, Carrington EM, Sutherland RM, Nutt SL, Zhang Y, Ko HJ, et al. The closely related CD103+ dendritic cells (DCs) and lymphoid-resident CD8+ DCs differ in their inflammatory functions. *PLoS One* 2014; 9:e91126; PMID:24637385; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0091126>
79. Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, Wasan PS, Wang XN, Malinarich F, Malleret B, et al. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 2012; 37:60-73; PMID:22795876; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.04.012>
80. Chu C-C, Ali N, Karagiannis P, Di Meglio P, Skowera A, Napolitano L, Barinaga G, Grys K, Sharif-Paghalah E, Karagiannis SN, et al. Resident CD141 (BDCA3)+ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J Exp Med* 2012; 209:935-45; PMID:22547651; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20112583>
81. Williams M, Crozat K, Henri S, Tamoutounour S, Grenot P, Devillard E, de Bovis B, Alexopoulou L, Dalod M, Malissen B. Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Blood* 2010; 115:1958-68; PMID:20068222; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-09-245274>
82. Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun C-M, Belkaid Y, Powrie F. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007; 204:1757-64; PMID:17620361; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20070590>
83. Kitajima M, Ziegler SE. Cutting edge: identification of the thymic stromal lymphopoietin-responsive dendritic cell subset critical for initiation of type 2 contact hypersensitivity. *J Immunol* 2013; 191:4903-7; PMID:24123684; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1302175>
84. Kumamoto et al. - 2013 - CD301b+ Dermal Dendritic Cells Drive T Helper 2 Ce.pdf.
85. Banchereau J, Thompson-Snipes L, Zurawski S, Blanck J-P, Cao Y, Clayton S, Gorvel JP, Zurawski G, Klechevsky E. The differential production of cytokines by human Langerhans cells and dermal CD14(+) DCs controls CTL priming. *Blood* 2012; 119:5742-9; PMID:22535664; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-08-371245>
86. Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu M-H, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 2012; 209:653-60; PMID:22430490; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20111457>
87. Soudja SM, Ruiz AL, Marie JC, Lauvau G. Inflammatory monocytes activate memory CD8(+) T and innate NK lymphocytes independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion. *Immunity* 2012; 37:549-62; PMID:22940097; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.029>

88. Domínguez PM, Ardavin C. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev* 2010; 234:90-104; PMID:20193014; <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00876.x>
89. López-Bravo M, Ardavin C. In vivo induction of immune responses to pathogens by conventional dendritic cells. *Immunity* 2008; 29:343-51; PMID:18799142; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.008>
90. Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, Abello MV, Novitskaya I, Pierson KC, Gonzalez J, Krueger JG, Lowes MA. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2009; 129:79-88; PMID:18633443; <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2008.194>
91. Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiochia G, Hosmalin A, Dalod M, Soumelis V, Amigorena S. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* 2013; 38:336-48; PMID:23352235; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.018>
92. Combadiere B, Liard C. Transcutaneous and intradermal vaccination. *Hum Vaccin* 2011; 7:811-27; PMID:21817854; <http://dx.doi.org/10.4161/hv.7.8.16274>
93. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:1-22; PMID:22136168; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-100311-102839>
94. Liard C, Munier S, Arias M, Joulin-Giet A, Bonduelle O, Duffy D, Shattock RJ, Verrier B, Combadiere B. Targeting of HIV-p24 particle-based vaccine into differential skin layers induces distinct arms of the immune responses. *Vaccine* 2011; 29:6379-91; PMID:21554912; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.080>
95. Belshe RB, Newman FK, Cannon J, Duane C, Treanor J, Van Hoecke C, Howe BJ, Dubin G. Serum antibody responses after intradermal vaccination against influenza. *N Engl J Med* 2004; 351:2286-94; PMID:15525713; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa043555>
96. Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol* 2000; 9:165-9; PMID:10839713; <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x>
97. Mahe B, Vogt A, Liard C, Duffy D, Abadie V, Bonduelle O, Boissonnas A, Sterry W, Verrier B, Blume-Peytavi U, et al. Nanoparticle-based targeting of vaccine compounds to skin antigen-presenting cells by hair follicles and their transport in mice. *J Invest Dermatol* 2009; 129:1156-64; PMID:19052565; <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2008.356>
98. Rancan F, Amselgruber S, Hadam S, Munier S, Pavot V, Verrier B, Hackbarth S, Combadiere B, Blume-Peytavi U, Vogt A. Particle-based transcutaneous administration of HIV-1 p24 protein to human skin explants and targeting of epidermal antigen presenting cells. *J Control Release* 2014; 176:115-22; PMID:24384300; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.022>
99. Vogt A, Mahé B, Costagliola D, Bonduelle O, Hadam S, Schaefer G, Schaefer H, Katlama C, Sterry W, Autran B, et al. Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *J Immunol* 2008; 180:1482-9; PMID:18209043; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1482>
100. Combadiere B, Vogt A, Mahé B, Costagliola D, Hadam S, Bonduelle O, Sterry W, Staszewski S, Schaefer H, van der Werf S, et al. Preferential amplification of CD8 effector-T cells after transcutaneous application of an inactivated influenza vaccine: a randomized phase I trial. *PLoS One* 2010; 5:e10818; PMID:20520820; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010818>
101. Sullivan SP, Koutsonanos DG, Del Pilar Martin M, Lee JW, Zarnitsyn V, Choi S-O, Murthy N, Compans RW, Skountzou I, Prausnitz MR. Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination. *Nat Med* 2010; 16:915-20; PMID:20639891; <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2182>
102. Glenn GM, Scharton-Kersten T, Vassell R, Mallett CP, Hale TL, Alving CR. Transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. *J Immunol* 1998; 161:3211-4; PMID:9759833
103. Glenn GM, Taylor DN, Li X, Frankel S, Montemarano A, Alving CR. Transcutaneous immunization: a human vaccine delivery strategy using a patch. *Nat Med* 2000; 6:1403-6; PMID:11100128; <http://dx.doi.org/10.1038/82225>
104. Behrens RH, Cramer JP, Jelinek T, Shaw H, von Sonnenburg F, Wilbraham D, et al. Efficacy and safety of a patch vaccine containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea: a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial in travellers from Europe to Mexico and Guatemala. *Lancet Infect Dis* [Internet] 2013 [cited 2014 Jun 11]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309913702974>
105. Joshi VB, Geary SM, Salem AK. Biodegradable particles as vaccine delivery systems: size matters. *AAPS J* 2013; 15:85-94; PMID:23054976; <http://dx.doi.org/10.1208/s12248-012-9418-6>
106. Ghotbi Z, Haddadi A, Hamdy S, Hung RW, Samuel J, Lavasanifar A. Active targeting of dendritic cells with mannan-decorated PLGA nanoparticles. *J Drug Target* 2011; 19:281-92; PMID:20590403; <http://dx.doi.org/10.3109/1061186X.2010.499463>
107. Cruz LJ, Tacke P, Fokkink R, Figdor CG. The influence of PEG chain length and targeting moiety on antibody-mediated delivery of nanoparticle vaccines to human dendritic cells. *Biomaterials* 2011; 32:6791-803; PMID:21724247; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.082>
108. Hamdy S, Molavi O, Ma Z, Haddadi A, Alshamsan A, Gobri Z, Elhasi S, Samuel J, Lavasanifar A. Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8+ T cell-mediated anti-tumor immunity. *Vaccine* 2008; 26:5046-57; PMID:18680779; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.035>
109. Fischer S, Schlosser E, Mueller M, Csaba N, Merkle HP, Groettrup M, Gander B. Concomitant delivery of a CTL-restricted peptide antigen and CpG ODN by PLGA microparticles induces cellular immune response. *J Drug Target* 2009; 17:652-61; PMID:19622019; <http://dx.doi.org/10.1080/10611860903119656>
110. Pavot V, Rochereau N, Primard C, Genin C, Perouzel E, Lioux T, Paul S, Verrier B. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *J Control Release* 2013; 167:60-7; PMID:23352911; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.01.015>
111. Caminschi I, Shortman K. Boosting antibody responses by targeting antigens to dendritic cells. *Trends Immunol* 2012; 33:71-7; PMID:22153931; <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2011.10.007>
112. Sancho D, Mourão-Sá D, Joffre OP, Schulz O, Rogers NC, Pennington DJ, Carlyle JR, Reis e Sousa C. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest* 2008; 118:2098-110; PMID:18497879; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI34584>
113. Caminschi I, Proietto AI, Ahmet F, Kitsoulis S, Shin Teh J, Lo JCY, Rizzitelli A, Wu L, Vremec D, van Dommelen SL, et al. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* 2008; 112:3264-73; PMID:18669894; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-05-155176>
114. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 2002; 196:1627-38; PMID:12486105; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20021598>
115. Mukherjee G, Geliebter A, Babad J, Santamaria P, Serreze DV, Freeman GJ, Tarbell KV, Sharpe A, DiLorenzo TP. DEC-205-mediated antigen targeting to steady-state dendritic cells induces deletion of diabetogenic CD8+ T cells independently of PD-1 and PD-L1. *Int Immunol* 2013; 25:651-60; PMID:24021877; <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxt031>

## Conclusion des travaux et perspectives

---

La peau possède une organisation structurale particulière et un environnement riche et spécialisé en cellules de l'immunité innée. La fascinante diversité des populations cellulaires de la peau et des ganglions n'a d'égal que la complexité des processus par lesquels elles permettent la mise en place de la réponse adaptative. La peau est située à l'interface entre le soi et le non soi, et le système immunitaire cutané se doit d'être capable de répondre de manière efficace et ciblée aux pathogènes susceptibles d'être rencontrés. De ce fait, la peau représente un tissu à fort potentiel en vaccination. Preuve en est le succès de l'éradication du virus de la variole, ou encore l'essor des nouvelles techniques d'immunisation ou de ciblage des cellules présentatrices d'antigène de la peau. La diversité et la complexité des CPAs capables de favoriser l'initiation de la réponse immunitaire commencent à être élucidées. La découverte des réseaux moléculaires et cellulaires qui leurs sont associés fait envisager de nouvelles possibilités pour l'induction d'une réponse immunitaire optimisée et adaptée au pathogène en vaccination.

La découverte du principe de la vaccination fait partie des avancées majeures du XX<sup>ème</sup> siècle. Basée sur un concept relativement simple – la préparation du système immunitaire à une future rencontre avec un pathogène – la vaccination fait intervenir une multitude de processus biologiques complexes. La découverte des cellules  $T_{FH}$  et de la relation qu'elles entretiennent avec les lymphocytes B et l'immunité humorale ont motivé l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires liés à leur induction après vaccination. Bien que les lymphocytes B soient les principaux acteurs de la réponse humorale, la présence des  $T_{FH}$  est requise pour la génération d'anticorps de haute affinité pour l'antigène. Le trio cellulaire formé par les cellules  $T_{FH}$ , B, et les DCs est fortement interconnecté, et son ciblage par différentes méthodes biologiques ou physiques pourrait permettre le développement de meilleurs vaccins.

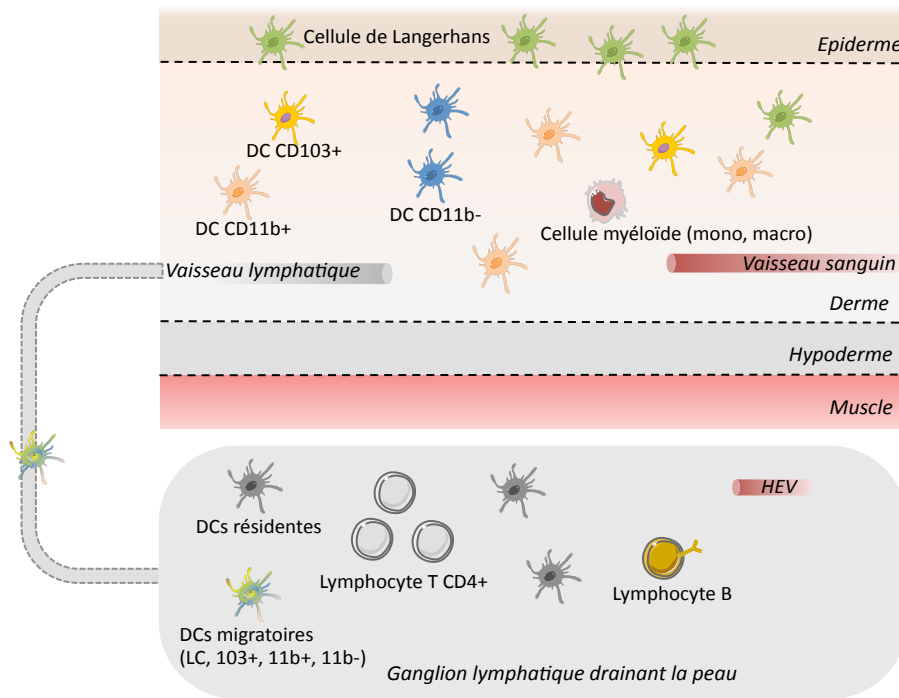
Mes travaux de thèse avaient pour objectif de mieux comprendre les mécanismes d'induction et d'amélioration des réponses  $T_{FH}$  et B du centre germinatif après vaccination cutanée. L'utilisation de modèles murins nous a permis d'évaluer la contribution de différentes populations de la peau, du ganglion, et du sang dans la mise en place de ces réponses après immunisation intradermique avec un antigène particulaire présentant l'antigène modèle p24 du VIH. Les principaux résultats de cette première étude sont synthétisés dans les figures 20 et 21. En résumé, nous avons observé que les cellules de Langerhans, une population cellulaire unique à la peau, sont responsables d'une partie de la réponse  $T_{FH}$  et humorale générée après vaccination intradermique avec des nanoparticules p24. De façon surprenante, les DCs résidentes du ganglion, ainsi que les DCs inflammatoires ne sont pas capables de générer ce type de réponse après immunisation. Cette étude laisse envisager de nouvelles stratégies vaccinales de ciblage des cellules de Langerhans pour l'induction de réponses anticorps.



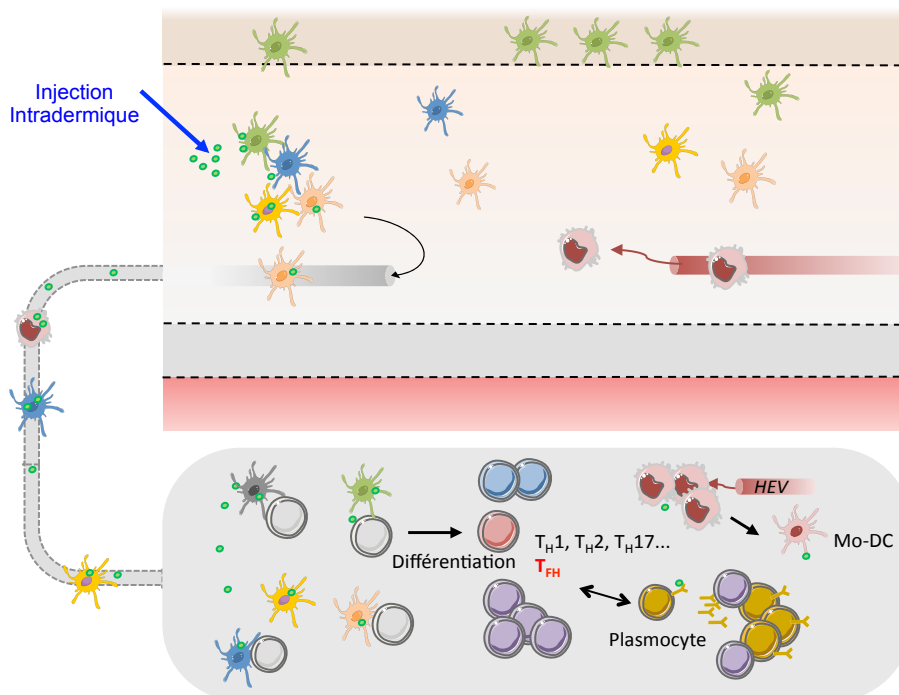
Dans une seconde approche, nous avons évalué la capacité de deux formulations d'adjuvants différents (IFA et Alum) à polariser la réponse  $T_{FH}$  et humorale contre un antigène de l'enveloppe du VIH à fort potentiel vaccinal après vaccination sous-cutanée. Bien que pauvre en cellules dendritiques résidentes, le tissu sous cutané permet un recrutement de cellules inflammatoires retrouvées par la suite dans le ganglion drainant. Après émulsion de l'antigène m3S avec l'adjuvant IFA, un fort recrutement de DCs inflammatoire est observé dans le ganglion. Alors que la fonction de ces cellules n'a pas encore été clairement établie, nous montrons que leur présence est suivie d'une forte polarisation des cellules  $T_{FH}$ , B du centre germinatif, et de la production d'anticorps neutralisants. Ces résultats suggèrent que l'utilisation de certaines formulations d'adjuvants permet de s'affranchir du faible potentiel immunologique du tissu sous-cutané (Liard et al., 2011).

En conclusion, les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse s'inscrivent dans une thématique de compréhension des mécanismes par lesquels la vaccination cutanée permet la génération d'une réponse immunitaire humorale et  $T_{FH}$  de forte intensité. Mes travaux apportent des pistes de réflexion sur l'induction et l'amélioration des réponses  $T_{FH}$  et neutralisantes après vaccination contre le VIH.

## 1. Etat basal (non inflammatoire)



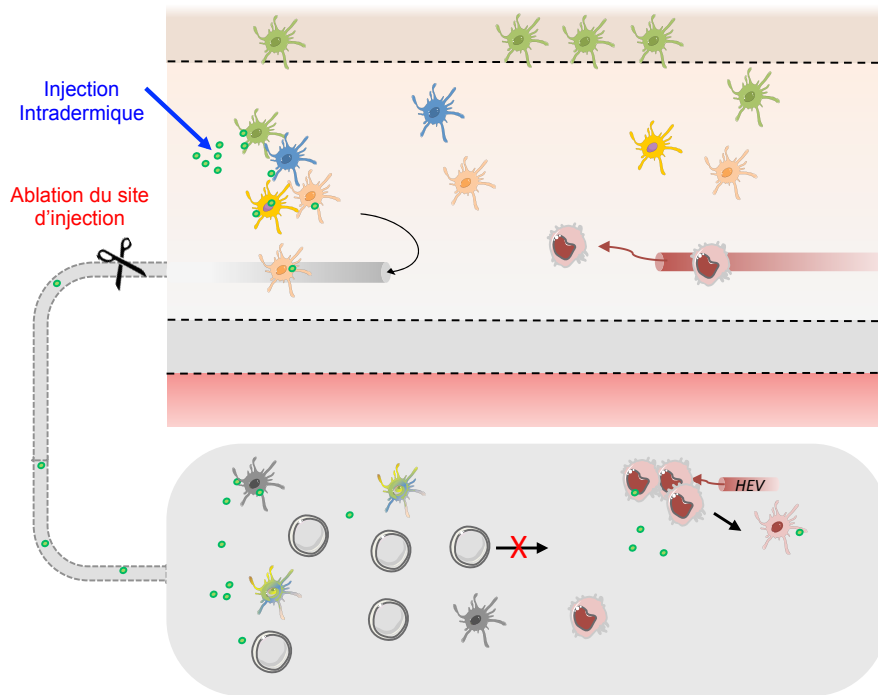
## 2. Etat inflammatoire



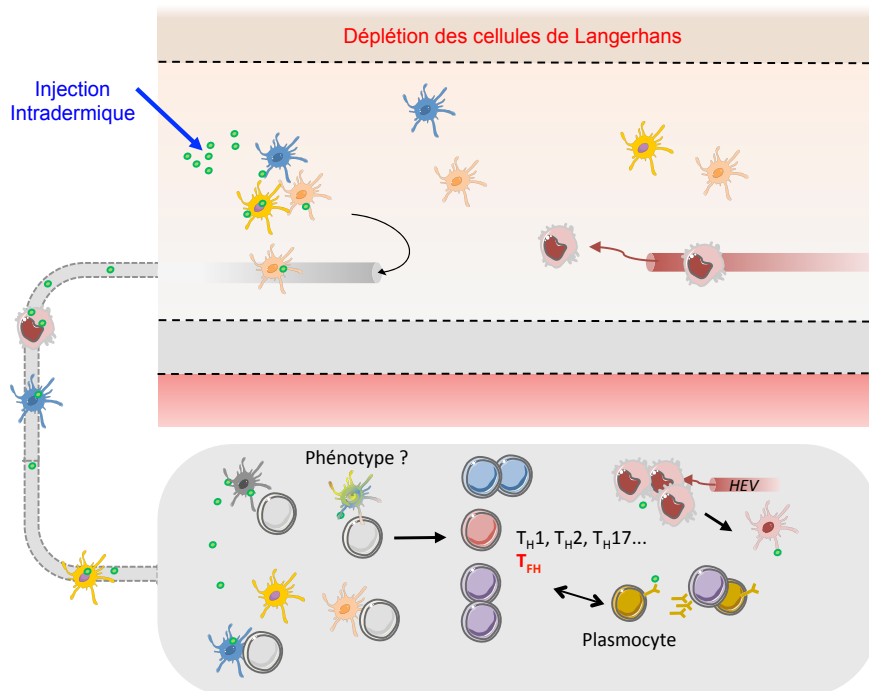
**Figure 20 : Synthèse des principaux résultats de l'étude 1 (1).**

(1) La peau est constituée de plusieurs populations de DCs, qui sont retrouvées dans le ganglion drainant en absence d'inflammation. (2) Après injection intradermique, les DCs et l'antigène libre migrent via les vaisseaux lymphatiques jusqu'au ganglion. Les DCs présentent l'antigène aux T naïfs et promeuvent leur différenciation en T auxiliaires et en  $T_{FH}$  pour la sécrétion d'anticorps.

### 3. Injection suivie de l'ablation du site d'injection



### 4. Déplétion des cellules de Langerhans (Lang-DTR)



**Figure 21 : Synthèse des principaux résultats de l'étude 1 (2).**

(3) Après ablation du site d'injection, l'antigène libre est retrouvé dans le ganglion. Un recrutement de cellules inflammatoires est également observé. Dans ces conditions, aucune différenciation des cellules T<sub>FH</sub> n'est observée. (4) La déplétion conditionnelle des cellules de Langerhans induit une diminution du nombre de cellules T<sub>FH</sub> et B du centre germinatif.

# Bibliographie

---

## A

Abadie, V., Bonduelle, O., Duffy, D., Parizot, C., Verrier, B., and Combadière, B. (2009). Original encounter with antigen determines antigen-presenting cell imprinting of the quality of the immune response in mice. *PloS One* *4*, e8159.

Allan, R.S., Waithman, J., Bedoui, S., Jones, C.M., Villadangos, J.A., Zhan, Y., Lew, A.M., Shortman, K., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2006). Migratory Dendritic Cells Transfer Antigen to a Lymph Node-Resident Dendritic Cell Population for Efficient CTL Priming. *Immunity* *25*, 153–162.

Allen, C.D.C., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., and Cyster, J.G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat. Immunol.* *5*, 943–952.

Allen, C.D.C., Okada, T., Tang, L.H., and Cyster, J.G. (2007). Imaging of Germinal Center Selection Events During Affinity Maturation. *Science* *315*, 528–531.

Allenspach, E.J., Lemos, M.P., Porrett, P.M., Turka, L.A., and Laufer, T.M. (2008). Migratory and Lymphoid-Resident Dendritic Cells Cooperate to Efficiently Prime Naive CD4 T cells. *Immunity* *29*, 795–806.

Aloulou, M., Carr, E.J., Gador, M., Bignon, A., Liblau, R.S., Fazilleau, N., and Linterman, M.A. (2016). Follicular regulatory T cells can be specific for the immunizing antigen and derive from naive T cells. *Nat. Commun.* *7*, 10579.

## B

Bachem, A., Hartung, E., Güttler, S., Mora, A., Zhou, X., Hegemann, A., Plantinga, M., Mazzini, E., Stoitzner, P., Gurka, S., et al. (2012). Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Front. Immunol.* *3*.

Bachmann, M.F., and Jennings, G.T. (2010). Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 787–796.

Bachy, V., Hervouet, C., Becker, P.D., Chorro, L., Carlin, L.M., Herath, S., Papagatsias, T., Barbaroux, J.-B., Oh, S.-J., Benlahrech, A., et al. (2013). Langerin negative dendritic cells promote potent CD8<sup>+</sup> T-cell priming by skin delivery of live adenovirus vaccine microneedle arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 3041–3046.

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.

Banchereau, J., Thompson-Snipes, L., Zurawski, S., Blanck, J.-P., Cao, Y., Clayton, S., Gorvel, J.-P., Zurawski, G., and Klechevsky, E. (2012). The differential production of cytokines by human Langerhans cells and dermal CD14<sup>+</sup> DCs controls CTL priming. *Blood* *119*, 5742–5749.

Bariya, S.H., Gohel, M.C., Mehta, T.A., and Sharma, O.P. (2012). Microneedles: an emerging transdermal drug delivery system: Microneedles: an emerging drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* *64*, 11–29.

Barnett, L.G., Simkins, H.M.A., Barnett, B.E., Korn, L.L., Johnson, A.L., Wherry, E.J., Wu, G.F., and Laufer, T.M. (2014). B Cell Antigen Presentation in the Initiation of Follicular Helper T Cell and Germinal Center Differentiation. *J. Immunol.* *192*, 3607–3617.

Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2012). Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B

cells. *Immunol. Rev.* 247, 172–183.

Baumjohann, D., and Ansel, K.M. (2013). Identification of T follicular helper (Tfh) cells by flow cytometry. *Nat. Protoc.*

Baumjohann, D., Kageyama, R., Clingan, J.M., Morar, M.M., Patel, S., de Kouchkovsky, D., Bannard, O., Bluestone, J.A., Matloubian, M., Ansel, K.M., et al. (2013a). The microRNA cluster miR-17~92 promotes TFH cell differentiation and represses subset-inappropriate gene expression. *Nat. Immunol.* 14, 840–848.

Baumjohann, D., Preite, S., Reboldi, A., Ronchi, F., Ansel, K.M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2013b). Persistent Antigen and Germinal Center B Cells Sustain T Follicular Helper Cell Responses and Phenotype. *Immunity* 38, 596–605.

Bauquet, A.T., Jin, H., Paterson, A.M., Mitsdoerffer, M., Ho, I.-C., Sharpe, A.H., and Kuchroo, V.K. (2009). The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat. Immunol.* 10, 167–175.

Behrens, R.H., Cramer, J.P., Jelinek, T., Shaw, H., von Sonnenburg, F., Wilbraham, D., Weinke, T., Bell, D.J., Asturias, E., Pauwells, H.L.E., et al. (2013). Efficacy and safety of a patch vaccine containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea: a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial in travellers from Europe to Mexico and Guatemala. *Lancet Infect. Dis.*

Belshe, R.B., Newman, F.K., Cannon, J., Duane, C., Treanor, J., Van Hoecke, C., Howe, B.J., and Dubin, G. (2004). Serum antibody responses after intradermal vaccination against influenza. *N. Engl. J. Med.* 351, 2286–2294.

Benson, R.A., MacLeod, M.K., Hale, B.G., Patakas, A., Garside, P., and Brewer, J.M. (2015). Antigen presentation kinetics control T cell/dendritic cell interactions and follicular helper T cell generation in vivo. *Elife* 4, e06994.

Bigley, V., McGovern, N., Milne, P., Dickinson, R., Pagan, S., Cookson, S., Haniffa, M., and Collin, M. (2015). Langerin-expressing dendritic cells in human tissues are related to CD1c<sup>+</sup> dendritic cells and distinct from Langerhans cells and CD141<sup>high</sup> XCR1<sup>+</sup> dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 97, 627–634.

Bobr, A., Olvera-Gomez, I., Igyarto, B.Z., Haley, K.M., Hogquist, K.A., and Kaplan, D.H. (2010). Acute Ablation of Langerhans Cells Enhances Skin Immune Responses. *J. Immunol.* 185, 4724–4728.

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral CD8<sup>+</sup> T Cell Tolerance. *J. Exp. Med.* 196, 1627–1638.

Bos, J.D., and Meinardi, M.M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.* 9, 165–169.

Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Förster, R. (2000). Follicular B Helper T Cells Express CXC Chemokine Receptor 5, Localize to B Cell Follicles, and Support Immunoglobulin Production. *J. Exp. Med.* 192, 1545–1551.

Breitkreutz, D., Koxholt, I., Thiemann, K., and Nischt, R. (2013). Skin Basement Membrane: The Foundation of Epidermal Integrity—BM Functions and Diverse Roles of Bridging Molecules Nidogen and Perlecan. *BioMed Res. Int.* 2013, 1–16.

Brewig, N., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Veit, A., Bickert, T., Fleischer, B., Mostbock, S., and Ritter, U. (2009). Priming of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T Cells in Experimental Leishmaniasis Is Initiated by Different Dendritic Cell Subtypes. *J. Immunol.* 182, 774–783.

Bukczynski, J., Wen, T., Ellefsen, K., Gauldie, J., and Watts, T.H. (2004). Costimulatory ligand 4-1BBL (CD137L) as an efficient adjuvant for human antiviral cytotoxic T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1291–1296.

Burton, D.R., Poignard, P., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2012). Broadly Neutralizing Antibodies Present New Prospects to Counter Highly Antigenically Diverse Viruses. *Science* 337, 183–186.

## C

Calabro, S., Tritto, E., Pezzotti, A., Taccone, M., Muzzi, A., Bertholet, S., De Gregorio, E., O'Hagan, D.T., Baudner, B., and Seubert, A. (2013). The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect. *Vaccine* 31, 3363–3369.

Carrasco, Y.R., and Batista, F.D. (2007). 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* 27, 160–171.

Chackerian, B., Lenz, P., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2002). Determinants of Autoantibody Induction by Conjugated Papillomavirus Virus-Like Particles. *J. Immunol.* 169, 6120–6126.

Chakarov, S., and Fazilleau, N. (2014). Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation. *EMBO Mol. Med.* n/a-n/a.

Chan, Y.-H., Chiang, M.-F., Tsai, Y.-C., Su, S.-T., Chen, M.-H., Hou, M.-S., and Lin, K.-I. (2009). Absence of the Transcriptional Repressor Blimp-1 in Hematopoietic Lineages Reveals Its Role in Dendritic Cell Homeostatic Development and Function. *J. Immunol.* 183, 7039–7046.

Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6. *Immunity* 34, 932–946.

Choi, Y.S., Eto, D., Yang, J.A., Lao, C., and Crotty, S. (2013a). Cutting Edge: STAT1 Is Required for IL-6-Mediated Bcl6 Induction for Early Follicular Helper Cell Differentiation. *J. Immunol.* 190, 3049–3053.

Choi, Y.S., Yang, J.A., Yusuf, I., Johnston, R.J., Greenbaum, J., Peters, B., and Crotty, S. (2013b). Bcl6 Expressing Follicular Helper CD4 T Cells Are Fate Committed Early and Have the Capacity To Form Memory. *J. Immunol.* 190, 4014–4026.

Chu, C.-C., Ali, N., Karagiannis, P., Di Meglio, P., Skowera, A., Napolitano, L., Barinaga, G., Grysb, K., Sharif-Paghaleh, E., Karagiannis, S.N., et al. (2012). Resident CD141 (BDCA3)<sup>+</sup> dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J. Exp. Med.* 209, 935–945.

Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R.I., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Y.-H., Lim, H., Reynolds, J.M., Zhou, X., et al. (2011). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* 17, 983–988.

Climent, N., Munier, S., Piqué, N., García, F., Pavot, V., Primard, C., Casanova, V., Gatell, J.M., Verrier, B., and Gallart, T. (2014). Loading dendritic cells with PLA-p24 nanoparticles or MVA expressing HIV genes induces HIV-1-specific T cell responses. *Vaccine* 32, 6266–6276.

Cohn, L., and Delamarre, L. (2014). Dendritic Cell-Targeted Vaccines. *Front. Immunol.* 5.

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

Combadière, B., Vogt, A., Mahé, B., Costagliola, D., Hadam, S., Bonduelle, O., Sterry, W., Staszewski, S., Schaefer, H., van der Werf, S., et al. (2010). Preferential Amplification of CD8 Effector-T Cells after Transcutaneous Application of an Inactivated Influenza Vaccine: A Randomized Phase I Trial. *PLoS ONE* 5, e10818.

Corti, D., and Lanzavecchia, A. (2013). Broadly Neutralizing Antiviral Antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 705–742.

Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* 29, 621–663.

Crotty, S. (2014). T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity* 41, 529–542.

Crotty, S. (2015). A brief history of T cell help to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 185–189.

Crozat, K., Tamoutounour, S., Vu Manh, T.-P., Fossum, E., Luche, H., Ardouin, L., Guilliams, M., Azukizawa, H., Bogen, B., Malissen, B., et al. (2011). Cutting Edge: Expression of XCR1 Defines Mouse Lymphoid-Tissue Resident and Migratory Dendritic Cells of the CD8 + Type. *J. Immunol.* 187, 4411–4415.

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.

## D

Dahlgren, M.W., Gustafsson-Hedberg, T., Livingston, M., Cucak, H., Alsen, S., Yrlid, U., and Johansson-Lindbom, B. (2015). T Follicular Helper, but Not Th1, Cell Differentiation in the Absence of Conventional Dendritic Cells. *J. Immunol.* 194, 5187–5199.

Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B., and Lawrence, T. (2014). Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.* 33, 1104–1116.

Dan, J.M., Lindestam Arlehamn, C.S., Weiskopf, D., da Silva Antunes, R., Havenar-Daughton, C., Reiss, S.M., Brigger, M., Bothwell, M., Sette, A., and Crotty, S. (2016). A Cytokine-Independent Approach To Identify Antigen-Specific Human Germinal Center T Follicular Helper Cells and Rare Antigen-Specific CD4+ T Cells in Blood. *J. Immunol.* 197, 983–993.

De Gregorio, E., Caproni, E., and Ulmer, J.B. (2013). Vaccine Adjuvants: Mode of Action. *Front. Immunol.* 4.

De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 137–148.

Dedeoglu, F. (2004). Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NF B. *Int. Immunol.* 16, 395–404.

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.

Di Meglio, P., Perera, G.K., and Nestle, F.O. (2011). The multitasking organ: recent insights into skin immune function. *Immunity* 35, 857–869.

Dong, C., Juedes, A.E., Temann, U.-A., Shresta, S., Allison, J.P., Ruddle, N.H., and Flavell, R.A. (2001). ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409, 97–101.

Du, X., Zheng, G., Jin, H., Kang, Y., Wang, J., Xiao, C., Zhang, S., Zhao, L., Chen, A., and Wang, B. (2007). The adjuvant effects of co-stimulatory molecules on cellular and memory responses to HBsAg DNA vaccination. *J. Gene Med.* 9, 136–146.

Duffy, D., Perrin, H., Abadie, V., Benhabiles, N., Boissonnas, A., Liard, C., Descours, B., Reboulleau, D., Bonduelle, O., Verrier, B., et al. (2012). Neutrophils Transport Antigen from the Dermis to the Bone Marrow, Initiating a Source of Memory CD8+ T Cells. *Immunity* 37, 917–929.

## E

Eickhoff, S., Brewitz, A., Gerner, M.Y., Klauschen, F., Komander, K., Hemmi, H., Garbi, N., Kaisho, T., Germain, R.N., and Kastentmüller, W. (2015). Robust Anti-viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions. *Cell* 162, 1322–1337.

Elgueta, R., Benson, M.J., De Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y., and Noelle, R.J. (2009). Molecular

mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.* 229, 152–172.

Engelke, L., Winter, G., Hook, S., and Engert, J. (2015). Recent insights into cutaneous immunization: How to vaccinate via the skin. *Vaccine* 33, 4663–4674.

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.

## F

Fairfax, K.C., Everts, B., Amiel, E., Smith, A.M., Schramm, G., Haas, H., Randolph, G.J., Taylor, J.J., and Pearce, E.J. (2015). IL-4-Secreting Secondary T Follicular Helper (Tfh) Cells Arise from Memory T Cells, Not Persisting Tfh Cells, through a B Cell-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* 194, 2999–3010.

Fausther-Bovendo, H., Vieillard, V., Sagan, S., Bismuth, G., and Debré, P. (2010). HIV gp41 Engages gC1qR on CD4+ T Cells to Induce the Expression of an NK Ligand through the PIP3/H2O2 Pathway. *PLoS Pathog.* 6, e1000975.

Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J., Rosen, H., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat. Immunol.* 10, 375–384.

Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G.A., Li, J., Mottram, P.L., McKenzie, I.F.C., and Plebanski, M. (2004). Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors. *J. Immunol.* 173, 3148–3154.

Flacher, V., Douillard, P., Aït-Yahia, S., Stoitzner, P., Clair-Moninot, V., Romani, N., and Saeland, S. (2008). Expression of Langerin/CD207 reveals dendritic cell heterogeneity between inbred mouse strains. *Immunology* 123, 339–347.

Flacher, V., Tripp, C.H., Stoitzner, P., Haid, B., Ebner, S., Del Frari, B., Koch, F., Park, C.G., Steinman, R.M., Idoyaga, J., et al. (2010). Epidermal Langerhans cells rapidly capture and present antigens from C-type lectin-targeting antibodies deposited in the dermis. *J. Invest. Dermatol.* 130, 755–762.

Flacher, V., Tripp, C.H., Mairhofer, D.G., Steinman, R.M., Stoitzner, P., Idoyaga, J., and Romani, N. (2014). Murine Langerin+ dermal dendritic cells prime CD8+ T cells while Langerhans cells induce cross-tolerance. *EMBO Mol. Med.* 6, 1191–1204.

Foged, C., Brodin, B., Frokjaer, S., and Sundblad, A. (2005). Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int. J. Pharm.* 298, 315–322.

Förster, R., Braun, A., and Worbs, T. (2012). Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends Immunol.* 33, 271–280.

Fujita, H., Nograles, K.E., Kikuchi, T., Gonzalez, J., Carucci, J.A., and Krueger, J.G. (2009). Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Furio, L., Briotet, I., Journeaux, A., Billard, H., and Péguet-Navarro, J. (2010). Human Langerhans Cells Are More Efficient Than CD14+ CD1c+ Dermal Dendritic Cells at Priming Naive CD4+ T Cells. *J. Invest. Dermatol.* 130, 1345–1354.

## G

Gerner, M.Y., Kastenmuller, W., Ifrim, I., Kabat, J., and Germain, R.N. (2012). Histo-Cytometry: A Method for Highly Multiplex Quantitative Tissue Imaging Analysis Applied to Dendritic Cell Subset Microanatomy in Lymph Nodes. *Immunity* 37, 364–376.

Gerner, M.Y., Torabi-Parizi, P., and Germain, R.N. (2015). Strategically Localized Dendritic Cells Promote Rapid T Cell Responses to Lymph-Borne Particulate Antigens. *Immunity* 42, 172–185.



- Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubeau, M., Dai, X.M., Stanley, E.R., Randolph, G.J., and Merad, M. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat. Immunol.* 7.
- 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.
- Girard, J.-P., Moussion, C., and Förster, R. (2012). HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 762–773.
- Gitlin, A.D., Mayer, C.T., Oliveira, T.Y., Shulman, Z., Jones, M.J.K., Koren, A., and Nussenzweig, M.C. (2015). T cell help controls the speed of the cell cycle in germinal center B cells. *Science* 349, 643–646.
- Gitlin, A.D., von Boehmer, L., Gazumyan, A., Shulman, Z., Oliveira, T.Y., and Nussenzweig, M.C. (2016). Independent Roles of Switching and Hypermutation in the Development and Persistence of B Lymphocyte Memory. *Immunity* 44, 769–781.
- Glasmacher, E., Hoefig, K.P., Vogel, K.U., Rath, N., Du, L., Wolf, C., Kremmer, E., Wang, X., and Heissmeyer, V. (2010). Roquin binds inducible costimulator mRNA and effectors of mRNA decay to induce microRNA-independent post-transcriptional repression. *Nat. Immunol.* 11, 725–733.
- Glenn, G.M., Scharton-Kersten, T., Vassell, R., Mallett, C.P., Hale, T.L., and Alving, C.R. (1998). Cutting edge: transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. *J. Immunol.* 161, 3211–3214.
- Glenn, G.M., Taylor, D.N., Li, X., Frankel, S., Montemarano, A., and Alving, C.R. (2000). Transcutaneous immunization: a human vaccine delivery strategy using a patch. *Nat. Med.* 6, 1403–1406.
- 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.
- Gomez de Agüero, M., Vocanson, M., Hacini-Rachinel, F., Taillardet, M., Sparwasser, T., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaiserlian, D., and Dubois, B. (2012). Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8+ T cells and activating Foxp3+ regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 122, 1700–1711.
- Gonzalez, S.F., Lukacs-Kornek, V., Kuligowski, M.P., Pitcher, L.A., Degen, S.E., Kim, Y.-A., Cloninger, M.J., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., Turley, S.J., et al. (2010). Capture of influenza by medullary dendritic cells via SIGN-R1 is essential for humoral immunity in draining lymph nodes. *Nat. Immunol.* 11, 427–434.
- 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.
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moro, G., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat. Immunol.* 2, 882–888.
- Guilliams, M., Crozat, K., Henri, S., Tamoutounour, S., Grenot, P., Devilard, E., de Bovis, B., Alexopoulou, L., Dalod, M., and Malissen, B. (2010). Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103- dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3+ regulatory T cells. *Blood* 115, 1958–1968.
- Guillon, C., Mayol, K., Terrat, C., Compagnon, C., Primard, C., Charles, M.-H., Delair, T., Munier, S., and Verrier, B. (2007). 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* 25, 7491–7501.
- Gunn, M.D., Ngo, V.N., Ansel, K.M., Ekland, E.H., Cyster, J.G., and Williams, L.T. (1998). A B-cell-

homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* *391*, 799–803.

Gupta, J., Gill, H.S., Andrews, S.N., and Prausnitz, M.R. (2011). Kinetics of skin resealing after insertion of microneedles in human subjects. *J. Controlled Release* *154*, 148–155.

Guy, B. (2007). The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 505–517.

## H

Hale, J.S., and Ahmed, R. (2015). Memory T Follicular Helper CD4 T Cells. *Front. Immunol.* *6*.

Hale, J.S., Youngblood, B., Latner, D.R., Mohammed, A.U.R., Ye, L., Akondy, R.S., Wu, T., Iyer, S.S., and Ahmed, R. (2013). Distinct Memory CD4<sup>+</sup> T Cells with Commitment to T Follicular Helper- and T Helper 1-Cell Lineages Are Generated after Acute Viral Infection. *Immunity* *38*, 805–817.

Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.-N., Malinarich, F., Malleret, B., et al. (2012). Human Tissues Contain CD141<sup>hi</sup> Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103<sup>+</sup> Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity* *37*, 60–73.

Haniffa, M., Gunawan, M., and Jardine, L. (2015). Human skin dendritic cells in health and disease. *J. Dermatol. Sci.* *77*, 85–92.

Hartung, E., Becker, M., Bachem, A., Reeg, N., Jakel, A., Hutloff, A., Weber, H., Weise, C., Giesecke, C., Henn, V., et al. (2015). Induction of Potent CD8 T Cell Cytotoxicity by Specific Targeting of Antigen to Cross-Presenting Dendritic Cells In Vivo via Murine or Human XCR1. *J. Immunol.* *194*, 1069–1079.

Hashimoto, D., Miller, J., and Merad, M. (2011). Dendritic Cell and Macrophage Heterogeneity In Vivo. *Immunity* *35*, 323–335.

Hatzi, K., Nance, J.P., Kroenke, M.A., Bothwell, M., Haddad, E.K., Melnick, A., and Crotty, S. (2015). BCL6 orchestrates Tfh cell differentiation via multiple distinct mechanisms. *J. Exp. Med.* *212*, 539–553.

Haynes, B.F., and Verkoczy, L. (2014). Host Controls of HIV Neutralizing Antibodies. *Science* *344*, 586–588.

Haynes, N.M., Allen, C.D.C., Lesley, R., Ansel, K.M., Killeen, N., and Cyster, J.G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and Appearance of a Programmed Cell Death Gene-1<sup>High</sup> Germinal Center-Associated Subpopulation. *J. Immunol.* *179*, 5099–5108.

He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., and Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* *31*, 3657–3666.

Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2013). The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat. Immunol.* *14*, 978–985.

Henri, S., and Poulin, L.F. (2010). CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* *207*, 189–206.

Herati, R.S., Reuter, M.A., Dolfi, D.V., Mansfield, K.D., Aung, H., Badwan, O.Z., Kurupati, R.K., Kannan, S., Ertl, H., Schmader, K.E., et al. (2014). Circulating CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> Response Predicts Influenza Vaccine Antibody Responses in Young Adults but not Elderly Adults. *J. Immunol.* *193*, 3528–3537.

Heuzé, M.L., Vargas, P., Chabaud, M., Berre, M., Liu, Y.-J., Collin, O., Solanes, P., Voituriez, R., Piel, M., and Lennon-Duménil, A.-M. (2013). Migration of dendritic cells: physical principles, molecular mechanisms, and functional implications. *Immunol. Rev.* *256*, 240–254.

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role

for CD8a+ Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Science* 322, 1097–1100.

Hirobe, S., Azukizawa, H., Hanafusa, T., Matsuo, K., Quan, Y.-S., Kamiyama, F., Katayama, I., Okada, N., and Nakagawa, S. (2015). Clinical study and stability assessment of a novel transcutaneous influenza vaccination using a dissolving microneedle patch. *Biomaterials* 57, 50–58.

Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., et al. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 209, 1167–1181.

Hollister, K., Kusam, S., Wu, H., Clegg, N., Mondal, A., Sawant, D.V., and Dent, A.L. (2013). Insights into the Role of Bcl6 in Follicular Th Cells Using a New Conditional Mutant Mouse Model. *J. Immunol.* 191, 3705–3711.

Hunger, R.E., Sieling, P.A., Ochoa, M.T., Sugaya, M., Burdick, A.E., Rea, T.H., Brennan, P.J., Belisle, J.T., Blauvelt, A., Porcelli, S.A., et al. (2004). Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J. Clin. Invest.* 113, 701–708.

Huret, C., Desjardins, D., Miyalou, M., Levacher, B., Amadoudji Zin, M., Bonduelle, O., Combadière, B., Dalba, C., Klatzmann, D., and Bellier, B. (2013). Recombinant retrovirus-derived virus-like particle-based vaccines induce hepatitis C virus-specific cellular and neutralizing immune responses in mice. *Vaccine* 31, 1540–1547.

## I

Idoyaga, J., Fiorese, C., Zbytniuk, L., Lubkin, A., Miller, J., Malissen, B., Mucida, D., Merad, M., and Steinman, R.M. (2013). Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J. Clin. Invest.*

Iezzi, G., Frohlich, A., Ernst, B., Ampenberger, F., Saeland, S., Glaichenhaus, N., and Kopf, M. (2006). Lymph Node Resident Rather Than Skin-Derived Dendritic Cells Initiate Specific T Cell Responses after *Leishmania major* Infection. *J. Immunol.* 177, 1250–1256.

Igyártó, B.Z., and Kaplan, D.H. (2013). Antigen presentation by Langerhans cells. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 115–119.

Igyarto, B.Z., Jenison, M.C., Dudda, J.C., Roers, A., Muller, W., Koni, P.A., Campbell, D.J., Shlomchik, M.J., and Kaplan, D.H. (2009). Langerhans Cells Suppress Contact Hypersensitivity Responses Via Cognate CD4 Interaction and Langerhans Cell-Derived IL-10. *J. Immunol.* 183, 5085–5093.

Igyártó, B.Z., Haley, K., Ortner, D., Bobr, A., Gerami-Nejad, M., Edelson, B.T., Zurawski, S.M., Malissen, B., Zurawski, G., Berman, J., et al. (2011). Skin-Resident Murine Dendritic Cell Subsets Promote Distinct and Opposing Antigen-Specific T Helper Cell Responses. *Immunity* 35, 260–272.

Ise, W., Inoue, T., McLachlan, J.B., Kometani, K., Kubo, M., Okada, T., and Kurosaki, T. (2014). Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression by memory follicular helper T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 11792–11797.

Italiani, P., and Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* 5.

Itano, A.A., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Ehst, B.D., Ingulli, E., Rudensky, A.Y., and Jenkins, M.K. (2003). Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 19, 47–57.

## J

Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, E.S., Dumortier, H., et al. (2015). OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* 42, 1159–1170.

Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., et al. (2013). Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They

Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes. *Immunity* 39, 599–610.

Jeong, H.-R., Lee, H.-S., Choi, I.-J., and Park, J.-H. (2016). Considerations in the use of microneedles: pain, convenience, anxiety and safety. *J. Drug Target.* 1–12.

Jiao, Z., Bedoui, S., Brady, J.L., Walter, A., Chopin, M., Carrington, E.M., Sutherland, R.M., Nutt, S.L., Zhang, Y., Ko, H.-J., et al. (2014). The Closely Related CD103+ Dendritic Cells (DCs) and Lymphoid-Resident CD8+ DCs Differ in Their Inflammatory Functions. *PLoS ONE* 9, e91126.

Johnson, L.A., Clasper, S., Holt, A.P., Lalor, P.F., Baban, D., and Jackson, D.G. (2006). An inflammation-induced mechanism for leukocyte transmigration across lymphatic vessel endothelium. *J. Exp. Med.* 203, 2763–2777.

Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 325, 1006–1010.

Johnston, R.J., Choi, Y.S., Diamond, J.A., Yang, J.A., and Crotty, S. (2012). STAT5 is a potent negative regulator of T<sub>FH</sub> cell differentiation. *J. Exp. Med.* 209, 243–250.

Joshi, V.B., Geary, S.M., and Salem, A.K. (2013). Biodegradable Particles as Vaccine Delivery Systems: Size Matters. *AAPS J.* 15, 85–94.

Junt, T., Moseman, E.A., Iannaccone, M., Massberg, S., Lang, P.A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S.E., Shayakhmetov, D.M., Di Paolo, N.C., et al. (2007). Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* 450, 110–114.

## K

Kalams, S.A., Parker, S.D., Elizaga, M., Metch, B., Edupuganti, S., Hural, J., De Rosa, S., Carter, D.K., Rybczyk, K., Frank, I., et al. (2013). Safety and Comparative Immunogenicity of an HIV-1 DNA Vaccine in Combination with Plasmid Interleukin 12 and Impact of Intramuscular Electroporation for Delivery. *J. Infect. Dis.* 208, 818–829.

Kang, S.G., Liu, W.-H., Lu, P., Jin, H.Y., Lim, H.W., Shepherd, J., Fremgen, D., Verdin, E., Oldstone, M.B.A., Qi, H., et al. (2013). MicroRNAs of the miR-17~92 family are critical regulators of TFH differentiation. *Nat. Immunol.* 14, 849–857.

Kanitakis, J., Morelon, E., Petruzzo, P., Badet, L., and Dubernard, J.-M. (2011). Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft: Letter to the Editor. *Exp. Dermatol.* 20, 145–146.

Karnowski, A., Chevrier, S., Belz, G.T., Mount, A., Emslie, D., D’Costa, K., Tarlinton, D.M., Kallies, A., and Corcoran, L.M. (2012). 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.* 209, 2049–2064.

Kashem, S.W., Riedl, M.S., Yao, C., Honda, C.N., Vulchanova, L., and Kaplan, D.H. (2015). Nociceptive Sensory Fibers Drive Interleukin-23 Production from CD301b+ Dermal Dendritic Cells and Drive Protective Cutaneous Immunity. *Immunity* 43, 515–526.

Kato, Y., Zaid, A., Davey, G.M., Mueller, S.N., Nutt, S.L., Zotos, D., Tarlinton, D.M., Shortman, K., Lahoud, M.H., Heath, W.R., et al. (2015). Targeting Antigen to Clec9A Primes Follicular Th Cell Memory Responses Capable of Robust Recall. *J. Immunol.* 195, 1006–1014.

Kaushik, S., Hord, A.H., Denson, D.D., McAllister, D.V., Smitra, S., Allen, M.G., and Prausnitz, M.R. (2001). Lack of pain associated with microfabricated microneedles. *Anesth. Analg.* 92, 502–504.

Kautz-Neu, K., Noordegraaf, M., Dinges, S., Bennett, C.L., John, D., Clausen, B.E., and von Stebut, E. (2011). Langerhans cells are negative regulators of the anti-Leishmania response. *J. Exp. Med.* 208, 885–891.

Kel, J.M., Girard-Madoux, M.J.H., Reizis, B., and Clausen, B.E. (2010). TGF- $\beta$  Is Required To Maintain the Pool of Immature Langerhans Cells in the Epidermis. *J. Immunol.* 185, 3248–3255.

- Kenney, R.T., Frech, S.A., Muenz, L.R., Villar, C.P., and Glenn, G.M. (2004). Dose sparing with intradermal injection of influenza vaccine. *N. Engl. J. Med.* *351*, 2295–2301.
- Khan, A.R., Hams, E., Floudas, A., Sparwasser, T., Weaver, C.T., and Fallon, P.G. (2015). PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat. Commun.* *6*, 5997.
- Kim, C.H., Rott, L.S., Clark-Lewis, I., Campbell, D.J., Wu, L., and Butcher, E.C. (2001). Subspecialization of Cxcr5+ T Cells B Helper Activity Is Focused in a Germinal Center–Localized Subset of Cxcr5+ T Cells. *J. Exp. Med.* *193*, 1373–1382.
- Kim, H.-J., Verbinnen, B., Tang, X., Lu, L., and Cantor, H. (2010). Inhibition of follicular T-helper cells by CD8+ regulatory T cells is essential for self tolerance. *Nature* *467*, 328–332.
- Kim, S.J., Zou, Y.R., Goldstein, J., Reizis, B., and Diamond, B. (2011). Tolerogenic function of Blimp-1 in dendritic cells. *J. Exp. Med.* *208*, 2193–2199.
- King, I.L., Kroenke, M.A., and Segal, B.M. (2010). GM-CSF-dependent, CD103+ dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization. *J. Exp. Med.* *207*, 953–961.
- Kissenpennig, 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.
- Kitajima, M., and Ziegler, S.F. (2013). Cutting Edge: Identification of the Thymic Stromal Lymphopoietin-Responsive Dendritic Cell Subset Critical for Initiation of Type 2 Contact Hypersensitivity. *J. Immunol.* *191*, 4903–4907.
- Kitano, M., Yamazaki, C., Takumi, A., Ikeno, T., Hemmi, H., Takahashi, N., Shimizu, K., Fraser, S.E., Hoshino, K., Kaisho, T., et al. (2016). Imaging of the cross-presenting dendritic cell subsets in the skin-draining lymph node. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 1044–1049.
- Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A.K., et al. (2008). Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells and CD14+ Dermal Dendritic Cells. *Immunity* *29*, 497–510.
- Kolarsick, P.A., Kolarsick, M.A., and Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *J. Dermatol. Nurses Assoc.* *3*, 203–213.
- Kreutz, M., Tacke, P.J., and Figdor, C.G. (2013). Targeting dendritic cells—why bother? *Blood* *121*, 2836–2844.
- Kroenke, M.A., Eto, D., Locci, M., Cho, M., Davidson, T., Haddad, E.K., and Crotty, S. (2012). Bcl6 and Maf Cooperate To Instruct Human Follicular Helper CD4 T Cell Differentiation. *J. Immunol.* *188*, 3734–3744.
- Kubo, A., Nagao, K., Yokouchi, M., Sasaki, H., and Amagai, M. (2009). External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J. Exp. Med.* *206*, 2937–2946.
- 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.
- Kumamoto, Y., Hirai, T., Wong, P.W., Kaplan, D.H., and Iwasaki, A. (2016). CD301b+ dendritic cells suppress T follicular helper cells and antibody responses to protein antigens. *eLife* *5*, e17979.
- Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 149–159.

## L

- Lahoud, M.H., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Wan, S.S., Vremec, D., Lee, C.-N., Phipson, B., Shi, W., Smyth, G.K., Lew, A.M., et al. (2011). Targeting Antigen to Mouse Dendritic Cells via Clec9A Induces Potent CD4 T Cell Responses Biased toward a Follicular Helper Phenotype. *J. Immunol.* *187*, 842–850.

- Lai, R.P.J., Seaman, M.S., Tonks, P., Wegmann, F., Seilly, D.J., Frost, S.D.W., LaBranche, C.C., Montefiori, D.C., Dey, A.K., Srivastava, I.K., et al. (2012). Mixed Adjuvant Formulations Reveal a New Combination That Elicit Antibody Response Comparable to Freund's Adjuvants. *PLoS ONE* 7, e35083.
- Lamalle-Bernard, D., Munier, S., Compagnon, C., Charles, M.-H., Kalyanaraman, V.S., Delair, T., Verrier, B., and Ataman-Önal, Y. (2006). Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. *J. Controlled Release* 115, 57–67.
- Lambert, P.H., and Laurent, P.E. (2008). Intradermal vaccine delivery: Will new delivery systems transform vaccine administration? *Vaccine* 26, 3197–3208.
- Lebre, M.C., van der Aar, A.M., van Baarsen, L., van Capel, T.M., Schuitemaker, J.H., Kapsenberg, M.L., and de Jong, E.C. (2006). Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J. Invest. Dermatol.* 127, 331–341.
- Lee, H.K., Zamora, M., Linehan, M.M., Iijima, N., Gonzalez, D., Haberman, A., and Iwasaki, A. (2009). Differential roles of migratory and resident DCs in T cell priming after mucosal or skin HSV-1 infection. *J. Exp. Med.* 206, 359–370.
- Lee, J.-Y., Skon, C.N., Lee, Y.J., Oh, S., Taylor, J.J., Malhotra, D., Jenkins, M.K., Rosenfeld, M.G., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2015). The Transcription Factor KLF2 Restrains CD4+ T Follicular Helper Cell Differentiation. *Immunity* 42, 252–264.
- León, B., López-Bravo, M., and Ardavín, C. (2007). Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania. *Immunity* 26, 519–531.
- Levin, C., Perrin, H., and Combadiere, B. (2015). Tailored immunity by skin antigen-presenting cells. *Hum. Vaccines Immunother.* 11, 22–21.
- Li, J., Lu, E., Yi, T., and Cyster, J.G. (2016). EB12 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-quenching dendritic cells. *Nature* 533, 110–114.
- 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.
- Liard, C., Munier, S., Joulin-Giet, A., Bonduelle, O., Hadam, S., Duffy, D., Vogt, A., Verrier, B., and Combadière, B. (2012). Intradermal immunization triggers epidermal Langerhans cell mobilization required for CD8 T-cell immune responses. *J. Invest. Dermatol.* 132, 615–625.
- Linterman, M.A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R.R., Srivastava, M., Hogan, J.J., Verma, N.K., Smyth, M.J., Rigby, R.J., and Vinuesa, C.G. (2010). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J. Exp. Med.* 207, 353–363.
- Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* 17, 975–982.
- Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D., and Qi, H. (2014). T–B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature* 517, 214–218.
- Liu, X., Yan, X., Zhong, B., Nurieva, R.I., Wang, A., Wang, X., Martin-Orozco, N., Wang, Y., Chang, S.H., Esplugues, E., et al. (2012). Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo. *J. Exp. Med.* 209, 1841–1852.
- Liu, X., Lu, H., Chen, T., Nallaparaju, K.C., Yan, X., Tanaka, S., Ichiyama, K., Zhang, X., Zhang, L., Wen, X., et al. (2016). Genome-wide Analysis Identifies Bcl6-Controlled Regulatory Networks during T Follicular Helper Cell Differentiation. *Cell Rep.*
- Locci, M., Havenar-Daughton, C., Landais, E., Wu, J., Kroenke, M.A., Arlehamn, C.L., Su, L.F.,

Cubas, R., Davis, M.M., Sette, A., et al. (2013). Human Circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ Memory Tfh Cells Are Highly Functional and Correlate with Broadly Neutralizing HIV Antibody Responses. *Immunity* 39, 758–769.

Lofano, G., Mancini, F., Salvatore, G., Cantisani, R., Monaci, E., Carrisi, C., Tavarini, S., Sammicheli, C., Rossi Paccani, S., Soldaini, E., et al. (2015). Oil-in-Water Emulsion MF59 Increases Germinal Center B Cell Differentiation and Persistence in Response to Vaccination. *J. Immunol.* 195, 1617–1627.

## M

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

MacLennan, I., Toellner, K.-M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M.-Y., Zúñiga, E., Cook, M.C., and Vinuesa, C.G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 194, 8–18.

Macri, C., Dumont, C., Johnston, A.P., and Mintern, J.D. (2016). Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness. *Clin. Transl. Immunol.* 5, e66.

Mahe, B., Vogt, A., Liard, C., Duffy, D., Abadie, V., Bonduelle, O., Boissonnas, A., Sterry, W., Verrier, B., Blume-Peytavi, U., et al. (2009). Nanoparticle-based targeting of vaccine compounds to skin antigen-presenting cells by hair follicles and their transport in mice. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1156–1164.

Malissen, B., Tamoutounour, S., and Henri, S. (2014). The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 417–428.

Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., and Bachmann, M.F. (2008). Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur. J. Immunol.* 38, 1404–1413.

Martín-Fontecha, A., Sebastiani, S., Höpken, U.E., Uguccioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2003). Regulation of Dendritic Cell Migration to the Draining Lymph Node: Impact on T Lymphocyte Traffic and Priming. *J. Exp. Med.* 198, 615–621.

Martin-Fontecha, A., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, p.

Martins, K.A.O., Cooper, C.L., Stronsky, S.M., Norris, S.L.W., Kwilas, S.A., Steffens, J.T., Benko, J.G., van Tongeren, S.A., and Bavari, S. (2016). Adjuvant-enhanced CD4 T Cell Responses are Critical to Durable Vaccine Immunity. *EBioMedicine* 3, 67–78.

Mastelic Gavillet, B., Eberhardt, C.S., Auderset, F., Castellino, F., Seubert, A., Tregoning, J.S., Lambert, P.-H., de Gregorio, E., Del Giudice, G., and Siegrist, C.-A. (2015). MF59 Mediates Its B Cell Adjuvanticity by Promoting T Follicular Helper Cells and Thus Germinal Center Responses in Adult and Early Life. *J. Immunol.* 194, 4836–4845.

Mathers, A.R., Janelsins, B.M., Rubin, J.P., Tkacheva, O.A., Shufesky, W.J., Watkins, S.C., Morelli, A.E., and Larregina, A.T. (2009). Differential Capability of Human Cutaneous Dendritic Cell Subsets to Initiate Th17 Responses. *J. Immunol.* 182, 921–933.

McDonald, P.W., Read, K.A., Baker, C.E., Anderson, A.E., Powell, M.D., Ballesteros-Tato, A., and Oestreich, K.J. (2016). IL-7 signalling represses Bcl-6 and the TFH gene program. *Nat. Commun.* 7, 10285.

McGovern, N., Schlitzer, A., Gunawan, M., Jardine, L., Shin, A., Poyner, E., Green, K., Dickinson, R., Wang, X., Low, D., et al. (2014). Human Dermal CD14+ Cells Are a Transient Population of Monocyte-Derived Macrophages. *Immunity* 41, 465–477.

McHeyzer-Williams, L.J., Milpied, P.J., Okitsu, S.L., and McHeyzer-Williams, M.G. (2015). Class-switched memory B cells remodel BCRs within secondary germinal centers. *Nat. Immunol.* 16, 296–

305.

Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I.L., Cyster, J.G., and Engleman, E.G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol.* *3*.

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.

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 563–604.

Mesin, L., Ersching, J., and Victora, G.D. (2016). Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* *45*, 471–482.

Miles, B., Miller, S.M., Folkvord, J.M., Kimball, A., Chamanian, M., Meditz, A.L., Arends, T., McCarter, M.D., Levy, D.N., Rakasz, E.G., et al. (2015). Follicular regulatory T cells impair follicular T helper cells in HIV and SIV infection. *Nat. Commun.* *6*, 8608.

Miller, J. (1965). Effect of thymectomy in adult mice on immunological responsiveness. *Nature* *208*, 1337–1338.

Mitragotri, S. (2005). Immunization without needles. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 905–916.

Mollah, S.A., Dobrin, J.S., Feder, R.E., Tse, S.-W., Matos, I.G., Cheong, C., Steinman, R.M., and Anandasabapathy, N. (2013). Flt3L Dependence Helps Define an Uncharacterized Subset of Murine Cutaneous Dendritic Cells. *J. Invest. Dermatol.* *134*, 1265–1275.

Moon, J.J., Suh, H., Li, A.V., Ockenhouse, C.F., Yadava, A., and Irvine, D.J. (2012). Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines that expand Tfh cells and promote germinal center induction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 1080–1085.

Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., et al. (2011). Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity* *34*, 108–121.

Murakami, R., Denda-Nagai, K., Hashimoto, S., Nagai, S., Hattori, M., and Irimura, T. (2013). A Unique Dermal Dendritic Cell Subset That Skews the Immune Response toward Th2. *PLoS ONE* *8*, e73270.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* *102*, 553–563.

## N

Nagao, K., Ginhoux, F., Leitner, W.W., Motegi, S.-I., Bennett, C.L., Clausen, B.E., Merad, M., and Udey, M.C. (2009). Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 3312–3317.

Nagao, K., Kobayashi, T., Moro, K., Ohyama, M., Adachi, T., Kitashima, D.Y., Ueha, S., Horiuchi, K., Tanizaki, H., Kabashima, K., et al. (2012). Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nat. Immunol.* *13*, 744–752.

Nakajima, S., Igyártó, B.Z., Honda, T., Egawa, G., Otsuka, A., Hara-Chikuma, M., Watanabe, N., Ziegler, S.F., Tomura, M., Inaba, K., et al. (2012). Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 1048–1055.e6.

Nakano, H., Lin, K.L., Yanagita, M., Charbonneau, C., Cook, D.N., Kakiuchi, T., and Gunn, M.D. (2009). Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat. Immunol.* *10*, 394–402.



Nestle, F.O., Zheng, X.G., Thompson, C.B., Turka, L.A., and Nickoloff, B.J. (1993). Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J. Immunol.* *151*, 6535–6545.

Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., and Nickoloff, B.J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 679–691.

Netea, M.G., Latz, E., Mills, K.H., and O’Neill, L.A. (2015). Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense. *Nat. Immunol.* *16*, 675–679.

Netea, M.G., Joosten, L.A.B., Latz, E., Mills, K.H.G., Natoli, G., Stunnenberg, H.G., O’Neill, L.A.J., and Xavier, R.J. (2016). Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* *352*, aaf1098-aaf1098.

Nickoloff, B.J., and Turka, L.A. (1994). Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol. Today* *15*, 464–469.

Nishibu, A., Ward, B.R., Jester, J.V., Ploegh, H.L., Boes, M., and Takashima, A. (2006). Behavioral responses of epidermal Langerhans cells in situ to local pathological stimuli. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 787–796.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y., and Dong, C. (2009). Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. *Science* *325*, 1001–1005.

Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., and Corcoran, L.M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 160–171.

## O

Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., and Förster, R. (2004). CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* *21*, 279–288.

O’Shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells. *Science* *327*, 1098–1102.

Ouwehand, K., Santegoets, S.J.A.M., Bruynzeel, D.P., Scheper, R.J., de Gruijl, T.D., and Gibbs, S. (2008). CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis. *Eur. J. Immunol.* *38*, 3050–3059.

Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.-P., Wang, G., Qi, C.-F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akilesh, S., Roopenian, D.C., et al. (2004). Regulation of B Cell Differentiation and Plasma Cell Generation by IL-21, a Novel Inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J. Immunol.* *173*, 5361–5371.

## P

Palframan, R.T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., Littman, D.R., Rollins, B.J., Zweerink, H., Rot, A., et al. (2001). Inflammatory Chemokine Transport and Presentation in HEV A Remote Control Mechanism for Monocyte Recruitment to Lymph Nodes in Inflamed Tissues. *J. Exp. Med.* *194*, 1361–1374.

Pape, K.A., Catron, D.M., Itano, A.A., and Jenkins, M.K. (2007). The Humoral Immune Response Is Initiated in Lymph Nodes by B Cells that Acquire Soluble Antigen Directly in the Follicles. *Immunity* *26*, 491–502.

Pasparakis, M., Haase, I., and Nestle, F.O. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*

Paus, D., Phan, T.G., Chan, T.D., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. (2006). Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J. Exp. Med.* *203*, 1081–1091.

Pavot, V., Climent, N., Rochereau, N., Garcia, F., Genin, C., Tiraby, G., Vernejoul, F., Perouzel, E., Lioux, T., Verrier, B., et al. (2016). Directing vaccine immune responses to mucosa by nanosized particulate carriers encapsulating NOD ligands. *Biomaterials* 75, 327–339.

Pelletier, N., McHeyzer-Williams, L.J., Wong, K.A., Ulrich, E., Fazilleau, N., and McHeyzer-Williams, M.G. (2010). Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nat. Immunol.* 11, 1110–1118.

Petitdemange, C., Achour, A., Dispinseri, S., Malet, I., Sennepin, A., Fang, R.H.T., Crouzet, J., Marcelin, A.-G., Calvez, V., Scarlatti, G., et al. (2013). A Single Amino-Acid Change in a Highly Conserved Motif of gp41 Elicits HIV-1 Neutralization and Protects Against CD4 Depletion. *Clin. Infect. Dis.* 57, 745–755.

Phan, T.G., Paus, D., Chan, T.D., Turner, M.L., Nutt, S.L., Basten, A., and Brink, R. (2006). High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J. Exp. Med.* 203, 2419–2424.

Picarda, G., Cheneau, C., Humbert, J.-M., Beriou, G., Pilet, P., Martin, J., Duteille, F., Perrot, P., Bellier-Waast, F., Heslan, M., et al. (2016). Functional Langerinhigh-Expressing Langerhans-like Cells Can Arise from CD14highCD16- Human Blood Monocytes in Serum-Free Condition. *J. Immunol.* 196, 3716–3728.

Poulin, L.F., Henri, S., de Bovis, B., Devillard, E., Kissenpfennig, A., and Malissen, B. (2007). The dermis contains langerin<sup>+</sup> dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 204, 3119–3131.

Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 17, 1063–1072.

## Q

Qi, H. (2016). T follicular helper cells in space-time. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 612–625.

Qi, H., Cannons, J.L., Klauschen, F., Schwartzberg, P.L., and Germain, R.N. (2008). SAP-controlled T–B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 455, 764–769.

Qu, C. (2004). Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J Exp Med* 200, 1231–1241.

Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., et al. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332, 600–603.

## R

Radtke, A.J., Kastenmüller, W., Espinosa, D.A., Gerner, M.Y., Tse, S.-W., Sinnis, P., Germain, R.N., Zavala, F.P., and Cockburn, I.A. (2015). Lymph-Node Resident CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Dendritic Cells Capture Antigens from Migratory Malaria Sporozoites and Induce CD8<sup>+</sup> T Cell Responses. *PLOS Pathog.* 11, e1004637.

Rancan, F., Amselgruber, S., Hadam, S., Munier, S., Pavot, V., Verrier, B., Hackbarth, S., Combadiere, B., Blume-Peytavi, U., and Vogt, A. (2014). Particle-based transcutaneous administration of HIV-1 p24 protein to human skin explants and targeting of epidermal antigen presenting cells. *J. Controlled Release* 176, 115–122.

Randolph, G.J., Ochando, J., and Partida-Sánchez, S. (2008). Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 293–316.

Ray, J.P., Marshall, H.D., Laidlaw, B.J., Staron, M.M., Kaech, S.M., and Craft, J. (2014). Transcription Factor STAT3 and Type I Interferons Are Corepressive Insulators for Differentiation of Follicular Helper and T Helper 1 Cells. *Immunity*.

Reddy, S.T., Rehor, A., Schmoekel, H.G., Hubbell, J.A., and Swartz, M.A. (2006). In vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly(propylene sulfide) nanoparticles. *J. Controlled Release* 112,

26–34.

Reddy, S.T., van der Vlies, A.J., Simeoni, E., Angeli, V., Randolph, G.J., O’Neil, C.P., Lee, L.K., Swartz, M.A., and Hubbell, J.A. (2007). Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat. Biotechnol.* *25*, 1159–1164.

Redecke, V., Hacker, H., Datta, S.K., Fermin, A., Pitha, P.M., Broide, D.H., and Raz, E. (2004). Cutting Edge: Activation of Toll-Like Receptor 2 Induces a Th2 Immune Response and Promotes Experimental Asthma. *J. Immunol.* *172*, 2739–2743.

Reed, S.G., Orr, M.T., and Fox, C.B. (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat. Med.* *19*, 1597–1608.

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.

Reuter, A., Panozza, S.E., Macri, C., Dumont, C., Li, J., Liu, H., Segura, E., Vega-Ramos, J., Gupta, N., Caminschi, I., et al. (2015). Criteria for Dendritic Cell Receptor Selection for Efficient Antibody-Targeted Vaccination. *J. Immunol.* *194*, 2696–2705.

Riol-Blanco, L., Ordovas-Montanes, J., Perro, M., Naval, E., Thiriout, A., Alvarez, D., Paust, S., Wood, J.N., and von Andrian, U.H. (2014). Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature* *510*, 157–161.

Romani, N., Flacher, V., Tripp, C.H., Sparber, F., Ebner, S., and Stoitzner, P. (2012). Targeting Skin Dendritic Cells to Improve Intradermal Vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* *351*, 113–138.

Rookhuizen, D.C., and DeFranco, A.L. (2014). Toll-like receptor 9 signaling acts on multiple elements of the germinal center to enhance antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, E3224–E3233.

## S

Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2015). T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends Immunol.* *36*, 410–418.

Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2016). T follicular regulatory cells. *Immunol. Rev.* *271*, 246–259.

Sage, P.T., Francisco, L.M., Carman, C.V., and Sharpe, A.H. (2012). The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat. Immunol.* *14*, 152–161.

Sage, P.T., Paterson, A.M., Lovitch, S.B., and Sharpe, A.H. (2014). The Coinhibitory Receptor CTLA-4 Controls B Cell Responses by Modulating T Follicular Helper, T Follicular Regulatory, and T Regulatory Cells. *Immunity* *41*, 1026–1039.

Sage, P.T., Ron-Harel, N., Juneja, V.R., Sen, D.R., Maleri, S., Sungnak, W., Kuchroo, V.K., Haining, W.N., Chevrier, N., Haigis, M., et al. (2016). Suppression by TFR cells leads to durable and selective inhibition of B cell effector function. *Nat. Immunol.*

Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A.B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J. Exp. Med.* *192*, 1553–1562.

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

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

Schmitt, N., Bustamante, J., Bourdery, L., Bentebibel, S.E., Boisson-Dupuis, S., Hamlin, F., Tran, M.V., Blankenship, D., Pascual, V., Savino, D.A., et al. (2013). IL-12 receptor 1 deficiency alters in vivo T follicular helper cell response in humans. *Blood* *121*, 3375–3385.

- Schmitt, N., Liu, Y., Bentebibel, S.-E., Munagala, I., Bourdery, L., Venuprasad, K., Banchereau, J., and Ueno, H. (2014a). The cytokine TGF- $\beta$  co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nat. Immunol.* *15*, 856–865.
- Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., and Ueno, H. (2014b). Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol.* *35*, 436–442.
- Schmitt, N., Liu, Y., Bentebibel, S.-E., and Ueno, H. (2016). Molecular Mechanisms Regulating T Helper 1 versus T Follicular Helper Cell Differentiation in Humans. *Cell Rep.*
- Segura, E., and Amigorena, S. (2013). Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* *34*, 440–445.
- Segura, E., Kapp, E., Gupta, N., Wong, J., Lim, J., Ji, H., Heath, W.R., Simpson, R., and Villadangos, J.A. (2010). Differential expression of pathogen-recognition molecules between dendritic cell subsets revealed by plasma membrane proteomic analysis. *Mol. Immunol.* *47*, 1765–1773.
- Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.-H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* *209*, 653–660.
- Seneschal, J., Clark, R.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C.M., and Kupper, T.S. (2012). Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells. *Immunity* *36*, 873–884.
- Seneschal, J., Jiang, X., and Kupper, T.S. (2013). Langerin $\alpha$  Dermal DC, but Not Langerhans Cells, Are Required for Effective CD8-Mediated Immune Responses after Skin Scarification with Vaccinia Virus. *J. Invest. Dermatol.*
- Seo, Y.B., Im, S.J., Namkoong, H., Kim, S.W., Choi, Y.W., Kang, M.C., Lim, H.S., Jin, H.T., Yang, S.H., Cho, M.L., et al. (2014). Crucial Roles of Interleukin-7 in the Development of T Follicular Helper Cells and in the Induction of Humoral Immunity. *J. Virol.* *88*, 8998–9009.
- Seré, K., Baek, J.-H., Ober-Blöbaum, J., Müller-Newen, G., Tacke, F., Yokota, Y., Zenke, M., and Hieronymus, T. (2012). Two Distinct Types of Langerhans Cells Populate the Skin during Steady State and Inflammation. *Immunity* *37*, 905–916.
- Shi, C., and Pamer, E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 762–774.
- Shin, C., Han, J.-A., Koh, H., Choi, B., Cho, Y., Jeong, H., Ra, J.-S., Sung, P.S., Shin, E.-C., Ryu, S., et al. (2015). CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Dendritic Cells Induce Antigen-Specific T Follicular Helper Cells Generating Efficient Humoral Immune Responses. *Cell Rep.*
- Shinnakasu, R., Inoue, T., Kometani, K., Moriyama, S., Adachi, Y., Nakayama, M., Takahashi, Y., Fukuyama, H., Okada, T., and Kurosaki, T. (2016). Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nat. Immunol.* *17*, 861–869.
- Shklovskaya, E., O’Sullivan, B.J., Ng, L.G., Roediger, B., Thomas, R., Weninger, W., and Fazekas de St Groth, B. (2011). Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 18049–18054.
- Shulman, Z., Gitlin, A.D., Targ, S., Jankovic, M., Pasqual, G., Nussenzweig, M.C., and Victora, G.D. (2013). T Follicular Helper Cell Dynamics in Germinal Centers. *Science* *341*, 673–677.
- Shulman, Z., Gitlin, A.D., Weinstein, J.S., Lainez, B., Esplugues, E., Flavell, R.A., Craft, J.E., and Nussenzweig, M.C. (2014). Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science* *345*, 1058–1062.
- Sixt, M., Kanazawa, N., Selg, M., Samson, T., Roos, G., Reinhardt, D.P., Pabst, R., Lutz, M.B., and Sorokin, L. (2005). The Conduit System Transports Soluble Antigens from the Afferent Lymph to Resident Dendritic Cells in the T Cell Area of the Lymph Node. *Immunity* *22*, 19–29.
- Solanas, G., and Benitah, S.A. (2013). Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell

pool and surrounding niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 737–748.

Steinman, R.M., and Hemmi, H. (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. In *From Innate Immunity to Immunological Memory*, p.

Streilein, J.W. (1983). Skin-Associated Lymphoid Tissues (SALT): Origins and Functions. *J. Invest. Dermatol.* *80*.

Suan, D., Nguyen, A., Moran, I., Bourne, K., Hermes, J.R., Arshi, M., Hampton, H.R., Tomura, M., Miwa, Y., Kelleher, A.D., et al. (2015). T Follicular Helper Cells Have Distinct Modes of Migration and Molecular Signatures in Naive and Memory Immune Responses. *Immunity*.

Sugita, K., Kabashima, K., Atarashi, K., Shimauchi, T., Kobayashi, M., and Tokura, Y. (2006). Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin. Exp. Immunol.* *0*, 061120065600003–???

Sullivan, S.P., Koutsonanos, D.G., del Pilar Martin, M., Lee, J.W., Zarnitsyn, V., Choi, S.-O., Murthy, N., Compans, R.W., Skountzou, I., and Prausnitz, M.R. (2010). Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination. *Nat. Med.* *16*, 915–920.

## T

Tacke, P.J., de Vries, I.J.M., Torensma, R., and Figdor, C.G. (2007). Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 790–802.

Tam, H.H., Melo, M.B., Kang, M., Pelet, J.M., Ruda, V.M., Foley, M.H., Hu, J.K., Kumari, S., Crampton, J., Baldeon, A.D., et al. (2016). Sustained antigen availability during germinal center initiation enhances antibody responses to vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, E6639–E6648.

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.

Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., and Deenick, E.K. (2013). The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 412–426.

Terhorst, D., Fossum, E., Baranska, A., Tamoutounour, S., Malosse, C., Garbani, M., Braun, R., Lechat, E., Cramer, R., Bogen, B., et al. (2015). Laser-Assisted Intradermal Delivery of Adjuvant-Free Vaccines Targeting XCR1+ Dendritic Cells Induces Potent Antitumoral Responses. *J. Immunol.* *194*, 5895–5902.

Tomura, M., Hata, A., Matsuoka, S., Shand, F.H.W., Nakanishi, Y., Ikebuchi, R., Ueha, S., Tsutsui, H., Inaba, K., Matsushima, K., et al. (2014). Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci. Rep.* *4*.

Tozuka, M., Oka, T., Jounai, N., Egawa, G., Ishii, K.J., Kabashima, K., and Takeshita, F. (2015). Efficient antigen delivery to the draining lymph nodes is a key component in the immunogenic pathway of the intradermal vaccine. *J. Dermatol. Sci.*

Tube, N.J., Pagán, A.J., Taylor, J.J., Nelson, R.W., Linehan, J.L., Ertelt, J.M., Huseby, E.S., Way, S.S., and Jenkins, M.K. (2013). Single Naive CD4+ T Cells from a Diverse Repertoire Produce Different Effector Cell Types during Infection. *Cell* *153*, 785–796.

Tussiwand, R., Everts, B., Grajales-Reyes, G.E., Kretzer, N.M., Iwata, A., Bagaitkar, J., Wu, X., Wong, R., Anderson, D.A., Murphy, T.L., et al. (2015). Klf4 Expression in Conventional Dendritic Cells Is Required for T Helper 2 Cell Responses. *Immunity* *42*, 916–928.

## U

Ueno, H., Banchereau, J., and Vinuesa, C.G. (2015). Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat. Immunol.* *16*, 142–152.

Ulvmar, M.H., Werth, K., Braun, A., Kelay, P., Hub, E., Eller, K., Chan, L., Lucas, B., Novitzky-

Basso, I., Nakamura, K., et al. (2014). The atypical chemokine receptor CCRL1 shapes functional CCL21 gradients in lymph nodes. *Nat. Immunol.* *15*, 623–630.

## V

Vaccari, M., Gordon, S.N., Fourati, S., Schifanella, L., Liyanage, N.P.M., Cameron, M., Keele, B.F., Shen, X., Tomaras, G.D., Billings, E., et al. (2016). Adjuvant-dependent innate and adaptive immune signatures of risk of SIVmac251 acquisition. *Nat. Med.* *22*, 762–770.

Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., et al. (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* *12*, 71–81.

Valladeau, J., Clair-Moninot, V., Dezutter-Dambuyant, C., Pin, J.-J., Kissenpfennig, A., Mattei, M.-G., Ait-Yahia, S., Bates, E.E.M., Malissen, B., Koch, F., et al. (2002). Identification of Mouse Langerin/CD207 in Langerhans Cells and Some Dendritic Cells of Lymphoid Tissues. *J. Immunol.* *168*, 782–792.

Valladeau, J., Dezutter-Dambuyant, C., and Saeland, S. (2003). Langerin/CD207 sheds light on formation of birbeck granules and their possible function in Langerhans cells. *Immunol. Res.* *28*, 93–107.

Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal Centers. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 429–457.

Victora, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal Center Dynamics Revealed by Multiphoton Microscopy with a Photoactivatable Fluorescent Reporter. *Cell* *143*, 592–605.

Vieillard, V., Strominger, J.L., and Debré, P. (2005). NK cytotoxicity against CD4<sup>+</sup> T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10981–10986.

Vinuesa, C.G., Linterman, M.A., Yu, D., and MacLennan, I.C.M. (2016). Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *34*.

Vogel, K.U., Edelmann, S.L., Jeltsch, K.M., Bertossi, A., Heger, K., Heinz, G.A., Zöller, J., Warth, S.C., Hoefig, K.P., Lohs, C., et al. (2013). Roquin Paralogs 1 and 2 Redundantly Repress the Icos and Ox40 Costimulator mRNAs and Control Follicular Helper T Cell Differentiation. *Immunity* *38*, 655–668.

Vogt, A., Combadiere, B., Hadam, S., Stieler, K.M., Lademann, J., Schaefer, H., Autran, B., Sterry, W., and Blume-Peytavi, U. (2006). 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, Nanoparticles Enter Epidermal CD1a<sup>+</sup> Cells after Transcutaneous Application on Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 1316–1322.

Vogt, A., Mahe, B., Costagliola, D., Bonduelle, O., Hadam, S., Schaefer, G., Schaefer, H., Katlama, C., Sterry, W., Autran, B., et al. (2008). Transcutaneous Anti-Influenza Vaccination Promotes Both CD4 and CD8 T Cell Immune Responses in Humans. *J. Immunol.* *180*, 1482–1489.

## W

Wang, C.J., Heuts, F., Ovcinnikovs, V., Wardzinski, L., Bowers, C., Schmidt, E.M., Kogimtzis, A., Kenefeck, R., Sansom, D.M., and Walker, L.S.K. (2014). CTLA-4 controls follicular helper T-cell differentiation by regulating the strength of CD28 engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201414576.

Weber, J.P., Fuhrmann, F., Feist, R.K., Lahmann, A., Al Baz, M.S., Gentz, L.-J., Vu Van, D., Mages, H.W., Haftmann, C., Riedel, R., et al. (2015). ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Kruppel-like factor 2. *J. Exp. Med.* *212*, 217–233.

Weinstein, J.S., Herman, E.I., Lainez, B., Licona-Limón, P., Esplugues, E., Flavell, R., and Craft, J. (2016). TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat. Immunol.*

Weisel, F.J., Zuccarino-Catania, G.V., Chikina, M., and Shlomchik, M.J. (2016). A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity* *44*,

116–130.

Weiss, R., Hessenberger, M., Kitzmüller, S., Bach, D., Weinberger, E.E., Krautgartner, W.D., Hauser-Kronberger, C., Malissen, B., Boehler, C., Kalia, Y.N., et al. (2012). Transcutaneous vaccination via laser microporation. *J. Controlled Release* 162, 391–399.

Willard-Mack, C. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of Lymph Nodes. *Toxicol. Pathol.* 34, 409–424.

Wing, J.B., Ise, W., Kurosaki, T., and Sakaguchi, S. (2014). Regulatory T Cells Control Antigen-Specific Expansion of Tfh Cell Number and Humoral Immune Responses via the Coreceptor CTLA-4. *Immunity* 41, 1013–1025.

Wollenberg, I., Agua-Doce, A., Hernandez, A., Almeida, C., Oliveira, V.G., Faro, J., and Graca, L. (2011). Regulation of the Germinal Center Reaction by Foxp3+ Follicular Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 187, 4553–4560.

## X

Xu, H., Li, X., Liu, D., Li, J., Zhang, X., Chen, X., Hou, S., Peng, L., Xu, C., Liu, W., et al. (2013). Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* 496, 523–527.

## Y

Yagi, H., Hashizume, H., Horibe, T., Yoshinari, Y., Hata, M., Ohshima, A., Ito, T., Takigawa, M., Shibaki, A., Shimizu, H., et al. (2006). Induction of Therapeutically Relevant Cytotoxic T Lymphocytes in Humans by Percutaneous Peptide Immunization. *Cancer Res.* 66, 10136–10144.

Yáñez, A., Hassanzadeh-Kiabi, N., Ng, M.Y., Megías, J., Subramanian, A., Liu, G.Y., Underhill, D.M., Gil, M.L., and Goodridge, H.S. (2013). Detection of a TLR2 agonist by hematopoietic stem and progenitor cells impacts the function of the macrophages they produce: Innate immunity. *Eur. J. Immunol.* 43, 2114–2125.

Yao, C., Zurawski, S.M., Jarrett, E.S., Chicoine, B., Crabtree, J., Peterson, E.J., Zurawski, G., Kaplan, D.H., and Igyártó, B.Z. (2015). Skin dendritic cells induce follicular helper T cells and protective humoral immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.*

Yoo, J.-K., Fish, E.N., and Braciale, T.J. (2012). LAPCs promote follicular helper T cell differentiation of Ag-primed CD4+ T cells during respiratory virus infection. *J. Exp. Med.* 209, 1853–1867.

Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., et al. (2009). The Transcriptional Repressor Bcl-6 Directs T Follicular Helper Cell Lineage Commitment. *Immunity* 31, 457–468.

Yuan, W., Xiaoyun Hong, Zaozhan Wu, Lizhu Chen, Liu, Z., Fei Wu, and Liangming Wei, L. (2013). Dissolving and biodegradable microneedle technologies for transdermal sustained delivery of drug and vaccine. *Drug Des. Devel. Ther.* 945.

Yue, H., and Ma, G. (2015). Polymeric micro/nanoparticles: Particle design and potential vaccine delivery applications. *Vaccine.*

Yusuf, I., Kageyama, R., Monticelli, L., Johnston, R.J., DiToro, D., Hansen, K., Barnett, B., and Crotty, S. (2010). Germinal Center T Follicular Helper Cell IL-4 Production Is Dependent on Signaling Lymphocytic Activation Molecule Receptor (CD150). *J. Immunol.* 185, 190–202.

## Z

Zaric, M., Lyubomska, O., Poux, C., Hanna, M.L., McCrudden, M.T., Malissen, B., Ingram, R.J., Power, U.F., Scott, C.J., Donnelly, R.F., et al. (2014). Dissolving Microneedle Delivery of Nanoparticle-Encapsulated Antigen Elicits Efficient Cross-Priming and Th1 Immune Responses by Murine Langerhans Cells. *J. Invest. Dermatol.*

Zhang, J.-G., Czabotar, P.E., Policheni, A.N., Caminschi, I., San Wan, S., Kitsoulis, S., Tullett, K.M., Robin, A.Y., Brammananth, R., van Delft, M.F., et al. (2012). The Dendritic Cell Receptor Clec9A Binds Damaged Cells via Exposed Actin Filaments. *Immunity* 36, 646–657.

Zhao, Q., Li, S., Yu, H., Xia, N., and Modis, Y. (2013). Virus-like particle-based human vaccines: quality assessment based on structural and functional properties. *Trends Biotechnol.* 31, 654–663.

Zimara, N., Florian, C., Schmid, M., Malissen, B., Kissenpfennig, A., Männel, D.N., Edinger, M., Hutchinson, J.A., Hoffmann, P., and Ritter, U. (2014). Langerhans cells promote early germinal center formation in response to *Leishmania* -derived cutaneous antigens: Immunity to infection. *Eur. J. Immunol.* 44, 2955–2967.

Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.-M., Smyth, M.J., et al. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell–intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* 207, 365–378.



