



HAL
open science

Étude des voies de génération des lymphocytes T folliculaires Helper (Tfh) humains dans un contexte pathologique d'infection par le VIH

Raphaël Jeger-Madiot

► **To cite this version:**

Raphaël Jeger-Madiot. Étude des voies de génération des lymphocytes T folliculaires Helper (Tfh) humains dans un contexte pathologique d'infection par le VIH. Immunologie. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS333 . tel-03433176v1

HAL Id: tel-03433176

<https://theses.hal.science/tel-03433176v1>

Submitted on 17 Nov 2021 (v1), last revised 18 Nov 2021 (v2)

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

SORBONNE-UNIVERSITÉ

Spécialité : Immunologie

École doctorale n°394 – Physiologie, physiopathologie et thérapeutique



Présentée et soutenue publiquement le 11 décembre 2020 par

Raphaël Jeger-Madiot

Étude des voies de génération des lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) humains dans un contexte pathologique d'infection par le VIH

Directrice de recherche
Pr. Stéphanie Graff-Dubois

Membres du jury :

Pr. Isabelle Cremer	Présidente
Dr. Nabila Seddiki	Rapportrice
Pr. Vassili Soumelis	Rapporteur
Dr. Lisa Chakrabarti	Examinatrice
Dr. Nicolas Fazilleau	Examineur
Pr. Stéphanie Graff-Dubois	Directrice de thèse

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	6
ABRÉVIATIONS.....	9
LISTE DES FIGURES	10
AVANT-PROPOS	12
INTRODUCTION	14
I. BIOLOGIE DES LYMPHOCYTES T FOLLICULAIRES HELPERS (T_{FH}).....	15
I.1 Classification des lymphocytes T CD4 (LT CD4).....	15
I.1.a Brève histoire de la découverte des LT CD4.....	15
I.1.a.i Rôle du thymus dans l'immunité.....	15
I.1.a.ii Identification des rôles des lymphocytes thymiques.....	16
I.1.b Définitions usuelles des LT CD4	16
I.1.b.i Dogme Th1/Th2.....	16
I.1.b.ii Autres sous-types principaux de LT CD4 effecteurs.....	17
I.1.b.iii Mémoire et migration	19
I.1.c Limites de la classification actuelle : Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle.....	21
I.1.d Explication à l'hétérogénéité phénotypique des LT CD4 : Propriété de plasticité.....	22
I.2 Découverte des T _{fh}	24
I.2.a Brève histoire de la réponse humorale et de sa dépendance aux LT CD4.....	24
I.2.b Les T_{fh} comme sous-type fonctionnel et tissulaire.....	26
I.3 Génération des T _{fh}	27
I.3.a Organisation des organes lymphoïdes secondaires (OLS)	27
I.3.b Voie de génération séquentielle des T_{fh} à partir du LT CD4 naïf.....	29
I.3.b.i Interaction avec la cellule dendritique (DC) dans la zone T	31
I.3.b.ii Migration des T _{fh} vers la bordure T-B	35
I.3.b.iii Interaction du T _{fh} avec le LB pour la mise en place du GC.....	35
I.3.b.iv Concentration des T _{fh} fonctionnels dans le GC : Rôle des LB « bystander »	37
I.3.c Voies de génération alternatives des T_{fh}	39
I.3.c.i Voie de génération des T _{fh} indépendante des DC.....	39
I.3.c.ii Acquisition du phénotype T _{fh} par des LT CD4 mémoires	40
I.4 Fonction des T _{fh} au sein des GC.....	41
I.5 Modulation du développement et de la fonction des T _{fh}	45
I.5.a Disponibilité antigénique.....	45
I.5.b Sous-types cellulaires associés à une régulation des T_{fh}.....	46

I.5.b.i	T folliculaires régulateurs (Tfr).....	46
I.5.b.ii	Sous-populations régulatrices de lymphocytes B et de cellules dendritiques.....	47
I.6	Mémoire et recirculation des Tfh.....	47
I.7	Hétérogénéité et plasticité des Tfh.....	48
II.	DEVELOPPEMENT DES TFH DANS UN CONTEXTE PATHOLOGIQUE : EXEMPLE DU VIH(-1).....	51
II.1	Brève description de l'infection par le VIH.....	51
II.1.a	Émergence de la pandémie de VIH.....	51
II.1.b	Les phases de l'infection du VIH.....	53
II.1.c	Les réservoirs viraux, un obstacle à l'éradication du VIH	54
II.2	Contexte de développement des Tfh dans l'infection par le VIH.....	56
II.2.a	Les LT CD4 dans l'infection par le VIH.....	56
II.2.a.i	Déplétion des LT CD4	56
II.2.a.ii	Les LT CD4 comme réservoirs cellulaires.....	57
II.2.a.iii	Exhaustion des LT CD4 dans l'infection par le VIH	59
II.2.b	Contexte inflammatoire chronique	59
II.2.c	Déstructuration des OLS.....	61
II.2.d	Modifications des principaux partenaires cellulaires des Tfh : DC et LB.....	63
II.3	Caractéristiques des Tfh dans l'infection par le VIH.....	64
II.3.a	Les Tfh comme réservoirs cellulaires du VIH	64
II.3.b	Le paradoxe quantitatif des Tfh dans l'infection par le VIH	65
II.3.c	Biais de la réponse effectrice LT CD4 vers un profil Tfh.....	66
II.3.d	Altérations de la qualité des Tfh.....	67
II.3.d.i	Modifications transcriptomiques et phénotypiques des Tfh.....	67
II.3.d.ii	Profil Th1 associé aux Tfh dans l'infection par le VIH-1	68
II.3.d.iii	Capacité d'aide délivrée aux LB par les Tfh.....	68
II.4	Défauts de la réponse LB associés à la réponse Tfh.....	69
II.5	Les Tfh comme potentiel levier thérapeutique.....	70
II.5.a	Les Tfh chez les « elite controllers »	70
II.5.b	Les Tfh chez les « elite neutralizers ».....	71
OBJECTIFS	74	
MATÉRIELS ET MÉTHODES	77	
COLLECTION DE RATE ET PBMC D'INDIVIDUS SAINS.....	78	
COLLECTION DE RATES DE PATIENTS CHRONIQUEMENT INFECTES.	78	
CULTURES DE TISSUS SPLENIQUES.....	78	
POLARISATION DES LT CD4 EN TFH PAR LES DC.	78	
CO-CULTURE DE LT ET LB.	79	

CULTURE DE SPLENOCYTES.....	79
CYTOMETRIE DE FLUX ET TRI CELLULAIRE.	79
CYTOMETRIE DE MASSE.....	80
ÉTUDE TRANSCRIPTOMIQUE : SEQUENÇAGE ARN HAUT DEBIT.	82
ÉTUDE TRANSCRIPTOMIQUE : SEQUENÇAGE EN CELLULES UNIQUES A PARTIR D’ECHANTILLONS DE PATIENTS INFECTES CHRONIQUEMENT INFECTES PAR LE VIH.....	82
PRODUCTION VIRALE DE VIH.	82
INFECTION PAR LE VIH.	82
RÉSULTATS.....	83
I. AXE I : MISE AU POINT D’UN MODELE D’ETUDE POUR LA GENERATION DES T_{FH}.....	84
I.1 Approches envisagées.....	84
I.1.a Approche conservant l’intégrité de l’organe : Organoculture	84
I.1.b Approche récapitulant la voie de génération séquentielle de T_{fh} : Co-cultures.....	87
I.1.b.i Co-culture pour l’induction d’un profil T _{fh} : DC – LT naïfs	87
I.1.b.ii Co-culture pour l’évaluation de la fonctionnalité des T _{fh} : LT - LB	89
I.1.c Approche conservant l’environnement lymphoïde : Culture de splénocytes.....	90
I.2 Approche sélectionnée : Génération d’une réponse T _{fh} par culture de splénocytes.....	91
I.2.a La génération de T_{fh} est transitoire	91
I.2.b La réponse T_{fh} générée s’apparente à une réponse T_{fh} de type GC	93
I.2.c Les T_{fh} générés soutiennent la maturation des LB	95
I.2.d La génération de T_{fh} implique une signalisation TCR et les cytokines polarisantes.....	96
I.2.e La génération de T_{fh} implique les LB	98
I.2.f Les T_{fh} générés présentent une hétérogénéité phénotypique	99
I.3 Conclusion de l’Axe I.....	102
II. AXE II : ÉTUDE DES VOIES DE GENERATION DES T_{FH} EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES	102
II.1.a Contribution des LT CD4 naïfs et mémoires à la génération des T_{fh}	102
II.1.b Effet de l’environnement polarisant pour l’induction de traits T_{fh}.....	106
II.1.c Contribution des LT CD4 naïfs et mémoires à l’hétérogénéité des T_{fh}	108
II.2 Conclusion de l’axe II.....	112
III. AXE III : ÉTUDE DE L’IMPACT DE L’INFECTION VIH SUR LA GENERATION DES T_{FH}	112
III.1 Altérations de l’expression de gènes relatifs aux T _{fh} dans les LT CD4 naïfs et mémoires spléniques de patients chroniquement infectés par le VIH.....	112
III.2 Étude des voies de générations des T _{fh} sous-infection VIH _{Y_u2b} <i>in-vitro</i>	114
III.3 Conclusion de l’axe III.....	117
MANUSCRIPT SOUMIS	119

DISCUSSION ET PERSPECTIVES	147
I. QUELS OUTILS POUR L'ETUDE DE LA GENERATION DES T_{FH} HUMAINS A L'AVENIR ?.....	149
I.1 Organoculture	150
I.1.a Culture sur coupe d'organe	150
I.1.b Culture sur bloc d'organe	151
I.2 Co-culture.....	151
I.3 Prélèvement des populations lymphoïdes avec une aspiration par aiguille.....	153
I.4 Nouvel outil proposé : Stimulation de cellules lymphoïdes	154
I.4.a Modulation moléculaire dans l'environnement lymphoïde.....	155
I.4.b Stimulation de cellules lymphoïdes issus de patients : exemple du VIH.....	157
I.4.c Génération d'une réponse T_{fh} spécifique d'un antigène	158
II. RATIONNEL D'UNE PLASTICITE CELLULAIRE POUR LA GENERATION DES T_{FH} <i>IN VIVO</i>	160
II.1 Notion d'effectivité sous-jacente à l'hétérogénéité des réponses LT CD4, et T _{fh} ?.....	161
II.2 T _{fh} -like dans les conditions d'inflammation chroniques : résultat d'une plasticité ?	163
II.3 Plasticité cellulaire dans les tissus lymphoïdes : relevance dans le VIH	164
II.4 Contrôle de l'inflammation et préservation des structures lymphoïdes : des pistes pour limiter la réponse T _{fh} exacerbée	166
III. QUID DE L'ETUDE DES PARTENAIRES CELLULAIRES, DE LA REGULATION ET DE LA CINETIQUE ?...167	167
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	169
BIBLIOGRAPHIE.....	170
ANNEXES	186

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier ma directrice de thèse Stéphanie Graff-Dubois, une belle personne tant professionnellement qu'humainement. Parmi tes nombreuses qualités, je soulignerai l'une des plus importantes pour l'encadrement d'une thèse : ta bienveillance. Celle-ci a été constante durant ces 4 années, ce qui m'aura permis d'évoluer et de progresser à tes côtés sereinement. Je suis heureux de finaliser aujourd'hui cette thèse, et qui plus est de l'avoir conduite avec toi.

Je remercie chaleureusement mon jury, dont j'ai suivi les travaux scientifiques durant ma thèse avec intérêt et qui me fait aujourd'hui l'honneur d'évaluer mon travail. Plus particulièrement, le Dr. Nabila Seddiki d'avoir accepté le rôle de rapportrice et de m'avoir promulgué ses conseils avisés ; le Pr. Vassili Soumelis de m'avoir suivi pendant cette thèse en qualité d'expert scientifique et de rapporteur, et donc pour ses conseils tout au long de ce projet ; le Dr. Lisa Chakrabarti et le Dr. Nicolas Fazilleau d'avoir accepté les rôles d'examineurs de ce travail ; enfin le Pr. Isabelle Cremer d'avoir pris la présidence de ce jury.

Je tiens à remercier les deux chefs d'équipes qui m'ont accueilli durant ces 4 années de thèse : le Dr. Arnaud Moris, avec qui j'ai apprécié discuter travail mais pas que ; le Pr. David Klatzmann pour ses conseils et ses remarques sur ce projet.

Je remercie également le Pr. Bertrand Bellier, à qui je dois beaucoup. Tu m'as permis d'enseigner en Immunologie, m'as toujours soutenu par tes conseils et tes relectures.

Je remercie ceux avec qui j'ai travaillé sur ce projet, plus particulièrement : Maud Heredia, mon binôme de travail avec qui j'ai aimé travailler et à qui je souhaite le meilleur pour la suite ; Nicolas Tchitchek, qui m'a grandement aidé pour les analyses de données multiparamétriques et par ses conseils ; Romain Vaineau, par ses relectures ; Bruno Gouritin et la plateforme de cytométrie CyPS (Catherine Blanc, Bénédicte Hoareau-Coudert et Aurélien Corneau) pour leur soutien technique ; l'équipe du Pr. Pierre Buffet, avec laquelle nous avons collaboré.

Je remercie mes amis du CERVI : Fabien, qui a eu la délicatesse d'abaisser son niveau de jeu au foot pour que je ne me sente pas dépassé ; Thomas, mon capitaine ; Nicolas B., d'avoir goûté mon pâté de pommes de terre ; Pierre B., d'avoir digéré mon pâté de pommes de terre ; Pierre E., d'avoir inventé des articles de qualité pour lesquels nous étions co-auteurs. Je souhaite également bon courage à tous les étudiants du labo, plus particulièrement à Aude B., qui récoltera je l'espère des

résultats à la hauteur de son investissement. Je remercie également tous les membres du CERVI que j'ai pu croisés, non-cités mais certainement pas oubliés.

Je remercie mes amis du CIMI : Mathias, mon fidèle compagnon de thèse, qui m'a appris comment ne pas allumer une hotte et à ne pas faire un ficoll ; Lisa et ses yeux fatigués pas fatigués, qui ont apporté un vent de fraîcheur à la virologie, et pour qui je souhaite la plus brillante des thèses ; Camille, grâce à qui je connais la première phrase de ma présentation de thèse ; Jordane, futur skipper du Vendée Globe ; Marie, future prix Nobel. Je remercie également tous les membres du CIMI que j'ai pu croisés, non-cités mais certainement pas oubliés.

Merci à mes amis : Théo, Hugo, Dimitri, Théo, Joseph, Hugo, Cyril, Jérémy, Gaelle, que j'ai aimé voir, que j'aime voir et que j'aimerai voir.

Merci à la famille de Laura pour leur soutien.

Merci infini à mes parents, mon frère, Audrey, et mes grands-parents.

Merci à Laura, pour tout.

ABRÉVIATIONS

ActA : Activine A	J(X) : Jour
AID : Activation-Induced cytidine deaminase	Klf2 : Kruppel-Like Factor 2
ARN : Acide Ribonucléique	LB : Lymphocyte B
ART : Antirétroviraux	LC : Langherans Cells
AZT : Azidothimidine	LEF-1 : Lymphoid enhancer-binding factor 1
Bcl6 : B-cell lymphoma 6 protein	LFA : Lymphocyte function-associated antigen
Blimp-1/PRDM1 : PR domain zinc finger protein 1	LPS : Lipopolysaccharide
bNAbs : Broadly Neutralizing Antibody	LT : Lymphocyte T
Breg : B régulateur	moDC : Monocyte derived Dendritic Cells
BTLA : B- and T-lymphocyte attenuator	Nef : Negative Regulatory Factor
CCL(X) : C-C motif chemokines Ligand	NP : Non-progressors
CCR(X) : Chemokine (C-C motif) receptor	OLS : Organe Lymphoïde Secondaire
CD : Cluster of Differentiation	OVA : Ovalbumine
CMH : Complexe Majeur Histocompatibilité	PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
CMV : CytomégaloVirus	PC : Principal Component
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	Prkd2 : Protein Kinase D2
CXCL(X) : Chemokine (C-X-C) motif receptor	RORγt : RAR-related orphan receptor gamma
DC : Dendritic Cell	RUNX3 : Runt-related transcription factor 3
DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin	S1PR1 : Sphingosine-1-phosphate receptor 1
E2A/TCF-3 : Immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47	SAP : SLAM-associated protein
EBI2 : Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2	SIDA : Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis
EC : Elite Controllers	SLAM : Signaling lymphocytic activation molecule
FAS : Apoptosis Stimulating Fragment	STAT(X) : Signal Transducer and Activator of Transcription
FDC : Follicular Dendritic Cell	T-bet/TBX21 : T-box expressed in T cells
FOXO1 : Forkhead box protein O1	Tat : Trans-Activator of transcription
Foxp3 : Forkhead box P3	TCR : T cell receptor
FRC : Fibroblastic Reticular Cells	Tfh : T folliculaires helper
FT : Facteur de Transcription	TGFβ : Tumor Growth Factor
GATA-3 : Trans-acting T-cell-specific transcription factor	Th : T helper
GC : Germinal Center	Thpok : T-helper inducing POZ-Kruppel like factor
Gp120 : Glycoprotéine 120	TLR(X) : Toll-Like Receptor
HBV : Virus de l'hépatite B	Tox2 : OX High Mobility Group Box Family Member 2
HVEM : Herpes Virus Entry Mediator	Tregs : T régulateur
ICOS : Inducible T-cell COStimulator	TSLP : Thymic stromal lymphopoietin
ID2 : Inhibitor Of DNA Binding 2	VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humaine
Ig : Immunoglobuline	VIS : Virus de l'Immunodéficiency Simienne
IL-(X) : Interleukin	Vpr : Viral protein r
IL(X)R : Interleukin Receptor	VR : Viremic Controllers
IRF4 : Interferon Regulatory Factor 4	

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Complexification progressive de la caractérisation des réponses LT CD4 et marqueurs exclusifs aux principaux sous-types LT CD4

Figure 2 : Analyses en composante principale du transcriptome et protéome de LT CD4 mémoires stimulés et soumis à différents environnements cytokiniques

Figure 3 : Exemple de définition des Tfh par cytométrie de flux

Figure 4 : Territoires immunitaires des OLS (Ganglion et Rate)

Figure 5 : Voie de génération séquentielle du Tfh

Figure 6 : Représentation de différents signaux impliqués dans un modèle de génération séquentielle de Tfh chez l'Homme

Figure 7 : Modèles des voies de génération séquentielle et alternatives des Tfh

Figure 8 : Processus de sélection et de maturation des LB dans le GC

Figure 9 : Synapses du LB avec les Tfh pour la recirculation des LB vers la DZ (i), la différenciation en plasmocytes (ii) et leur différenciation en LB mémoires (iii)

Figure 10 : Illustration de la plasticité lymphocytaire liée au profil Tfh

Figure 11 : Mécanismes de la persistance virale

Figure 12 : Fibrose au sein des ganglions durant les phases de l'infection

Figure 13 : GC dans les ganglions de donneurs sains et patients infectés sous ART

Figure 14 : Tableau récapitulatif des différentes observations quantitatives des Tfh dans l'infection VIH/SIV

Figure 15 : Impact de l'infection par le VIH sur la génération des Tfh au niveau des tissus lymphoïdes

RÉSULTATS

Figure 1 : Culture de tissu splénique adapté d'études sur le thymus

Figure 2 : Culture de tissu splénique adaptée d'études sur tissus lymphoïdes

Figure 3 : La culture de LT CD4 naïfs avec des moDC en conditions polarisantes permet la génération de Tfh

Figure 4 : Les DC primaires cDC2 conduisent à une génération de Tfh plus importante que les moDC

Figure 5 : La co-culture avec des LB mémoires permet d'étudier la fonctionnalité des LT CD4

Figure 6 : La culture de splénocytes conduit à la génération de Tfh

Figure 7 : La stimulation de splénocytes conduit à une génération transitoire de Tfh

Figure 8 : La stimulation de splénocytes conduit la génération de Tfh au phénotype GC

Figure 9 : La génération de GC Tfh n'apparaît pas avec des PBMC

Figure 10 : Une maturation des LB est concomitante à la génération de Tfh

Figure 11 : Les GC Tfh générés induisent la génération de plasmocytes CD27^{hi}CD38^{hi} et conservent leur phénotype fonctionnel

Figure 12 : La génération des GC Tfh est dépendante du signal TCR et potentialisée par les cytokines polarisantes

Figure 13 : La fonctionnalité des GC Tfh générés est potentialisée par les cytokines polarisantes

Figure 14 : La génération de GC Tfh est dépendante des LB.

Figure 15 : L'immunophénotypage par cytométrie de masse révèle une hétérogénéité au sein de Tfh obtenus

Figure 16 : Les LT CD4 naïfs et mémoires s'orientent vers un profil Tfh

Figure 17 : Les cytokines polarisantes potentialisent le développement et la fonction de Tfh quel que soit le sous-type LT CD4

Figure 18 : Les Tfh générés à partir de différents LT CD4 présentent des phénotypes fonctionnels distincts

Figure 19 : Impact de l'infection par le VIH sur l'expression de gènes impliqués dans la génération de Tfh dans différents sous types de LT CD4 spléniques.

Figure 20 : L'infection par le VIH *in vitro* est productive dans les splénocytes et conduit à une baisse de la fréquence des LT CD4

Figure 21 : L'infection *in vitro* par le VIH perturbe l'orientation vers des LT CD4 vers un profil Tfh.

DISCUSSION

Figure 1 : Modèle d'intégration des signaux gouvernants la génération des Tfh, de leur impact sur la dialogue entre Tfh-LB et la réponse LB résultante

Figure 2 : Culture de suspensions cellulaires lymphoïdes pour le test de nouveaux axes modulateurs des Tfh.

Figure 3 : Génération de Tfh à partir de cellules lymphoïdes issus de patients : exemple du VIH

Figure 4 : Complémentarité des différentes approches pour l'étude de la biologie des Tfh

Figure 5 : Proposition d'une génération des Tfh basée sur l'effectivité cellulaire

Figure 6 : Modèle proposé des causes de l'accumulation des Tfh dans l'infection par le VIH chronique

Figure 7 : Proposition d'une étude de la génération réponses LT CD4 folliculaires (Tfh/Tfr) par une analyse en cellule unique

AVANT-PROPOS

Par l'intégration et la retranscription de signaux moléculaires et membranaires, les lymphocytes T (LT) CD4 organisent les réponses immunitaires. Leur caractérisation quantitative et qualitative est un outil puissant pour la compréhension et la prédiction des réponses immunitaires, qu'elles soient bénéfiques (vaccinales ou anti-infectieuses) ou délétères (maladies auto-immunes). La caractérisation des réponses LT CD4 s'appuie sur l'association de l'expression de marqueurs phénotypiques à des fonctions biologiques précises. Ainsi, les LT CD4 ont été progressivement catégorisés en sous-types sur la base de critères phénotypiques et d'une fonction effectrice spécifique. Le schéma de génération de ces réponses effectrices repose sur l'orientation d'un LT CD4 naïf vers un de ces profils. Ces dernières années, l'avènement d'outils technologiques de plus en plus résolus a mis en évidence une grande diversité et hétérogénéité dans les réponses LT CD4. Avec les analyses multiparamétriques qui en résultent, des chevauchements entre traits phénotypiques et fonctionnels initialement pensés comme exclusifs ont été rapportés. Ces résultats ont permis d'interroger la conception des réponses LT CD4 reposant uniquement sur une spécialisation immuable des LT CD4 naïfs vers les différents sous-types effecteurs. L'hétérogénéité des réponses LT CD4 a permis de considérer l'éventualité d'une plasticité cellulaire pour les expliquer, c'est à dire la réorientation d'un sous-type effecteur vers un autre sous-type dans un nouvel environnement biologique. Ainsi, les réponses LT CD4 pourraient relever d'états lymphocytaires distincts plus que d'une spécialisation irréversible vers un sous-type effecteur spécifique.

Mon projet de thèse s'inscrit dans ce contexte et se focalise sur un sous-type de LT CD4 dit T folliculaires helpers (T_{fh}). Le rôle de ces LT CD4 est de soutenir les lymphocytes B pour la mise en place des réponses humorales. La grande hétérogénéité phénotypique observée au sein des réponses T_{fh} laisse penser qu'une voie de génération de ces LT CD4 reposant sur une plasticité lymphocytaire est possible. Si le plus souvent les T_{fh} permettent la mise en place d'une réponse humorale efficace, ils sont également impliqués dans la pathogénie de certaines maladies. De fait, une meilleure compréhension de leur génération permettrait une meilleure orientation ou correction des réponses immunitaires. Dans ce travail, je tente de contribuer à cet objectif.

INTRODUCTION

I. Biologie des lymphocytes T folliculaires helpers (Tfh)

I.1 Classification des lymphocytes T CD4 (LT CD4)

Les lymphocytes T (LT) CD4 coordonnent l'immunité adaptative pour une réponse spécifique ainsi que l'établissement et le maintien d'une mémoire immunitaire à un pathogène. La compréhension du rôle des LT CD4 dans l'immunité, qu'ils soient naïfs, effecteurs ou mémoires repose sur l'association de marqueurs phénotypiques et de propriétés fonctionnelles. Si mon projet porte spécifiquement sur les Tfh, je pense que les problématiques associées s'appliquent aux réponses LT CD4 en général. Ainsi, il me semble pertinent de donner un bref aperçu historique de la découverte des LT CD4 et de leur classification progressive en sous-types effecteurs (Th1, Th2, Th17, Tfh et Tregs) ou mémoires (centraux, effecteurs, résidents) distincts. Cela permettra de mieux comprendre pourquoi cette classification selon ces critères classiques est de moins en moins compatible avec les analyses multiparamétriques, qui révèlent une très grande hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle au sein de ce compartiment cellulaire. Cette hétérogénéité a permis d'interroger la conception selon laquelle les réponses LT CD4 reposent uniquement sur l'engagement d'un LT CD4 naïf vers un des sous-types effecteurs. En effet, il est également proposé aujourd'hui que les réponses LT CD4 s'appuient sur la capacité des LT CD4 à se réorienter vers un nouveau phénotype ou une nouvelle fonction. Cette faculté, dite plasticité, sera également abordée dans cette partie.

I.1.a Brève histoire de la découverte des LT CD4

I.1.a.i Rôle du thymus dans l'immunité

En 1944, des chercheurs rapportent que l'ablation du thymus permet de prévenir le développement spontané de leucémies lymphoïdes chez la souris¹. A l'inverse, la greffe de tissu thymique en sous-cutanée restaure la capacité des souris à développer des leucémies². Le rôle du thymus est associé aux tissus lymphoïdes puisqu'aucune incidence de son ablation n'est observée sur le développement des leucémies myéloïdes. Parallèlement, des souris thymectomisées après naissance sont immunodéficientes : plus sensibles aux infections et moins immunocompétentes pour le rejet de greffes de peau. Des défauts en centres germinatifs (GC) et plasmocytes sont également constatés chez ces animaux³. Chez des souris adultes irradiées, les non-thymectomisées sont capables de mettre en place une réponse immunitaire efficace face à une immunisation ou une greffe de peau,

alors que les thymectomisées ne recouvrent pas leurs fonctions immunes⁴. L'implication du thymus dans les réactions immunitaires est donc démontrée.

I.1.a.ii Identification des rôles des lymphocytes thymiques

Dans les années 1960, l'importance pour la mise en place de l'immunité adaptative de la collaboration entre deux types de lymphocytes distincts par leur localisation anatomique est mise en évidence. Les lymphocytes thymiques (LT) aident les lymphocytes B (LB) issus de la moelle osseuse pour la production d'anticorps. Cette fonction d'aide aux LB sera la première associée aux LT et j'y reviendrai dans la suite de cette introduction. A partir de cette découverte, il devient possible d'associer à ces deux types cellulaires des fonctions biologiques précédemment décrites pour les cellules lymphoïdes. Par exemple, le rôle cytotoxique déjà connu pour les cellules lymphoïdes dans les années 1960⁵ sera associé spécifiquement aux LT plus tard⁶. En 1969, plusieurs fonctions sont attribuées aux LT : mémoire immunitaire, cytotoxicité dans le rejet de greffe, activateurs de la perméabilité vasculaire, propriétés mitogéniques, activateurs de macrophages et capacité d'aide aux LB⁷.

Le développement de nouveaux outils expérimentaux tels que les anti-sérums et la technologie des hybridomes⁸ rend possible l'association d'une fonction cellulaire à l'expression d'un marqueur spécifique^{9,10}. Cette stratégie permettra et permet toujours de définir et de caractériser les populations cellulaires du système immunitaire. L'étude des antigènes exprimés par les LT permet l'association de deux fonctions, l'une d'aide aux LB et l'autre cytotoxique, à deux antigènes respectifs : T4 et T8 à l'époque, CD4 et CD8 aujourd'hui.

I.1.b Définitions usuelles des LT CD4

I.1.b.i Dogme Th1/Th2

En 1978, une équipe de chercheurs émet l'hypothèse que les différentes réponses des LB, dépendantes et indépendantes de l'antigène, pourraient être induites par des sous-types de LT distincts. Afin de tester leur hypothèse, les chercheurs discriminent deux sous-types de LT par leur adhérence ou non à une colonne en nylon : Les LT non adhérents sont appelés T helpers 1 (Th1) et les LT adhérents T helpers 2 (Th2). Les chercheurs montrent alors que la capacité d'aide délivrée aux LB par les deux types de LT est différente¹¹. En 1986, Mosmann et Coffman reprennent ces

appellations et associent des fonctions ainsi que des cytokines à ces Th1 et Th2. Ils proposent une définition phénotypique et fonctionnelle exclusive pour ces deux populations : les Th2 ne sécrètent pas d'interféron γ (IFN γ) ni d'interleukine (IL)-2, sécrétées par les Th1. Les Th2 sécrètent en revanche du MCGF2 (ancien nom de l'IL-4) et aident à la production d'IgE et IgG1. Mosmann et Coffman anticipent déjà une complexité supplémentaire au sein de ces sous-types : “ *The presence or absence of some of the proteins in particular T cell clones suggest that additional bioassays may reveal heterogeneity within Th1 and Th2 groups* ”¹². L'idée d'une dualité entre les profils Th1 et Th2 est renforcée par le fait que l'IFN γ inhibe spécifiquement la prolifération des Th2. A l'inverse, les Th2 prolifèrent avec de l'IL-4 en présence d'IL-1, contrairement aux Th1¹³.

L'étude des facteurs de transcription (FT) permettra d'asseoir la dichotomie Th1/Th2. Le FT GATA3 est exprimé par un LT CD4 naïf stimulé dans un environnement pro-Th2. Ce FT est nécessaire pour le maintien du phénotype caractéristique des Th2, défini par la production d'IL-4¹⁴. Le développement de Th1 est associé à une protéine de la famille des T-box. Elle est nommée T-bet (T-box expressed in T cells). L'expression de ce FT dans des LT CD4 naïfs permet le développement d'un profil Th1, défini selon la production d'IFN γ ¹⁵.

Le dogme Th1/Th2 ne suffira pas à expliquer toutes les réactions immunitaires. Dès la fin des années 1990, certains chercheurs mettent en garde contre les préconceptions, qui pourraient être un frein à de nouvelles découvertes¹⁶.

I.1.b.ii Autres sous-types principaux de LT CD4 effecteurs

Pendant longtemps, les réponses lymphocytaires LT CD4 ont été restreintes à la dichotomie Th1/Th2. La découverte de nouveaux sous-types effecteurs a permis de mieux appréhender la complexité des réponses LT CD4. Mon but n'est pas ici de décrire de façon exhaustive les différents sous-types de LT CD4 effecteurs mais de relater comment chaque sous-type fonctionnel s'est distingué des autres.

Th17. La découverte des Th17 fait suite à un paradoxe entre une réaction immunitaire et son explication par le dogme Th1/Th2. L'injection de Th1 au niveau des pattes de souris induit un gonflement après 24 heures et cette réaction d'hypersensibilité retardée n'est pas reproduite avec des Th2. De fait, les réactions inflammatoires semblent être conduites par les Th1. Alors que l'injection d'IFN γ devrait augmenter l'inflammation, celle-ci la diminue. De même, l'usage d'un

anticorps anti-IFN γ empire l'inflammation alors qu'il devrait théoriquement la diminuer. La découverte de l'IL-23, cytokine associée à ces réactions inflammatoires, permet d'identifier un nouveau sous-type fonctionnel de LT CD4. Cette cytokine induit la sécrétion d'IL-17 mais pas d'IFN γ par les LT CD4. Le transfert de LT CD4 sécrétant de l'IL-17 induit une réaction inflammatoire et bloquer l'IL-17 diminue l'inflammation. L'IL-4 et l'IFN γ inhibent la production d'IL-17 par les LT CD4, ce qui suggère l'existence d'un sous-type de LT CD4 exclusif des deux autres précédemment décrits¹⁷. Le développement des Th17 est associé au facteur de transcription ROR γ t (RAR-related orphan receptor gamma). Lorsque l'expression de ce FT est supprimée dans les LT CD4, ils ne sont pas capables de produire de l'IL-17¹⁸. Les Th17 sont particulièrement associés à l'immunité des muqueuses et un rôle pathogénique leur est attribué dans de nombreuses maladies inflammatoires et auto-immunes.

T régulateurs (Tregs). Le concept d'un sous-type de LT immunosuppresseurs date des années 1970. Le fait que l'injection de LT chez des animaux thymectomisés permette de prévenir l'apparition de syndromes auto-immuns prouve leur existence. Ces LT furent appelés suppresseurs faute de marqueurs fiables pour les désigner. Les premiers marqueurs qui leur sont associés sont le CD5 et CD45R. Chez la souris, les LT CD5^{high} sont capables de limiter le développement de syndromes auto-immuns alors que les lymphocytes CD5^{low} les déclenchent¹⁹. Le transfert de LT CD45R^{hi} chez des rats athymiques ou des souris présentant une immunodéficience combinée sévère conduit à la manifestation d'une inflammation dans de nombreux organes. En revanche, le co-transfert de LT CD45R^{hi} avec des LT CD45R^{lo} ne conduit pas à de l'inflammation^{20,21}. En 1995, l'expression du récepteur de haute affinité à l'IL-2 (CD25) est rapportée sur ces LT CD5^{hi}CD45R^{lo}. La déplétion de ces LT induit le développement de syndromes auto-immuns²². Les premiers tests immunosuppresseurs *in vitro* sont faits en 1998, où il est montré que ces LT CD4 CD25^{pos} sont capables de limiter la prolifération des LT CD4 et CD8²³. L'importance du facteur de transcription Foxp3 dans de nombreux contextes auto-immuns oriente vers une recherche de l'expression de ce facteur dans ces LT CD4. Il est montré en 2003 que l'expression de Foxp3 est indispensable pour la mise en place et le maintien du phénotype immunosuppresseur de ces LT CD4^{24,25}. Les Tregs sont associés à la régulation des réponses immunitaires. Une complexité supplémentaire s'est ajoutée avec l'identification de sous-populations dans les Tregs. Les Tregs thymiques exprimant le Foxp3 à la sortie du thymus et les Tregs périphériques (pTregs), dont l'expression de Foxp3 est induite, sont distingués. L'analyse du répertoire des récepteurs des LT (TCR) entre ces deux populations a permis de mettre en évidence que les pTregs ne sont pas restreints aux antigènes du soi et dérivent de LT CD4 aux propriétés initialement non régulatrices²⁶. D'autres populations de

LT CD4 appelées Tr1 et les Th3 qui n'expriment pas le Foxp3 ont également été décrites, illustrant la difficulté d'associer un phénotype précis à une fonction précise.

Les **T folliculaires helpers (Tfh)**, sujets de cette thèse, seront décrits dans la suite de cette introduction.

La diversité des LT CD4 s'est étoffée et deux autres sous-types se sont ajoutés. L'étude des LT CD4 dans la peau de patients atteints de dermatite atopique ou de psoriasis a révélé l'existence de LT CD4 produisant de l'IL-22 mais pas d'IL-17²⁷. Ces LT CD4 dits **Th22** sont trouvés dans le sang et leur développement est associé au facteur de transcription AHR²⁸. La découverte d'une sous-population sécrétant de l'IL-9, mais pas d'IL-4 conduira à la description du sous-type **Th9**²⁹.

La polarisation d'un LT CD4 naïf vers un de ces profils est déterminée par une combinaison de signaux induits par le pathogène et le microenvironnement. Le fait qu'un partage de TCR soit possible après stimulation antigénique entre des Th1, Th2, et Th17³⁰ montre que la polarisation vers des profils distincts par un même clonotype est possible. Ceci suggère que plus que les propriétés intrinsèques du LT CD4, c'est l'environnement biologique qui détermine l'orientation des réponses effectrices.

I.1.b.iii Mémoire et migration

De nombreuses études ont permis l'association d'une mémoire aux différents profils fonctionnels décrits précédemment, comme les Th1³¹, les Tregs³² ou les Th17³³. Au même titre que la classification fonctionnelle, la mémoire des LT CD4 est définie par l'expression de marqueurs spécifiques.

Les LT CD4 naïfs et mémoires se distinguent par les expressions respectives de CD45RA et UCHL1 (CD45RO), deux isoformes de la glycoprotéine phosphatase CD45. Cette définition a été posée suite à l'observation d'une prolifération préférentielle des LT CD4 CD45RA^{pos} face à une stimulation non spécifique et d'une prolifération préférentielle des LT CD4 CD45RO^{pos} face à une stimulation antigénique spécifique impliquant le TCR³⁴. Une réexpression de CD45RA par des LT CD4 effecteurs mémoires après restimulation antigénique a été décrite récemment³⁵, montrant qu'il est particulièrement difficile de considérer ces deux marqueurs comme immuablement exclusifs.

Le CD62L (L-sélectine) et le CCR7, récepteurs aux chimiokines et marqueurs de migration au niveau des organes lymphoïdes secondaires (OLS) participent également au cloisonnement des sous-types mémoires et naïfs. La perte d'expression de CD62L sur les LT CD4 conduit, *in vitro*, à une absence de liaison aux veinules à endothélium épais (HEV) et à des défauts de migration des lymphocytes au niveau des OLS *in vivo*³⁶. Le CCR7 et le CD62L sont exprimés par les LT CD4 naïfs pour leur migration aux ganglions plutôt qu'aux tissus inflammés, afin qu'ils s'y activent et acquièrent leurs fonctions effectrices³⁷, selon le schéma traditionnel des réponses LT CD4. Chez les LT CD4 mémoires, l'expression de CCR7 est également possible³⁸. Cette population CCR7^{pos} exprime le CD62L qui permet sa migration aux OLS. A l'inverse, la population CCR7⁻ exprime préférentiellement des molécules associées à une migration dans les tissus. Au final, deux populations de LT CD4 mémoires sont définies : les LT CD4 à mémoire centrale (T_{cm}), CCR7⁺, capables d'aller migrer aux OLS et les LT CD4 effecteurs mémoires (T_{em}), CCR7⁻, capables de migrer dans les tissus inflammés. L'association entre ces sous-types mémoires et les phénotypes fonctionnels Th précédemment décrits est complexe. S'il est montré une empreinte Th1 ou Th2 plus représentée parmi les T_{em}, les T_{cm} peuvent également la porter. A l'inverse, si les T_{cm} expriment de manière plus importante des marqueurs de migration aux OLS, les T_{em} peuvent également les exprimer de manière transitoire³⁹. Une autre population d'abord décrite chez les LT CD8⁴⁰, résidente des tissus (T_{rm}) est également décrite. L'expression de CD69, une lectine et marqueur d'activation ainsi que de CD103, une intégrine, est utilisée pour définir cette population résidente des tissus. Alors que cette population était pensée comme immuablement résidente des tissus, une étude récente sur des explants de peau suggère que la perte d'expression de CD69 est possible, suivie par une sortie du tissu pour une recirculation dans le sang et la rate⁴¹. Cette dernière observation permet d'illustrer la mobilité tissulaire et circulatoire des LT CD4, et montre la difficulté d'en déterminer de façon stable le phénotype ou la fonction.

Ces données montrent que la classification des LT CD4 s'est progressivement étoffée dans le temps, avec un ensemble de marqueurs phénotypiques qui permettent aujourd'hui de déterminer l'appartenance d'un LT CD4 à un sous-type précis (**Figure 1**).

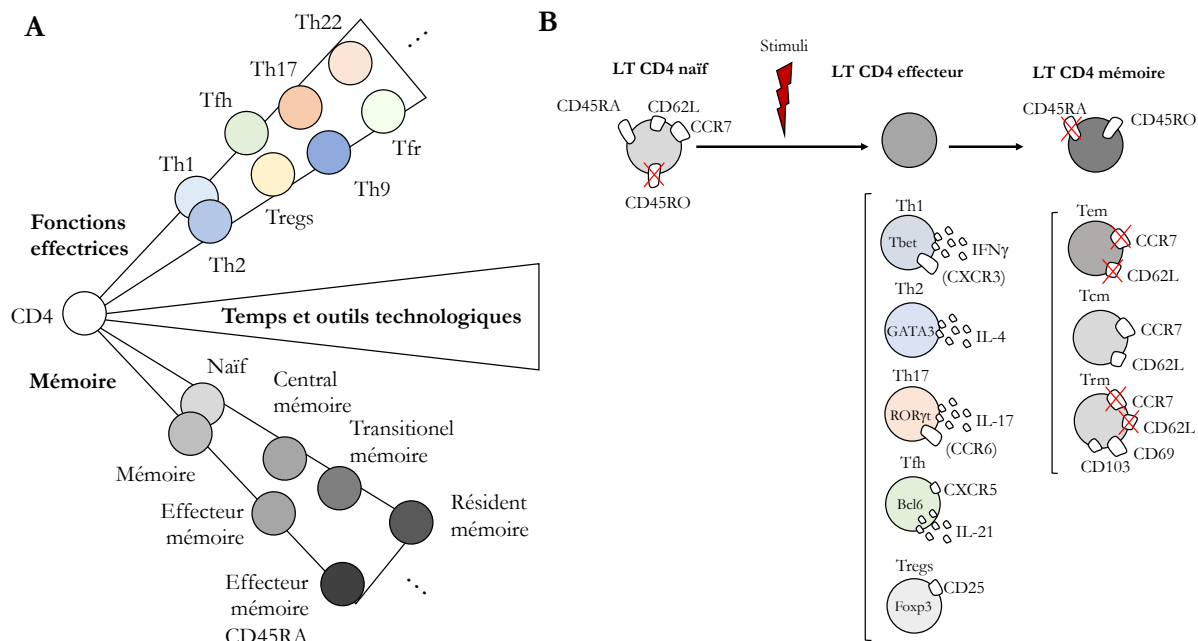


Figure 1 : (A) Complexification progressive de la caractérisation des réponses LT CD4 et (B) marqueurs exclusifs aux principaux sous-types LT CD4

I.1.c Limites de la classification actuelle : Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle

L'évolution des techniques permettant d'étudier simultanément une multitude de marqueurs a révélé une grande hétérogénéité de phénotypes de LT CD4. L'hétérogénéité se définit comme une collection de phénotypes variables reliés par des marqueurs phénotypiques communs. Au sein de cette hétérogénéité, de nouvelles sous-populations, se caractérisant par des chevauchements entre traits phénotypiques initialement pensés comme exclusifs d'un sous-type de LT CD4 donné, ont été identifiées.

Pour exemple, des LT CD4 co-exprimant T-bet et GATA3 et les cytokines associées sont observés dans l'étude d'une réponse antiparasitaire⁴². De même, des Th1 (T-bet⁺CXCR3⁺) exprimant des marqueurs Th17 (ROR γ t⁺CCR6⁺) ont été identifiés dans certaines infections comme la tuberculose. Ces LT CD4 ne produisent pas d'IL-17 et sont distincts transcriptionnellement des Th1, Th2 et Th17⁴³. A l'inverse, l'implication de Th17 qui sécrètent de l'IFN γ a été montrée dans le déclenchement d'une auto-immunité⁴⁴. Dans l'asthme atopique, il est décrit des Th2/Th17 qui expriment simultanément de l'IL-4, de l'IL-17, GATA3 et ROR γ t⁴⁵. Les Tregs, définis comme Foxp3⁺, sont une bonne illustration des chevauchements phénotypiques observés dans les LT CD4

car ils peuvent exprimer simultanément les FT associés aux autres types de Th, tels que ROR γ T ou GATA3⁴⁶. La sécrétion de cytokines relatives à d'autres Th effecteurs est également observée dans les Tregs, comme celle d'IFN γ dans le contrôle de la réaction du greffon contre l'hôte⁴⁷, d'IL-17 dans le cadre d'une étude sur des tumeurs⁴⁸ ou d'IL-4 dans le cadre de tests d'immunosuppression *in vitro*⁴⁹.

Les techniques multiparamétriques à l'échelle de la cellule unique ont été particulièrement utiles pour dévoiler la diversité des réponses LT CD4. Par l'analyse de sang d'individus sains selon 23 marqueurs avec de la cytométrie de masse, une équipe a mis en évidence 11 sous-types distincts de Th et 4 sous types de Tregs. Parmi ces sous-types, il est décrit des LT CD4 aux traits phénotypiques Th1 et Th17 ou Th2 et Tregs combinés⁵⁰. Une autre étude utilisant la même technologie montre que l'empreinte phénotypique des LT CD4 est également dépendante des tissus. L'expression combinée de marqueurs, récepteurs aux chimiokines et cytokines, permet de définir des profils LT CD4 singuliers à différents organes humains (rate, amygdales, ganglions, foie, colon et peau)⁵¹. Dans cette étude, des chevauchements entre production cytokinique sont préférentiellement associés à un organe comme par exemple la combinaison de sécrétion d'IL-4 et IFN γ au niveau des poumons, d'IL-17 et IFN γ au niveau du colon, d'IL-10 et d'IL-17 au niveau des amygdales. La question est par conséquent de savoir si ces profils sont le fruit d'une migration préférentielle directe de ces profils au niveau de tissus spécifiques ou d'une acquisition de ces profils une fois que la migration dans les tissus a lieu. Certains travaux sont en faveur de cette deuxième possibilité. Dans un modèle murin, des travaux récents montrent l'adaptabilité phénotypique des Tregs des OLS aux organes non lymphoïdes, à l'aide de séquençage sur cellule unique de Tregs issus de peau ou de colon et des ganglions drainants respectifs⁵². Bien que focalisée sur une population fonctionnelle unique, la question de cette adaptabilité à un nouvel environnement biologique se pose pour les autres sous-types de LT CD4.

I.1.d Explication à l'hétérogénéité phénotypique des LT CD4 : Propriété de plasticité

La diversité de phénotype décrite sous-entend que l'organisation des réponses LT CD4 est moins binaire qu'initialement pensée. Du fait de l'hétérogénéité phénotypique des LT CD4, la question d'une plasticité lymphocytaire a rapidement été posée. La plasticité cellulaire se définit comme l'acquisition par un LT CD4 Th du phénotype ou de la fonction d'un autre profil Th. Cette plasticité est conceptuellement illustrée dans les premiers articles associant des FT spécifiques aux Th1 et Th2. En effet, la surexpression de T-bet dans des Th2 entraîne la sécrétion d'IFN γ en plus de l'IL-

4¹⁵. A l'inverse, la surexpression de GATA3 entraîne la sécrétion d'IL-4 en plus de l'IFN γ ¹⁴. *In vivo*, des LT CD4 aux propriétés Th1 (production d'IFN γ) sécrètent de l'IL-4 après transfert adoptif chez des souris infectées avec des helminthes⁵³, indiquant qu'un nouveau contexte biologique peut moduler les profils effecteurs. *In vitro*, des Th17 issus de patients souffrant d'arthrite idiopathique juvénile peuvent être convertis en Th17/Th1 ou en Th1⁵⁴. A l'inverse, des travaux chez la souris montrent que des Th1 peuvent se convertir en Th17 sous l'influence de TGF β ⁵⁵. Ces données ne sont présentées qu'à titre d'exemple et la plasticité des Th a été abondamment discutée dans de nombreuses revues^{43,46,56}. Cette plasticité est dépendante de nombreux signaux. Parmi les 3 signaux associés à la différenciation des LT CD4 (TCR, molécules de co-stimulation et cytokines), les cytokines sont à ma connaissance le plus décrit. L'implication du TCR, notamment de l'intensité du signal qu'il délivre, ou des molécules de co-stimulation demeure encore peu connue⁴⁶. Nous avons vu au travers des deux exemples précédents avec les surexpressions de T-bet et GATA3, que les FT guident la plasticité des LT CD4. La considération d'autres aspects a émergé ces dernières années dans l'étude de la plasticité comme la régulation de l'accessibilité aux gènes (épigénétique). En effet, une chromatine plus ou moins ouverte permet d'autoriser ou non l'expression des gènes ayant un rôle dans les fonctions effectrices des LT CD4. Cette régulation est en partie médiée par différents processus de modifications post-transcriptionnelles des histones ou de l'ADN lui-même. Par exemple, des enzymes régulent l'ajout de groupements chimiques sur les histones pour une méthylation, acétylation, phosphorylation ou ubiquitination⁵⁷. Cela permet de compacter de manière différentielle l'ADN et de le rendre plus ou moins accessible. De manière intéressante, le paysage épigénétique est remodelé par les signaux reçus par la cellule et est donc fonction du statut des LT CD4. En effet, l'activation et la différenciation des LT CD4 en des profils effecteurs ou mémoires induit des modifications épigénétiques⁵⁷. La régulation épigénétique du génome apparaît donc également capitale pour la sensibilité des LT CD4 aux stimuli environnementaux et leur capacité à y répondre.

La capacité de conversion des LT CD4 suppose que les LT CD4 mémoires comme les LT CD4 naïfs pourraient contribuer à la diversité des réponses LT CD4. Une étude récente renforce élégamment cette éventualité par l'étude des caractéristiques transcriptomiques et protéiques de LT CD4 mémoires soumis à différents environnements cytokiniques. Les profils résultants sont différents au niveau transcriptomique et protéique (**Figure 2**), montrant que les LT CD4 mémoires restent capables de s'adapter à un nouvel environnement⁵⁸. Ces études *in vitro* sont réductionnistes et au regard de la diversité des signaux tissulaires cellulaires et moléculaires, ces données laissent présager de la complexité de la mise en place des réponses LT CD4. En effet, une même cytokine

(IFN- α) dans des contextes différents (Th1, Th2, Th17) induit des profils LT CD4 transcriptionnels et fonctionnels différents⁵⁹, montrant que l'intégration des signaux par les LT CD4 est complexe car contextuelle. Les LT CD4 sont donc un compartiment cellulaire extrêmement dynamique, plus plastique qu'initialement pensé.

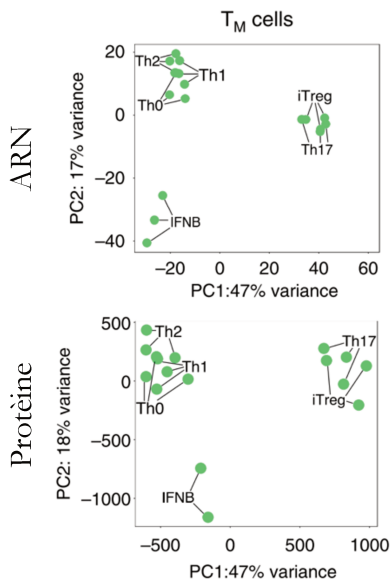


Figure 2 : Analyses en composante principale du transcriptome et protéome de LT CD4 mémoires stimulés et soumis à différents environnements cytokiniques (tiré de ⁵⁸) : Des LT CD4 mémoires (TM) sont stimulés avec un signal mimant le TCR (CD3/CD28) soumis à des environnements sans cytokines (Th0) ou avec des cytokines pro-Th1, Th2, Treg et Th17 et IFN β . L'expression génique est analysée à 5 jours par séquençage d'ARN et l'expression protéique est analysée par spectrométrie de masse. Une analyse en composante principale (PC1, PC2) de la totalité du transcriptome et du protéome a été réalisée.

I.2 Découverte des Tfh

L'aide délivrée aux LB est la première fonction décrite pour les LT. L'association de marqueurs cellulaires spécifiques à cette fonction a permis de définir un nouveau sous-type de LT CD4 : les T folliculaires helpers (Tfh).

I.2.a Brève histoire de la réponse humorale et de sa dépendance aux LT CD4

L'existence d'une réponse immunitaire humorale est montrée en 1890 dans le cadre de recherches thérapeutiques contre la diphtérie et le tétanos, dont les symptômes cliniques sont dus aux toxines bactériennes. Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato, de l'institut allemand Koch, arrivent à guérir des animaux malades en leur injectant le sérum d'animaux immunisés avec des doses sublétales de toxines bactériennes. Le terme d'antitoxine est utilisé par Tizzoni et Cattani en 1891 pour désigner cette substance protectrice contenue dans le sang⁶⁰. Le 25 décembre 1891, le premier enfant est traité efficacement et la mortalité due à la diphtérie baisse en Europe dans les années qui suivent⁶¹. Emil von Behring recevra en 1901 le prix Nobel pour ces découvertes.

Malgré la baisse de mortalité, l'efficacité de cette thérapie ne reste que partielle à cause de la grande variabilité des sérums. Paul Ehrlich, qui a rejoint l'institut Koch en 1890, introduit le concept d'unité, qui représente la quantité de substances actives d'une solution. Ce nouvel outil de mesure permettra la standardisation des sérums, par leur activité et non par leur volume. Paul Ehrlich utilise le terme d'anticorps pour définir ces antitoxines présentes dans le sérum⁶⁰. Pour ses travaux, Paul Ehrlich est nobélisé en 1908 et pose les bases de l'immunité adaptative moderne :

“The relations between toxin and its antitoxin are strictly specific - tetanus antitoxin neutralizes exclusively tetanus toxin, diphtheria serum only diphtherial toxin....”

“the cell receptor, must be identical with the "antitoxin" which is contained in solution in the serum of immunized animals... one can hardly fail to assume that the antitoxin is nothing else but discharged components of the cell, namely receptors discharged in excess.”

Lecture de Paul Ehrlich au Nobel en 1908

A la fin des années 1890, Pfeiffer et Marx associent des organes à la production de ces anticorps. En immunisant des cochons d'inde et des lapins avec le bacille cholérique chauffé, ils rapportent que la concentration d'anticorps est plus importante dans les ganglions, la rate et la moelle osseuse que dans le sérum 5 jours après immunisation⁶². L'association de la production des anticorps à un sous-type cellulaire est faite plus tard. Partant de l'observation que la formation d'anticorps apparaît de manière concomitante à une augmentation du nombre de plasmocytes, une équipe de chercheurs immunise des souris avec des érythrocytes de mouton et prélèvent ensuite des cellules ganglionnaires et musculaires. Les cellules sont lavées puis lysées. L'hémolyse et l'agglutination sont plus importantes pour les lysats issus de cellules ganglionnaires. Les anticorps sont donc présents dans les lymphocytes, puisqu'ils représentent 90% des cellules ganglionnaires et sont absents du tissu musculaire⁶³. Cette association est renforcée quatre années plus tard par des expériences *in vitro*, où il est montré que plus un fragment splénique contient de plasmocytes plus la production d'anticorps est importante⁶⁴.

Dans les années 1960, la dépendance de la production d'anticorps au thymus est démontrée. Des chercheurs utilisent des modèles de déplétion sélective du Bursa (équivalent de la moelle osseuse) et du thymus chez le poulet. Si le thymus est enlevé avant immunisation, la quantité d'anticorps est réduite et le tissu lymphoïde au sein de la rate est histologiquement impacté⁶⁵. Un an plus tard, une

équipe de chercheurs arrive aux mêmes conclusions chez la souris par des transferts adoptifs de cellules thymiques et de moelle osseuse. Des souris irradiées, puis immunisées après transferts de cellules thymiques et de moelle osseuse, sont capables de produire des anticorps contrairement à des souris dans lesquelles seules des cellules de moelle osseuse ont été injectées⁶⁶.

Dans une série d'articles publiés en 1968, Miller et Mitchell démontrent que la production d'anticorps intervient grâce à la coopération de deux types cellulaires. L'un permet la formation des anticorps, l'autre permet d'induire la production d'anticorps par le premier. Ces cellules sont respectivement les LB et les LT CD4. Cette fonction d'aide est associée en 1986 aux Th2, auxquels sont associées certaines cytokines¹². Dès 1982, la présence d'un sous-type de LT spécialisé au niveau des OLS est questionnée⁶⁷ :

“Our findings indicate that T cell distribution within the various functional lymphoid domains is not purely random, and suggest the subpopulations of T cells present in B zones may be performing specific helper functions.”

Citation tirée de ⁶⁷

I.2.b Les Tfh comme sous-type fonctionnel et tissulaire

Dans les années 2000, l'expression de CXCR5 par les LT CD4 est associée à la fonction spécifique d'aide aux LB. Des LT CD4 CXCR5⁺ issus d'amygdales, co-cultivés avec des LB, induisent une production d'immunoglobulines plus importante que des LT CD4 CXCR5⁻^{68,69}. Dans ces articles, le nom de T folliculaires helpers (Tfh) est introduit du fait de la localisation anatomique de ces LT CD4 dans les follicules des OLS. L'expression de CXCR5, déjà mise en évidence sur les LT CD4 au niveau des OLS, était initialement associée à une mémoire lymphocytaire⁷⁰.

Les Tfh présentent une signature transcriptomique distincte des Th1 et des Th2 avec une forte expression du FT Bcl6 (B-cell lymphoma 6 protein)⁷¹, laissant penser d'un rôle prépondérant de ce FT dans cette population. En 2009, l'importance de Bcl6 pour l'acquisition du phénotype Tfh est montrée^{72,73}. En son absence, la différenciation en Tfh est inhibée alors que celles des autres Th n'est pas impactée⁷⁴. Depuis, les fonctions de Bcl6 ont été clarifiées, notamment son rôle de répresseur de FT répresseurs de la différenciation des Tfh⁷⁵. La balance entre FT régulant le devenir en Tfh la plus connue implique Bcl6 et Blimp-1, Bcl6 inhibant Blimp-1 pour l'établissement du phénotype Tfh⁷⁶. De nombreux autres facteurs de transcription sont décrits pour leur rôle dans le

développement des Tfh⁷⁷, certains favorables, tels que Tox2⁷⁸ et Thpok⁷⁹, d'autres défavorables tels que Prkd2⁸⁰ et Klf2^{75,81}.

Le FT Bcl6 favorise l'expression de gènes de localisation et de différenciation propres aux Tfh⁸², comme le CXCR5 et le PD-1^{83,84}. Ces deux marqueurs membranaires sont communément utilisés pour définir les Tfh *ex vivo*, et leur niveau d'expression permet de déterminer l'association des Tfh aux GC ou non^{85,86}. Les Tfh associés aux GC (GC Tfh), hautement fonctionnels, expriment plus fortement le CXCR5 et le PD-1 que les Tfh non associés aux GC (non-GC Tfh) (**Figure 3**). Cette définition a été confirmée récemment *in situ* sur des ganglions humains par une approche d'histocytométrie⁸⁷. Afin d'exercer leur fonction d'aide aux LB, les Tfh expriment des molécules de co-simulation telles que ICOS, CD40L, OX40, SLAM et produisent de l'IL-21, de l'IL-4^{88,89}. Les Tfh sont également associés à la production de CXCL13 chez l'Homme⁹⁰ mais pas chez la souris.

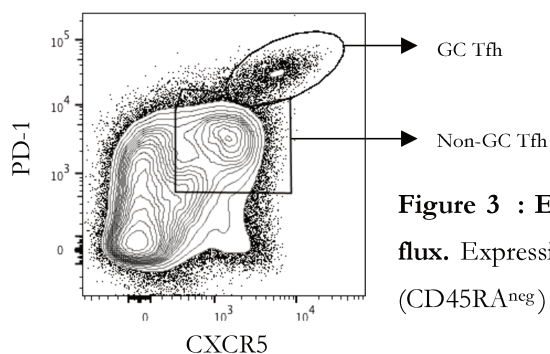


Figure 3 : Exemple de définition des Tfh par cytométrie de flux. Expression de CXCR5 et PD-1 par des LT CD4 mémoires (CD45RA^{neg}) spléniques.

L'implication bénéfique ou délétère des Tfh dans les réponses anti-infectieuses, vaccinales, auto-immunes et tumorales est aujourd'hui démontrée⁷⁶. La compréhension des mécanismes conduisant à leur génération est donc particulièrement importante.

I.3 Génération des Tfh

Les Tfh se différencient et se maintiennent au niveau des OLS pour leur fonction d'aide aux LB, à l'inverse des autres Th générés destinés à quitter les OLS et à migrer au site d'inflammation.

I.3.a Organisation des organes lymphoïdes secondaires (OLS)

Les OLS sont le site d'initiation et de maturation de la réponse adaptative. Leur organisation architecturale permet de contrôler et d'optimiser la coopération entre cellules spécifiques d'un

antigène, pour la mise en place d'une réponse immunitaire efficace. De manière simpliste, les OLS regroupent principalement deux zones immunitaires distinctes : l'une riche en LT (zone T) et l'autre riche en LB (zone B). C'est à ces deux zones que la génération des Tfh est associée. Cette compartimentalisation en deux zones est organisée par les cellules dites fibroblastiques réticulaires (FRC). Il est admis que ces cellules offrent un soutien structurel pour la formation et le maintien des territoires immunitaires des OLS. Souvent considérées comme cellules spectatrices de la réponse immunitaire, leur rôle comme acteurs de sa mise en place est de plus en plus considéré et reste à clarifier. Lors d'une sollicitation du système immunitaire par un pathogène, les FRC soutiennent les changements dynamiques des tissus lymphoïdes, comme l'expansion de la taille des ganglions pour l'accueil des LT CD4 naïfs. Les FRC sont par exemple capables de proliférer suite à une exposition antigénique⁹¹, indiquant qu'elles sont un des facteurs majeurs de la mise en place des réponses adaptatives.

De manière réductrice, deux types de FRC régissent les territoires et les migrations cellulaires au sein des OLS. Les FRC de la zone T sécrètent les chimiokines CCL19 et le CCL21 et permettent l'attraction des LT CD4 naïfs ou centrales mémoires via le CCR7. Les LT CD4, ayant préalablement interagis avec les parois des HEV via le CD62L, colonisent cette zone. L'absence d'expression de CCL21 ou de CCR7 conduit à une déstructuration des OLS, dans lesquels les différentes zones ne sont plus distinguables et la réponse adaptative ne peut aboutir⁹². La concentration des LB dans la zone B est guidée par la sécrétion de CXCL13 par des cellules dendritiques folliculaires (FDC). Cette vision est simplifiée et le rôle des FRC, plus complexe, a été abondamment passé en revue^{91,93}. A l'instar des axes de migration dépendants du CCL19, CCL21 et CXCL13, la sortie des LT CD4 des OLS passe par un axe de migration dépendant d'un lipide, le Sphingosine-1-Phosphate (S1P) et du récepteur S1PR1 respectif exprimé par les LT CD4. L'expression de ce récepteur permet aux LT CD4 de quitter l'organe lymphoïde au niveau des vaisseaux lymphatiques efférents. Cet axe est connu dans les ganglions mais reste à préciser dans la rate⁹⁴, dont les structures anatomiques ne sont pas totalement similaires.

Les structures d'un ganglion et de la rate sont schématisées en **Figure 4**. La rate, tissu sur lequel nos recherches ont été réalisées, s'organise en deux parties différentes dites pulpes spléniques. La pulpe blanche englobe les structures lymphoïdes qui ont pour but la mise en place d'une réponse immunitaire. La pulpe rouge a pour rôle la filtration des globules rouges, bien que des fonctions immunitaires y soient également associées. La rate est un tissu périphérique du système circulatoire et la compartimentalisation séparant les zones LT et LB y est similaire à celle des ganglions.

Quelques différences sont cependant à signifier. Contrairement aux ganglions, la rate ne possède pas de capsule. Parallèlement, les cellules et les antigènes n'y sont pas apportés via les vaisseaux afférents. Au final, la rate peut être considérée comme l'OLS drainant du système circulatoire, par analogie aux ganglions drainants les différents tissus⁹⁵.

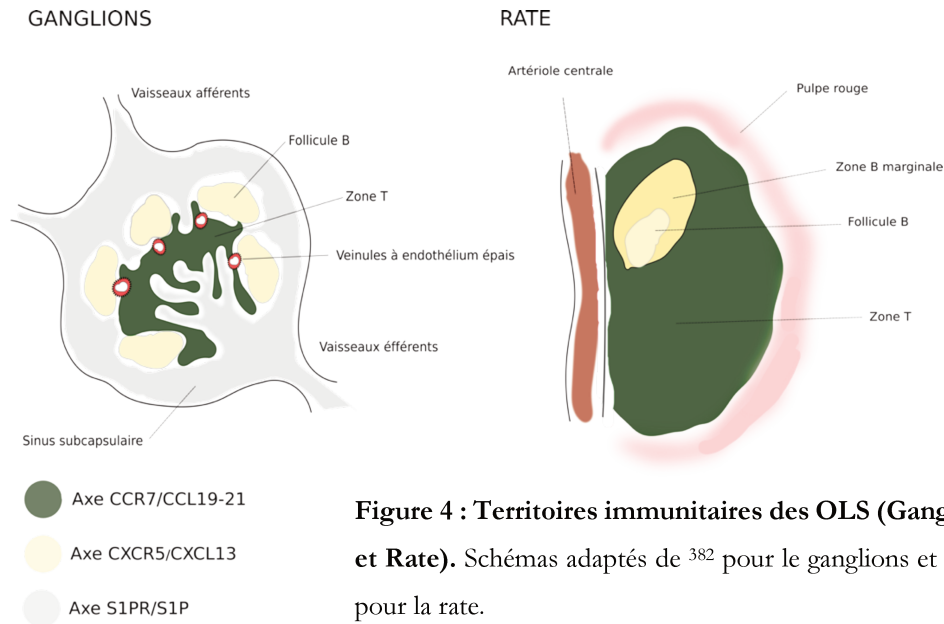


Figure 4 : Territoires immunitaires des OLS (Ganglion et Rate). Schémas adaptés de ³⁸² pour le ganglions et de ⁹⁵ pour la rate.

I.3.b Voie de génération séquentielle des Tfh à partir du LT CD4 naïf

L'intégration des différentes observations rapportées chez la souris et chez l'Homme permet de proposer un modèle relativement complet de génération de Tfh à partir d'un LT CD4 naïf, bien que la cinétique exacte des signaux engagés reste à préciser. Chez la souris, la mise en évidence de l'implication de facteurs cellulaires ou moléculaires dans la génération des Tfh repose souvent sur des modèles d'ablation du facteur pour lequel un rôle est supposé. Chez l'Homme, cette mise en évidence s'appuie principalement sur des modèles *in vitro* de culture de LT CD4 naïfs.

La voie de génération de Tfh impliquant le LT CD4 naïf se déroule successivement dans la zone T et la zone B. Elle dépend de deux interactions cellulaires : une première avec la cellule dendritique (DC pour Dendritic cell) dans la zone T et une deuxième avec le LB dans la zone B. Les LB spécifiques de l'antigène sont rares au début d'une immunisation et sont donc rarement considérés comme une cellule présentatrice de l'antigène (CPA) capable d'initier les réponses LT CD4. Ce rôle d'initiation est rempli par les DC qui s'abrogent de la contrainte d'une spécificité pour l'antigène grâce à divers récepteurs aux molécules des pathogènes (PAMPs pour Pathogen Associated Molecular Patterns), qui permettent une internalisation non médiée par une reconnaissance

spécifique, puis une présentation aux LT CD4. En revanche, les cellules présentatrices de l'antigène majoritaires dans une réponse plus tardive sont les LB, ayant proliférés après reconnaissance de l'antigène.

Le suivi *in situ* de LT CD4 naïfs spécifiques d'un antigène modèle (ovalbumine ou OVA) transférés chez des souris immunisées avec ce même antigène permet de bien illustrer ce modèle de génération de Tfh. A deux jours de l'immunisation, les LT CD4 sont principalement au niveau de la zone T de la rate et des ganglions, dans laquelle ils interagissent avec les DC. A 4 jours de l'immunisation, les LT CD4 spécifiques se localisent au niveau du follicule B pour une interaction avec les LB. A 7-8 jours de l'immunisation, le nombre de LT CD4 dans les follicules B est augmenté et les interactions avec les LB sont majoritaires⁹⁶. La DC seule est suffisante pour l'induction d'un phénotype Tfh (CXCR5⁺PD-1⁺Bcl6⁺) à des temps précoces, dans un modèle d'immunisation avec de l'OVA⁹⁷ ou d'infection au virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)⁸³. Dans ce modèle d'infection virale, des souris dans lesquelles les LB sont préalablement éliminés ne présentent pas de réduction de Tfh à 3 jours de l'infection, suggérant qu'ils ne sont pas nécessaires à l'induction de Tfh. En revanche, une diminution de la fréquence de Tfh apparaît à 4 jours en l'absence de LB⁸³, indiquant qu'ils sont nécessaires pour le maintien des Tfh. En effet, l'absence de LB ne permet pas la génération de Tfh hautement fonctionnels associés aux GC^{86,97,98}, définis comme CXCR5^{hi}PD-1^{hi}. Ces données supportent la nécessité des interactions avec la DC et le LB pour la génération de Tfh. Les signaux délivrés lors des interactions avec la DC et le LB peuvent être partagés, comme pour l'axe ICOS/ICOS-L qui sera décrit par la suite.

Les principales étapes de cette génération sont indiquées dans la **Figure 5**.

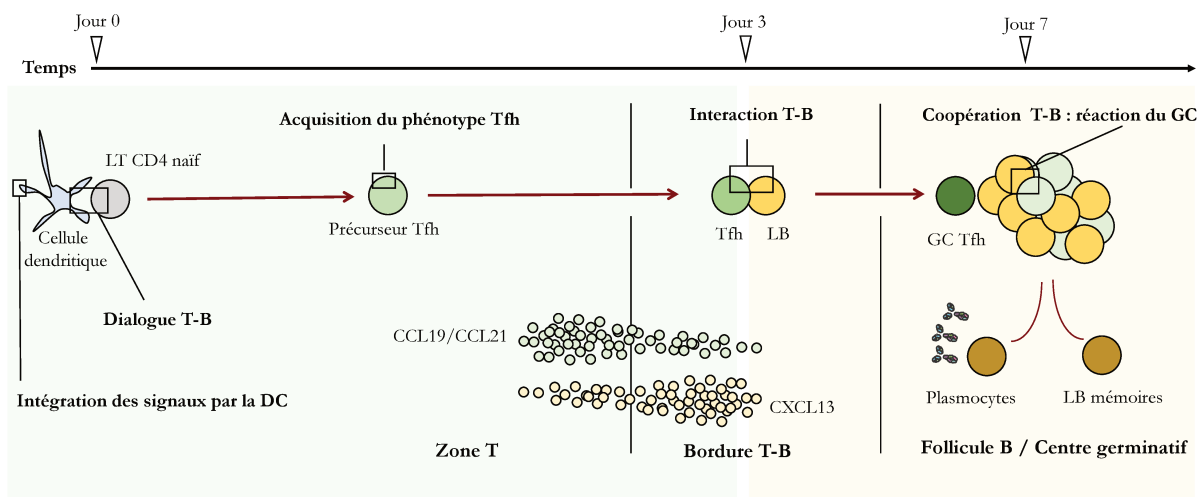


Figure 5 : Voie de génération séquentielle du Tfh. Cette voie passe par (1) l'initiation de l'activation des LT CD4 naïfs par la DC, (2) la migration du LT CD4 grâce à l'acquisition du phénotype Tfh au niveau du follicule B pour son interaction avec le LB et (3) le dialogue entre le Tfh et LB avec une coopération des deux types cellulaires pour la formation du GC et la génération de plasmocytes et de LB mémoires.

I.3.b.i Interaction avec la cellule dendritique (DC) dans la zone T

.I.3.b.i.1 Mise en place du phénotype Tfh

Comme toute initiation de la différenciation d'un LT CD4 naïf en un profil effecteur, l'interaction avec la DC pour le développement de Tfh implique le TCR, des molécules de co-stimulation et des cytokines.

Une reconnaissance antigénique médiée la DC pour l'induction de Tfh est nécessaire puisque l'ablation sélective de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMHII) sur les DC conduit à une absence de génération de Tfh⁹⁶. La modulation de la force du signal délivré par le TCR est également déterminante dans l'orientation du LT CD4 naïf vers un profil Tfh. En effet, le développement d'un phénotype Tfh est favorisé chez les LT CD4 naïfs ayant des TCR plus affins pour l'antigène^{99,100}. Chez l'homme, des LT CD4 naïfs soumis à des doses croissantes de billes CD3/CD28, mimant un signal TCR de plus en plus fort, se caractérisent par une intensité d'expression croissante des marqueurs Tfh¹⁰¹. Ce fort signal TCR est ensuite associé à une forte expression de Bcl6, qui précède l'expression de CXCR5, PD-1 et ICOS^{100,102}. Plus récemment, ce fort signal TCR a également été associé à un axe de régulation dépendant de l'IL-2 médié à un stade précoce du développement des Tfh¹⁰⁰. Les LT CD4 ayant reçu un fort signal TCR s'orientent préférentiellement vers un profil Tfh, avec une forte sécrétion d'IL-2. Alors que cette sécrétion d'IL-2 peut sembler surprenante au vu de son effet inhibiteur sur la génération des Tfh¹⁰³, elle permet de limiter l'établissement du phénotype Tfh chez les LT CD4 ayant reçu un faible signal TCR, ces derniers exprimant fortement le récepteur à l'IL-2 (IL-2R)¹⁰⁰. Le signal délivré par l'IL-2R limite via STAT5 le développement du phénotype Tfh¹⁰⁵ et permet ainsi un contrôle de la réponse Tfh à des temps précoces. A l'inverse, les DC sécrètent dans la zone T du CD25 soluble pour favoriser un développement Tfh en captant l'IL-2¹⁰⁵.

Suite à la reconnaissance antigénique, l'interaction entre la DC et le LT CD4 implique de nombreuses molécules de co-stimulation. Un des axes fortement associé à la génération des Tfh est l'axe ICOS-L/ICOS. Il est parfois difficile de savoir si son rôle apparaît dans l'interaction avec

la DC ou avec le LB car son importance est double, dans l'induction et le maintien de la réponse Tfh. Dans un modèle murin de réponse LT CD4 spécifique au LCMV, des LT CD4 naïfs déficients pour ICOS transférés à des souris receveuses témoignent d'une réduction de l'expression Bcl6 après infection. De manière cohérente, cette absence d'expression de ICOS par les LT CD4 conduit à une absence de génération des Tfh à 3 jours de l'infection⁸³, alors que cette génération est montrée comme indépendante des LB. Cette étude suggère donc une implication d'ICOS dans l'interaction de la DC avec le LT CD4 pour l'induction de Bcl6 et d'un profil Tfh. Dans une autre étude également basée sur des transferts adoptifs de LT CD4 spécifiques, la molécule de co-stimulation CD28 est impliquée dans l'induction d'une réponse Tfh à des temps précoces et non pour leur maintien¹⁰⁶. La dépendance à cette molécule pour une réponse Tfh à des temps précoces supporte l'idée d'un rôle dans l'interaction LT CD4 – DC. En effet, une absence sélective des ligands de CD28 (CD80/CD86) sur les DC conduit à l'absence de génération de Tfh, 10 jours après immunisation avec un antigène modèle. En revanche, l'absence de ces marqueurs sur les LB n'induit pas de variation dans la proportion de Tfh générées⁹⁶ et montre leur implication préférentielle dans le dialogue avec la DC. Parallèlement, l'absence d'expression d'OX40 dans un modèle de souris KO conduit à une baisse de cellules Tfh après infection avec un virus de la vaccine. Les LT CD4 OX40⁺ co-localisent habituellement avec les DC OX40L⁺ dans la rate, suggérant que cet axe OX40/OX40L de co-stimulation intervient lors de l'interaction avec la DC¹⁰⁷. De manière cohérente, l'importance de l'axe OX40/OX40L est également identifiée chez l'Homme. Des DC primaires stimulées avec la lympopoïétine stromale thymique (TSLP) puis co-cultivées avec un LT naïf conduisent à la génération de Tfh de manière OX40L dépendante. Bloquer l'axe OX40/OX40L dans cette co-culture aboutit à une baisse de la production d'IL-21 et CXCL13, ainsi qu'à une baisse d'expression de Bcl6¹⁰⁸. Par ailleurs, la stimulation de LT CD4 naïfs avec du OX40L soluble conduit à l'expression de Bcl6, CXCR5, CD40L et à la production d'IL-21¹⁰¹.

L'induction d'un profil Tfh est également dépendante de cytokines spécifiques. Si les axes de co-stimulation sont considérés comme conservés entre les modèles animaux et l'Homme, ce n'est pas le cas pour les cytokines.

Chez la souris, une déficience pour l'IL-6 ou l'IL-6R montre une réduction de la formation de Tfh⁷⁶. De manière similaire, des souris déficientes pour l'IL-21 témoignent d'une diminution du nombre de Tfh et des LT CD4 naïfs soumis à de l'IL-21 acquièrent l'expression de marqueurs Tfh¹⁰⁹. Alors que l'IL-12 est connue pour son effet pro-Th1, elle a également un effet promoteur

du phénotype Tfh sur des LT CD4 naïfs chez la souris¹¹⁰. Chez l'homme, l'IL-6 influence peu la quantité de production d'IL-21 de LT CD4 *in vitro*⁷⁶. Les cytokines connues pour orienter un LT CD4 naïf vers un profil Tfh sont l'IL-12 seule^{111,112}, combinée avec du TGFβ ou de l'activine A^{113,114}. L'implication de ces 3 cytokines pour le développement d'un phénotype Tfh a été montrée récemment dans des co-cultures de LT CD4 naïfs avec des cellules primaires issues de tissu lymphoïde (macrophages et DC)¹¹⁵. L'ajout d'un anticorps anti-IL-12 dans la co-culture de LT CD4 naïfs avec des cDC2 ou des macrophages entraîne une baisse d'induction de la production d'IL-21. Bloquer l'activine A et le TGFβ entraîne une baisse de la sécrétion de CXCL13¹¹⁵. L'activine A, récemment testée comme adjuvant dans le cadre d'une vaccination contre le VIH, promeut la génération de Tfh chez des primates non humains. Son ajout à la formulation vaccinale permet une augmentation de la proportion des Tfh dans les ganglions à 14 semaines de l'immunisation¹¹⁶.

.I.3.b.i.2 Sous-types de DC associés à la génération des Tfh

Les DC permettent l'initiation des réponses immunitaires LT CD4. Les DC (i) intègrent les signaux du contexte biologique, (ii) communiquent via des interactions moléculaires membranaires et solubles avec les LT CD4 pour (iii) l'orientation vers le phénotype Th le plus approprié au contexte biologique. Du fait de leur rôle de pivot, les DC sont hétérogènes et se caractérisent par de nombreux phénotypes. On peut les diviser en deux grandes catégories principales : les DC conventionnelles (de type 1 et 2) et les DC non conventionnelles. Parmi les DC non conventionnelles, on distingue les DC dérivées de cellules plasmacytoïdes, les DC dérivées de monocytes ou encore les cellules de Langherans. Les DC conventionnelles se séparent en deux sous-groupes selon leur ontogénie, dépendante ou non de l'expression du FT Batf3 : de type 1 (cDC1) et de type 2 (cDC2). Chez la souris, l'implication d'un sous-type particulier de DC dans l'induction d'une réponse Tfh a pu être observée *in vivo*, par des modèles de déplétion sélective ou de ciblage spécifique. Chez l'Homme, l'association d'un sous-type de DC à une réponse Tfh repose essentiellement sur sa capacité à induire l'expression de marqueurs associés aux Tfh chez des LT CD4 naïfs cultivés *in vitro*.

Chez la souris, si les cDC1 peuvent conduire des réponses humorales, le rôle des cDC2 semble prépondérant pour l'induction d'une réponse Tfh¹¹⁷. Par exemple, la déplétion de cDC2 conduit à une absence de Tfh dans un modèle d'allo-immunisation¹¹⁸. Aussi, dans le cadre d'une immunisation intranasale, les cDC2 migratoires, mais non les cDC1, sont responsables de l'initiation de la réponse Tfh¹¹⁹. L'implication d'autres types de DC dans les réponses Tfh est

cependant rapportée. Les DC dérivées de monocytes (moDC) permettent d'augmenter la réponse Tfh, dans un contexte d'immunisation avec des adjuvants particuliers¹²⁰. De manière similaire, les cellules de Langerhans (LC) sont également associées à l'induction d'une réponse Tfh, après immunisation intradermique^{121,122}. L'induction de la réponse Tfh dépend également du récepteur impliqué dans l'endocytose de l'antigène et de l'activation de la DC. Ces observations ont été permises grâce à des expériences d'adressage antigénique à la DC via des récepteurs spécifiques. Pour exemple, délivrer l'antigène à des cDC1 via les marqueurs Clec9 ou XCR1 permet une forte réponse anticorps^{123,124}. Le ciblage des cDC2 via DCIR2 induit une réponse Tfh¹²⁵. Avec un système basé sur des anticorps anti-langerine, des travaux montrent que le ciblage de ce récepteur sur deux types de DC différentes (cDC1 ou cellules de Langerhans) n'entraîne pas la même réponse Tfh. Une plus forte expression de PD-1 et de Bcl6 est observée sur les LT CD4 spécifiques de l'antigène lorsque les LC sont ciblées alors qu'une plus forte expression de CXCR5 est constatée lorsque les cDC1 sont ciblées¹²².

Chez l'Homme, en accord avec les données générées chez la souris, une capacité préférentielle des cDC2 (BDCA1⁺) comparée aux cDC1 (BDCA3⁺), obtenues à partir de tissus lymphoïdes, à induire un profil Tfh chez des LT CD4 naïfs est rapportée¹¹⁵. Des signaux permettant de potentialiser la capacité des DC à induire un profil Tfh chez les LT CD4 naïfs sont également connus. Lorsqu'elles sont soumises à la TSLP ou à des bactéries vivantes (*E.coli*), des DC primaires totales (non discriminées en sous-types fonctionnels) issues du sang favorisent l'établissement d'un phénotype Tfh chez le LT CD4 naïf dans des modèles de culture *in vitro*^{108,126}. Des moDCs, différenciées *in vitro* et simulées avec du LPS, du CD40L ou des bactéries tuées sont également associées à l'induction d'un phénotype Tfh (sécrétion d'IL-21)¹¹¹. Cette induction du phénotype est dépendante de l'IL-12 puisque l'ajout d'un anticorps anti-IL-12 dans la co-culture abroge la sécrétion d'IL-21 par les LT CD4¹¹¹. Pour finir, une fréquence plus importante de Tfh est obtenue à partir de LT CD4 naïfs cultivés avec des LC en comparaison à une culture avec des moDC, les deux sous-types étant différenciés *in vitro* à partir de cellules de sang de cordon¹²².

Au même titre que les LT CD4, les DC sont extrêmement dynamiques et leurs caractéristiques dépendent du contexte antigénique, tissulaire et inflammatoire dans lequel elles évoluent. L'ensemble de ces données illustre la difficulté d'associer une réponse Tfh à un phénotype spécifique chez les DC. Pour répondre à ce besoin, il serait pertinent de s'inspirer d'une nouvelle approche publiée récemment visant à faire le lien entre la combinaison des signaux intégrés par la DC et le profil cytokinique résultant des LT CD4¹²⁷. Dans ces travaux, 82 conditions d'activation

différentes ont été testées *in vitro* sur des DC, dont les phénotypes (cytokines et co-stimulation) résultants ont été analysés. Par la mesure des cytokines produites par des LT CD4 co-cultivés avec les DC, un lien a pu être établi entre l'intégration de signaux par les DC, les interactions régissant le dialogue entre les DC et les LT CD4 et l'induction du profil cytokinique résultant chez les LT CD4¹²⁷. Dans cette étude, la sécrétion d'IL-21 par les LT CD4 est étudiée mais celle-ci est difficilement associable à une combinaison de marqueurs phénotypiques sur la DC. Développer ce type d'approche pour déterminer plus précisément les signaux favorisant l'induction du phénotype Tfh serait judicieux. Différents types de DC pourraient être soumis à différentes combinaisons de perturbateurs et l'acquisition par le LT CD4 naïf des marqueurs Tfh cités précédemment pourrait être mesurée en complément des cytokines produites.

I.3.b.ii Migration des Tfh vers la bordure T-B

Après interaction avec la DC, l'expression de la chimiokine CXCR5 combinée à une perte d'expression de CCR7 guide la migration du LT CD4 au niveau des follicules B en réponse au CXCL13⁸⁶. L'expression de CXCR5 n'est cependant pas indispensable pour la mise en place d'une réponse LB dépendante des LT CD4. En l'absence de son expression sur des LT CD4 dans un modèle murin d'immunisation à l'OVA, la position de ceux-ci est affectée dans les GC, qui sont moins nombreux⁸⁶. De manière cohérente, l'absence d'expression de CXCR5 conduit à la génération d'anticorps avec une capacité neutralisante plus faible dans un modèle murin d'infection au LCMV¹²⁸. Néanmoins, ces études montrent que la migration des LT CD4 vers les follicules ne relève pas uniquement sur l'expression de CXCR5. En effet, une baisse d'expression de CCR7 est également indispensable⁸⁶. Parallèlement, l'expression d'ICOS participe également à la migration car elle permet qu'augmenter la motilité des LT CD4 ayant reçu le signal CXCR5 pour la migration à la bordure des zones T et B. En son absence, la migration des LT CD4 CXCR5⁺ dans le follicule B est diminuée¹²⁹. L'expression d'autres molécules de migration telle que la protéine G EB12 est également favorisée par Bcl6^{82,130}. En l'absence d'expression d'EB12 par les LT CD4, la fréquence des LT CD4 retrouvés à la bordure T-B est fortement réduite, ainsi que la fréquence des Tfh¹⁰⁵.

I.3.b.iii Interaction du Tfh avec le LB pour la mise en place du GC

La migration au follicule B permet au LT CD4 d'interagir avec le LB, dont la migration vers la zone T s'est faite via un processus inverse au LT CD4, c'est à dire grâce à une expression accrue de CCR7¹³¹. Un rôle déterminant de l'expression d'ICOS-L par le LB a été proposé récemment pour

l'orientation vers un couple stable ou non entre le LB et le LT CD4. Ceci fait suite à l'observation d'une expression plus faible de ICOS-L des LB les plus affins (signal BCR fort) en comparaison aux LB les moins affins (signal BCR faible) après stimulation antigénique. Ce schéma propose que la coopération du LT CD4 avec le LB via ICOS/ICOS-L se fera préférentiellement avec les LB moins affins, pour lesquels il y a nécessité d'une maturation de leur affinité au sein du GC. A l'inverse, les LB plus affins seront amplifiés en zone extra-folliculaire pour une réponse précoce contre l'antigène¹³². Cet axe de régulation au niveau de la frontière T-B est cohérent avec l'observation rapportant que les LB avec les BCR les plus affins s'orientent préférentiellement vers une réponse extra-folliculaire¹³³. De manière logique, les LB qui expriment plus fortement ICOS-L induisent une expression de Bcl6 et de PD-1 plus forte¹³² et permettent ainsi un maintien du phénotype Tfh. Si cette voie est indépendante de l'intensité de présentation antigénique à la surface des LB, le maintien des Tfh dépend cependant d'une présentation antigénique constante.

En effet, une présentation antigénique par le LB est nécessaire puisque une déplétion sélective de l'expression du CMHII conduit à l'absence de génération de Tfh et de réponse du GC⁹⁶. Un des axes majeurs décrits pour son implication dans le dialogue Tfh – LB est l'axe CD40/CD40L. Grâce à des modèles d'ablation d'expression sélective d'une population cellulaire, il a été montré que l'expression de CD40 sur les LB et non sur les DC est associée à un maintien des Tfh. En revanche, le CD28 n'est pas impliqué au niveau de l'interaction avec LB puisque la déplétion de CD80/CD86 spécifiquement sur les LB n'induit pas de variation dans la fréquence de Tfh générés⁹⁶. Cependant, un autre système murin suggère que le CD28 pourrait être nécessaire à des temps plus tardifs d'une réponse Tfh, et donc possiblement dans l'interaction avec le LB. Partant de l'observation qu'un LT CD4 exprime OX40 après priming, des chercheurs ont transféré des LT CD4 naïfs OX40^{cre} CD28^{lox/lox} spécifiques de l'OVA à des souris immunisées avec ce même antigène. Dans ce système, le CD28 est perdu juste après priming des LT CD4 et un défaut d'orientation vers un phénotype Tfh est observé à 12 jours d'une immunisation. Aucune variation dans la génération des Tfh n'est constatée à 5 jours, ce qui supporte l'idée que le CD28 est nécessaire pour le maintien des Tfh¹³⁴. Le rôle de SAP dans l'interaction entre le Tfh et le LB est également rapporté¹³⁵. La molécule SAP est associée à l'interaction avec le LB puisqu'aucun impact n'est observé sur l'activation (expression de CXCR5 et ICOS) de LT CD4 déficients pour SAP par des DC. Les LT CD4 déficients pour SAP ne sont pas recrutés dans le GC, aboutissant à une réaction du GC défectueuse¹³⁵. Pour finir, des données suggèrent un rôle de l'axe OX40/OX40L dans l'interaction du Tfh avec le LB pour la mise en place du GC. En effet, des analyses histologiques sur des rates de souris immunisées

avec le virus de la vaccine montrent une co-localisation de LB OX40L⁺ et de Tfh OX40⁺¹⁰⁷, suggérant d'un rôle de cet axe dans le dialogue Tfh – LB.

I.3.b.iv Concentration des Tfh fonctionnels dans le GC : Rôle des LB « bystander »

Le développement des Tfh dans les OLS dépend également d'interactions non restreintes par une spécificité antigénique avec des LB. Ces LB non spécifiques sont dits « bystander » et guident la migration des Tfh dans les GC via des axes impliquant des molécules de co-stimulation. A l'aide de microscopie biphotonique, l'équipe de Hai Qi a montré l'importance de l'expression de ICOS-L par les LB bystander pour favoriser la migration des Tfh¹²⁹. Cette même équipe a récemment identifié un rôle spécifique de l'expression du PD-1 sur les Tfh, marqueur dont l'attribution aux Tfh peut poser question au regard de son expression commune à de nombreuses populations LT CD4 activées. Le PD-1 limite l'activité de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) nécessaire à la migration des Tfh, induite par les voies de signalisation relatives à CXCR5 et ICOS¹³⁶. La migration des Tfh exprimant le plus fortement ICOS est favorisée et cette forte expression permet de contrebalancer l'inhibition de la mobilité médiée par le PD-1. Ainsi, une concentration des Tfh les plus fonctionnels au niveau du GC est privilégiée grâce à l'expression de PDL1 par les LB « bystander »¹³⁷. Cette étude a permis enfin d'expliquer le fort taux d'expression de PD-1 observé sur les Tfh des GC. Une absence d'expression de PD-1 chez des souris conduit à une réponse anticorps altérée au niveau des plaques de Peyer, caractérisée par une augmentation du nombre de Tfh¹³⁸. Cette augmentation de Tfh pourrait s'expliquer par une migration accrue de Tfh moins fonctionnels au niveau des GC car non contrôlée par l'axe PD-1/PDL1. Par ailleurs, la fonctionnalité des Tfh est affectée avec une sous-représentation de la sécrétion d'IL-21 et une surreprésentation de la sécrétion d'IFN γ parmi les Tfh. De manière intéressante, les données obtenues par l'équipe de Hai Qi rapportent que le PD-1 permet de limiter l'expression de CXCR3 au sein des GC, marqueur habituellement associé à la production d'IFN γ ¹³⁷. Ainsi, sans expression du PD-1, une migration exacerbée de Tfh exprimant le CXCR3 et sécrétant de l'IFN γ pourrait survenir.

Au vu de l'ensemble de ces données, un modèle simplifié d'une génération séquentielle de Tfh chez l'Homme peut être proposé (**Figure 6**).

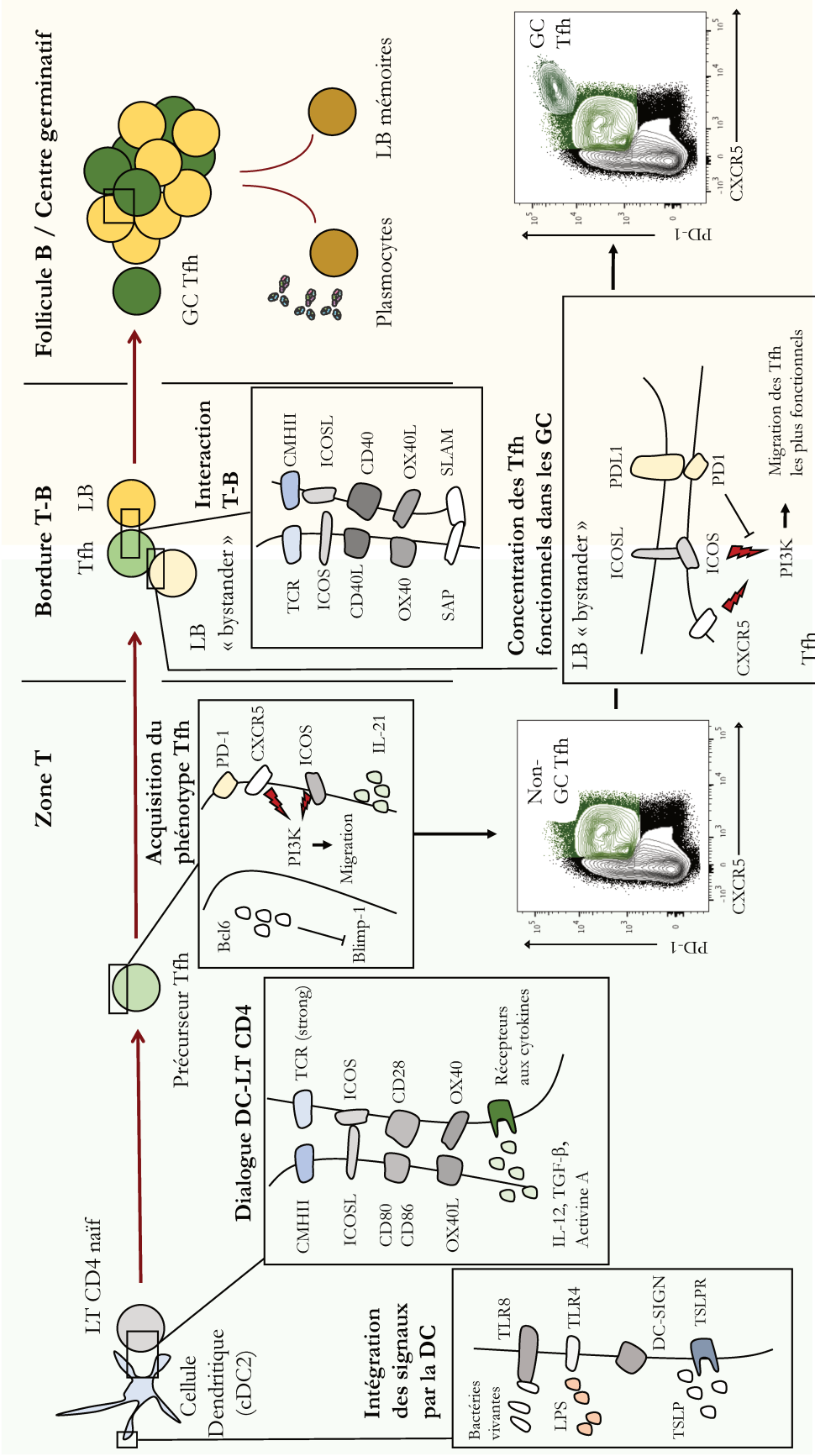


Figure 6 : Représentation de différents signaux impliqués dans un modèle de génération séquentielle de Tfh chez l'Homme. Les DC intègrent différents des signaux (tels que la viabilité de micro-organismes, les composants microbiens ou des cytokines) qui permettent l'établissement d'un phénotype regroupant une combinaison de molécules favorisant l'établissement d'un profil Tfh (CMHII, ICOSL, CD80/CD86, OX40, IL-12, TGF-β et activine A). L'établissement d'un profil Tfh médié par l'expression de Bcl6 permet la migration des Tfh vers la bordure T-B via l'expression de CXCR5 et ICOS. Le Tfh interagit avec le LB grâce une multitude d'interactions, qui détermineront l'issue de la coopération entre les deux types cellulaires. Une synapse étroite entre le Tfh et le LB conduira à la mise en place réaction du GC. Parallèlement, les LB « bystander » permettent par des interactions non restreintes par une spécificité antigénique (ICOSL/ICOS et PD1L1/PD1) de concentrer les Tfh les plus fonctionnels au niveau des GC. Les données de cytométrie de flux sont issues du laboratoire.

I.3.c Voies de génération alternatives des Tfh

Au vu de certains travaux, d'autres voies de génération de Tfh qui ne relèveraient pas du modèle précédemment décrit peuvent également être proposées aujourd'hui.

I.3.c.i Voie de génération des Tfh indépendante des DC

Dans un système où les DC sont éliminées, augmenter la dose antigénique permet de restaurer la réponse Tfh diminuée¹³⁹, ce qui suggère que les LB peuvent être suffisants pour l'induction d'une réponse Tfh dans ce contexte. L'affinité résultante des anticorps n'est pas altérée, indiquant que les Tfh induits sous ces conditions sont fonctionnels¹³⁹. A l'instar de ces observations, une voie de génération de Tfh médiée par les LB a été mise en évidence récemment dans un modèle d'immunisation avec de l'OVA délivrée sous forme particulaire. Cette voie est retrouvée dans un modèle d'infection à influenza¹⁴⁰ et suggère que l'implication de la DC n'est pas forcément indispensable pour l'induction de Tfh. Une réponse Tfh dépendante des LB et indépendante des DC est également retrouvée dans un modèle murin d'infection au plasmodium¹⁴¹. Ces résultats indiquent que les LB pourraient être à l'origine d'une réponse Tfh précoce. Confortant cette idée, si le nombre de LT CD4 interagissant avec la DC dans la zone T diminue dans le temps (2, 4, 7 jours) au profit de l'interaction LT CD4/LB après une immunisation, le nombre d'interactions entre les LT CD4 et LB à des temps précoces (2 jours) est non négligeable^{96,142}. Ce nombre d'interactions est même équivalent ou supérieur au nombre d'interactions entre les LT CD4 et les DC⁹⁶. Toutes ces données obtenues *in vivo* à l'aide de modèles murins mettent en perspective le dogme selon lequel une DC est nécessaire pour l'initiation d'une réponse Tfh.

Chez l'Homme, les co-cultures LT CD4/LB sont majoritairement un outil d'étude pour mesurer la capacité du LT CD4 à aider le LB. La capacité du LB à initier une réponse Tfh y est rarement étudiée. Néanmoins, des plasmocytes, des LB mémoires ou naïfs, sont capables d'orienter *in vitro* des LT CD4 naïfs vers un profil Tfh (CXCR5, ICOS, IL-21, Bcl6). Cette induction est dépendante de la sécrétion d'IL-6¹⁴³ et indique que parallèlement aux DC, les LB sont capables d'induire un phénotype Tfh.

I.3.c.ii Acquisition du phénotype Tfh par des LT CD4 mémoires

Outre les partenaires cellulaires impliqués dans le développement des Tfh, la question du type de LT CD4 précurseurs d'une réponse Tfh peut également être posée. Cette interrogation fait suite à des expériences réalisées *in vitro* chez l'Homme où il est rapporté que l'acquisition d'un phénotype Tfh n'est pas restreinte aux LT CD4 naïfs. Dans le cadre d'une étude sur le lupus, des travaux montrent *in vitro* l'acquisition d'un phénotype Tfh par des LT CD4 mémoires stimulés avec un signal TCR mimé (Billes CD3/CD28), de l'IL-12 et de l'OX40L. La fréquence de Tfh obtenus dépend de la combinaison de ces différents signaux¹⁰¹, ce qui illustre que la réactivité des LT CD4 mémoires à un environnement pro-Tfh est modulable. De la même manière, une co-culture de DC stimulées à la TSLP avec des LT CD4 mémoires conduit à l'acquisition par ces LT CD4 mémoires de traits phénotypiques Tfh tels que l'IL-21, ICOS, CXCR5 et Bcl6¹⁰⁸. Pour finir, des Th (Th1, Th2, Th17) soumis à environnement pro-Tfh acquièrent un profil Tfh, défini dans cette étude par la sécrétion d'IL-21¹⁴⁴. Ces données indiquent que les LT CD4 mémoires peuvent acquérir un phénotype Tfh et pose la question de leur possible contribution à la génération de Tfh *in vivo*, selon la propriété de plasticité cellulaire. Nous verrons par la suite que l'idée d'une voie de génération de Tfh alternative à partir de LT CD4 mémoires est renforcée par le constat d'une grande hétérogénéité chez les Tfh, qui peuvent exprimer des marqueurs relatifs à d'autres Th.

Ces différents travaux permettent donc d'envisager d'autres éventualités quant à la génération des Tfh dans les OLS (**Figure 7**).

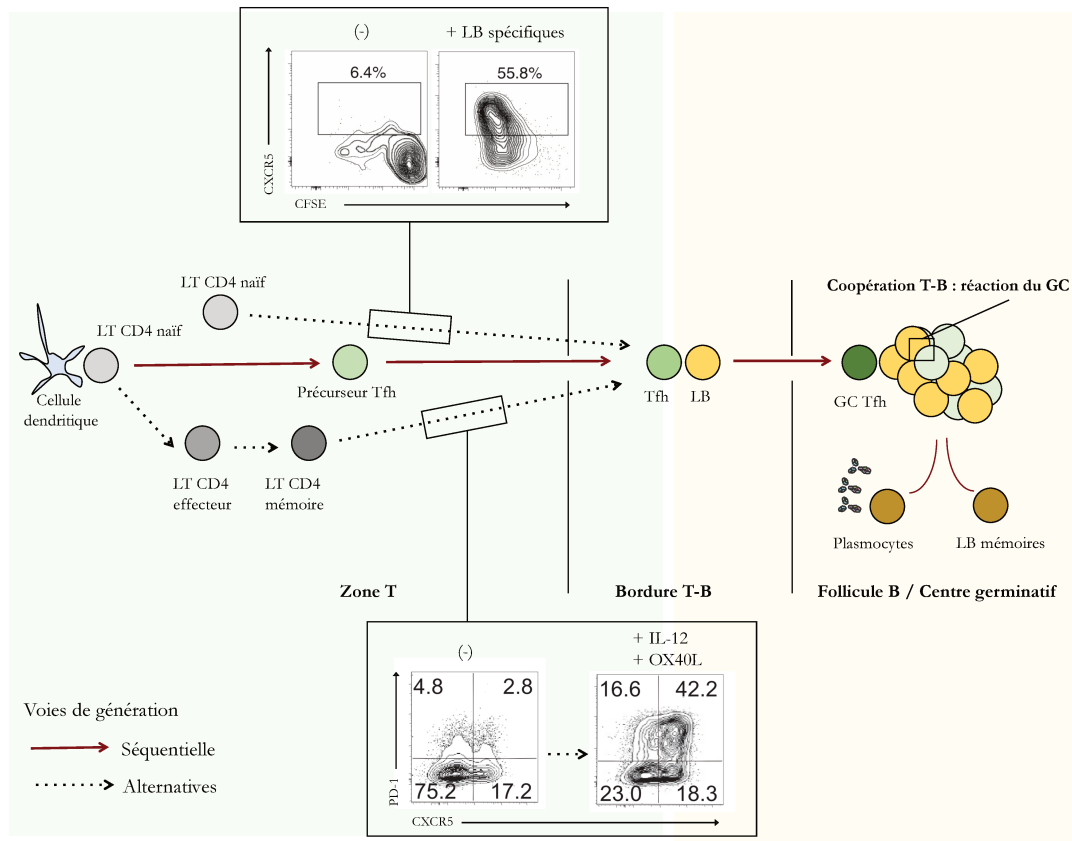


Figure 7 : Modèles des voies de génération séquentielle et alternatives des Tfh. Au vu des données de la littérature, une première voie alternative de génération de Tfh indépendante d'une DC et dépendante des LB peut être supposée (données de cytométrie de flux tirées de ¹⁴⁰). Parallèlement, une deuxième voie peut être intégrée, reposant sur l'acquisition par les LT CD4 mémoires d'un phénotype Tfh dans des conditions adéquates (exemple de l'IL-12 et OX40L, données de cytométrie de flux tirées de ¹⁰²)

I.4 Fonction des Tfh au sein des GC

Le GC est une structure micro-anatomique dans laquelle la réponse des LB est optimisée. C'est au sein de cette structure que les Tfh exercent leur fonction. Cette structure est polarisée en deux zones, la zone sombre (DZ) et la zone claire (LZ) et les processus généraux s'y déroulant sont décrits en **Figure 8**. Au sein du GC, les Tfh sont un point de contrôle cellulaire pour la sélection et l'orientation de la réponse LB. Ils permettent la recirculation du LB dans la DZ pour un gain d'affinité (hypermutations somatiques), une évolution de leur fonction par commutation de classe et une maturation du LB en plasmocytes ou LB mémoires.

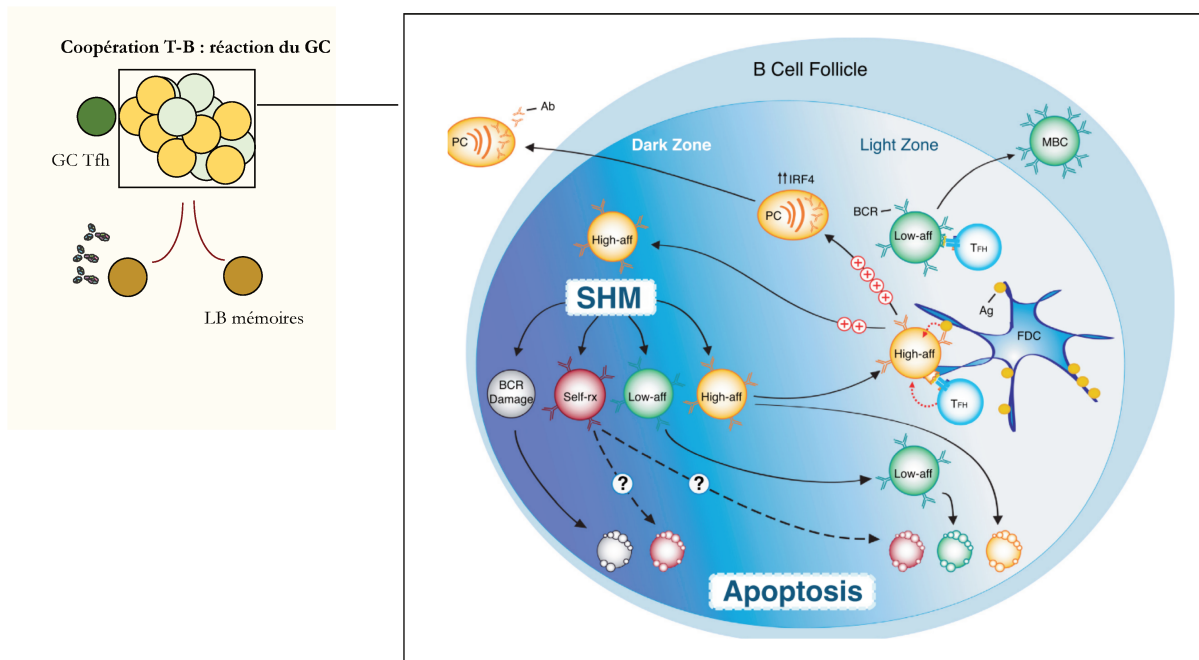


Figure 8 : Processus de sélection et de maturation des LB dans le GC. Tiré de ¹⁴⁵. Les GC LB hautement affins accèdent préférentiellement à l'antigène, dont la rétention est assurée par les FDC. Le premier signal reçu par le LB est le signal issu de l'engagement du BCR avec l'antigène. Le BCR est internalisé pour la présentation de l'antigène sur le CMHII. La présentation dépend de l'affinité du LB pour son antigène et il est usuellement considéré que plus l'affinité est forte, plus le LB présentera de complexes CMHII/peptide. Le premier contact entre le Tfh et le LB dépend de l'interaction TCR-CMHII/pep. Cette interaction oriente la communication (co-stimulations et cytokines) entre ces deux cellules. A l'issue de cette coopération, les LB avec une haute affinité, expriment IRF4 pour une différenciation en plasmocytes puis quittent le GC. Dans le cas d'une affinité moins forte, le LB migre dans la DZ (Zone sombre) où il prolifère et subit une hypermutation somatique. Les clones dont le BCR a conservé ou gagné en affinité retournent dans la LZ, où ils suivent un nouveau cycle de sélection par l'antigène et les Tfh. Les LB qui ne reconnaissent pas l'antigène meurent par apoptose. Les clones dont les mutations sont délétères pour l'affinité BCR ne retournent pas dans la LZ (Zone claire) et meurent dans la DZ. Les LB avec une affinité plus faible sont préférentiellement orientés vers un phénotype mémoire.

Un LB ayant reconnu l'antigène et qui ne reçoit pas l'aide d'un LT CD4 meurt dans les 24h¹⁴⁶. Le premier processus dans lequel sont impliqués les Tfh est par conséquent la sélection des LB. Cette sélection est restreinte par la spécificité antigénique et dépendante de l'affinité du BCR du LB. Il est généralement considéré que plus l'affinité du LB pour l'antigène est forte, plus la présentation sera importante¹⁴⁷. Cette présentation conduit à un signal TCR plus fort sur les Tfh, qui permet l'établissement et le maintien de leur phénotype fonctionnel. Bloquer un axe régulateur du signal TCR (BTLA/HVEM) dans les Tfh, ce qui revient à augmenter le signal TCR, conduit à une compétitivité accrue entre les LB de faible et haute affinités dans les GC¹⁴⁸. Par ailleurs,

l'augmentation du nombre de Tfh conduit à la migration de LB de faible affinité de la LZ vers la DZ et est délétère pour l'émergence d'une réponse de haute affinité¹⁴⁹. Ces deux études supportent l'idée qu'une limitation d'aide qualitative et quantitative est nécessaire pour favoriser l'émergence de clones LB de haute affinité. Du fait de cette sélection dépendante de la présentation antigénique, il semble intuitif qu'une baisse d'expression du CMHII sur les LB altère leur sélection dans le GC. Cette baisse pourrait notamment modifier leur interaction avec les Tfh, lesquels requièrent un signal antigénique soutenu pour le maintien de leur phénotype et donc de leur fonction. Cependant, l'usage de souris (CMHII^{+/+} et CMHII^{+/-}) qui présentent des capacités d'expression de CMHII différentes montre que l'abondance de CMHII sur les LB n'a pas d'incidence sur la sélection positive des LB au sein GC. En effet, les deux lignées murines présentent les mêmes taux d'IgG, de GC et de maturation d'affinité à 8, 12, 16 et 24 jours d'une immunisation avec un antigène modèle. En revanche, cette même étude montre grâce à un transfert de LB CMHII^{+/+} et CMHII^{+/-} avant immunisation que les LB ayant une plus forte expression de CMHII sont plus abondants dans les GC à 8 ou 16 jours de l'injection de l'antigène¹⁵⁰. Par conséquent, l'abondance du CMHII serait déterminante pour une sélection des LB à des temps précoces au niveau de la frontière T-B dans l'interaction avec les LT CD4. Au contraire, cette abondance serait moins déterminante au sein du GC pour la sélection des clones LB de haute affinité. Cette sélection au niveau de la frontière T-B peut apparaître contradictoire avec les données exposées précédemment, où les LB les plus affins, ayant reçu et donc présentant abondamment, ont été décrits comme s'orientant vers une réponse préférentiellement extrafolliculaire, médiée par l'axe ICOS/ICOS-L. D'autres investigations sont donc nécessaires pour mieux comprendre comment les processus de sélection qui s'appuient sur ces axes interviennent pour l'issue de la coopération entre les Tfh et les LB.

Au sein du GC, le dialogue entre Tfh et LB dépend d'axes de co-stimulation tels que ICOS-L/ICOS, CD40-CD40L, ICAM-LFA-1, SLAM-SAP, CD80-CD86/CD28¹⁵¹. La délétion génétique de CD40L conduit à un défaut de LB ayant subi une commutation de classe et bloquer l'axe CD40-CD40L abolit les GC déjà établis¹⁵². CD40L induit l'expression ICOS-L sur les GC LB, qui une fois lié à ICOS permettra d'augmenter l'expression de CD40L sur les Tfh, permettant ainsi la mise en place d'une boucle de stimulation. Plus surprenant, une implication de la dopamine dans la communication Tfh – B au sein des GC a été récemment rapportée chez l'Homme. En réponse à une stimulation TCR, les Tfh relarguent de la dopamine, qui permet l'expression d'ICOS-L par le LB. ICOS-L interagit avec ICOS, qui permet de maintenir le phénotype Tfh et de favoriser l'expression de CD40L, pour l'établissement d'une synapse stable avec le LB¹⁵³.

Les deux cytokines principalement décrites pour leur fonction d'aide aux LB sont l'IL-21 et l'IL-4. L'étude de souris dans lesquelles les cellules sécrétrices d'IL-21 et d'IL-4 sont associées à une fluorescence spécifique a permis de mettre en évidence une cinétique de sécrétion par les Tfh dans les GC. Les Tfh sécrètent dans un premier temps l'IL-21, qui se combine à d'IL-4 dans un deuxième temps. Enfin, seule la sécrétion d'IL-4 apparaît à des temps plus tardifs. Des positionnements préférentiels dans le GC sont associés à ces différents profils fonctionnels. Les Tfh IL-21⁺, proches de la DZ, favorisent la maturation d'affinité alors que les Tfh IL-4⁺ plus distaux de la DZ favorisent la commutation de classe et la différenciation en plasmocytes¹⁵⁴. Chez l'Homme, une équipe a récemment proposé deux états fonctionnels de Tfh définis selon la sécrétion d'IL-21 et de CXCL13. Les Tfh du GC sécrètent plus de CXCL13 et moins d'IL-21 que les Tfh extra-folliculaires¹¹⁵.

La fonction des Tfh au sein du GC pourrait également relever de mécanismes de toxicité sur les LB. Une voie dépendante d'une cytotoxicité des Tfh via le granzyme B est décrite dans le contrôle des réponses LB au sein du GC^{151,155}. L'augmentation de gènes associés à de la cytotoxicité chez les Tfh conduit à une augmentation de l'apoptose des GC LB¹⁵⁵, suggérant qu'une élimination des clones LB de plus faible affinité pourrait être médiée par cet axe. Un autre axe dépendant de FAS-L/FAS pourrait être impliqué mais son rôle reste à clarifier⁷⁶.

La combinaison et la force de ces différentes interactions comprenant le TCR-CMHII, des molécules de co-stimulation et des cytokines vont orienter le LB vers une issue spécifique : LB mémoires, plasmocytes ou maturation ou mort dans le GC (**Figure 9**)⁷⁶. Néanmoins, les combinaisons favorisant préférentiellement l'orientation des LB vers une de ces issues demeurent peu connues, notamment chez l'Homme.

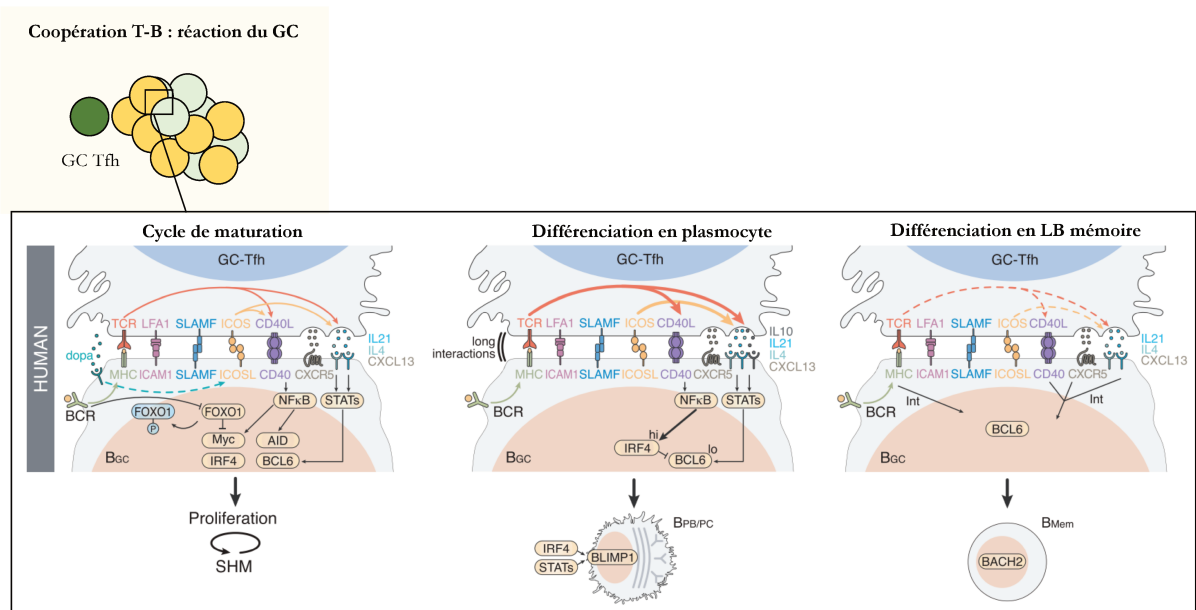


Figure 9 : Synapses du LB avec les Tfh pour la recirculation des LB vers la DZ (i), la différenciation en plasmocytes (ii) et leur différenciation en LB mémoires (iii). Tiré de ⁷⁶. Si les mêmes molécules sont impliquées dans la communication entre Tfh et LB pour l'orientation du LB vers une issue spécifique, leur intensité d'expression permet de moduler la réponse LB avec l'induction de programmes de différenciation différents. Pour exemple, la différenciation en plasmocytes est favorisée après une interaction de LB de haute affinité qui expriment IRF4 et faiblement Bcl6 avec des Tfh via de fortes interactions CD40L/CD40 et ICOS/ICOS-L. En revanche une synapse avec une force de signaux moins intense conduit à une recirculation des LB dans la DZ pour une maturation d'affinité. L'interaction entre LB et Tfh est moins intense en cas de faible affinité du LB et résulte d'une différenciation en plasmocytes.

I.5 Modulation du développement et de la fonction des Tfh

Une régulation du développement et la fonction des Tfh est indispensable, pas nécessairement pour supprimer la réponse Tfh mais pour favoriser l'émergence d'une réponse LB de haute affinité. En effet, nous avons vu précédemment qu'augmenter le nombre de Tfh ou favoriser un signal TCR fort est contre-productif car la réponse LB résultante est moins affine pour l'antigène.

I.5.a Disponibilité antigénique

Les Tfh sont plus abondants dans des contextes pathologiques de persistance antigénique, comme certaines infections virales¹⁵⁶ et parasitaires^{157,158} ou des contextes d'auto-immunité¹⁵⁹. Par la comparaison entre une infection virale aiguë ou chronique, il est mis en évidence que la persistance virale conduit à une stimulation TCR continue dans le temps et favorise l'émergence d'une réponse

Tfh¹⁵⁶. Ces observations concordent avec le fait que l'orientation vers un profil Tfh est favorisée par un signal TCR soutenu. Lors d'une réponse immunitaire efficace, le pathogène est peu à peu éliminé et les GC disparaissent. La disponibilité antigénique et la présentation antigénique par les LB et par les DC diminue, et par conséquent le nombre de Tfh diminue également. Une stratégie de vaccination consistant à délivrer de manière constante et lente l'antigène par des pompes osmotiques conduit à une stabilisation de la fréquence des Tfh dans le temps, contrairement à une stratégie où l'antigène est délivré transitoirement¹⁶⁰.

I.5.b Sous-types cellulaires associés à une régulation des Tfh

I.5.b.i T folliculaires régulateurs (Tfr)

Dans les années 2000, l'expression de CXCR5 sur une sous-population de Tregs est observée. Ces Tregs CXCR5⁺ sont capables de limiter les réponses LB, telles que la production d'immunoglobulines, la survie des LB et les hypermutations somatiques^{161,162}. Il faut attendre 10 ans pour que les Tfr soient définis comme un sous-type de LT CD4 à part entière, exprimant à la fois des caractéristiques propres aux Tfh et aux Tregs. L'expression des traits Tfh est indispensable car des LT CD4 Foxp3⁺ qui n'expriment ni CXCR5 ni Bcl6 ne contrôlent pas les réponses du GC¹⁶³. De manière équivalente aux Tfh, l'inhibition de Blimp-1 est importante pour la génération des Tfr puisque des souris déficientes pour ce FT présentent un taux de Tfr augmenté¹⁶⁴. Par ailleurs, des souris Foxp3^{Cre} Bcl6^{fl/fl} présentent une altération de la fonctionnalité des Tfh, avec une forte sécrétion d'IL-21, IFN γ et IL-10. En résultat, plus IgA et moins d'IgG sont produits, et les anticorps générés sont moins affins¹⁶⁵, illustrant l'importance des Tfr dans la régulation des réponses LB. Dans un modèle d'infection à influenza, l'expansion des Tfr est plus tardive que celle des Tregs et permet de limiter la génération d'auto-anticorps suite à une infection¹⁶⁶. L'étude du répertoire TCR des Tfh et des Tfr révèle que les Tfr reconnaissent préférentiellement des antigènes du soi comparés aux Tfh¹⁶⁷. Les mécanismes d'action des Tfr ne sont pas encore très bien définis. Quelques mécanismes d'actions immunosuppresseurs communs aux Tregs, tels que l'axe CTLA4/CD28, sont supposés¹⁶⁸. Un nouvel axe de régulation dépendant de l'IL-1 a récemment été proposé par notre laboratoire. Les Tfh expriment le récepteur IL1R1 et l'IL-1 permet l'induction de la sécrétion d'IL-4 et d'IL-21. Les Tfr permettent de limiter l'activité de l'IL-1 en la captant via l'expression de l'IL1R2 et l'IL1RA¹⁶⁹. Une étude *in situ* dans des ganglions humains suggère un rôle prépondérant des Tfr au niveau de la formation du couple Tfh-B à la bordure T-B⁸⁷. Cette spéculation fait suite à l'observation de leur positionnement majoritaire au niveau de la

frontière T-B et non dans les GC. Néanmoins, le rôle des Tfr comme celui des Tregs dans la régulation des réponses LB reste ambigu. Alors que l'IL-10 est une cytokine habituellement décrite comme immunosuppressive, sa production par les Tfr pourraient promouvoir les réponses au sein des GC¹⁷⁰. Parallèlement, une fonction de promotion d'une réponse Tfh est attribuée aux Tregs. Ces derniers captent l'IL-2, qui inhibe le développement d'un phénotype Tfh¹⁷¹.

I.5.b.ii Sous-populations régulatrices de lymphocytes B et de cellules dendritiques

À ma connaissance, les Tfr sont la principale population régulatrice des réponses Tfh et peu d'autres ont été décrites. Néanmoins, les quelques exemples ci-dessous suggèrent que les axes de régulations cellulaires des réponses Tfh sont multiples.

Lymphocytes B régulateurs. Chez l'Homme, des B régulateurs (Bregs), obtenus après stimulation de LB mémoires ou naïfs stimulés par le TLR9 et le CD40, limitent l'établissement d'un phénotype Tfh par des lymphocytes T naïfs stimulés dans un environnement pro-Tfh. Ces Bregs ont également un effet inhibiteur sur le maintien du phénotype de Tfh *ex-vivo*¹⁷². Ils expriment le PD-L1, ICOS-L, le récepteur à l'IL-21 (IL-21R), le CD5 et sécrètent de l'IL-10 et du TGFβ.

Cellules dendritiques. La déplétion à des temps précoces d'une immunisation d'un sous type de DC exprimant le CD301 chez la souris augmente la fréquence des Tfh hautement fonctionnels. Cette limitation de l'abondance des Tfh serait dépendante de l'axe PD-1/PDL1¹⁷³.

I.6 Mémoire et recirculation des Tfh

Dans le sang, une population de LT CD4 partage avec les Tfh l'expression du CXCR5 et représente 10-15% des LT CD4 totaux. Le fait que les caractéristiques de cette population puissent refléter celles acquises par les Tfh au niveau des tissus lymphoïdes la rend particulièrement intéressante à étudier chez l'Homme où l'accessibilité aux OLS est limitée. Une filiation entre les Tfh des OLS et les LT CD4CXCR5⁺ du sang a donc été questionnée.

L'observation selon laquelle les LT CD4 CXCR5⁺, via la sécrétion d'IL-21 et l'expression d'ICOS, promeuvent une production d'immunoglobulines plus importante comparée aux LT CD4 CXCR5⁻ a permis de mettre sur la piste d'une possible filiation de cette population avec les Tfh des tissus lymphoïdes¹⁷⁴. Après une vaccination influenza, l'abondance de LT CD4CXCR5⁺ augmente et leur

fréquence est corrélée à une réponse anticorps spécifique¹⁷⁵. Des relations clonotypiques ont été montrées dans plusieurs études par séquençage de TCR entre Tfh et LT CD4 CXCR5⁺^{176,177}. Ce n'est que récemment qu'un lien de filiation préférentiel entre ces deux populations a été confirmé, dans une étude rapportant que le répertoire TCR des LT CD4 CXCR5⁺ se recoupe avec les Tfh mais non avec les LT CD4 non-Tfh¹⁷⁷. Le lien dynamique entre ces populations a également été interrogé. Des patients atteints de sclérose en plaques traités avec du Fingolimod (anti-S1PR1) témoignent d'une baisse de LT CD4 CXCR5⁺ dans le sang, suggérant que l'apparition de cette population dans le sang fait suite à une sortie des Tfh des OLS¹⁷⁸. Cette même étude confirme également la proximité phénotypique, transcriptomique et clonotypique entre les LT CD4 CXCR5⁺PD-1⁺ de différents organes (amygdales, ganglions, canal thoracique et sang). Il y est proposé que les GC Tfh quittent les ganglions par les vaisseaux lymphatiques efférents, passent par le canal thoracique pour rejoindre le sang¹⁷⁸. L'ensemble de ces données permet de considérer les LT CD4 CXCR5⁺ du sang comme le compartiment mémoire relatif aux Tfh.

Dans le cadre du suivi d'une réponse spécifique chez la souris, une localisation différentielle de plusieurs compartiments de Tfh mémoires au niveau de la rate et des ganglions a été décrite. Les Tfh de forte affinité qui promeuvent rapidement une commutation de classe s'établissent au niveau des ganglions drainants alors qu'un autre compartiment mémoire, au phénotype Tfh moins marqué, rejoint la circulation¹⁷⁹. Cette étude suggère donc que la distribution des Tfh mémoires est multiple.

I.7 Hétérogénéité et plasticité des Tfh

A l'image de la diversité observée dans les sous-types de Th, des profils hybrides partageant des traits Tfh avec ceux d'autres sous-types de Th sont communément décrits.

Le profil Tfh/Th1 est fréquemment décrit car intrinsèque à la dynamique de développement du phénotype Tfh ou Th1 chez les LT CD4^{110,180}. Ceci s'explique par un développement des Th1 et des Tfh favorisé par des voies de signalisation partagées, comme celles induites par l'IL-12¹⁸¹. Un profil précoce Th1/Tfh se met en place et l'orientation vers un de ces profils relève d'une balance entre FT, comme T-bet et Bcl6^{76,110}. Cependant, l'expression de T-bet ne supprime pas la réponse Tfh et est même nécessaire pour qu'ils sécrètent de l'IFN γ dans le cadre d'une infection au LCMV¹⁸². L'expression de T-bet est perdue au niveau des Tfh des follicules, mais seuls les Tfh ayant préalablement exprimés T-bet sécrètent de l'IFN γ dans les GC¹⁸³. Le rôle de la sécrétion

d'IFN γ reste à clarifier mais un rôle dans la commutation de classe lui est attribué (IgG2)¹⁸⁴, ce qui suggère un rôle potentiellement bénéfique de cette production dans certains contextes biologiques. Le profil Tfh/Th1 est particulièrement représenté dans des contextes d'infections chroniques qu'elles soient virales¹⁸⁵ ou parasitaires^{157,158}. Parallèlement, un profil de Tfh, défini comme CXCR5⁺ICOS⁺, sécrétant de l'IL-17 est décrit dans des ganglions de souris immunisées avec une glycoprotéine de myéline¹⁸⁶. La sécrétion d'IL-17 par ces Tfh a été montrée plus récemment comme indépendante de l'expression de ROR γ t¹⁸⁷.

La diversité de profils Tfh est particulièrement bien illustrée par l'étude des LT CD4 CXCR5⁺ du sang. L'équipe de Hideki Ueno a défini 3 populations hybrides dans le sang dites Tfh1, Tfh2 et Tfh17¹⁷⁴. Ces définitions sont basées sur l'expression de FT et de récepteurs aux chimiokines relatifs aux Th. Les Tfh1 expriment CXCR5, CXCR3, T-bet et sécrètent de l'IFN γ . Les Tfh2 expriment CXCR5, GATA3 et sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-13 et de l'IL-21. Les Tfh17 expriment CXCR5, CCR6, ROR γ t et sécrètent de l'IL-17, IL-21 et de l'IL-22. Ces différents sous-types présentent des capacités d'aide aux LB différentes¹⁷⁴. Des variations quantitatives de ces différentes populations sont associées à différents contextes, pathologiques^{43,188} ou thérapeutiques. Pour exemple, le nombre de LT CD4CXCR5⁺CXCR3⁺ corrèle avec le développement d'anticorps neutralisant dans le cadre d'un vaccin à influenza¹⁸⁹. Une réponse Tfh1 dominante est également observée dans le cadre d'un suivi de la réponse Tfh d'individus vaccinés contre la fièvre jaune¹⁹⁰. Si ces travaux portent sur des cellules sanguines, cette diversité phénotypique a été montrée au niveau de Tfh issus d'amygdales à l'aide de la cytométrie de masse. Ces travaux rapportent que ces sous-types hybrides de Tfh apparaissent plutôt à des stades extra-folliculaires, avec une expression plus faible de CXCR5 et PD-1¹⁹¹.

L'hétérogénéité fonctionnelle observée dans le compartiment Tfh renforce l'hypothèse de différentes voies pour leur génération. Shane Crotty propose 3 modèles qui pourraient conduire à la génération de ces profils hybrides. Les LT CD4 naïfs soumis à un environnement mixte pro-Tfh avec un biais Th, pourraient acquérir un phénotype Tfh-Th hybride. Ce modèle s'inscrit dans la voie de génération spatio-temporelle des Tfh décrite précédemment. Le second modèle considère les LT CD4 mémoire comme précurseur de ce profil hybride. Des Tfh déjà différenciés, soumis à un environnement favorisant l'expression de caractéristiques Th autres, pourraient acquérir ces caractéristiques. Cette possibilité fait écho à l'acquisition du phénotype Tfh par les LT CD4 mémoires précédemment décrite dans cette introduction^{101,108} (I.3.c.ii) et repose sur la plasticité des Th et des Tfh. Le troisième modèle considère comme précurseur un LT CD4 en transition d'un

statut naïf vers un statut mémoire, où les LT CD4 sont plus faiblement engagés dans une voie de différenciation et leur phénotype reste hautement modulable¹⁹². Illustrant cette plasticité, soumettre des Th1, Th2 et Th17 générés *in vitro* à partir de LT CD4 naïfs à des conditions connues pour orienter les LT CD4 vers des Tfh permet l'induction de la sécrétion d'IL-21. A l'inverse, des Tfh triés soumis *in vitro* à des environnements pro-Th1, Th2 et Th17 sécrètent les cytokines respectives IFN γ , IL-4 et IL-17¹⁴⁴, illustrant que des profils Tfh hétérogènes pourraient résulter d'une plasticité des LT CD4 effecteurs (**Figure 10**). Cette propriété est cependant peu documentée *in vivo*.

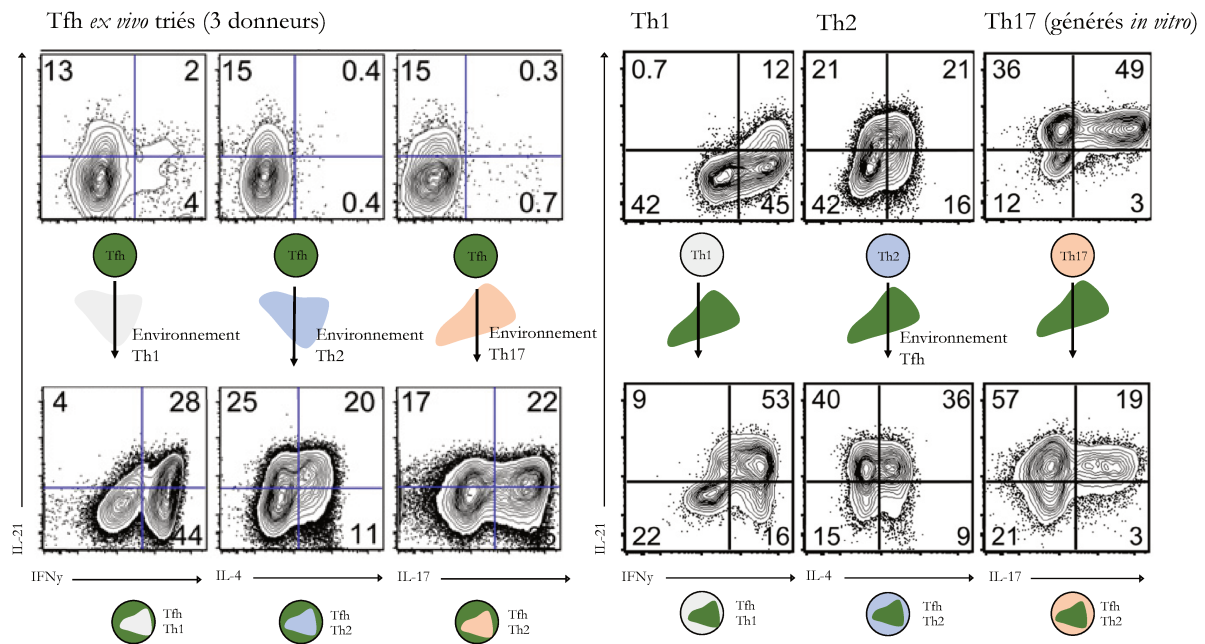


Figure 10 : Illustration de la plasticité lymphocytaire liée au profil Tfh. Tiré de ¹⁴⁴. Des Tfh triés obtenus chez la souris et soumis à des environnements cytokiniques connus pour orienter les réponses LT CD4 vers les profils Th1, Th2 et Th17 acquièrent la capacité de sécrétion des cytokines respectives. A l'inverse, des profils effecteurs (Th1, Th2 et Th17) générés *in vitro* soumis à un environnement pro-Tfh acquièrent des traits Tfh, comme ici l'IL-21. Les cercles représentent différents profils de LT CD4 effecteurs, caractérisés sur la base de leur sécrétion cytokinique analysée par cytométrie de flux (les dot plot sont obtenus de ¹⁴⁴).

Pour conclure, cette première partie montre que beaucoup d'inconnues demeurent concernant le développement et la fonction des Tfh. Si leur génération se fait dans un environnement tissulaire hautement contrôlé, les facteurs favorisant la génération des Tfh sont relatifs au contexte physiopathologique. Deux interrogations majeures peuvent être soulevées. La première concerne les coopérations cellulaires de la génération d'une réponse Tfh puisque des voies uniquement dépendantes des LB sont décrites, remettant en perspective le dogme de la nécessité d'une DC dans l'initiation de la différenciation de ce profil. Cela pose la question des processus biologiques

déterminants l'initiation de la réponse Tfh par des DC ou des LB. La deuxième interrogation porte sur les LT CD4 précurseurs d'une réponse Tfh. En effet, l'hétérogénéité et la plasticité observées au sein des réponses Tfh suggèrent que les LT CD4 mémoires pourraient y contribuer, remettant en perspective le schéma des réponses LT CD4 basé sur l'orientation d'un LT CD4 naïf.

Aussi, beaucoup reste à faire pour mieux comprendre le développement des Tfh, qui peuvent être impliquées dans l'immunopathologie de certaines maladies, comme c'est le cas dans l'infection par le VIH.

II. Développement des Tfh dans un contexte pathologique : Exemple du VIH(-1)

Dans l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1, abrégé VIH dans la suite de cette introduction), l'intérêt d'étudier les Tfh est double. Chez la majorité des patients infectés, les Tfh sont caractérisés par des altérations qualitatives et quantitatives. Ces altérations se manifestent dans un contexte où les facteurs tissulaires, cellulaires et moléculaires impliqués dans leur développement et fonction sont hautement modifiés. Ainsi, les Tfh jouent un rôle pathogénique en contribuant vraisemblablement aux réponses LB anormales observées chez les patients infectés. A l'inverse, les Tfh sont également associés chez de rares patients à une réponse immunitaire bénéfique, neutralisante ou de contrôle du virus. Mieux caractériser les réponses Tfh dans l'infection par le VIH pourrait permettre de corriger ou orienter les réponses immunitaires humorales.

II.1 Brève description de l'infection par le VIH

II.1.a Émergence de la pandémie de VIH

En 1981, des pneumonies dues à un pathogène habituellement bénin sont rapportées dans le cadre d'une étude de suivi de patients drogués, homosexuels ou les deux¹⁸⁹. Ces patients présentent un taux de LT anormalement bas, avec un défaut de prolifération lorsqu'ils sont exposés à des mitogènes, des antigènes ou des cellules allogéniques. La même année, des sarcomes de Kaposi inhabituellement agressifs chez huit jeunes hommes homosexuels sont signalés. Une survie inférieure à 20 mois est observée, contre les 8 à 13 années habituelles pour ce type de cancer¹⁹⁴. Cinq de ces patients présentent une infection pulmonaire et d'autres infections au cytomégalovirus (CMV), au virus de l'hépatite B (HBV) ou diverses maladies sexuellement transmissibles. A la fin

de l'année, 337 cas avec des manifestations cliniques et immunologiques similaires sont décrits aux États-Unis. Le terme de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est posé en 1982. L'agent pathogène responsable de ce syndrome est isolé en 1983 à l'institut Pasteur : Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier isolent un rétrovirus à partir d'un ganglion de patient atteint du SIDA de 33 ans¹⁹⁵. Un an plus tard, des travaux rapportent que le virus cible préférentiellement les LT CD4, en mesurant l'activité de la reverse transcriptase sur une fraction de LT CD4 et CD8¹⁹⁶. Quelques mois plus tard, la même équipe démontre que le virus cible les LT CD4 grâce au récepteur CD4 en montrant que l'ajout d'un anticorps anti-CD4 sur une culture permet d'inhiber l'infection^{196,197}. Le tropisme du virus est donc identifié. L'Institut National du cancer aux États-Unis identifie le même virus, et les deux pays se querelleront la découverte.

De 1985 à 1986, le nombre de cas suit une progression exponentielle en passant de 20 000 cas à 38 000. Les chiffres sont alarmants puisque 51% des adultes et 59% des enfants ayant été diagnostiqués sont morts. Le virus responsable du SIDA est nommé Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et la première drogue antivirale, la zidovudine (AZT), est mise sur le marché en 1987. En 1992, le SIDA devient aux États-Unis la première cause de mort pour les hommes de 25 à 44 ans. Une année plus tard, le stade SIDA est défini plus précisément par le Centre pour le contrôle et la prévention des maladies. L'entrée en phase SIDA se définit par un nombre de LT CD4 inférieur à 200 par mm³ de sang. En 1995, les traitements combinant des antirétroviraux hautement actifs sont introduits (dit HAART, cART ou ART). Ces ART permettent de supprimer la virémie au-delà des seuils de détection après quelques semaines de traitements¹⁹⁸. En parallèle, la capacité du virus à s'établir de manière latente (sans production virale) au niveau de LT CD4 qui demeurent dans un état quiescent est mise en évidence¹⁹⁹. Nous verrons par la suite que cette capacité d'infection latente est l'obstacle à une élimination du virus de l'organisme, et ce malgré le traitement avec des ART. En 1996, 23 millions de personnes sont infectées dans le monde et deux corécepteurs du virus sont identifiés : CXCR4 et CCR5²⁰⁰. En 1999, 14 millions de personnes ont succombé des conséquences de l'infection par le VIH. De 2000 à 2009, de nouvelles combinaisons et formulations d'ART sont approuvées et permettent d'alléger la lourdeur des traitements. Les ART ont permis d'augmenter considérablement la survie des patients et de convertir une maladie mortelle en une maladie chronique. A titre préventif, les traitements ART permettent de réduire la transmission sexuelle du virus, lorsque la charge virale (mesure de la quantité d'ARN viral) est indétectable chez les patients²⁰¹. Malgré cela, l'accès aux traitements ART est limité. En 2017 par exemple, seulement 27% des personnes vivant avec le VIH en Europe de l'Est et en Asie centrale ont accès aux traitements ART (source UNAIDS). Cette inaccessibilité aux traitements ART est

un frein à la fin de l'épidémie. L'Organisation des Nations Unies a récemment lancé une campagne qui a pour objectif de diagnostiquer 90% des personnes atteintes, de traiter 90% des personnes atteintes et que 90% de ces personnes traitées aient une charge virale indétectable²⁰². Remplir ces objectifs permettrait d'endiguer l'épidémie.

En 2017, l'ONUSIDA rapporte que 35,4 millions de personnes sont mortes depuis le début de l'épidémie, 36,9 millions de personnes vivent avec le VIH dans le monde dont 21,7 millions ont accès à une thérapie anti-virale. Cette même année, 1,8 millions d'individus ont été nouvellement infectés. Malgré de nettes améliorations dans la prise en charge des patients depuis le début des années 2000, la recherche scientifique se doit de continuer car « *il n'y aura pas de fin de l'épidémie sans vaccin préventif avec un bon niveau d'efficacité* ». Parallèlement, il faut « *définir plus précisément les conditions d'une « guérison » même temporaire et partielle, qui permettrait d'éviter les traitements à une partie au moins de personnes vivant avec le VIH* » (François Dabis, Président de l'ANRS, Le Monde, novembre 2019).

II.1.b Les phases de l'infection du VIH

En l'absence de traitements ART, l'infection par le VIH se décline en 3 phases classées selon des observations cliniques et des caractéristiques biologiques :

Primo-infection ou phase aiguë : Dans les semaines suivant l'infection, la charge virale augmente et un état grippal se manifeste chez l'individu (fièvre, éruptions cutanées, fatigue, maux de têtes). La sévérité des symptômes est corrélée à la charge virale²⁰³, qui atteint sa valeur maximale durant cette phase. Le virus se dissémine dans l'organisme, plus particulièrement au niveau des tissus lymphoïdes. Cette dissémination virale est favorisée par les DC²⁰⁴ et une lymphadénopathie est rapportée durant cette phase. Parallèlement à l'augmentation de la charge virale, une perte de LT CD4 dans le sang et les tissus lymphoïdes est observée, particulièrement à ceux associés à la muqueuse intestinale²⁰⁵⁻²⁰⁸. Par conséquent, l'architecture des tissus lymphoïdes commence à être impactée²⁰⁹. Après plusieurs semaines, le système immunitaire est capable de contrôler le virus, notamment grâce à la mise en place d'une réponse LT CD8 cytotoxique²⁰⁷. En résultat, la charge virale baisse et la fréquence de LT CD4 augmente. La charge virale atteint une valeur dite « set viral point », prédictive de la progression vers le stade SIDA. Les patients avec une charge virale plus élevée à ce « set viral point » progressent plus rapidement vers la phase SIDA²¹⁰.

Phase asymptomatique ou chronique : Cette phase se caractérise par un épuisement progressif du système immunitaire, continuellement activé par le VIH qui persiste dans l'organisme. Cette persistance virale est permise par la capacité du virus à s'établir de manière latente (sans production virale) au niveau de certains types de LT CD4 en état de quiescence^{199,211}. Cette latence permet une absence de reconnaissance de la cellule infectée par le système immunitaire. La latence est réversible et une production de virus apparaît lorsque les LT CD4 sont réactivés^{212,213}. Dans la phase chronique, peu de virus est retrouvé dans le sang des patients²¹⁴ alors qu'une réplication virale active est présente au niveau des tissus lymphoïdes²¹⁵. Du fait de cette persistance virale, les cellules lymphoïdes sont exposées chroniquement à des stimulations antigéniques et inflammatoires. Cet état d'activation constant entraîne une perte progressive des fonctions effectrices des LT CD4 comme des LT CD8, dite exhaustion. Parallèlement à cette exhaustion, la capacité très importante de mutations du virus rend les réponses cytotoxiques LT CD8 et les réponses anticorps inefficaces. En résumé, dans ce contexte où le virus persiste, échappe et épuise, le nombre de LT CD4 diminue progressivement, et ce particulièrement au niveau des tissus lymphoïdes²¹⁵ où le virus est concentré. La charge virale augmente lentement et sans traitements ART, l'infection chronique évolue vers la phase SIDA.

Phase d'immunodéficience acquise (SIDA) : Cette phase est définie par un seuil de LT CD4 dans le sang inférieur à une concentration de 200 cellules par mm³ de sang. Des infections opportunistes surviennent du fait de l'incapacité du système immunitaire à y répondre efficacement.

II.1.c Les réservoirs viraux, un obstacle à l'éradication du VIH

Les ART permettent de baisser la charge virale, jusqu'à la rendre indétectable dans le sang par les techniques de laboratoire utilisées. Bien qu'indétectable dans le sang, le virus persiste dans l'organisme et continue d'évoluer et de circuler chez les patients traités²¹⁶. L'existence de la persistance virale est parfaitement illustrée par l'observation d'un rebond viral 3 semaines après l'interruption des ART chez des patients traités depuis 3 ans et ayant une charge virale indétectable²¹⁷. De cette observation de persistance virale a découlé la notion de réservoir viral, qui désigne les tissus ou les cellules abritant du virus malgré les traitements ART. La formation d'un réservoir viral repose sur la capacité du VIH à s'intégrer de manière latente^{199,211}. La **Figure 11** tirée d'une revue du Lancet²⁰² reprend les mécanismes de l'établissement de ce réservoir.

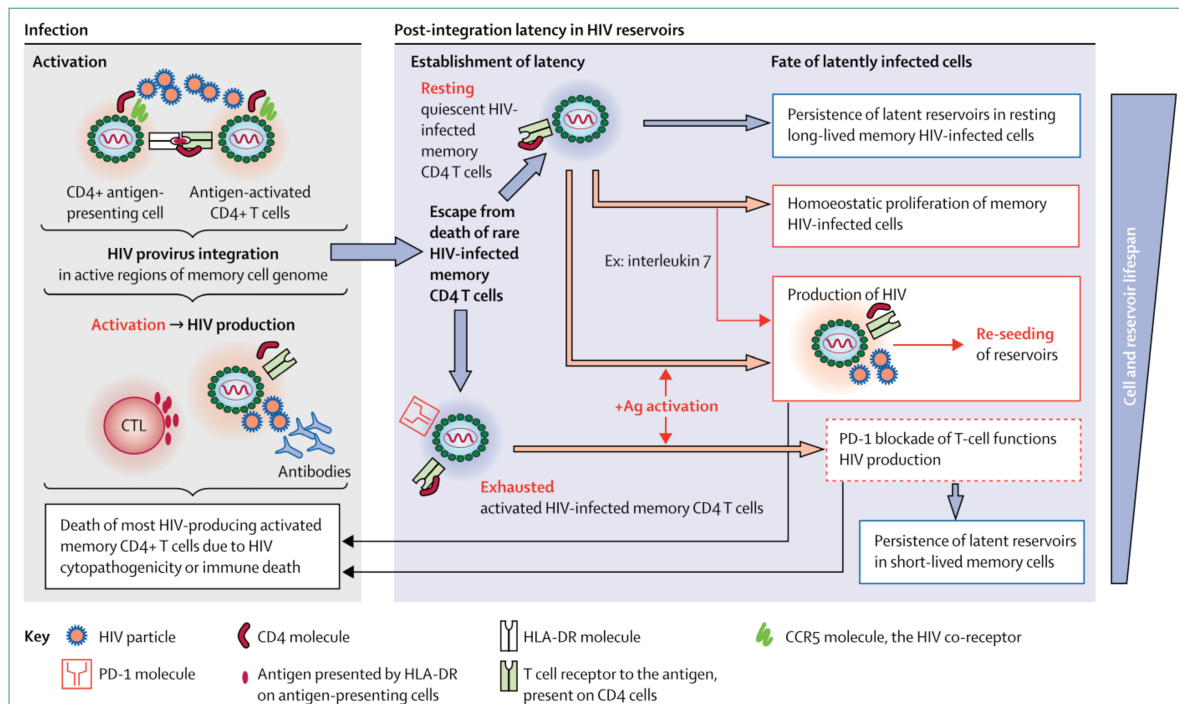


Figure 11 : Mécanismes de la persistance virale. Tiré de ²⁰². L'infection des LT CD4 conduit à l'intégration du génome viral dans la cellule. L'activation des LT CD4 permet la production des molécules virales pour la production de nouveaux virions. Si la majorité des LT CD4 infectés meurent des suites d'un effet cytopathique du VIH ou d'une réponse immunitaire, une partie des LT CD4 quiescente ou épuisée échappe à cette mort et permet au virus de persister, sans visibilité par le système immunitaire. Via la réactivation de ces cellules, de nouveaux virions vont être produits et un nouveau cycle d'établissement de réservoir pourra recommencer.

De fait, la définition précise du réservoir viral, au niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire est un des enjeux majeurs de la recherche sur le VIH. Les territoires anatomiques réservoirs les plus connus sont les tissus lymphoïdes. En effet, malgré plusieurs années de traitements aux ART, l'ARN et l'ADN viraux sont détectés dans les ganglions de patients infectés^{218,219}. Cette observation est également rapportée dans le cadre d'études sur des modèles d'infections de primates non humains, où des taux d'ADN et d'ARN viraux importants sont décrits au niveau de ganglions et de la rate^{220,221}. Du fait de la distribution anatomique des réservoirs viraux, l'accessibilité des ART aux tissus lymphoïdes a été questionnée et quelques études suggèrent que la concentration des ART y serait moins importante^{216,222}. Plus récemment, des travaux supportent que la persistance au niveau des ganglions est soutenue par une prolifération de cellules infectées pré-traitement plutôt que la conséquence de cycle viraux après introduction des traitements ART²²³. L'étude du réservoir est complexe car celui-ci est multiple. Par exemple, le tractus gastro-intestinal²²⁴ et plus récemment le système nerveux²²⁵ ont également été décrits comme des réservoirs viraux. La définition des

réservoirs cellulaires, plus particulièrement des LT CD4 comme réservoirs viraux, sera abordée ultérieurement.

Actuellement, des stratégies d'éliminations du virus sont testées comme la réactivation des cellules réservoirs (« Shock and kill »), ou le renforcement de l'immunité de l'hôte par des vaccins²⁰². Certaines figures de la recherche sur le VIH comme Antonio Fauci, trouvent actuellement plus réalistes les stratégies visant à contrôler un rebond viral en l'absence d'ART (« Sustained virologic remission ») plutôt que les stratégies visant à éradiquer le virus (Congrès IAS 2017). Ces stratégies de contrôle de la virémie permettraient de limiter la transmissibilité du virus (non-transmissible quand la charge virale du patient est indétectable) tout en diminuant le poids des traitements pour les patients.

II.2 Contexte de développement des Tfh dans l'infection par le VIH

Dans le cadre de l'infection par le VIH, les acteurs biologiques du développement et de la fonction des Tfh sont modifiés. Tout d'abord, les LT CD4 sont la cible du virus et sont soumis à une exposition antigénique et un contexte inflammatoire continu du fait de la persistance virale. Les LT CD4 sont donc particulièrement affectés dans l'infection. S'ajoutant à ce contexte, les OLS sont déstructurés chez les patients, avec des zones T et B régissant habituellement la génération des Tfh qui ne sont plus définies. Pour finir, les principaux partenaires cellulaires (DC et LB) des Tfh présentent également de nombreuses modifications fonctionnelles et phénotypiques. Cette partie se focalisera sur ces différents éléments.

II.2.a Les LT CD4 dans l'infection par le VIH

II.2.a.i Déplétion des LT CD4

Les LT CD4 sont les cibles de l'infection^{196,197} et leur déplétion graduelle est prédictive de la progression vers le SIDA. La déplétion des LT CD4 était initialement associée à une infection virale productive, avec l'identification d'une mort par apoptose de LT CD4 activés et infectés. Cependant, la faible fréquence de cellules activées observée a rendu peu probable l'explication de la perte massive de LT CD4 par une infection productive²²⁶. Un effet de déplétion dit « bystander » existe. Cette mort des LT CD4 a été observée dans des ganglions de primates humains ou non humains infectés, où de l'apoptose fut observée dans des LT CD4 non infectés²²⁷. Avec des

systèmes de culture d'OLS, seuls 5% des LT CD4 qui meurent produisent activement le virus alors que 95% des LT CD4 n'en produisent pas²²⁸. Empêcher la fusion du virus via le CD4 permet d'inhiber la mort cellulaire, celle-ci n'étant pas inhibée en bloquant la reverse transcriptase²²⁶. Cette observation indique qu'une mort lymphocytaire peut résulter d'une infection non productive et ne dépend pas toujours de la voie apoptotique. Cette mort cellulaire relève plus d'un suicide cellulaire appelé pyroptose que d'un effet cytopathique²²⁸. Alors que cette voie permet habituellement de protéger l'hôte par la prévention d'une infection virale dans la cellule, elle participe à l'immunopathogénicité du VIH puisqu'elle favorise la déplétion des LT CD4. Les LT CD4 des OLS sont plus sensibles à la pyroptose que les LT CD4 du sang. En effet, la co-culture des LT CD4 ou CD8 issus de tissus lymphoïdes avec des LT CD4 du sang conduit à de la pyroptose chez ces derniers²²⁹. La mort des LT CD4 peut également être le résultat d'une réponse cytotoxique, médiée par les LT CD8²³⁰ ou les NK via de l'ADCC (pour « Antibody Dependent Cell Cytotoxicity »)²³¹. Cependant, la forte capacité de mutations du virus limite l'efficacité de ces réponses spécifiques. Les LT CD4 producteurs de virus ne sont pas éliminés et la persistance virale est donc favorisée. Paradoxalement, dans ce contexte où une mort des LT CD4 est favorisée, plusieurs publications rapportent une surreprésentation des Tfh dans les tissus lymphoïdes d'individus infectés par le VIH en phase chronique^{232,233}.

II.2.a.ii Les LT CD4 comme réservoirs cellulaires

Les LT CD4 représentent le réservoir majeur du virus. Le réservoir semble s'établir précocement puisque certains clones LT CD4 infectés 4 semaines après infection sont retrouvés chez les individus après plusieurs années²³⁴. L'infection des LT CD4 est favorisée au niveau des tissus lymphoïdes, où les contacts entre cellules sont nombreux et l'exposition aux cytokines importante²³⁵. La réplication du VIH est par conséquent préférentielle dans les tissus lymphoïdes et celle-ci persiste malgré l'introduction d'un traitement aux antirétroviraux²¹⁸. Il est estimé que plus 10^{10} virions sont produits par jour et que la majorité de ces virions est générée et retenue au niveau des tissus lymphoïdes²³⁶.

Les LT CD4 mémoires sont considérés comme les réservoirs majeurs de l'infection latente²¹¹ en comparaison aux LT CD4 naïfs. En effet, les LT CD4 naïfs contiennent moins d'ADN viral en comparaison aux LT CD4 mémoires, supportant une permissivité plus faible à l'infection²³⁷. *In vitro*, des travaux rapportent que l'établissement de la latence se fait entre 6 et 13 jours, au moment où les LT CD4 passent d'un état effecteur à mémoire. Cette mise en place de la latence virale est

favorisée par un programme transcriptionnel permettant la transition entre ces deux états²³⁸. Une fois que l'infection latente a été montrée comme préférentielle dans les LT CD4 mémoires, la question d'un sous-type associé s'est rapidement posée. Parmi les LT CD4 mémoires, les travaux de Nicolas Chomont indiquent que les Tcm et les LT dits transitionnels mémoires (Ttm) sont des réservoirs majeurs de l'infection²¹³, plus stables que les Tem²³⁹. Récemment, les Ttm ont été décrits comme principalement infectés au niveau de la muqueuse cervicale, comparé au LT CD4 non-Ttm²⁴⁰. Ces différentes études montrent que la définition robuste d'un réservoir viral cellulaire est difficile. Partant de ce constat, une étude récente soutient que la quantité d'ADN viral est difficilement associable à une population de LT CD4 mémoires en particulier, que ce soient les Tcm, les Tem ou Ttm²⁴¹.

Une susceptibilité à l'infection a également été associée à différents sous-types de LT CD4 effecteurs, tels que les Th1²⁴², les Tregs²⁴³ ou les Th17²⁴⁴⁻²⁴⁶. Exposés à du virus *in vitro*, des LT CD4 au profil Th1/17 (CXCR3⁺CCR6⁺) issus de sang d'individus sains sont plus permissifs à l'infection et une production plus forte de virus par des LT CD4 avec ce phénotype est observée chez des patients infectés sous ART²⁴⁷. En combinant les récepteurs aux chimiokines et la sécrétion de cytokines dans leur définition cellulaire, une étude récente suggère que les Th1, Th2, Th17 et Tregs sont infectés de manière équivalente *in vivo* dans un modèle de primate non humains d'infection, dans le sang ou dans les tissus lymphoïdes²⁴⁸. Cette étude n'inclut pas les Tfh et nous verrons par la suite que ce sous-type de LT CD4 effecteur est considéré comme un réservoir majeur du virus.

Outre l'association du réservoir à des sous-populations cellulaires particulières, la définition du réservoir dans les LT CD4 repose également sur l'association de marqueurs spécifiques. Les marqueurs lymphocytaires d'une activation ou d'une exhaustion comme PD-1, LAG-3, TIGIT, Tim-3 et CD160 sont associés aux LT CD4²⁴⁹. Des travaux récents montrent, après isolation de LT CD4 de patients infectés non traités, que l'engagement du PD-1 (via le PD-L1) permet de limiter la production virale suite à une stimulation TCR et prouve le rôle de ce récepteur pour l'établissement de la latence virale. Le blocage du PD-1 par un anticorps permet de reverser cette latence et montre le potentiel de cet axe pour une thérapie²⁵⁰. La découverte de CD32 comme marqueur spécifique des LT CD4 réservoir du VIH a récemment suscité de nombreux espoirs^{251,252}. Le fréquence de LT CD4 CD32⁺ est d'autant plus forte que la virémie est importante²⁵³. Le PD-1 indépendamment du CD32, permet de caractériser les LT CD4 particulièrement susceptibles à l'infection²⁵³. Il est intéressant de noter qu'un marqueur du réservoir, le PD-1, fait partie intégrante de la définition phénotypique des Tfh.

II.2.a.iii Exhaustion des LT CD4 dans l'infection par le VIH

L'infection par le VIH conduit à une exhaustion des LT CD4, définie comme une altération dans leurs capacités fonctionnelles et prolifératives. Des LT CD4 issus de sang ou de tissus lymphoïdes de patients infectés sont moins réactifs à des stimulations spécifiques, allogéniques ou aspécifiques comparativement à ceux des individus sains²⁵⁴⁻²⁵⁶. Si les différences dans les réponses spécifiques pourraient s'expliquer par un changement de répertoire TCR durant l'infection²⁵⁷, l'absence de réponse face à des stimuli physiologiques non spécifiques indique que les LT CD4 témoignent de défauts d'activation intrinsèques. Dans le cadre d'une stimulation spécifique²⁵⁸ et également aspécifique (anti-CD3)²⁵⁹, une déficience de production d'IL-2 par les LT CD4 de patients infectés est rapportée. Des défauts de sécrétion d'IFN γ et de TNF- α sont décrits chez les LT CD4 issus de patients infectés²⁶⁰ et une perte de capacité à sécréter simultanément plusieurs cytokines (polyfonctionnalité) est rapportée^{261,258}. Une réduction de l'expression de marqueurs de co-stimulation tels que OX40 et CD40L est également décrite sur les LT CD4²⁵⁷. Des défauts de réponse à l'IL-2 ou à l'IL-7 des LT CD4 médiés par une perte d'expression et de fonction des récepteurs respectifs sur les LT CD4 sont observés^{262,263}. Des travaux récents montrent que 80% des LT CD4 de patients en phase chronique présentent des micro-domaines membranaires anormaux, qui retiennent des récepteurs aux cytokines comme l'IL-7R et conduisent à leur inactivité²⁶⁴.

Outre les défauts d'expression de molécules effectrices, la perte de fonction des LT CD4 est également associée à une expression de récepteurs inhibiteurs de l'activation lymphocytaire comme le PD-1, CTLA-4, CD160, TIGIT et TIM-3. Ces marqueurs corrént avec la charge virale et la progression de la maladie²⁶⁰. Des marqueurs liés à l'activation tels que HLADR et CD38 sont plus représentés chez les LT CD4 de patients infectés^{249,265}. L'implication dans le développement et la fonction des Tfh a été montrée pour nombre de marqueurs cités ci-dessus. Par conséquent, des défauts phénotypiques pourraient interférer dans la communication entre les LT CD4 et ses partenaires cellulaires, et donc perturber l'orientation des LT CD4 vers un profil Tfh. Cette sur-activation et exhaustion sont le résultat d'un contexte inflammatoire chronique.

II.2.b Contexte inflammatoire chronique

Du fait de la persistance virale, le système immunitaire est constamment exposé à des composants viraux qui favorisent l'activation de voies pro-inflammatoires. Les protéines virales comme la

Gp120 et Nef peuvent induire directement l'activation des lymphocytes et macrophages^{266,267}. Certaines protéines du VIH comme Tat, Nef et Vpr activent la voie dépendante de NF- κ B et conduisent à la production de molécules pro-inflammatoires²⁶⁸. Le VIH conduit aux relargage d'IFN- α par les DC, via une activation du TLR7²⁶⁹. D'autres voies dépendantes du TLR8 et DC-SIGN, décrites comme pouvant être impliquées dans le développement de Tfh^{126,270}, sont induites par les composants viraux^{271,272}. Ces données ne sont prises qu'à titre d'exemple et soulignent l'impact des protéines virales dans l'induction d'un contexte pro-inflammatoire, pouvant moduler le développement des Tfh.

Outre l'inflammation qui résulte de la persistance virale et qui est induite par les composants relatifs au VIH, d'autres causes de l'inflammation sont également connues. Une des principales résulte de la perte d'intégrité de la barrière intestinale chez les patients infectés. Cette perte d'intégrité de la barrière intestinale est due à une déplétion précoce des LT CD4 prépondérante dans le tractus gastro-intestinal^{208,273,274} et conduit à une translocation microbienne du tractus vers le sang. Cette translocation bactérienne se traduit par des taux élevés de LPS dans le sang de patient infectés, qui corrélerent la concentration d'IFN- α mesurée²⁷⁵. En combinaison avec le LPS, le CD14 soluble (sCD14) témoigne également d'une translocation bactérienne. Ces deux molécules pro-inflammatoires sont en concentration plus importantes dans la phase chronique que dans la phase aiguë²⁷⁵ et participent à l'activation immunitaire qui caractérise cette phase. Parallèlement, des co-infections (CMV, EBV, HBV, HBC) présentes chez les patients infectés par le VIH peuvent également favoriser un contexte inflammatoire persistant²⁷⁶.

Ces différentes causes d'inflammation résultent en une quantité de cytokines pro-inflammatoires accrue chez les patients infectés non traités comparés à des patients non infectés²⁷⁷. La quantité de molécules pro-inflammatoires est inversement corrélée à la reconstitution du compartiment LT CD4 puisque des patients présentant une faible reconstitution se caractérisent par des taux d'IL-6 et de sCD14 plus importants²⁷⁸. Cette observation souligne l'effet délétère de l'inflammation sur la reconstitution des LT CD4. Plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF- α , l'IL-6, l'IFN α , l'IL-10 et l'IL-15 sont retrouvées à des concentrations plus importantes dans le sang de patients infectés^{267,277}. Les ART ne résorbent pas cette inflammation même s'ils permettent de la diminuer, probablement car les traitements ne permettent pas l'élimination du virus et des réservoirs viraux persistent. Pour exemple la concentration d'IL-6 reste très importante chez les adultes traités aux antirétroviraux avec des concentrations 40% à 60% plus élevées que chez des patients non infectés²⁷⁹. Au niveau des ganglions de patients infectés, une concentration plus

importante de IL-1 β , d'IL-2, d'IL-4, d'IL-10, d'IL-12, de TNF- α et d'IL-15²⁸⁰, suggérant qu'une forte activation est présente au niveau de ces tissus et pourrait agir sur le développement et la fonction des Tfh. Par exemple, nous avons vu que l'IL-12 et l'IL-1 β sont deux cytokines décrites pour leur implication dans le développement et la fonction des Tfh^{111,169}.

II.2.c Déstructuration des OLS

Probablement du fait d'une déplétion des LT CD4 et d'une activation chronique, de fortes altérations structurelles sont liées dans les OLS de patients infectés. La lymphoadénopathie a été une des premières atteintes décrite chez les patients infectés par le VIH^{193,194}. Dans les premières études histologiques de ganglions de patients infectés, trois profils histologiques distincts ont été observés. La majorité des patients présentait une hyperplasie explosive des follicules, anormalement larges et irréguliers. Une involution folliculaire et une atrophie étaient également observées chez certains patients. Le troisième profil histologique correspond à l'addition des deux profils précédemment décrits. Il fut réalisé rapidement que ces altérations étaient le reflet de la progression de la maladie avec (1) une hyperplasie folliculaire, (2) une lyse folliculaire (3) une atrophie avec ou sans fibrose et enfin (4) une déplétion folliculaire²⁰⁹. En conséquence, dans les tissus lymphoïdes, les zones immunitaires fonctionnelles sont progressivement remplacées par des dépôts de fibronectine (fibrose) et de collagène²⁰⁹ (**Figure 12**).

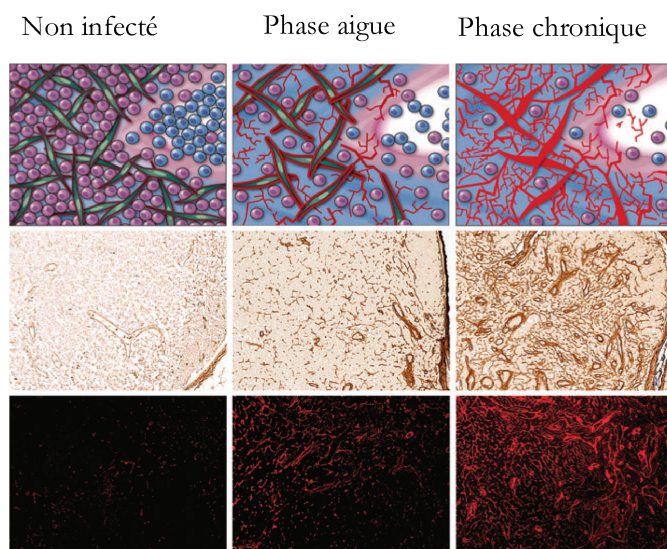


Figure 12 : Fibrose au sein des ganglions durant les phases de l'infection. Tiré de ²⁰⁹. En haut, schéma montrant la fibrose progressive durant les différentes phases de l'infection par le VIH. Schéma et immunomarquage sur coupe histologique de ganglions dans un modèle d'infection simien : en marron marquage du collagène (milieu) et de la fibronectine en rouge (bas). Les LB sont en bleu et les LT en violet.

Le lien entre les LT CD4 et les dommages des tissus lymphoïdes a été fait par l'observation que la fibrose des tissus lymphoïdes corrèle inversement à l'abondance de la population LT CD4 dans la zone T de ganglions de patients infectés²⁸¹. Les patients présentant des dommages ganglionnaires

les plus sévères arborent également une déplétion de LT CD4 plus grande²⁰⁹. Dans des modèles d'infection chez le primate non humain, la perte précoce de LT CD4 conduit à une perte des FRC, médiée par réduction de la production lymphotoxine β ²⁸². De même, l'analyse de ganglions avant et pendant les phases aiguës/chroniques dans un modèle d'infection de primates non humains révèle que la fibrose limite l'accessibilité des LT CD4 à l'IL-7 produite par les FRC²⁸³. Limiter le dépôt de collagène par l'usage d'une drogue anti-fibrotique permet de préserver les populations LT CD4²⁸⁴. Ces altérations des tissus lymphoïdes relèvent probablement d'un cercle vicieux dans lequel la perte des LT CD4 favorise une perte des FRC, qui favorise la perte des LT CD4.

La sévérité des altérations des OLS est prédictive de la reconstitution du compartiment LT CD4 après la prise d'ART²⁸⁵. La prise d'ART permet l'amélioration de nombreux paramètres immunologiques comme l'activation des LT CD4, le recouvrement du compartiment LT CD4 et de follicules secondaires. Néanmoins, la reconstitution des capacités immunes reste partielle²⁸⁶. Pour exemple, des réactions granulomateuses, un infiltrat plasmocytaire, une déplétion de la pulpe blanche, de la nécrose et de l'inflammation subsiste dans la rate de patients infectés traités²⁸⁷. De même, après un an de traitement avec des antirétroviraux, les ganglions de patients sont toujours altérés²⁸⁸, montrant que l'infection VIH conduit à une déstructuration irréversible des OLS. L'activation immunitaire persiste au sein des OLS malgré les traitements ART. En effet, le nombre de GC continue d'augmenter chez des primates non humains à 6 semaines de la prise d'ART alors que la charge virale est indétectable dès 2 semaines de traitement²⁸⁹.

L'utilisation d'imagerie confocale sur des coupes de patients infectés sous ART permet d'illustrer particulièrement bien l'hyperplasie des follicules B (**Figure 13**). Ces follicules B sont irréguliers et recouvrent une surface plus large que chez des individus sains²⁹⁰.

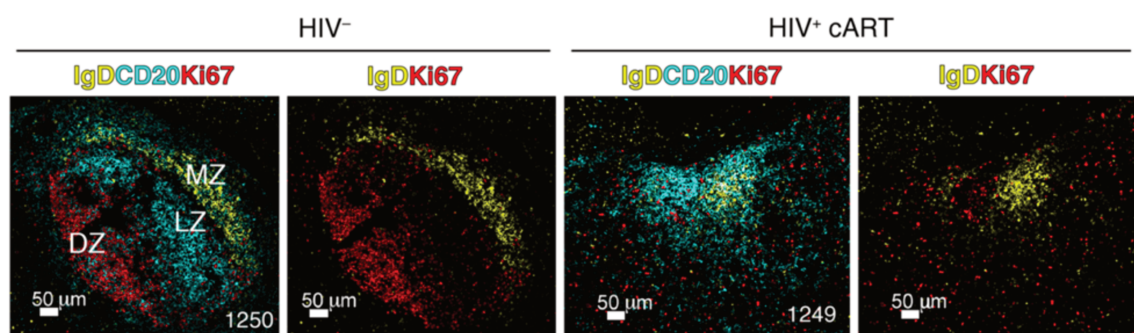


Figure 13 : GC dans les ganglions de donneurs sains et patients infectés sous ART. Tiré de ²⁹⁰. Imagerie confocale montrant l'architecture de follicules secondaires de donneurs sains et de patients infectés. Le marquage anti-CD20 permet d'identifier le follicule, le marquage anti-IgD permet d'identifier la LZ des GC alors que le Ki67 permet d'identifier la DZ des GC.

Étant donné l'importance de l'architecture tissulaire dans la génération des Tfh, ce découpage des territoires immunitaires interfère probablement avec le développement des Tfh. Par la perte de zones B et T bien définies, le LB et les LT CD4 pourraient interagir librement et établir une synapse normalement restreinte à la bordure T-B. Considérant que les LB sont des acteurs d'une initiation d'une réponse Tfh, cette décompartmentalisation pourrait avoir une incidence sur le contrôle des interactions cellulaires dans l'espace, notamment entre les LB et LT CD4.

II.2.d Modifications des principaux partenaires cellulaires des Tfh : DC et LB

Plusieurs modifications fonctionnelles des principaux partenaires cellulaires des Tfh sont également rapportées. Chez l'Homme ou dans des modèles d'infection de primates non humains, la distribution des DC dans l'organisme est modifiée, notamment avec un nombre de DC myéloïdes qui baisse dans le sang alors qu'il augmente dans les tissus lymphoïdes²⁶⁹. En parallèle de ces modifications quantitatives, des modifications fonctionnelles sont également rapportées. L'exposition *in vitro* de DC myéloïdes au plasma de patients virémiques non traités diminue leur capacité de sécrétion d'IL-12, d'IL-6 et de TNF- α ^{291,292}. De manière identique, des moDC issus de patients infectés sécrètent moins d'IL-12 et plus d'IL-10. Mis en co-culture avec ces DC, des LT CD4 allogéniques produisent moins d'IFN γ ²⁹³, illustrant la possible répercussion de la modification fonctionnelle de la DC sur la réponse LT CD4. Cette altération de la sécrétion d'IL-12 par les DC est également rapportée chez des patients infectés au stade chronique de leur infection²⁹⁴. D'autres altérations dans les capacités de maturation et d'expression des molécules co-stimulation (CD80, CD86, CD83) après une exposition virale *in vitro* sont également relatées^{295,296}. En générant deux états de moDC différents, l'un inflammatoire (IL-12⁺), l'autre suppresseur (IL-10⁺), une équipe a récemment montré que l'effet du virus est différent selon l'état de la DC. Une baisse de la sécrétion de l'IL-12 et de l'IL-6 est constatée chez les moDC inflammatoires alors qu'une augmentation d'IL-12 est constatée sur les DC au phénotype suppresseur²⁹⁷. Ces données permettent de souligner la difficulté d'une mise en évidence d'un effet conservé sur les DC, qui dépend de l'état de celle-ci.

Dans l'infection par le VIH, les modifications observées dans le compartiment LB pourraient également avoir des répercussions sur le dialogue établi avec le Tfh. Par exemple, la protéine virale Nef s'accumule au niveau des LB dans les follicules de patients infectés et interfère avec la capacité des LB à répondre à des stimulations au CD40L, à l'IL-4 et à l'IL-10²⁹⁸. Par la comparaison de patients avec différentes charges virales, il a été montré un impact de la virémie sur les axes co-

stimulation CD80 et CD86 pour leur communication du LB avec les LT CD4. La faible expression de CD80/86 analysée sur les LB des patients avec une virémie haute conduit à un défaut d'activation des LT CD4³⁰⁸. A l'instar de ces défauts d'expression de molécules de co-stimulation, des altérations de la sécrétion d'IL-6 et de TNF sont rapportées³⁰¹. Une forte sécrétion de CXCL13 par des LB de patients infectés est également observée après stimulation polyclonale, de manière concomitante avec une expression de CXCR5 plus faible³⁰². Ces variations pourraient biaiser la migration des Tfh vers les LB et également le positionnement des deux types de cellules pour l'initiation d'un dialogue. Pour finir, une plus forte abondance de LB PD-L1⁺ est trouvée dans les ganglions de patients chroniquement infectés²³². Un possible impact sur le développement et la fonction des Tfh est supposé, du fait de l'importance de cet axe pour la régulation des Tfh.

Ces données ne sont prises qu'à titre d'exemple mais illustrent bien que différentes modifications relatives aux DC et LB pourraient impacter le développement des Tfh.

II.3 Caractéristiques des Tfh dans l'infection par le VIH

II.3.a Les Tfh comme réservoirs cellulaires du VIH

Parmi les LT CD4, les Tfh sont considérés comme un des réservoirs majeurs de l'infection. Cette assertion fait suite à l'observation que chez des patients virémiques, les Tfh de ganglions abritent un nombre plus important de copies d'ADN viral en comparaison à des LT CD4 qui expriment uniquement le PD-1, le CXCR5 ou aucun des deux^{303,304}. Cette observation concerne également des Tfh issus de tissu splénique en comparaison à des LT CD4 mémoires et naïfs²³³. De manière cohérente, la production de virus est plus forte par les Tfh isolés de patients infectés comparée aux autres populations de LT CD4 après restimulation *in vitro*³⁰⁵. De la même façon, l'infection *in vitro* de populations de LT CD4 provenant de patients sains montre qu'une production virale plus importante est obtenue avec des Tfh en comparaison à des LT CD4 non-Tfh^{303,304}. Du fait de cette permissivité à l'infection, il est suggéré que les Tfh participent hautement à la persistance virale observé chez les patients traités³⁰⁵. Afin d'expliquer cette susceptibilité des Tfh à l'infection, une équipe a recherché les recouvrements entre les molécules associées aux phénotypes Tfh et les molécules favorisant l'intégration virale. En analysant des LT CD4 CXCR5^{high} et CXCR5^{low} de ganglions de sujets sains, cette équipe suggère que les expressions de gènes associés aux IFN, au cycle cellulaire, au métabolisme et à l'activation relative des Tfh favorisent l'intégration du virus dans ce compartiment³⁰⁶, indiquant un terrain cellulaire propice. L'inhibition de Bcl6 dans des Tfh

ou dans des LT CD4 non-Tfh issus d'amygdales conduit à une baisse de l'infection. L'inhibition de Bcl6 permet également de limiter la réactivation et production de virus de cellules issues de patient infectés, mais ne permet pas de baisser le taux d'ADN viral³⁰⁷. Si les Tfh sont plus sensibles à l'infection, leur abondance est plus importante chez les patients infectés en phase chronique.

II.3.b Le paradoxe quantitatif des Tfh dans l'infection par le VIH

L'abondance des Tfh observée dans l'infection dépend de la phase de la maladie ainsi que de la définition phénotypique utilisée. Les différentes observations quantitatives quant à la dynamique des Tfh lors de l'infection par le VIH ou SIV sont exposées en **Figure 14**.

Virus	Stade	Progression	Organe	Phénotype	Dynamique
VIH	Chronique	N.D.	Ganglions	CXCR5 ⁺ PD-1 ⁺ Bcl-6 ⁺	Accumulation
VIH	Chronique	N.D.	Ganglions	CXCR5 ⁺ PD-1 ⁺ Bcl-6 ⁺ (CCR7 ⁺ CD45RA ⁻)	Accumulation
SIV	Précoce	Progresseurs	Rate	CXCR5 ⁺ PD-1 ⁺	Perte
SIV	Précoce	Progresseurs lents	Ganglions	CXCR5 ⁺ PD-1 ⁺	Accumulation
SIV	Précoce	Progresseurs rapides	Ganglions	CXCR5 ⁺ PD-1 ⁺	Pas d'accumulation
SIV	Chronique	Progresseurs lents	Ganglions	CXCR5 ⁺ PD-1 ⁺	Accumulation
SIV	Chronique	Progresseurs lents	Rate Ganglions	CD45RA-CD62L ⁺ CXCR5 ⁺ PD-1 ⁺	Accumulation
SIV	Chronique	Progresseurs rapides	Ganglions	CXCR5 ⁺ PD-1 ⁺	Perte
SIV	Sida	Progresseurs	Ganglions	CXCR5 ⁺ PD-1 ⁺	Perte
SIV	Chronique	Contrôleurs	Ganglions	CXCR5 ⁺ PD-1 ⁺	Préservation
SIV	Chronique	Progresseurs	Ganglions	CXCR5 ⁺ PD-1 ⁺	Accumulation
SIV	Chronique	ND	Ganglions	CD28 ^{fort} CD95 ^{fort} CCR7 ^{faible} PD-1 ^{fort}	Accumulation

Figure 14 : Tableau récapitulatif des différentes observations quantitatives des Tfh dans l'infection VIH/VIS. Tiré de ³⁸³.

La majorité des études réalisées sur les individus chroniquement infectés rapporte une accumulation des Tfh dans les ganglions^{232,303,308} ou dans la rate²³³. Cette accumulation de Tfh, décrite au regard de leur spécificité ou non pour le virus³⁰⁸, peut paraître surprenante au vu du contexte d'élimination et d'exhaustion des LT CD4 décrit précédemment. Dans les modèles d'infection chez des primates non humains, l'accumulation des Tfh est également observée chez les individus chroniquement infectés, comparée à des individus non infectés ou des individus en phase aiguë ou SIDA^{309,310}. Discriminant les Tfh du GC par leur expression du CD57⁹⁰, deux études rapportent que les Tfh qu'ils soient du GC ou non sont augmentés dans la rate de patients non traités²³³ ou dans les ganglions de patients traités sous antirétroviraux comparés à des patients sains²⁹⁰.

Les ART résorbent partiellement cette accumulation puisque la fréquence des Tfh reste plus importante chez les patients traités que chez des individus sains^{290,303,308}. Ces observations soulignent le fait que la persistance virale et l'activation immune persistent malgré la prise d'ART, et favorisent la génération des Tfh. D'autres processus pourraient être impliqués dans l'accumulation de Tfh. Pour exemple, le contexte inflammatoire chronique avec des cytokines pro-Tfh comme l'IL-6 ou l'IL-12 pourrait favoriser la génération de Tfh. Parallèlement, la perte de définition des zones T et B pourrait conduire à des interactions incontrôlées avec les LB, capables d'induire le développement d'un profil Tfh.

II.3.c Biais de la réponse effectrice LT CD4 vers un profil Tfh

L'accumulation de Tfh observée chez les patients infectés sous-entend que l'environnement infectieux est propice à l'établissement de ce profil effecteur dans les LT CD4. Soutenant cette hypothèse d'un biais vers une réponse Tfh, la fréquence des Th1, Th2 et Th17 dans le sang de patients en infection aiguë ou chronique est plus faible que celle décrite chez des individus sains²⁴². Cela indique par conséquent d'une sous-représentation de ces profils effecteurs chez les patients infectés parmi les LT CD4.

Récemment, l'analyse de signatures Th associées à des LT CD4 spécifiques du VIH de patients présentant différentes charges virales a permis de faire le lien entre la virémie et la réponse LT CD4 induite. Un enrichissement de signature Th1 et Th17 est identifié dans LT CD4 spécifiques du VIH de patients contrôlant spontanément l'infection et de fait, présentant une virémie faible. Au contraire, l'expression de gènes associés au profil Tfh (définis par la comparaison transcriptomique entre des Tfh et non-Tfh des tissus lymphoïdes) est enrichie dans les LT CD4 spécifiques du VIH de patients avec des virémies hautes³¹¹. Cet enrichissement de la signature génique relative au profil Tfh n'est pas dû à une surreprésentation quantitative par les LT CD4 des cellules LT CD4 CXCR5⁺ décrite chez les patients avec une virémie haute. En effet, la signature Tfh est également enrichie dans des LT CD4 CXCR5⁻. Les différentes signatures de ces profils effecteurs sont obtenues à partir de bases de données disponibles, avec la signature Tfh définie grâce à une comparaison de LT CD4 CXCR5^{hi} en comparaison à des LT CD4 CXCR5⁻ issues d'amygdales. Ainsi, la signature Tfh est favorisée dans un contexte de persistance antigénique, idée renforcée par le fait que l'introduction d'ART permet de réduire la signature Tfh associée aux LT CD4 spécifiques du VIH. Aucune modification n'est en revanche observée pour les signatures Th1 et Th17 après la prise d'antirétroviraux³¹¹.

II.3.d Altérations de la qualité des Tfh

II.3.d.i Modifications transcriptomiques et phénotypiques des Tfh

En réalisant une étude transcriptomique sur cellule unique de Tfh spléniques issus de patients chroniquement infectés, notre équipe a révélé de nombreuses modifications dans l'expression de gènes relatifs à la fonction des Tfh²³³. Nous avons observé des niveaux d'expression de CD40L, OX40 et ICOS plus faibles dans les Tfh et GC Tfh de patients infectés, suggérant de défauts dans les capacités de co-stimulations. A l'inverse, les Tfh de patients infectés se caractérisent par une expression plus forte d'IL-21 et CXCL13²³³, laissant penser à un gain de fonction. Nous rapportons une baisse de l'expression d'IL-10²³³, également relatée au niveau protéique dans des co-cultures de LB avec des Tfh de ganglions ou des LT CD4 CXCR5⁺ du sang de patients infectés^{232,312}.

Parallèlement, l'analyse des Tfh par cytométrie de flux selon des marqueurs de fonction indique également que la distribution de sous-populations fonctionnelles est modulée dans l'infection. Par exemple, l'abondance de cellules ICOS⁺, PD-1⁺ ou ICOS⁺PD1⁺ parmi les Tfh est plus importante chez les individus infectés comparé aux non infectés^{308,309}. De la même manière, des travaux récents montrent un enrichissement en cellules ICOS⁺SLAMF⁺ dans les Tfh de patients infectés traités²⁹⁰. Concernant les profils cytokiniques, il est montré que les Tfh issus de patients chroniquement infectés non traités sécrètent moins d'IFN- γ , de granzyme A, d'IL-2 et de TNF- α . Ces Tfh présentent un phénotype activé mais sont moins polyfonctionnels, car associés à une sécrétion d'IL-21 non combinée à la sécrétion d'autres cytokines³¹³. Des variations dans l'expression de molécules impliquées dans la migration sont décrites, telles que la perte d'expression de PD-1 et de CXCR5 par les Tfh après une exposition *in vitro* à du virus³⁰⁴. La perte d'expression de PD-1 est également constatée dans les Tfh spléniques de patients infectés bien que la perte de CXCR5 ne soit pas retrouvée²³³. Pour finir, les Tfh sont également associés à une surexpression de marqueurs d'activation (HLADR, CD38) et prolifération (ki67)^{310,313}, moins spécifique aux Tfh puisqu'observée globalement sur les LT CD4 en général. L'ensemble de ces données souligne le fait que les caractéristiques phénotypiques des Tfh sont modifiées dans l'infection, ce qui pourrait contribuer aux réponses LB anormales des patients infectés.

II.3.d.ii Profil Th1 associé aux Tfh dans l'infection par le VIH-1

Dans l'infection par le VIH, de nombreuses données rapportent l'émergence d'une population Tfh hybride présentant des traits Th1. Une accumulation de Tfh CXCR3⁺, récepteur classiquement associé aux Th1, est décrite dans des ganglions de patients traités²⁹⁰. Dans des modèles d'infection de primates non humains, cette accumulation de Tfh exprimant CXCR3 est également rapportée. Une grande partie de ces Tfh CXCR3⁺ exprime T-bet et sécrète de l'IFN- γ ⁺, validant ainsi leur identité Th1 avec d'autres marqueurs. De plus fortes proportions de cellules triples sécrétrices d'IFN- γ , d'IL-21, et de CD40L, ou doubles sécrétrices d'IFN- γ -CD40L et d'IFN- γ -IL-21 et simples sécrétrices d'IFN- γ sont décrites parmi ces Tfh/Th1³¹⁴. D'autres travaux se focalisant sur la phase aiguë de l'infection montrent que les LT CD4 CXCR5⁺ du sang de patients infectés ont un profil orienté vers les Th1 (CXCR3⁺) au détriment du profil Th17 (CCR6⁺)³¹⁵. Reposant toujours sur la positivité pour le CXCR3, une étude récente montre que le profil Th1 associé aux LT CD4 CXCR5⁺ du sang persiste même avec la prise d'ART³¹⁶. La génération et le rôle de cette population de Tfh au profil Th1 ne sont pas encore très bien définis et deux éventualités peuvent être envisagées pour expliquer l'émergence de cette population. Premièrement, l'émergence du profil Tfh pourrait résulter de la différenciation d'un LT CD4 naïf dans un environnement mixte Th1-Tfh. Deuxièmement, la génération de ce profil pourrait reposer sur une plasticité des Tfh ou des Th1, dont la réorientation vers le profil respectif surviendrait sous contexte infectieux. Au regard de l'association d'un profil génique Tfh plutôt que Th1 chez les LT CD4 dans le contexte de persistance antigénique de l'infection par le VIH, la question d'une repolarisation de Th1 vers un profil Tfh peut être posée.

II.3.d.iii Capacité d'aide délivrée aux LB par les Tfh

À ma connaissance, les tests de fonctionnalité sur des Tfh issus de patients infectés sont rares. Dans une des premières études décrivant une accumulation de Tfh dans les ganglions de patients chroniquement infectés non traités, les auteurs montrent que la production d'IgG par des LB cultivés avec des Tfh issus de patients infectés est plus faible en comparaison à des patients non infectés. Dans ces travaux, la perte de fonction est expliquée par une interaction exacerbée entre le PD-1 et le PDL1, du fait d'une surreprésentation de l'expression de PDL1 par les LB du GC. Cette interaction conduirait à une baisse d'activation des Tfh, qui expriment moins intensément ICOS et sécrètent moins d'IL-21²³². En comparant la capacité d'aide des LT CD4 CXCR5⁺ à différents stades de la phase aiguë de l'infection chez des patients non traités, une étude rapporte que la capacité de

l'aide aux LB (production d'immunoglobulines) décroît au fur et à mesure de la progression de la maladie³¹². Bien que peu nombreuses, ces études suggèrent directement un défaut dans le dialogue entre les Tfh et les LB. Si le lien direct avec les Tfh dans ces réponses anormales n'est pas encore clairement établi *in vivo*, les études analysant en parallèle les compartiments Tfh et LB chez les patients infectés permettent de postuler l'existence d'un lien de causalité entre l'altération fonctionnelle des Tfh et les défauts des réponses LB.

II.4 Défauts de la réponse LB associés à la réponse Tfh

Les défauts associés aux compartiments LB sont nombreux chez les patients infectés par le VIH et ont été répertoriés dans de nombreuses revues^{317,318}. Brièvement, la réponse LB chez les patients infectés se caractérise par une hypergammaglobulinémie, une augmentation de clonalité dans le compartiment LB, une expression accrue de marqueurs d'activation, une augmentation des plasmocytes, une augmentation de la production d'auto-anticorps et une augmentation de la fréquence des tumeurs liées aux LB³¹⁷. Ces différentes observations pourraient être liées aux caractéristiques mentionnées sur les Tfh.

Le premier lien qui peut être fait avec les réponses LB anormales est l'accumulation de Tfh. Celle-ci est probablement délétère pour la génération d'anticorps de haute affinité. Comme vu précédemment, la sélection des LB de haute affinité est favorisée par une aide Tfh limitée et un nombre trop important de Tfh accroît la compétition entre clones LB de faible et haute affinité. Cette accumulation pourrait contribuer à l'émergence d'une hypergammaglobulinémie chez les patients et même favoriser des réponses auto-immunes. Dans les différentes études rapportant une accumulation de Tfh, l'étude concomitante des LB via l'expression des marqueurs CD38 et IgD est utile pour évaluer la distribution des différents sous-types associés à l'état de maturation des LB. Par cette stratégie d'identification, l'accumulation des LB naïves, des GC LB et des plasmocytes est corrélée à l'accumulation de Tfh^{233,303,308}, suggérant un lien de causalité entre les deux. À l'inverse, une corrélation négative est observée entre l'abondance de Tfh et la fréquence de LB mémoires, sous-entendant que les Tfh ne soutiennent pas la maturation des LB en LB mémoires. Sur un aspect plus fonctionnel, une équipe a étudié sur des mêmes échantillons ganglionnaires de patients non traités les Tfh IL-21⁺ et les phénotypes LB, partant de l'hypothèse que les Tfh IL-21⁺ pourraient promouvoir une réponse LB anormale. Par des stratégies de corrélations, les auteurs suggèrent que les Tfh IL-21⁺ favorisent la génération de plasmocytes et non la commutation de classe chez les patients infectés³¹³.

II.5 Les Tfh comme potentiel levier thérapeutique

Bien que pathogéniques chez la majorité des patients, les Tfh sont également associés à des réponses efficaces contre le virus.

II.5.a Les Tfh chez les « elite controllers »

De manière intéressante, certains individus infectés sont capables de contrôler spontanément la réplication virale pendant des durées prolongées sans prise d'ART. Ces patients sont dits « controllers » et se divisent en plusieurs groupes. Je ne parlerai ici que de ceux capables de maintenir une charge virale en dessous de 50 copies ARN viral par mm³ de sang, appelés « elite controllers ». L'observation selon laquelle ces patients ne présentaient pas de réponses anticorps neutralisantes^{319,320} a laissé penser que l'immunité humorale n'était pas impliquée dans le contrôle du virus. Cependant, l'observation selon laquelle ces patients maintiennent une forte fréquence de LB mémoires spécifiques du VIH malgré une virémie faible³²¹ a remis au goût du jour l'étude de l'immunité humorale chez ces individus. De fait, des spécificités relatives aux Tfh sont recherchées chez ces patients.

L'étude des Tfh chez les patients « elite controllers » repose principalement sur l'étude des LT CD4 CXCR5⁺ du sang. A ma connaissance, aucune étude n'a encore associé des critères phénotypiques ou fonctionnels de Tfh de tissus lymphoïdes avec le contrôle viral chez ce type de patients particuliers. En revanche, des études ont été menées sur les LT CD4 CXCR5⁺ du sang relatifs aux Tfh. La capacité d'aide délivrée aux LB (maturation et production d'immunoglobulines) est plus importante avec des LT CD4 CXCR5⁺ issus de patients « elite controllers » en comparaison à celle de LT CD4 CXCR5⁺ issus de patients non traités progressant dans la maladie³²². La fréquence de LT CD4 CXCR5⁺ spécifiques du VIH est plus importante chez des « elite controllers » que chez des patients sous ART. De plus, une induction plus importante d'IgG spécifiques du VIH est obtenue dans un co-culture de LB mémoires avec des LT CD4 CXCR5⁺ de patients « elite controllers » en comparaison avec une co-culture avec ceux de patients sous ART³²³. Comparés à ceux de patients sous ART, les LT CD4 CXCR5⁺ de patients « elite controllers » sont associés à une expression plus faible d'IL-2R et à une expression forte de Bcl6, de CXCR5 et d'IL-21³²⁴.

Si une réponse neutralisante est rarement décrite chez ces patients, deux études récentes s'intéressent à un groupe de patients « elite controllers » capable de générer des réponses

neutralisantes. La réponse neutralisante chez ces patients est associée à une population de LT CD4 CXCR5⁺CXCR3⁺PD-1^{lo}³²⁵ et des populations de DC myéloïdes particulières^{325,326}.

Dans une étude récente, les signatures Th associés aux LT CD4 spécifiques de patients « elite controllers » (<50 copies), « viremic controllers », autres patients particuliers capables de contrôler le virus mais de manière moins importante (entre 50 et 5000 copies) et des patients progressant vers la maladie (>5000 copies) ont été comparées. Les LT CD4 spécifiques des patients « elite controllers » sont associés à un enrichissement de la signature Th22 et Th17. A l'inverse, plus la virémie est importante chez les patients plus la signature associée aux Tfh est enrichie dans LT CD4 spécifiques du VIH³¹¹.

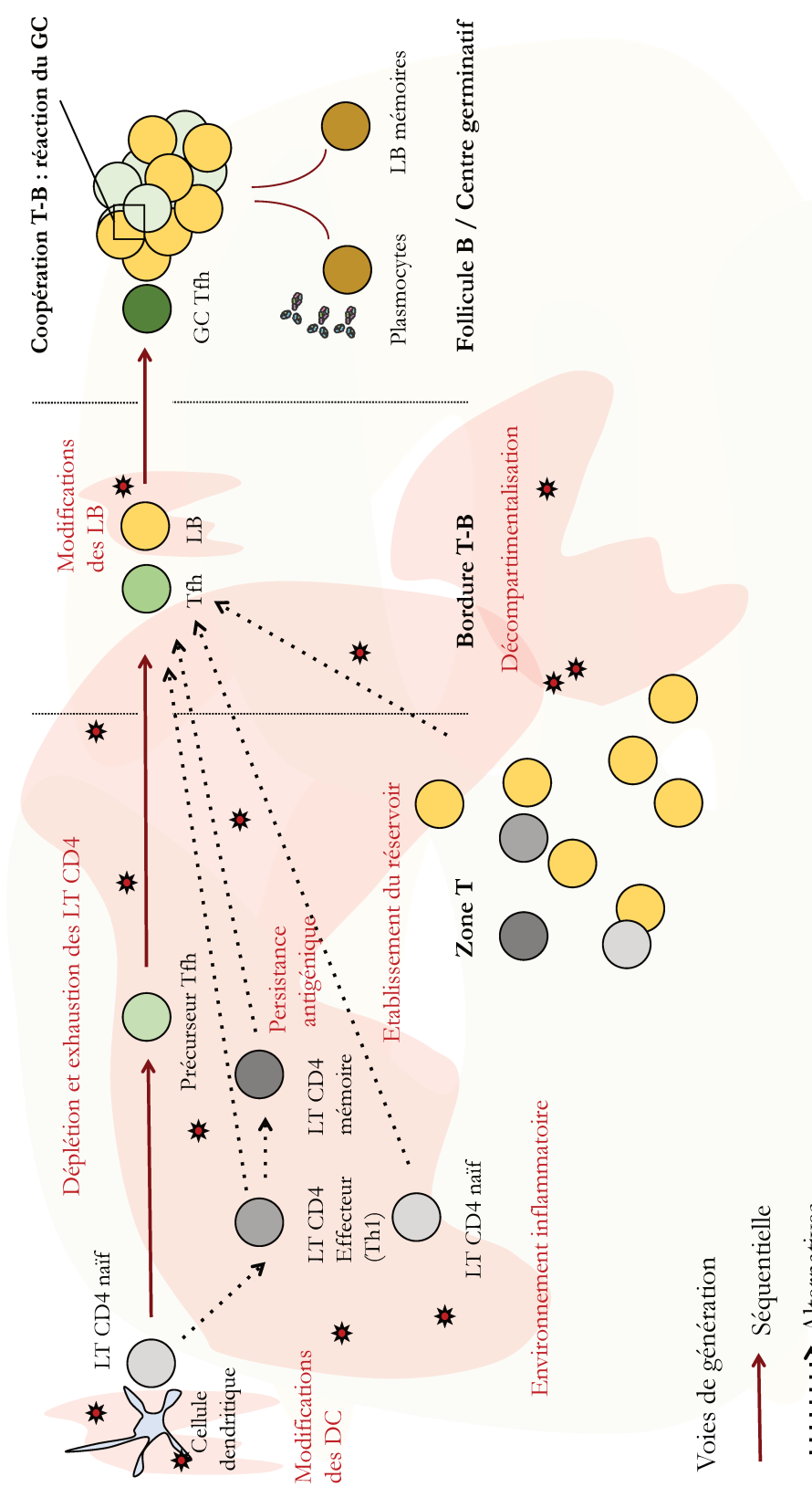
II.5.b Les Tfh chez les « elite neutralizers »

Les anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs) sont un des grands espoirs actuels pour une thérapie contre le VIH, notamment pour le développement d'un vaccin. Ces anticorps se développent chez 20% des individus infectés, avec un délai d'apparition compris entre 2 et 4 ans. Les bNAbs sont des anticorps hypermutés, avec un nombre de mutations somatiques 10 fois plus important que les anticorps produits par les LB dans les réponses vaccinales classiques chez l'Homme. Malheureusement, la présence de bNAbs n'est pas corrélée à une évolution favorable chez les patients les développant. En effet, les bNAbs ne permettent pas la neutralisation des souches autologues mais sont capables de neutraliser 70% d'isolats viraux hétérologues. L'équipe de Michel de Nussenzweig à New York a clairement démontré le potentiel prophylactique et préventif de ces anticorps³²⁷. Une seule injection d'une infusion de bNAbs prévient l'infection chez des primates non humains chez lesquels le virus est inoculé toutes les semaines³²⁸. La découverte de ces bNAbs a prouvé qu'un vaccin préventif contre le VIH est possible et arriver à induire leur génération est l'un des enjeux majeurs de la vaccination. Des spécificités biologiques sont donc recherchées sur les Tfh des patients capables de générer ces anticorps neutralisants. Si ces anticorps sont principalement étudiés pour leur capacité de neutralisation, supprimer la partie Fc de ces bNAbs conduit à une réduction de l'efficacité thérapeutique, laissant penser que des propriétés fonctionnelles autres que la neutralisation peuvent être associées à ces anticorps³²⁹.

Le maintien de l'abondance de LT CD4 CXCR5⁺ et des LB durant la première année d'infection corrèle avec le score de neutralisation des anticorps générés durant la phase chronique de l'infection³³⁰. Par ailleurs, des sous-populations Tfh sont associées à la neutralisation du virus. Par exemple, la fréquence de LT CD4 CXCR5⁺CXCR3⁻ est plus importante dans le sang des individus

génération de bNAbs³³¹. De la même manière, la fréquence de LT CD4 CXCR5⁺PD-1⁺ du sang est corrélée avec la capacité de neutralisation observée chez les patients infectés³³⁰. L'activité des GC, évaluée par la concentration de CXCL13 mesurée dans le sang³³², est plus importante chez les individus infectés qui développent des bNAbs comparée à celle des patients qui n'en développent pas^{330,332}. Des stratégies vaccinales consistant à délivrer de manière continue l'antigène à l'aide de pompes osmotiques sont actuellement envisagées pour la génération de ces anticorps³³³ de façon à maintenir dans la durée l'activation du GC et permettre ainsi de générer un taux de mutations somatiques similaire à celui des bNAbs.

En conclusion de cette deuxième partie, le rôle des Tfh dans l'infection par le VIH est ambivalent. D'une part et chez la majorité des patients, l'accumulation de Tfh dysfonctionnels contribue vraisemblablement aux réponses anormales observées chez les patients. Cependant, les processus sous-jacents à cette accumulation de Tfh dysfonctionnels sont encore peu compris dans le contexte infectieux. Dans ce contexte, où l'environnement lymphoïde est fortement impacté, la considération des différentes voies de générations de Tfh apparaît particulièrement pertinente (**Figure 15**). D'autre part, et chez de rares patients, les Tfh sont un des marqueurs immunologiques d'une réponse efficace contre le virus. Ainsi, mieux comprendre la génération des Tfh en contexte infectieux offrirait de nouvelles perspectives pour le développement d'outils thérapeutiques.



OBJECTIFS

L'introduction a permis de souligner que le développement et la fonction des Tfh s'appuient sur une succession de signaux cellulaires et moléculaires dans les tissus lymphoïdes. Au sein de ce compartiment cellulaire, une hétérogénéité phénotypique est rapportée et les processus biologiques y conduisant demeurent peu connus. Cette hétérogénéité pourrait résulter d'engagements différentiels de LT CD4 naïfs mais également d'une plasticité des LT CD4 mémoires. Notre hypothèse est que les LT CD4 mémoires pourraient contribuer à la génération de Tfh et participer à l'hétérogénéité des réponses Tfh observées en conditions physiologiques et pathologiques. Cette hypothèse apparaît particulièrement pertinente dans des contextes de persistance antigénique où l'environnement lymphoïde est fortement altéré. C'est le cas de l'infection par le VIH où les Tfh, qui présentent des altérations quantitatives et qualitatives, ont un rôle pathogénique.

Le but de ma thèse a été de mieux caractériser les voies de génération des Tfh chez l'Homme dans un environnement lymphoïde soumis ou non à un contexte pathologique d'infection par le VIH.

Mes objectifs ont été :

1. De développer un modèle permettant d'étudier le développement des Tfh chez l'Homme.

Nous avons développé un nouveau modèle de génération de Tfh *in vitro* à partir de cellules spléniques humaines. Cette approche conduit à la génération de Tfh fonctionnels dans un environnement cellulaire et moléculaire lymphoïde conservé.

2. D'étudier le développement des Tfh, en considérant plusieurs voies de génération.

Grâce au modèle mis au point, nous avons pu étudier la dynamique de LT CD4 naïfs et de populations LT CD4 mémoires stimulées et cultivées dans un environnement lymphoïde. Nous avons pu mettre en évidence que les LT CD4 naïfs ou mémoires contribuent à la génération de Tfh. De la contribution de différents sous-types de LT CD4 résulte une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle dans les Tfh générés.

3. D'étudier les voies de génération des Tfh dans un contexte d'infection par le VIH.

Tout d'abord, nous avons étudié l'expression de gènes relatifs au développement et à la fonction des Tfh dans les compartiments LT CD4 naïfs, mémoires et Tfh spléniques de patients chroniquement infectés. Cette analyse a permis de mettre en évidence des altérations dans l'expression génique de gènes relatifs aux Tfh dans tous les sous-types de LT CD4 étudiés. Un gain d'expression des gènes relatifs aux Tfh est observé dans les LT CD4 mémoires, suggérant qu'ils

pourraient s'orienter vers un profil Tfh dans le cadre de l'infection par le VIH. En parallèle, à l'aide du modèle développé, nous avons évalué la contribution des compartiments LT CD4 naïfs et mémoires à la génération de Tfh dans un contexte d'infection par le VIH. Nos résultats suggèrent une contribution différentielle des LT CD4 naïfs et mémoires à la génération de Tfh dans le contexte de l'infection VIH.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Collection de rate et PBMC d'individus sains. Les fragments de tissus spléniques sont issus de donneurs sains (n=14). Le consentement éclairé et les protocoles ont été approuvés par l'agence de Biomédecine. Les échantillons spléniques inclus dans notre étude ont été collectés en suivant les directives éthiques nationales réglementant l'utilisation des tissus humains. Les PBMC (pour peripheral blood mononuclear cells) ont été obtenus de l'Etablissement Français du Sang.

Collection de rates de patients chroniquement infectés. Les rates ont été obtenues à partir de patients nécessitant une splénectomie. Tous les échantillons inclus dans ces travaux ont été collectés en suivant les directives éthiques nationales régulant l'utilisation des tissus humains, décrites précédemment^{334,335}.

Cultures de tissus spléniques. Les fragments ont été obtenus à partir de coupes avec un scalpel et déposés sur une matrice de collagène (Gelfoam, Pfizer) imbibée du milieu RPMI (Thermo Fischer Scientific) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), de la L-Glutamine à 2 mM, de la pénicilline à 2 unités/ml et 1 mg/ml de streptomycine (RPMI complet). Pour l'autre protocole testé, les fragments spléniques ont été coupés à l'aide d'un vibratome (Leica) après enrobage dans du gel gélifiant à faible température (4°C, Sigma Aldrich). Les coupes de 400 µm obtenues ont été déposées dans des inserts organotypiques (PTFE, MERCK Millipore) mis dans un puits de plaque 6 puis contenant 1 ml de RPMI complet. Le maillage de l'insert est en contact avec le milieu et la coupe n'est pas recouverte de milieu (interface Air-liquide). Les cultures ont ensuite été mises pendant plusieurs jours à 37°C avec 5% de CO₂.

Polarisation des LT CD4 en T_{fh} par les DC. Avant chaque manipulation, les échantillons (PBMC ou splénocytes) ont été lavés deux fois en RPMI complet après décongélation. Les cellules ont ensuite été resuspendues pendant 2 heures minimum dans du RPMI complet à 37°C contenant de la DNase (10 ng / ml, Sigma Aldrich). Les moDC (PBMC et rate) ont été obtenues après tri positif des monocytes avec des billes CD14 (BD, bioscience) puis différenciation pendant 4 jours en GM-CSF (20 ng / ml) et IL-4 (2 ng / ml) (Premium Grade, Miltenyi). Pour l'obtention de cDC2 (BDCA-1⁺) (rate), un enrichissement en DC a été réalisé (Pan-DC enrichment Kit, human) puis les cDC2 ont été triées via leur expression de BDCA1 par BD FACSAria II (BD, Bioscience). 20 000 LT CD4 naïfs autologues ont été co-cultivés avec 5000 DC (PBMC ou rate) (ratio 4 : 1) pendant 3, 4, 5 et 6 jours dans du RPMI complet contenant du CytoStim (Miltenyi) et des cytokines

polarisantes : IL-7 (4 ng/ml) , Il-12 (5 ng/ml) et Activine A (100 ng/ml) (Miltenyi, Premium Grade).

Co-culture de LT et LB. Les différents sous-types LT CD4 *ex vivo* (naïfs, mémoires ou Tfh) ont été obtenus après 3 jours de culture (Tfh ou CXCR5⁺PD-1⁺) ont été triés par BD FACSAria II (pureté supérieur à 95%) et cultivés avec des LB naïfs (CD19⁺CD27⁻IgD⁺) ou LB mémoires (CD19⁺CD27⁺IgD⁻) autologues pendant 7 jours dans du milieu conditionné (1/2 de milieu issu de la culture de splénocytes à 3 jours et 1/2 de RPMI complet) avec du CytoStim (Miltenyi). A 7 jours de culture, la maturation des LB en plasmocytes a été évalué par l'expression de CD38 et CD27. Les immunoglobulines ont été mesurées à l'aide du antibody Isotyping 7-Plex Human ProcartaPlex™ Panel (ThermoFischer).

Culture de splénocytes. Avant chaque manipulation, les splénocytes ont été lavés deux fois en RPMI complet après décongélation. Les cellules ont ensuite été resuspendues pendant 2 heures minimum dans du RPMI complet à 37°C contenant de la DNase (10 ng / ml, Sigma Aldrich). Les splénocytes ont ensuite été lavés et stimulés pour 3 heures avec du CytoStim (Miltenyi) dans du RPMI complet à 37°C. Après centrifugation, les splénocytes sont resuspendus dans du milieu polarisant consistant en du RPMI complet supplémenté en Activine A (100 ng/ml), IL-12 (5 ng/ml) et IL-7 (4 ng/ml) (Miltenyi, Premium Grade). Les splénocytes ont ensuite été cultivés pour 3 à 10 jours dans des plaques de cultures 24 puits (Dorland) à la concentration de 2 millions de splénocytes/1 ml /1 puit. Pour les expériences de suivi des différents sous-types de LT CD4, ceux-ci triés par BD FACSAria II (BD Bioscience). Les LT CD4 ont ensuite été marqués avec du Cell Trace Violet (CTV) (Thermo Fischer Scientific) pendant 20 minutes à 37°C et remis dans la fraction négative du tri conservé. Ensuite le même protocole de culture a été appliqué.

Cytométrie de flux et tri cellulaire. La viabilité cellulaire a été évaluée de manière systématique dans les marquages réalisés dans ces travaux. Pour discriminer les cellules vivantes des cellules mortes, les cellules ont été marquées en PBS 1X avec du Viobility à température ambiante (Miltenyi). Après 2 lavages en PBS 1X, les marquages membranaires pour les récepteurs aux chimiokines ont été réalisés en PBS 1X 5% SVF à 4°C pendant 10 minutes. Après 1 lavage en PBS 1X 5% SVF, les cellules ont été mises pendant 20 minutes avec le mix des anticorps membranaires. Pour le marquage intracellulaire des facteurs de transcription, les cellules ont été perméabilisées et fixées avec le Foxp3 Fixation/Permeabilization kit (BD Bioscience) selon les instructions du

fournisseur. Pour le marquage intracellulaire des cytokines, les cellules ont été stimulées pour 6 heures à 37°C avec de la phorbo 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma Aldrich 1µg/ml), avec ajout de brefeldine A après 1 heure d'incubation (BFA, Sigma Aldrich, 5 µg/ml). Après marquage membranaire les cellules ont été fixées avec le Cytofix/Cytoperm kit (BD Bioscience). Les cellules ont été analysées avec un LSR Fortessa Cell Analyzer (BD Bioscience) ou un CytoFLEX (Beckman Coulter). Pour les tris, un BD FACSAria II (BD Bioscience) a été utilisé.

Cytométrie de masse. Tous les anticorps utilisés pour la cytométrie de masse, dont certains couplés manuellement à l'aide des Maxpar X8 Antibody Labeling Kit (Fluidigm) sont listés dans la Table 2. Pour chaque marquage, 3 millions de cellules ont été utilisées. La viabilité cellulaire a été évaluée avec du Ciplatin Cell-IDTM (Fluidigm) en RPMI 1640 pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées avec du RPMI. Afin d'éviter un marquage aspécifique, une saturation des récepteurs aux fractions Fc des anticorps a été réalisée par incubation des cellules avec du Fc Block (Miltenyi) pendant 15 minutes à température ambiante. Après lavage en PBS 1X 5% SVF, les anticorps dirigés contre les récepteurs aux chimiokines (CXCR5, CXCR3, CXCR4, CCR5, CCR6, CCR7) ont été mis sur les cellules (en PBS 1X 5% SVF) avant ajout des anticorps dirigés contre des marqueurs membranaires (CD45, CD56, CD19, CD11b, CD8, CD4, CD45RA, CD62L, CD45RO, Tim-3, PD-1, CD25, Fas, HLADR, ICOS, Ox40, CD28, BTLA, CD57, CD127, CD27, IL-1R1, IL-1R2) et incubation pendant 30 minutes supplémentaires. Après le marquage membranaire et lavage en PBS 1X 5% SVF, les cellules ont été fixées dans du PBS 1X contenant 2% de paraformaldéhyde (PFA) (à partir d'ampoule 16%, Thermo Scientific) pendant 15 minutes. Après lavage en PBS 1X 5% SVF et élimination du surnageant, les cellules ont été resuspendues dans le volume résiduel et mises sur glace pendant 10 minutes. Un ml de méthanol (Sigma Aldrich) préalablement refroidi à 20°C a ensuite été mis sur les cellules, incubées 10 minutes sur glace. Après lavage en PBS 1X 5% SVF, les anticorps dirigés contre les marqueurs intracellulaires (Foxp3, SH2D1a/SAP, CD40L, Ki67, CTLA4) sont mis sur les cellules pendant 60 minutes à température ambiante. Après 2 lavages en PBS 1X 5% SVF, l'ADN cellulaire a été marqué à l'aide de Cell-ID-Intercalator-Ir-125 µM (Fluidigm) dilué au 4000ème dans du PBS 1X 2% PFA à 4°C pendant 24 heures. Les échantillons ont ensuite été congelés à -80°C et décongelés à température ambiante avant acquisition, lavés 3 fois dans du PBS 1X et dans de l'eau puis dilués avec des billes Element EQ (Fluidigm) avant passage sur Helios (Fluidigm, plateforme de Cytométrie de la Pitié-Salpêtrière). Les profils phénotypiques ont été représentés en utilisant l'algorithme UMAP³³⁶.

Label	Target	Clone	Providers
89Y	CD45	HI30	Fluidigm
141Pr	CD196 (CCR6)	11A9	Fluidigm
142Nd	CD19	HIB19	Fluidigm
143Nd	CD45RA	HI100	Fluidigm
144Nd	CD38	HIT2	Fluidigm
145Nd	CD4	RPA-T4	Fluidigm
146Nd	CD8a	RPA-T8	Fluidigm
147Sm	CD195 (CCR5)	REA245 (IgG1)	Miltenyi
148Nd	CD197 (CCR7)	REA546	Fluidigm
149Sm	CD25 (IL-2R)	2A3	Fluidigm
150Nd	CD272 (BTLA)	Polyclonal (IgG)	RnD system
151Eu	CD278/ICOS	C398.4A	Fluidigm
152Sm	CD95/Fas	DX2	Fluidigm
153Er	Tim-3	F38- 2E2	Fluidigm
154Sm	IL1R1	Polyclonal (IgG)	RnD system
155Gd	CD279 (PD-1)	EH12.2H7	Fluidigm
156Gd	CD183 (CXCR3)	G025H7	Fluidigm
158Gd	CD134 (OX40)	ACT35	Fluidigm
159Tb	FoxP3	259D/C7	Fluidigm
160Gd	CD28	CD28.2	Fluidigm
161Dy	IL6Ralpha	REA291	Miltenyi
162Dy	CD27	L128	Fluidigm
163Dy	CD57	HCD57	Fluidigm
164Dy	CD45RO	UCHL1	Fluidigm
165Ho	CD127 (IL-7Ra)	A019D5	Fluidigm
166Er	IL1R2	34141	RnDsystems
167Er	SH2D1a	782702	RnDsystems
168Er	CD154 (CD40L)	24-31	Fluidigm
170Er	CD152 (CTLA-4)	14D3	Fluidigm
171Yb	CD185 (CXCR5)	RF8B2	Fluidigm
172Yb	Ki-67	B56	Fluidigm
173Yb	HLA-DR	L243	Fluidigm
174Yb	CD56 (NCAM)	REA196 (IgG1)	Miltenyi
175Lu	CD184 (CXCR4)	12G5	Fluidigm
176Yb	CD62L (L-selectin)	REA615	Miltenyi
209Bi	CD11b (Mac-1)	ICRF44	Fluidigm

Déjà couplé par le fournisseur.

Couplé manuellement.

Étude transcriptomique : Séquençage ARN haut débit. L'ARN total a été isolé à l'aide du RNeasy Mini Kit (Qiagen). L'intégrité de l'ARN a été évaluée par le système TapeStation (Agilent) et tous les RINe obtenus des échantillons analysés sont supérieurs à 8. Les ARN ont été séquencés par Illumina Novaseq (Illumina, 80 millions de reads d'une longueur de 100 paires de bases par échantillon). Les fragments séquencés ont été découpés pour évaluer la qualité avec Cutadapt³³⁷ et alignés en utilisant Salmon³³⁸ sur la référence Ensembl pour le transcriptome humain (version GRCh38). L'expression des gènes a été analysé grâce à DESeq2³³⁹. L'enrichissement fonctionnel a été réalisé en utilisant EnrichR³⁴⁰.

Étude transcriptomique : Séquençage en cellules uniques à partir d'échantillons de patients infectés chroniquement infectés par le VIH. Les splénocytes de patients chroniquement infectés par le VIH non traités ont été triés à l'aide d'un FACSARIA II et 100 cellules de chaque population (LT CD4 naïfs, mémoires, non GC et GC Tfh) ont été collectées. Le même protocole que réalisé dans le précédent article du laboratoire a été réalisé²³³, en utilisant PCR en temps réel développée par Fluidigm.

Production virale de VIH. La souche virale VIH_{YU2b} répliquative à tropisme CCR5 a été générée comme précédemment décrit³⁴¹ à partir d'une transfection de 293T à l'aide du Calcium Phosphate Transfection kit (Sigma Aldrich). Les 293T ont été transfectées dans des flasques T75 (Sigma Aldrich) lorsque la confluence était de l'ordre de 60%. Les 293T ont été ensuite cultivées dans du DMEM (Thermo Fischer Scientific) 10% SVF, de la L-Glutamine à 2 mM, de la pénicilline à 2 unités/ml et 1 mg/ml de streptomycine. Les surnageants de culture ont été récupérés 3 fois toutes les 12 heures à compter de la transfection. Après centrifugation pour élimination des débris cellulaires ceux-ci ont été congelés à - 80°C.

Infection par le VIH. Les splénocytes ont été exposés à la souche de laboratoire VIH_{YU2b} (de 150 ng à 700 ng/ml) à 37°C pendant 3 heures après stimulation au CytoStim. Les infections ont été réalisées en présence de 4 µg/ml diéthylaminométhyle (DEAE) – dextran (Sigma Aldrich). Ensuite, les splénocytes ont été lavés 2 fois en RPMI complet avant d'être cultivés en milieu polarisant comme précédemment.

RÉSULTATS

I. Axe I : Mise au point d'un modèle d'étude pour la génération des Tfh

Un des enjeux majeurs de ma thèse a été de développer des outils qui permettraient de mieux apprécier les processus impliqués dans la génération des Tfh chez l'Homme. Classiquement, l'étude cinétique des réponses Tfh humaines se fait grâce à l'étude quantitative et qualitative des LT CD4 CXCR5⁺ du sang du fait de la faible accessibilité aux Tfh dans les OLS. L'autre alternative est l'étude des réponses Tfh dans les tissus lymphoïdes de modèles animaux mais la prédiction de la physiologie, de la pathologie ou des réponses thérapeutiques chez ces modèles reste limitée, car des différences avec l'immunité de l'Homme existent. De fait, la compréhension des signaux modulant la génération des Tfh humains s'appuie majoritairement sur des modèles de co-cultures à partir de cellules isolées du sang, notamment les LT CD4 naïfs. Pour l'étude de la génération des Tfh, nous avons testé différentes stratégies qu'il m'apparaît pertinent d'exposer brièvement afin de mieux comprendre la démarche expérimentale qui a été la nôtre.

I.1 Approches envisagées

I.1.a Approche conservant l'intégrité de l'organe : Organoculture

Comme souligné dans l'introduction de ces travaux, le développement des Tfh est étroitement contrôlé dans l'espace et le temps. L'idée de mettre au point un modèle permettant une conservation du micro-environnement tissulaire est donc particulièrement séduisante. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur deux types de protocoles de culture d'organes.

Le premier modèle s'inspire de travaux sur des cultures de fragments thymiques. La culture du thymus était initialement utilisée pour la transplantation dans le cadre de réponses LT dysfonctionnelles, comme dans le syndrome de DiGeorge où une hypoplasie du thymus est constatée^{342,343}. Plus tardivement, les coupes de thymus ont représenté un outil robuste pour l'étude du développement des LT³⁴⁴⁻³⁴⁸, notamment les sélections positives et négatives. En plus de maintenir l'intégrité architecturale de l'organe, cette stratégie offre l'avantage de pouvoir suivre la migration des LT CD4 dans différentes régions thymiques³⁴⁵. Nous avons souhaité transposer cette approche à du tissu lymphoïde avec l'objectif de suivre la dynamique des LT CD4 dans l'environnement lymphoïde (**Fig. 1 A**). Après enrobage de fragments spléniques humains dans un gel d'agarose gélifiant à faible température, des coupes de tissus spléniques de 400 µm ont été obtenues (**Fig. 1 B**). La consistance particulière de la rate rend difficile sa coupe et un enrobage

dans du gel est indispensable pour éviter son écrasement. Les coupes de tissu splénique ont ensuite été déposées sur des inserts organotypiques qui offrent un support optimal pour le tissu, favorisant son adhérence et les échanges à une interface air-liquide. Malgré l'obtention de coupes, une baisse rapide de la viabilité cellulaire a été observée durant la culture (**Fig. 1 C**). Afin de contourner les difficultés relatives aux études histologiques, nous avons considéré le maintien de l'expression de CXCR5 sur les LB dans le temps comme garant d'une conservation des axes chimiokiniques de l'organe, et donc de l'intégrité des zones immunitaires T et B. L'expression de CXCR5 est perdue sur les splénocytes dès le premier jour de culture (**Fig. 1 C**), suggérant que l'architecture de l'organe n'est pas conservée. Du fait des résultats obtenus, cette approche n'a pas été retenue pour répondre à ma problématique de thèse.

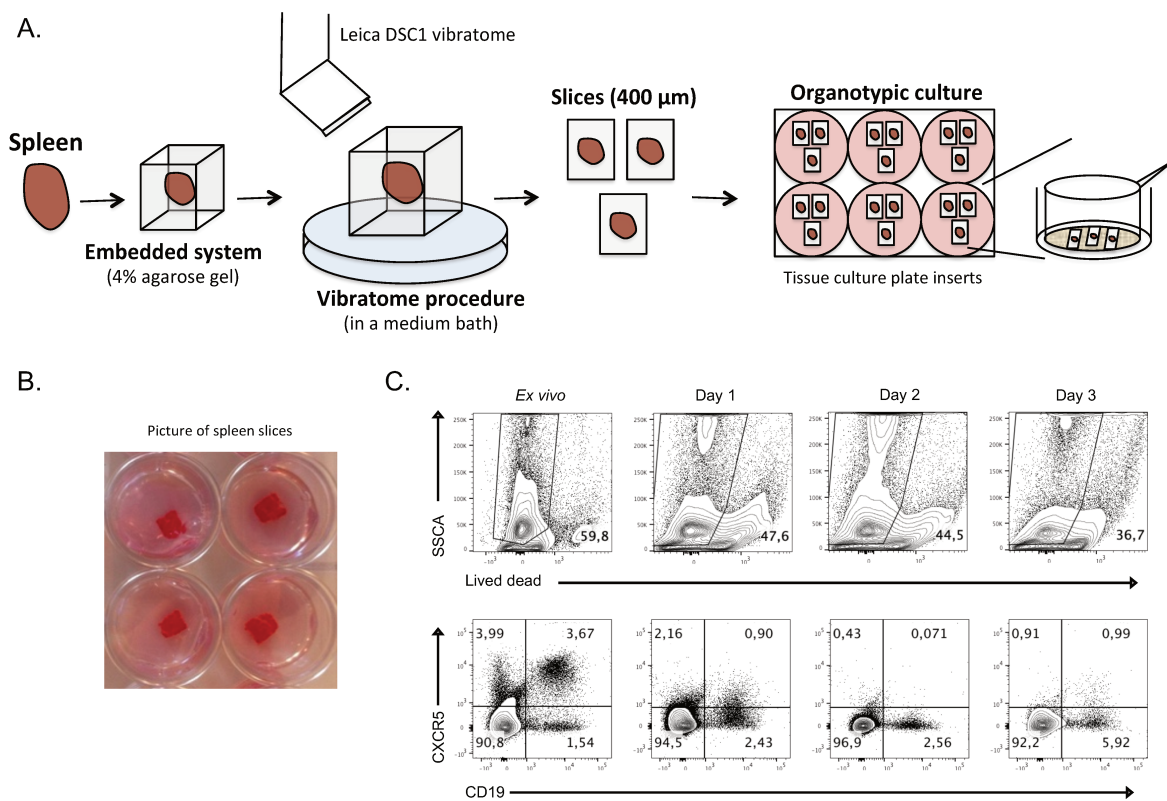


Figure 1 : Culture de tissu splénique adapté d'études sur le thymus (A) Les fragments spléniques ont été enrobés dans un gel d'agarose gélifiant à basse température. Le fragment enrobé est mis dans un bain de PBS et les coupes sont effectuées (400 µm) à l'aide d'un vibratome. Les coupes de tissus spléniques sont ensuite déposées sur des inserts organotypiques et cultivées pendant plusieurs jours. **(B)** Exemple de coupes obtenues à partir de rates humaines. **(C)** Analyse par cytométrie de la viabilité et de l'expression de CXCR5 et de CD19 à différents temps de culture. Représentatif de 3 expériences indépendantes.

La deuxième stratégie de culture d'organe envisagée s'appuie sur des protocoles de culture d'organe sur tissus lymphoïdes (amygdales, adénoïdes, tissu rectosigmoïde et cervicovaginal) dans l'infection par le VIH³⁴⁹⁻³⁵¹, maintenus durant plusieurs semaines. Ce protocole a fait l'objet d'une publication dans *Nature Protocol* en 2009³⁵² et consiste à maintenir des blocs d'organes à une interface air liquide sur une matrice de collagène imbibée de milieu complet (**Fig. 2 A**). Ce type de matrice est insoluble dans le milieu, possède des propriétés hémostatiques et présente l'avantage de ne pas induire de réactions tissulaires. Enfin, ce type de protocole permet une infection par le VIH des tissus lymphoïdes *in vitro*³⁴⁹⁻³⁵², avantage non négligeable pour répondre au 3^{ème} axe de ma thèse. Du fait d'un maintien des tissus lymphoïdes sur plusieurs semaines avec ce type de protocole, nous avons dans un premier temps évalué la viabilité des splénocytes à 1 semaine. Après 7 jours de culture de tissu splénique selon ce protocole, la viabilité cellulaire est fortement réduite, avec 20% de viabilité cellulaire en comparaison aux 80% observés pour les splénocytes *ex-vivo* (**Fig. 2 B**). De même qu'avec le premier protocole testé, l'expression de CXCR5 sur les LB est perdue (**Fig. 2 B**), indiquant vraisemblablement d'une perte de l'intégrité du tissu. Cette approche n'a donc pas été retenue.

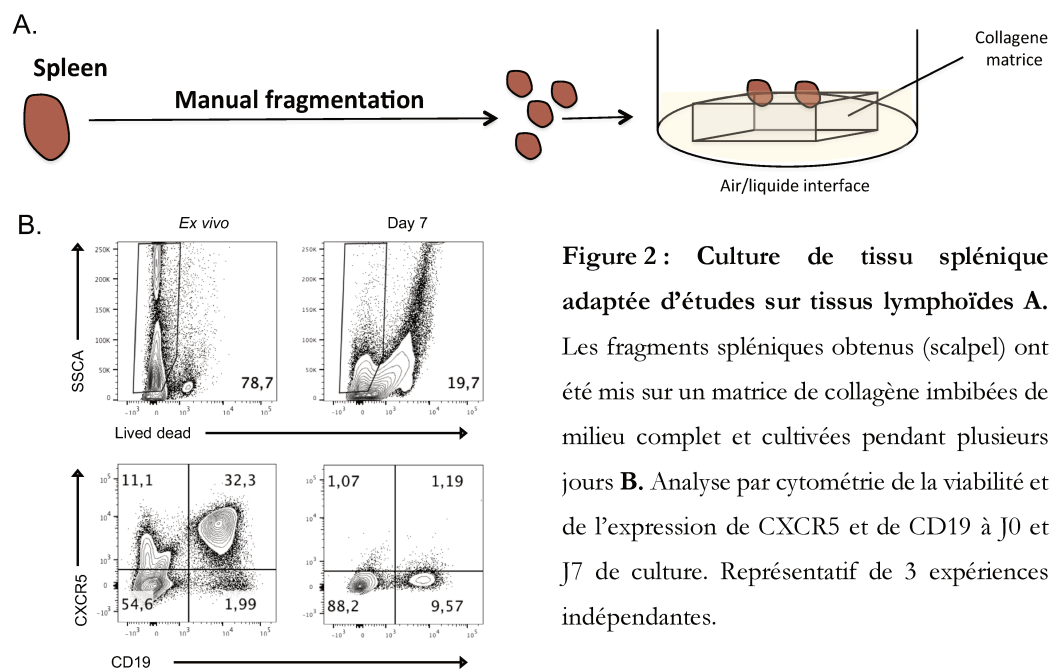


Figure 2 : Culture de tissu splénique adaptée d'études sur tissus lymphoïdes A.

Les fragments spléniques obtenus (scalpel) ont été mis sur un matrice de collagène imbibées de milieu complet et cultivées pendant plusieurs jours **B**. Analyse par cytométrie de la viabilité et de l'expression de CXCR5 et de CD19 à J0 et J7 de culture. Représentatif de 3 expériences indépendantes.

Le champ de recherche sur la culture d'organe est un domaine en pleine expansion et plusieurs articles s'appuyant sur des approches similaires à celles décrites ici sont parus durant les années de ma thèse. Une discussion de ces travaux sera faite par la suite.

Nous avons également considéré des approches avec des modèles d'études plus réductionnistes comme les co-cultures. Si ces approches présentent l'inconvénient de ne pas intégrer tous les

facteurs impliqués dans la génération des Tfh, elles offrent l'avantage d'être plus faciles à mettre en œuvre et d'un meilleur contrôle de paramètres biologiques.

I.1.b Approche récapitulant la voie de génération séquentielle de Tfh : Co-cultures

La génération des Tfh dite séquentielle à partir de LT CD4 repose principalement sur l'interaction avec la DC et l'interaction avec le LB. Nous avons considéré une approche qui repose sur ces deux interactions séquentiellement, avec l'initiation de la mise en place du phénotype Tfh par la DC puis le dialogue entre le Tfh et le LB.

I.1.b.i Co-culture pour l'induction d'un profil Tfh : DC – LT naïfs

Pour la mise au point d'un modèle de co-culture récapitulant le dialogue du LT CD4 avec la DC, nous nous sommes inspirés du protocole de l'équipe de Shane Crotty, paru en 2016 qui désigne l'activine A (ActA) comme un facteur majeur de la polarisation des réponses LT CD4 vers un profil Tfh chez l'Homme¹¹³. Dans cette étude, des LT CD4 naïfs sont stimulés avec des billes CD3/CD28 et cultivés dans un milieu contenant de l'IL-7, l'IL-12 et de l'activine A. Afin d'intégrer les signaux relatifs à la DC dans ce système, nous avons testé le même protocole en remplaçant le signal des billes CD3/CD28 par de moDC obtenues grâce à une isolation et différenciation des monocytes du sang (CD14⁺). Après co-culture avec des LT CD4 naïfs pendant 4 jours en présence d'une molécule similaire à un superantigène (CytoStim) (**Fig. 3 A**), nous avons observé un effet potentialisant de la combinaison IL-12/ActA sur la génération de Tfh à partir de LT naïfs, puisque pour tous 4 donneurs testés, la fréquence de Tfh est plus importante avec ces deux cytokines (**Fig. 3 B**). De la même façon, l'ajout de ces deux cytokines conduit à une expression d'ICOS plus intense (**Fig. 3 C**), indiquant une probable potentialisation de la fonctionnalité des Tfh.

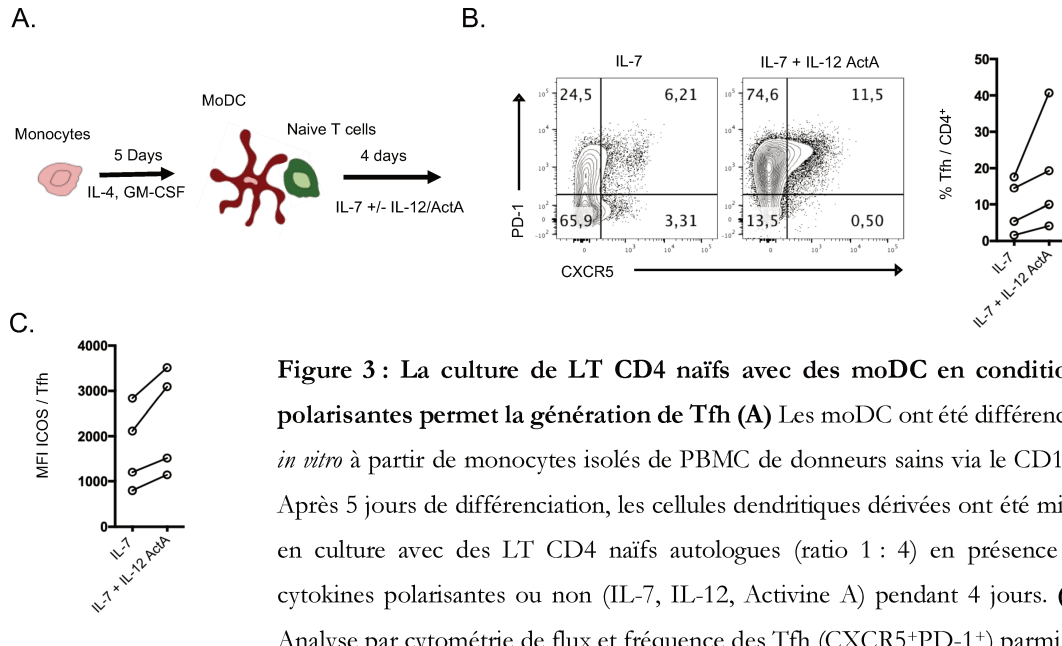


Figure 3 : La culture de LT CD4 naïfs avec des moDC en conditions polarisantes permet la génération de Tfh (A) Les moDC ont été différenciés *in vitro* à partir de monocytes isolés de PBMC de donneurs sains via le CD14⁺. Après 5 jours de différenciation, les cellules dendritiques dérivées ont été mises en culture avec des LT CD4 naïfs autologues (ratio 1 : 4) en présence de cytokines polarisantes ou non (IL-7, IL-12, Activine A) pendant 4 jours. **(B)** Analyse par cytométrie de flux et fréquence des Tfh (CXCR5⁺PD-1⁺) parmi les LT CD4 **(C)** Intensité d'expression d'ICOS par les Tfh générés dans les conditions de cultures décrites en A.

Afin de mieux mimer les processus biologiques conduisant à la génération de Tfh au sein des tissus lymphoïdes, nous avons ensuite comparé la capacité de DC primaires à induire des Tfh en comparaison à des moDC. Les DC primaires que nous avons sélectionnées sont les DC exprimant le BDCA-1 (cDC2), considérées comme inductrices des réponses Tfh au sein des tissus lymphoïdes¹¹⁵. Alors que leur fréquence est presque nulle dans le sang, elles représentent 29% à 70% des DC totales sur les échantillons spléniques que nous avons analysés (données non montrées). Les cDC2 expriment plus fortement le CMHII et des molécules de co-stimulation telles que le CD80 ou le CD40 (données non montrées), nous confortant dans le choix de ce type de DC pour la génération de Tfh. Sur deux donneurs testés, la proportion de Tfh générés à partir de LT CD4 naïfs est plus importante avec les cDC2 en comparaison aux co-cultures réalisées avec des moDC différenciées issues du même donneur (**Fig. 4**). Ces résultats indiquent que la capacité d'initiation des réponses Tfh est plus importante avec des cellules primaires, ce qui renforce le choix de leur utilisation pour la génération de Tfh.

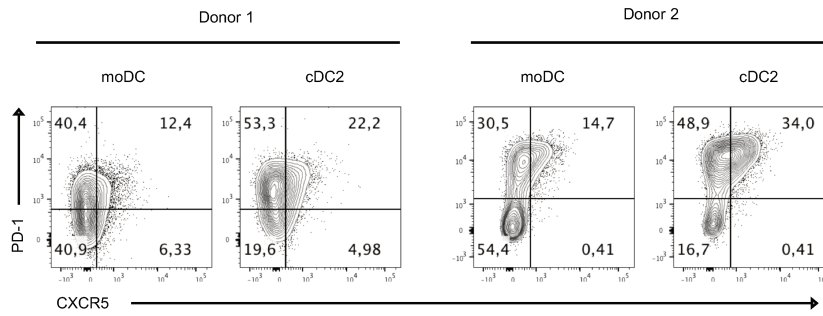


Figure 4 : Les DC primaires cDC2 conduisent à une génération de Tfh plus importante que les moDC. A partir de tissu splénique de deux donneurs, des moDC ont été générées et des cDC2 ont été isolées sur la base de leur positivité pour le BDCA1. Les deux types de DC ont été mises en co-culture avec des LT CD4 naïfs autologues et la génération de Tfh a été évaluée via l'expression de CXCR5 et PD-1 après 4 jours de co-cultures en présence d'IL-7, IL-12 et d'activine A.

Une fois les bases d'un modèle d'étude de l'interaction LT-DC posées, nous avons par la suite développé un modèle de co-culture avec le LB, visant à mimer leur coopération avec les Tfh.

I.1.b.ii Co-culture pour l'évaluation de la fonctionnalité des Tfh : LT - LB

Afin de valider un système qui permette d'évaluer la fonction d'aide délivrée aux LB par les Tfh, nous avons réalisé des co-cultures de différents sous-types LT CD4 avec des LB naïfs (CD19⁺CD27⁺IgD⁺) et mémoires (CD19⁺CD27⁺IgD⁻). La capacité à induire la génération de plasmocytes CD38^{hi}CD27^{hi} a été testée pour les LT CD4 *ex-vivo* naïfs (CD4⁺CD45RA⁺), mémoires non Tfh (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺PD-1⁻) et Tfh (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺PD-1⁺) (**Fig. 5 A**). Seuls les résultats obtenus avec les LB mémoires sont montrés car leur capacité à générer des plasmocytes CD38^{hi}CD27^{hi} est plus importante que celle de LB naïfs (données non montrées). Après 7 jours de culture, la fréquence de plasmocytes obtenus lorsque les LB sont co-cultivés avec les Tfh (50,3% ± 26) et les mémoires non-Tfh (47,8% ± 22,4) est significativement plus importante qu'avec les LT CD4 naïfs (28,1% ± 25) (**Fig. 5 B**). De manière cohérente, la concentration d'Ig retrouvée dans le surnageant est significativement plus importante pour les co-cultures réalisées avec des Tfh en comparaison à celles réalisées avec des LT CD4 naïfs, et ce quel que soit le type d'Ig mesuré (**Fig. 5 D**). En revanche, une tendance à une plus forte production d'Ig est obtenue avec les Tfh en comparaison aux LT CD4 mémoires non-Tfh, plus marquée pour les IgG et les IgE (**Fig. 5 D**). Ce modèle de co-culture LT-LB apparaît robuste pour l'étude de la fonction d'aide délivrée aux LB par les LT CD4.

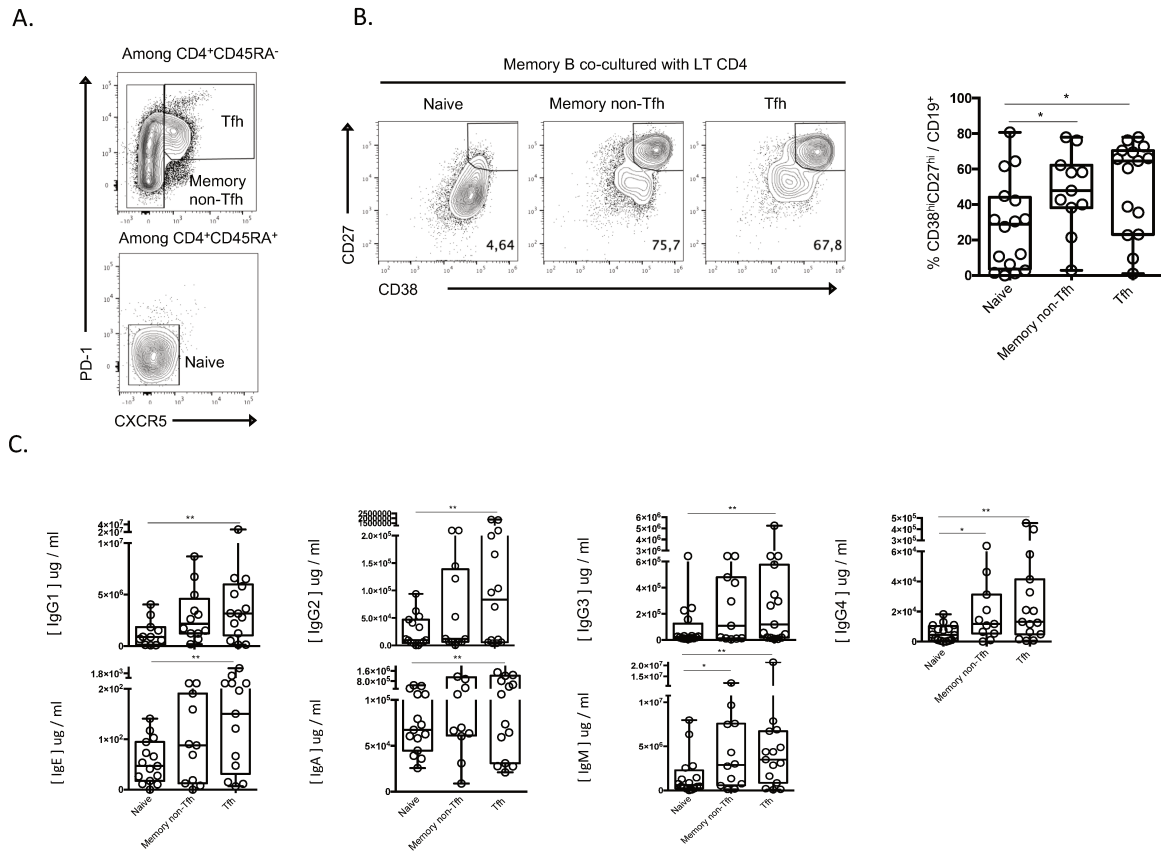


Figure 5 : La co-culture avec des LB mémoires permet d'étudier la fonctionnalité des LT CD4 (A) A partir de tissu splénique, les LT CD4 naïfs (CD4⁺CD45RA⁺), les mémoires non-Tfh (CD4⁺ CD45RA⁻CXCR5⁻) et les Tfh (CD4⁺ CD45RA⁻CXCR5⁺PD-1⁺) ont été isolés par cytométrie de flux comme présenté. **(B)** Après 7 jours de co-cultures avec les sous-types LT CD4 définis en A, l'expression de CD27 et CD38 par les LB mémoires (CD27⁺IgD⁺) a été évaluée par cytométrie de flux. Les fréquences de cellules CD38^{hi}CD27^{hi} (plasmocytes) parmi les LB sont montrées. **(C)** Concentration des différentes Ig mesurées dans les surnageants des co-cultures de LB mémoires avec les LT CD4 définis en A après 7 jours. Test statistique de Wilcoxon, *p<0,05, **p<0,005, ***p <0,001.

I.1.c Approche conservant l'environnement lymphoïde : Culture de splénocytes

Le troisième système testé pour l'étude du développement et la fonction des Tfh repose sur une culture de splénocytes totaux. Les Tfh étant des cellules résidentes des tissus lymphoïdes, nous avons émis l'hypothèse que la stimulation de splénocytes totaux pourrait favoriser la génération de Tfh. Les splénocytes ont été stimulés à l'aide de CytoStim et cultivés en présence d'IL-7, d'IL-12 et d'activine A (**Fig. 6 A**), dont le potentiel dans l'induction d'un profil Tfh est montré par la littérature et nos résultats de co-cultures (**Fig. 3 A**). Après 3 jours de culture, la proportion de Tfh parmi les LT CD4 spléniques est doublée (51,5% ± 8,6 vs 26,2% ± 8,4), de manière reproductible

chez tous les donneurs testés (n =14) (**Fig. 6 B et C**). Ces résultats suggèrent que la stimulation et culture de splénocytes permet une génération importante de Tfh.

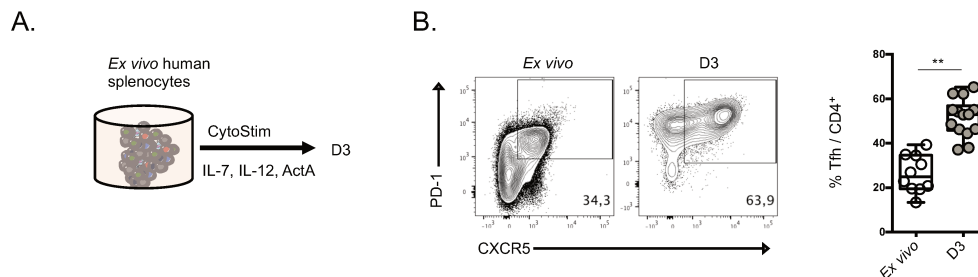


Figure 6 : La culture de splénocytes conduit à la génération de Tfh (A) Les splénocytes ont été stimulés avec du CytoStim et cultivés pendant 3 jours en présence d'IL-7, d'IL-12 et d'Activine A **(B)** Analyse par cytométrie de flux et fréquence des Tfh parmi les LT CD4 dans des splénocytes *ex-vivo* (gauche) et après 3 jours de culture (droite). Chaque point représente un donneur indépendant, n = 14. Test statistique de Wilcoxon, *p<0,05, **p<0,01.

Les 3 approches (organoculture, co-culture et culture de splénocytes) décrites ont été testées parallèlement en début de thèse. Une seule de ces approches a été sélectionnée pour répondre à ma problématique de thèse. Notre choix s'est porté sur la culture de splénocytes. La culture de splénocytes (i) présente un très fort rendement en Tfh avec (ii) une conservation des acteurs cellulaires et moléculaires présents dans les tissus lymphoïdes. Ce protocole est (iii) plus simple à réaliser expérimentalement et est moins consommateur en splénocytes. Pour finir, la culture de splénocytes présente (iv) l'avantage d'une approche moins biaisée quant à l'implication des acteurs cellulaires et moléculaires pour la génération des Tfh, puisque ceux-ci ne sont pas pré-sélectionnés comme dans le cadre d'une co-culture.

I.2 Approche sélectionnée : Génération d'une réponse Tfh par culture de splénocytes

I.2.a La génération de Tfh est transitoire

Le modèle de génération de Tfh à partir de splénocytes totaux étant inédit, il m'a fallu mieux le caractériser.

Afin d'évaluer la dynamique de génération de Tfh après stimulation et culture de splénocytes, nous avons suivi par cytométrie de flux l'expression de CXCR5 et de PD-1 par les LT CD4 dans le temps. La fréquence maximale de Tfh obtenue est maximale à 3 jours (51,51% ± 8,6), puis baisse significativement dans le temps à 5 jours (23% ± 15,3) et 10 jours (9,8% ± 4,6) (**Fig. 7 A**). L'analyse

de la sécrétion d'IL-21 parmi les Tfh révèle que le pic de fonctionnalité est concomitant au pic d'abondance. Alors que la sécrétion d'IL-21 est quasi nulle par les Tfh *ex-vivo*, le pourcentage de cellules sécrétrices d'IL-21 est plus important parmi les Tfh à 3 jours qu'à 5 jours (**Fig. 7 B**). L'analyse d'ICOS, autre marqueur caractéristique des Tfh, montre que si la fréquence de cellules ICOS⁺ est plus importante après stimulation en comparaison aux Tfh *ex-vivo* (64,74% ± 18,6 vs 33,4% ± 20,9), celle-ci reste stable dans le temps et est comparable entre 3 jours et 5 jours de culture (**Fig. 7 C**). L'ensemble de ces résultats suggère que la stimulation et la culture de splénocytes conduit à la génération de Tfh adoptant un phénotype fonctionnel après 3 jours de culture. Afin de simplifier la lecture pour la suite, les Tfh *ex-vivo* ou obtenus après 3 jours de culture seront respectivement nommés Tfh^{*ex-vivo*} et Tfh³.

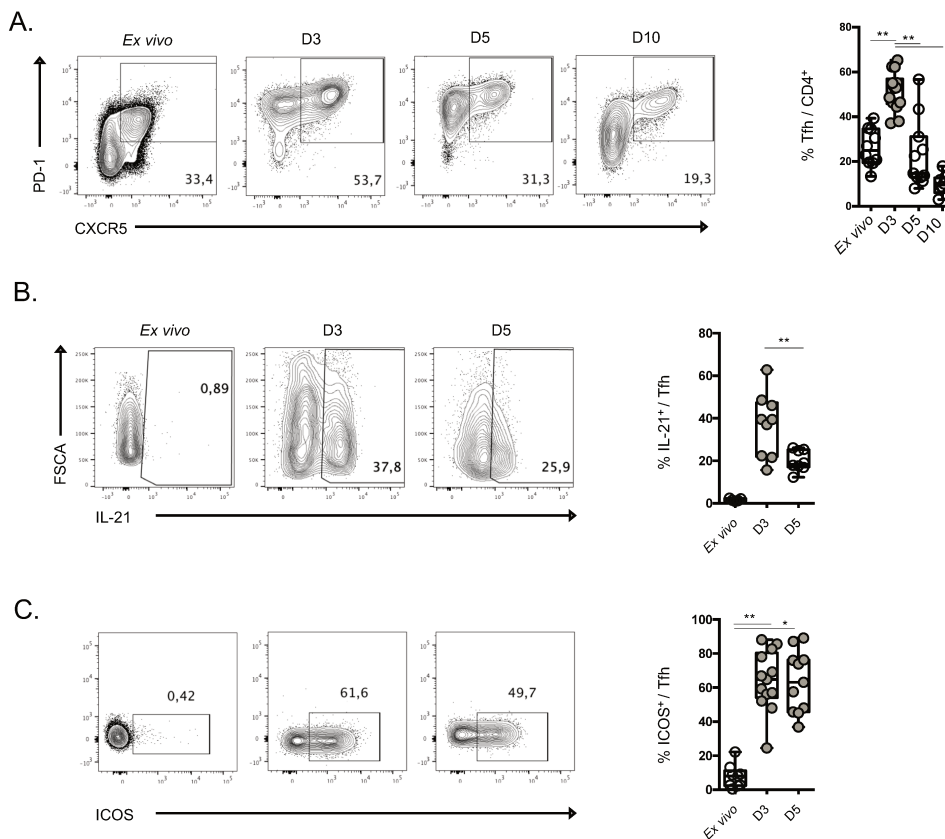


Figure 7 : La stimulation de splénocytes conduit à une génération transitoire de Tfh (A) Les splénocytes ont été stimulés avec du CytoStim et cultivés pendant 3, 5 et 10 jours en présence d'IL-7, d'IL-12 et d'actinine A. Analyse par cytométrie de flux et fréquence de Tfh parmi les LT CD4 à chaque point de temps **(B)** Analyse par cytométrie de flux et fréquence des cellules sécrétrices d'IL-21 parmi les Tfh **(C)** Analyse par cytométrie de flux et fréquence des cellules ICOS⁺ parmi les Tfh. Chaque point représente un donneur indépendant, n = 14 pour (A) et (C), n = 9 pour (B) . Test statistique de Wilcoxon, *p<0,05, **p<0,005, ***p <0,001.

I.2.b La réponse Tfh générée s'apparente à une réponse Tfh de type GC

Afin de mieux caractériser les Tfh^{J3} générés dans ce système, nous les avons discriminés selon leur niveau d'expression de CXCR5 et de PD-1 comme cela est classiquement fait *ex-vivo* ou *in situ* dans les tissus lymphoïdes chez l'Homme ou les modèles animaux. La forte expression de CXCR5 et de PD-1 désigne les Tfh du GC (GC Tfh) alors qu'une plus faible expression désigne les Tfh non associés aux GC (non-GC Tfh)^{83,86,87}. En utilisant cette stratégie (**Fig. 8 A**), la proportion de GC-Tfh est trouvée significativement accrue après 3 jours de culture (25.47% ± 15.3), alors qu'elle est presque nulle dans les splénocytes *ex-vivo* (1.53% ± 1.4). En revanche, la proportion de non-GC Tfh ne varie pas et reste stable après stimulation et culture (**Fig. 8 B**). Afin d'évaluer les similarités des populations Tfh obtenues à 3 jours dans la culture aux populations Tfh des tissus lymphoïdes, nous avons évalué l'abondance de cellules sécrétrices d'IL-21 et d'IFN γ . *In vivo*, la sécrétion d'IL-21 est plus abondante dans les GC Tfh et la sécrétion d'IFN γ plus abondante dans les non-GC Tfh dans des amygdales humaines¹⁷⁷. Ces organes sont une bonne référence pour la définition d'une réponse Tfh suite à une activation antigénique dans l'environnement lymphoïde car ils sont constamment exposés à des antigènes des voies respiratoires. De fait, les GC Tfh sont particulièrement bien représentés dans ces organes (\cong 10%, données issues de la littérature¹⁷⁸) en comparaison aux ganglions (\cong 1%, données issues de la littérature¹⁷⁸) et à la rate (\cong 1,5%, données de notre laboratoire). De manière cohérente avec les profils Tfh décrits dans les amygdales, une fréquence significativement plus importante de cellules sécrétrices d'IL-21 est trouvée parmi les GC Tfh^{J3} alors que les cellules sécrétrices d'IFN γ sont plus représentées parmi les non-GC Tfh^{J3} (**Fig. 8 B**). Alors que les Tfh^{*ex-novo*} ne témoignent d'aucune sécrétion d'IL-21 (Données non montrées), ces résultats indiquent la génération d'une réponse Tfh relative à une activation dans l'environnement lymphoïde. La fréquence de cellules ICOS⁺ est significativement plus importante dans les deux populations Tfh^{J3} définies (non-GC Tfh^{J3}: 64% ± 17.6 ; GC Tfh^{J3} 63.5% ± 18.1) en comparaison aux cellules double négatives pour le CXCR5 et le PD-1 (26.1 % ± 20.1) (**Fig. 8 D**) et aux Tfh^{*ex-novo*} (7.8% ± 6.9, données non montrées). De la même façon, l'expression de Bcl6 est significativement plus intense dans les Tfh^{J3} qu'ils soient associés au phénotype GC ou non GC en comparaison au LT CD4 CXCR5⁻PD-1⁻ (**Fig. 8 E**).

L'ensemble de ces données indique que la stimulation et la culture de cellules lymphoïdes en conditions polarisantes permet de générer une réponse Tfh de type GC. Confortant cette idée, la génération de GC Tfh^{J3} n'est pas obtenue à partir d'une culture de PBMC dans les mêmes conditions

(Fig. 9). De plus, une forte maturation des LB en plasmocytes CD27^{hi}CD38^{hi} est observée en parallèle à la génération de GC Tfh¹³ dans la culture de splénocytes 3 jours après culture (Fig. 10). L'ensemble de ces résultats suggère que la stimulation et culture de splénocytes permet de reproduire une réponse Tfh relative à une réaction du GC.

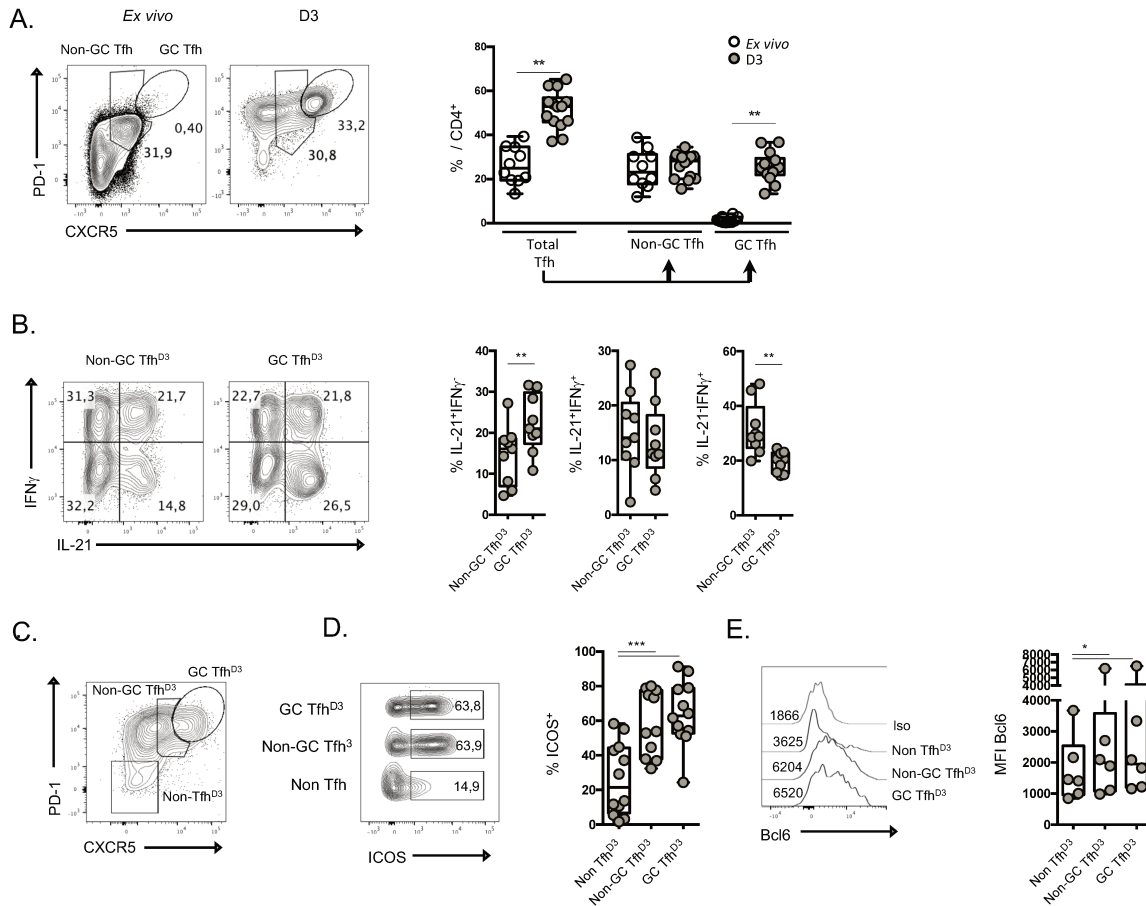


Figure 8 : La stimulation de splénocytes conduit la génération de Tfh au phénotype GC (A) Les splénocytes ont été stimulés avec du CytoStim et cultivés pendant 3 jours en présence d'IL-7, d'IL-12 et d'activine A. La stratégie d'analyse par cytométrie de flux et la fréquence des différents sous-types de Tfh (GC et non-GC) parmi les LT CD4 sont représentées **(B)** Analyse par cytométrie de flux et fréquence des cellules sécrétrices d'IL-21 et d'IFN γ parmi les populations Tfh (GC Tfh¹³ et non GC Tfh¹³) **(C)** Analyse par cytométrie de flux de différentes populations de LT CD4 selon l'expression de CXCR5 et de PD-1 et **(D)** Analyse par cytométrie de flux et fréquence des cellules ICOS⁺ dans les populations de LT CD4 définies en C. **(E)** Niveau d'expression de Bcl6 en MFI dans les populations LT CD4 définies en E. Chaque point représente un donneur indépendant, n = 12 pour (B) et (G), n = 9 pour (D), n = 6 pour (H) ; Test statistique de Wilcoxon, *p<0,05, **p<0,005, ***p <0,001.

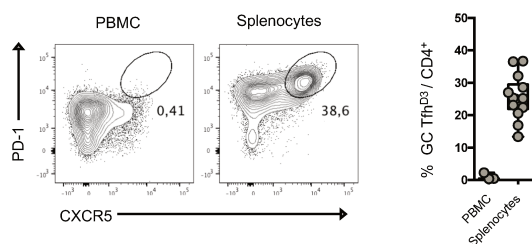


Figure 9 : La génération de GC Tfh n'apparaît pas avec des PBMC. Après stimulation (CytoStim) et 3 jours de culture (IL-7, IL-12, Activine A) de PBMC et splénocytes, le développement de GC Tfh a été évalué. La stratégie d'analyse par cytométrie de flux et la fréquence des cellules GC Tfh parmi les LT CD4 sont représentées. Chaque point représente un donneur indépendant, n (PBMC) = 3, n (splénocytes) = 12.

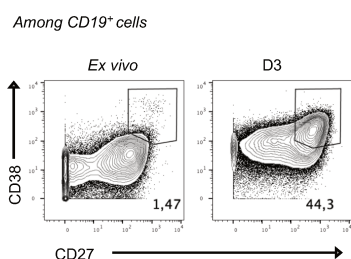


Figure 10 : Une maturation des LB est concomitante à la génération de Tfh. Analyse de la maturation des LB selon l'expression de CD27 et CD38 dans les splénocytes *ex vivo* ou stimulés et cultivés 3 jours avec des cytokines polarisantes. La maturation suit le développement des GC Tfh.

I.2.c Les Tfh générés soutiennent la maturation des LB

Par la suite, nous avons évalué la fonctionnalité des GC Tfh^{J3} générés à 3 jours. Pour ce faire, nous sommes concentrés sur leur capacité à induire la génération de plasmocytes CD27^{hi}CD38^{hi} à partir de LB mémoires en comparaison à celle de LT CD4 CXCR5PD-1⁺ obtenus 3 jours après stimulation. Après 7 jours de co-culture, la génération de plasmocytes CD27^{hi}CD38^{hi} obtenue et le maintien des LB sont significativement plus importants lorsque les LB mémoires sont cultivés en présence de GC Tfh^{J3} en comparaison aux LT CD4 CXCR5PD-1⁺ (**Fig. 11 A**). A l'issue de la co-culture, la fréquence de cellules sécrétrices d'IL-21 parmi les GC Tfh^{J3} est significativement plus importante que celle relatée parmi les LT CD4 CXCR5PD-1⁺. A l'inverse, les cellules sécrétrices d'IFN γ sont plus abondantes parmi les LT CD4 CXCR5PD-1⁺ (**Fig. 11 B-C**). Les mêmes différences de sécrétion étant rapportées avant la co-culture avec les LB (données non montrées), ces résultats indiquent le maintien du phénotype fonctionnel des GC Tfh^{J3} durant la co-culture. De manière intéressante, la sécrétion d'IL-4 par les GC Tfh^{J3} apparaît après la co-culture avec les LB mémoires alors que celle-ci n'est pas détectée avant la co-culture (**Fig. 11 D**). Cette observation est en accord avec les travaux de Weinstein qui montrent, à l'aide de modèles murins, que la sécrétion d'IL-21 précède celle d'IL-4 dans les Tfh¹⁵⁴. En conclusion, les GC Tfh^{J3} générés sont donc préférentiellement associés à une fonction d'aide aux LB en comparaison à une population de LT CD4 activée.

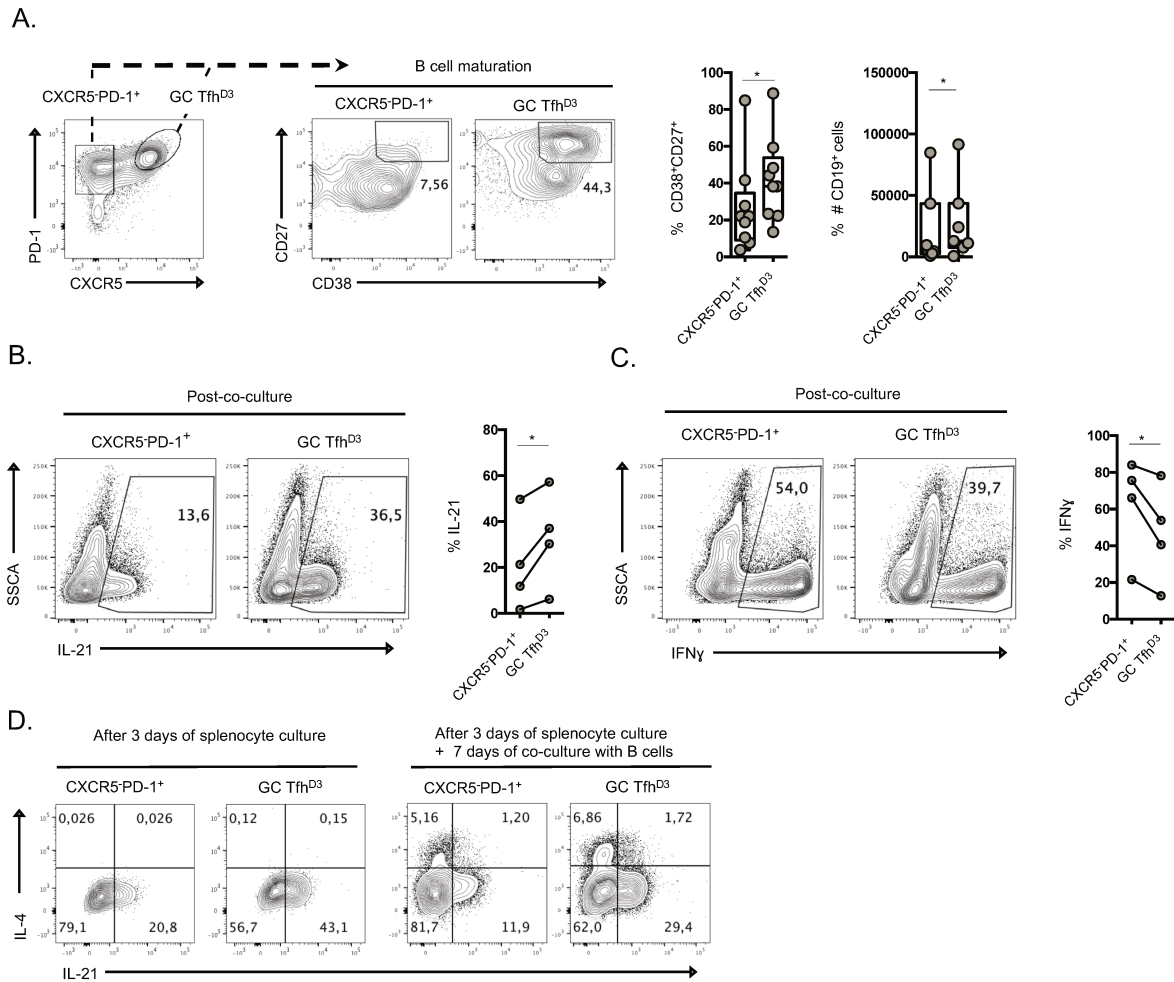


Figure 11 : Les GC Tfh générés induisent la génération de plasmocytes $CD27^{hi}CD38^{hi}$ et conservent leur phénotype fonctionnel (A) Les GC Tfh^{J3} et les LT CD4 CXCR5-PD-1⁺ issus de la culture de splénocytes ont été triés et mis en culture avec des LB mémoires pendant 7 jours. La stratégie d'analyse par cytométrie de flux, la fréquence et le nombre de plasmocytes $CD27^{hi}CD38^{hi}$ sont représentés **(B-C)** Analyse par cytométrie et fréquence des cellules sécrétrices d'IL-21 (B) et d'IFN γ (C) par les GC Tfh^{J3} et LT CD4 CXCR5-PD-1⁺ J7 après co-culture **(D)** La stratégie d'analyse par cytométrie de flux et le pourcentage de cellules produisant l'IL-4 et l'IL-21 par les GC Tfh^{J3} et les LT CD4 CXCR5-PD-1⁺ obtenus à J3 de la stimulation (à gauche) et à J7 de la co-culture (à droite) sont représentés (représentatif de 4 donneurs). Chaque point représente un donneur n = 9 pour (A), n = 4 pour (B-D) ; Test statistique de Wilcoxon, *p<0,05, **p<0,005, ***p <0,001 pour (A) ; t-test apparié, *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001 pour (B-D)

I.2.d La génération de Tfh implique une signalisation TCR et les cytokines polarisantes

Afin d'évaluer l'apport du CytoStim et des cytokines polarisantes pour la génération des GC Tfh^{J3}, ces paramètres ont été retirés un à un de la culture de splénocytes. Une stimulation dépendante du TCR est nécessaire pour la génération de GC Tfh^{J3} car en l'absence de CytoStim cette population n'apparaît pas (**Fig. 12 A et B**). En parallèle, le cocktail cytokinique permet de potentialiser

significativement la génération de GC Tfh¹³ puisque la proportion de GC Tfh¹³ générée parmi les LT CD4 augmente de 5.5% lorsque les 3 cytokines sont ajoutées à la culture (**Fig. 12 C**). La combinaison de l'IL-12 et de l'activine A ajoutées à l'IL-7 permet d'obtenir une fréquence maximale de GC Tfh¹³ (**Fig. 12 E et F**), supportant les données de la littérature qui montrent l'effet pro-Tfh de ces cytokines. De même, l'ajout de cytokines permet l'établissement d'un phénotype hautement fonctionnel par les GC Tfh¹³, en promouvant l'expression d'ICOS ainsi que la sécrétion d'IL-21 par celles-ci. La fréquence de cellules ICOS⁺ parmi les GC Tfh¹³ passe de 27% ± 19.2 à 58% ± 10 lorsque les cytokines sont ajoutées dans la culture. Pour finir, l'abondance de cellules sécrétrices d'IL-21 parmi les GC Tfh¹³ est de 5% ± 6.6 sans cytokines alors que cette proportion atteint 17.31 ± 10% en présence du cocktail cytokinique (**Fig. 13 A-D**).

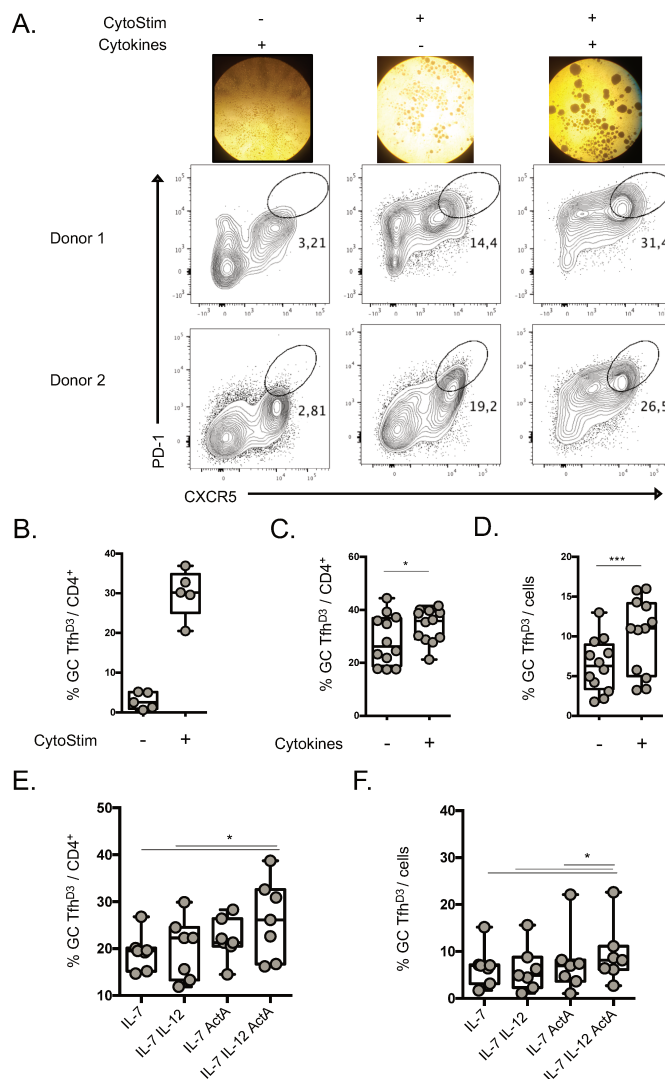


Figure 12 : La génération des GC Tfh est dépendante du signal TCR et potentialisée par les cytokines polarisantes (A) Les splénocytes ont été cultivés pendant 3 jours en présence ou non de CytoStim ou de cytokines polarisantes (IL-7, IL-12, Activine A). La formation d'amas cellulaires a été évaluée (photos obtenues en microscopie optique). La génération de GC Tfh a ensuite été évaluée par cytométrie de flux par le niveau d'expression de CXCR5 et PD-1. (Deux donneurs représentatifs). **(B)** Fréquence de cellules GC Tfh¹³ parmi les LT CD4 obtenues après une culture de splénocytes avec ou sans CytoStim **(C-F)** Fréquence de GC Tfh¹³ parmi les LT CD4 (C) ou les splénocytes totaux (D) obtenues après une culture de splénocytes avec, sans cytokines polarisantes et différentes combinaisons cytokiniques. Chaque point représente un donneur indépendant, n = 5 pour (B), n = 12 pour (C) et (D), n = 6 pour (E) et (F) ; Test statistique de Wilcoxon, *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001.

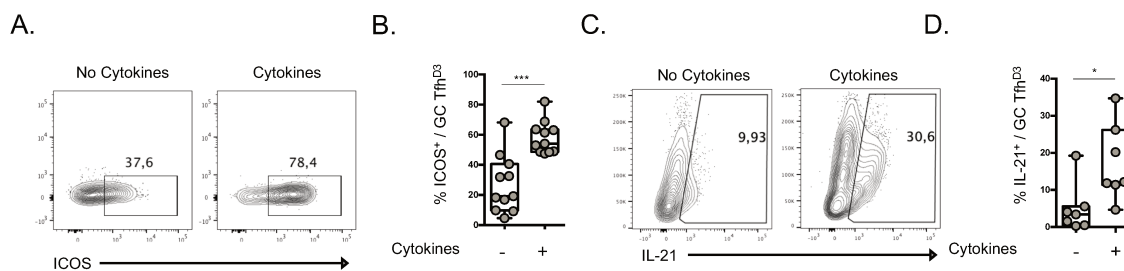


Figure 13 : La fonctionnalité des GC Tfh générés est potentialisée par les cytokines polarisantes (A) Les splénocytes ont été cultivés pendant 3 jours en présence ou non de cytokines polarisantes (IL-7, IL-12, Activine A). L'expression d'ICOS a ensuite été analysée par cytométrie de flux parmi les GC Tfh³ (**B**) Fréquence de cellules ICOS⁺ parmi les GC Tfh³ obtenues après une culture de splénocytes avec ou sans cytokines polarisantes (**C**) Analyse de la sécrétion d'IL-21 par les cellules GC Tfh³ (**D**) Fréquence de cellules sécrétrices d'IL-21 parmi les GC Tfh³ obtenues après une culture de splénocytes avec ou sans cytokines polarisantes. Chaque point représente un donneur indépendant n = 6 – 11 ; Test statistique de Wilcoxon, *p<0,05, **p<0,005, ***p <0,001.

L'ensemble de ces résultats indique que la stimulation antigénique et la culture de splénocytes avec des cytokines polarisantes et le cytoStim permettent la génération d'une réponse Tfh présentant un phénotype de GC Tfh.

I.2.e La génération de Tfh implique les LB

Les LB sont fortement impliqués dans la génération des Tfh car ils sont associés à leur maturation du statut de non GC à celui de GC d'une part et, d'autre part à une induction d'un profil Tfh. Les tissus spléniques étant particulièrement riches en LB, nous avons évalué l'implication des LB dans la génération des Tfh.

Afin d'investiguer cette question, nous avons tiré profit de rates obtenues à partir de patients atteints de purpura thrombocytopénique traités au rituximab (anti-CD20), dans lesquels les LB sont éliminés. Chez ces patients, la fréquence de LB obtenue est de 1 à 8% alors qu'elle équivaut à 40%-60% chez les patients sains (Analyses non montrées). En soumettant ces rates aux mêmes protocoles de stimulation et de culture en condition polarisantes, la génération de GC Tfh³ n'est pas induite (**Fig. 14 A et B**). Cette absence de génération n'est pas liée à un défaut d'activation des LT CD4 puisque l'expression d'ICOS est augmentée grâce au CytoStim et aux cytokines polarisantes (**Fig. 14 C et D**), témoignant d'une activation cellulaire. Ces données soulignent l'importance de la présence des LB dans les splénocytes pour la génération de GC Tfh.

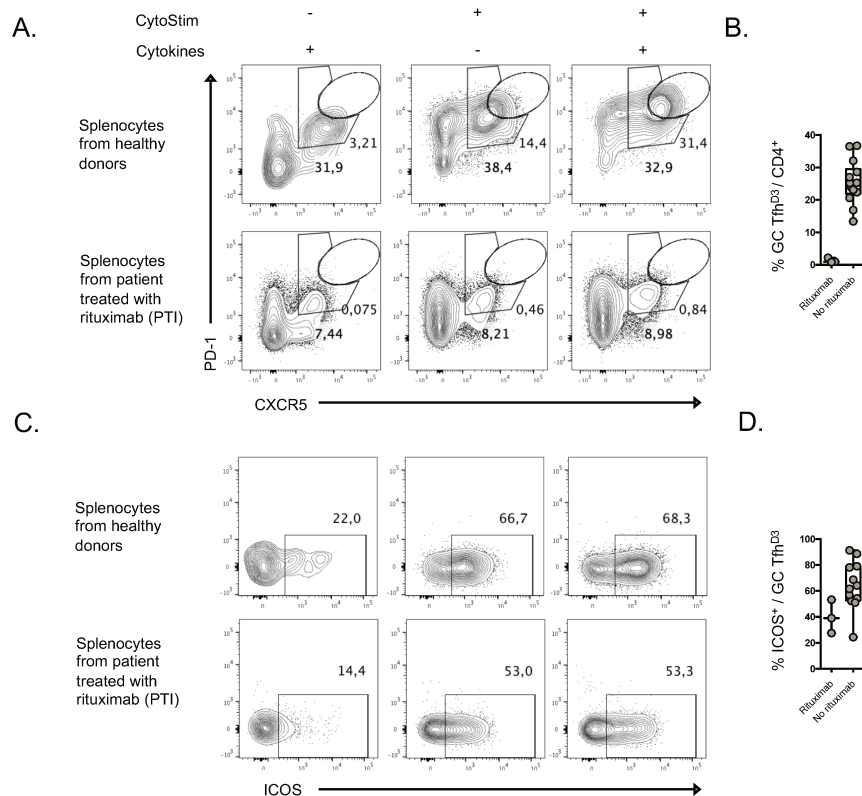


Figure 14 : La génération de GC Tfh est dépendante des LB. (A) Après stimulation (CytoStim) et 3 jours de culture (IL-7, IL-12, Activine A) les splénocytes issus de donneurs sains ou de patients traités au rituximab (RTX), le développement de GC Tfh a été évalué par analyse de l'expression de CXCR5 et PD-1 par cytométrie de flux. **(B)** Fréquence de cellules GC Tfh parmi les LT CD4. **(C)** L'expression d'ICOS parmi les GC Tfh est analysée par cytométrie de flux. **(D)** Fréquence des cellules ICOS⁺ parmi les cellules GC Tfh. Chaque point représente un donneur indépendant, n (RTX) = 3, n (sains) = 12.

I.2.f Les Tfh générés présentent une hétérogénéité phénotypique

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation de la réponse Tfh obtenue après 3 jours de culture de splénocytes, les LT CD4 ont été analysés par cytométrie de masse. Ainsi, nous avons pu étudier la distribution des LT CD4 selon 27 marqueurs grâce à une représentation utilisant l'algorithme UMAP (pour Uniform Manifold Approximation and Projection) (**Fig. 15 A**). Une très grande reproductibilité dans les distributions d'expression des marqueurs a été observée pour les différents donneurs (n = 4) et les données obtenues ont par conséquent été concaténées. Comme en cytométrie de flux, l'intensité d'expression de CXCR5 permet de définir deux zones, l'une enrichie en GC Tfh³ ayant une haute expression de CXCR5 et l'autre enrichie en non-GC Tfh³ ayant une expression de CXCR5 plus faible (**Fig. 15 B**). L'expression de CXCR5 apparaît plus discriminante que le PD-1 pour la définition des phénotypes Tfh associés ou non au GC (**Fig. 8 A**).

Les groupes cellulaires enrichis en GC Tfh¹³ se caractérisent par une forte intensité d'expression de CXCR4, CD126 et Fas (**Fig 15. C**). Cette observation est cohérente avec les données de la littérature dans laquelle des GC Tfh issus d'amygdales présentent une co-expression de ces 3 marqueurs³⁵³. Aussi, ceci renforce l'idée que la réponse Tfh que nous générons présente des similarités à celle observée suite à une activation dans les tissus lymphoïdes. De plus, la zone enrichie en GC Tfh¹³ est associée à un phénotype mémoire (CD45RO), alors que la zone enrichie en non-GC Tfh¹³ est associée à une plus forte expression de marqueurs associés à un phénotype LT CD4 naïf (CD45RA, CD62L) (**Fig 15. D**). Ceci suggère deux états de maturation Tfh à 3 jours d'une stimulation de splénocytes.

L'intensité d'expression des molécules de co-stimulation est hétérogène dans les sous-groupes définis comme enrichis en non-GC et GC Tfh¹³. Seules les expressions de BTLA et de CD28 sont homogènes, d'intensités modérées dans les sous-groupes cellulaires associés aux non-GC Tfh¹³. Pour les autres molécules de co-stimulation (ICOS, CD40L, OX40, CD27) des disparités d'expression, allant de faible à forte, sont observées au sein des sous-groupes cellulaires associés aux non-GC et GC Tfh¹³. Ces observations révèlent une hétérogénéité phénotypique au sein des populations Tfh étudiées. Aucune co-expression entre les différentes molécules de co-stimulation n'est trouvée. Cela indique que les combinaisons d'expression des molécules de co-stimulation au sein des Tfh¹³ obtenus sont diverses.

L'expression des marqueurs d'activation et de prolifération ki67, CD38, HLADR, CD127 est relativement homogène dans la zone associée aux non-GC Tfh¹³, avec une intensité modérée jusqu'à forte. En revanche, les intensités d'expression des marqueurs d'activation sont plus hétérogènes dans la zone associée aux GC Tfh¹³, avec la présence de sous-groupes ayant des faibles expressions. La faible expression de ces marqueurs d'activation est partagée par les mêmes sous-groupes de GC Tfh¹³ (**Fig 15. E**), suggérant d'une population moins fortement activée au sein ce compartiment.

Une hétérogénéité d'expression est retrouvée pour le CXCR3 avec un plus fort niveau d'expression pour les non-GC Tfh¹³ alors que des sous-groupes cellulaires avec un faible niveau d'expression sont trouvés au sein des GC Tfh¹³ (**Fig 15. E**).

En résumé, les données obtenues avec la cytométrie de masse nous permettent de confirmer des états de maturation associés aux non-GC et GC Tfh¹³ avec des marqueurs (CXCR4, IL-6R, CD95)

dont les niveaux d'expression discriminent ces deux états *in vivo*. De plus, au regard des marqueurs associés à de la co-stimulation et de l'activation, une hétérogénéité phénotypique est observée au sein de la réponse Tfh^{J3} générée, suggérant différents profils fonctionnels.

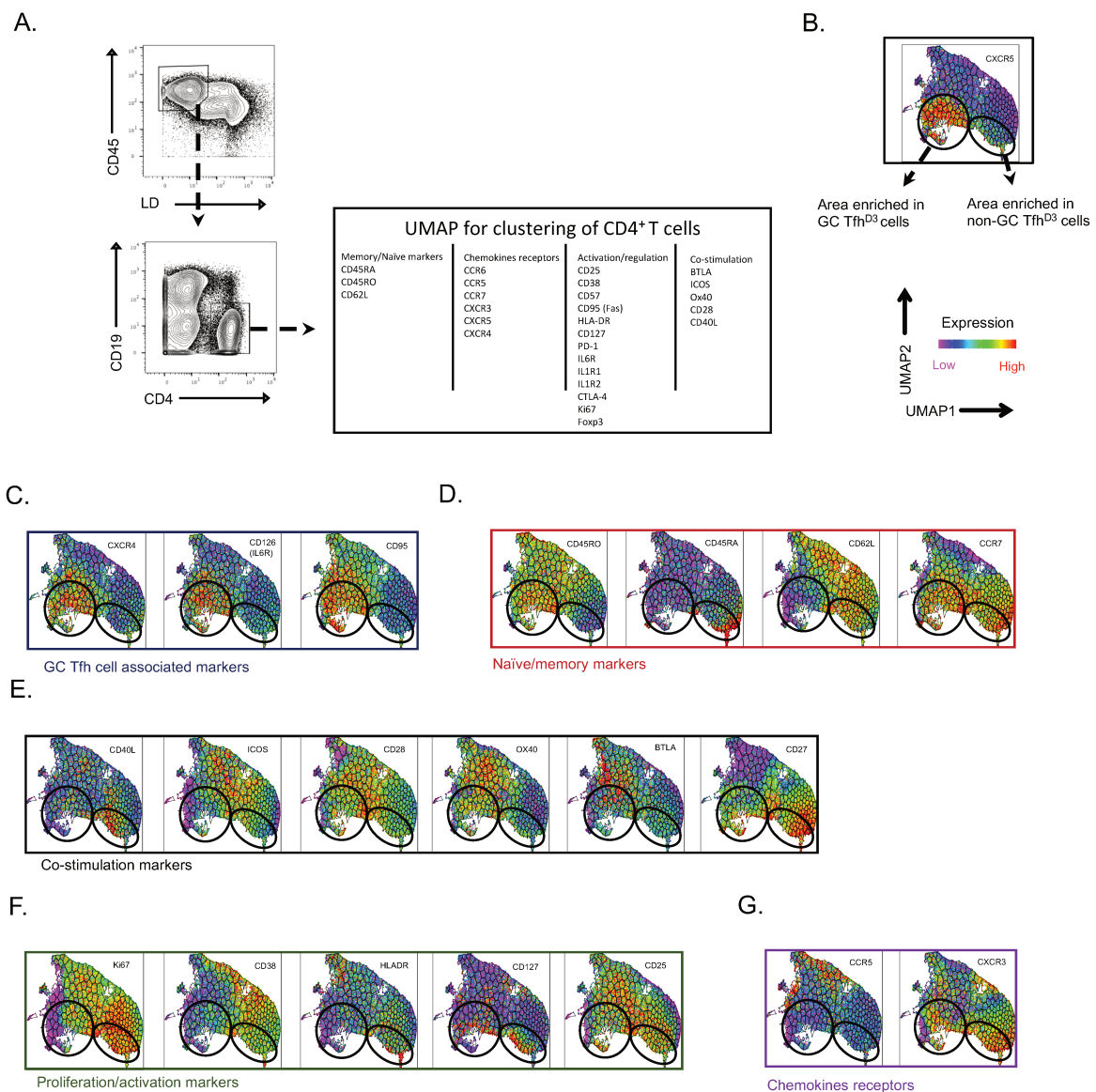


Figure 15 : L'immunophénotypage par cytométrie de masse révèle une hétérogénéité au sein de Tfh obtenus.

(A) Un immunophénotypage par cytométrie de masse a été réalisé après 3 jours de stimulation et culture en conditions polarisantes (IL-7, IL-12, Activine A). Une sélection préalable de LT CD4 a été faite avant analyse à l'aide de l'expression de CD45, CD8, CD11c, CD56, CD19 and CD4. La distribution phénotypique des LT CD4 a ensuite été faite à l'aide de l'algorithme UMAP (UMAP pour Uniform Manifold Approximation and Projection) selon les marqueurs indiqués (B) Deux zones ont été définies, suivant leur enrichissement en cellules exprimant fortement le CXCR5 (GC Tfh^{J3}) ou leur enrichissement en cellules exprimant modérément le CXCR5 (non-GC Tfh^{J3}) (C-G). L'expression de plusieurs marqueurs associés à différentes fonctions est montrée parmi les LT CD4 distribués selon l'algorithme UMAP. Les résultats obtenus à partir de 4 donneurs indépendants ont été concaténés.

I.3 Conclusion de l'Axe I

Le premier axe de ma thèse a consisté en la mise au point d'un modèle permettant de mimer au mieux une réponse Tfh au sein des tissus lymphoïdes lors d'une exposition antigénique. L'approche que nous avons retenue repose sur la stimulation et la culture de splénocytes totaux pendant 3 jours dans un milieu supplémenté avec un cocktail cytokinique connu pour orienter la réponse LT CD4 vers une réponse Tfh. Ce protocole hautement reproductible permet de générer une réponse Tfh, qui se rapproche de celle relative aux tissus lymphoïdes humains lors d'une activation antigénique. Les deux états de maturation des Tfh y sont représentés, associés ou non au phénotype GC. En parallèle, l'analyse multiparamétrique par cytométrie de masse sur les populations Tfh obtenues a permis de mettre en évidence une hétérogénéité phénotypique. Dans ce modèle, les acteurs cellulaires et moléculaires lymphoïdes potentiellement impliqués dans la génération des Tfh sont conservés, comme les populations LT CD4 spléniques susceptibles d'y contribuer. Ainsi, j'ai pu répondre à mon deuxième objectif de thèse.

II. Axe II : Étude des voies de génération des Tfh en conditions physiologiques

II.1.a Contribution des LT CD4 naïfs et mémoires à la génération des Tfh

Afin de comprendre la dynamique LT CD4 conduisant une réponse Tfh dans un environnement lymphoïde, nous avons développé un schéma expérimental permettant de tracer différents sous-types de LT CD4. Nous avons divisé les LT CD4 en 3 grandes sous-populations spléniques : naïfs, mémoires non-Tfh et Tfh. Les LT CD4 mémoires ont été discriminés selon leur état d'activation, indexé via l'expression de PD-1. En effet, l'expression de PD-1 suit une stimulation TCR, en faisant un bon indicateur de l'historique de la stimulation antigénique de la cellule. Une fois les populations triées selon la stratégie exposée en **Fig. 16 A**, les cellules ont été marquées au CTV puis réintroduites dans la fraction négative du tri, afin de conserver des proportions cellulaires identiques et éviter des modifications de l'environnement lymphoïde. Le protocole promouvant la génération de Tfh précédemment décrit a été ensuite réalisé (**Fig. 16 B**).

Nous avons, dans un premier temps, évalué la capacité des différents sous-types cellulaires à exprimer le CXCR5 et PD-1 après 3 jours de stimulation. De manière intéressante, des cellules positives pour le CXCR5 et le PD-1 sont obtenues à partir de tous les sous-types de LT CD4 tracés (**Fig. 16 C et D**). La capacité des différents sous-types de LT CD4 n'est en revanche pas identique

car une proportion significativement plus importante de cellules CXCR5⁺PD-1⁺ est obtenue à partir des memPD-1^{pos} (44,7% ± 20,9) en comparaison aux memPD-1^{neg} et LT CD4 naïfs (respectivement 19,4% ± 4,8 et 27,2% ± 10,42) (**Fig. 16 C et D**). Les Tfh présents avant la stimulation maintiennent leur phénotype après stimulation, car plus de 90% demeurent CXCR5⁺PD-1⁺. Tirant profit du CTV, nous avons par la suite analysé l'acquisition de l'expression de CXCR5 et PD-1 selon les divisions cellulaires de chaque sous-type de LT CD4. L'expression de CXCR5 et PD-1 par les populations LT CD4 naïfs et memPD-1⁻ apparaît à la 2^{ème} et 3^{ème} division alors qu'elle apparaît dès la deuxième division pour la population memPD-1^{pos} (**Fig. 16 E**). Couplées au rendement de Tfh¹³ obtenus, ces données suggèrent que les memPD-1^{pos} s'orientent de manière plus rapide vers un profil Tfh en comparaison aux autres populations LT CD4 tracées. Pour chaque sous-type de LT CD4, l'expression de Bcl6 est plus importante dans les Tfh¹³ qui en dérivent en comparaison aux cellules (CXCR5⁺PD-1⁺ et CXCR5⁺PD-1⁻) issues du même sous-type (**Fig. 16 F**). Cette observation suppose l'établissement d'une signature transcriptionnelle relative aux Tfh dans les différents Tfh¹³ générés.

Afin d'étudier les spécificités transcriptionnelles de chacune des transitions vers le profil Tfh^{D3}, nous avons réalisé un séquençage ARN sur les Tfh¹³ et les populations *ex-vivo* dont ils sont issus. Parmi chacune des populations LT CD4 étudiées, un grand nombre de gènes est différenciellement exprimés durant la transition du sous-type LT CD4 vers son profil Tfh¹³ respectif : 3720 pour les Tfh, 3156 pour les memPD-1^{pos}, 3186 pour les memPD-1⁻ et 4297 pour les LT CD4 naïfs (**Fig. 16 G**). Du fait de ces nombres importants, nous avons dans un premier temps déterminé à quel enrichissement fonctionnel correspondent ces variations d'expression génique. Utilisant différentes bases de données (EnrichR), les enrichissements de fonction majeurs sont associés à du cycle cellulaire (données non montrées), comme déjà décrit pour des LT CD4 stimulés via un signal TCR⁵⁸. Par la suite, nous avons concentré notre analyse sur les gènes impliqués dans le développement et la fonction des Tfh parmi ces gènes différenciellement exprimés (**Table I**).

Une augmentation de l'expression des facteurs de transcription IRF4 et ZBTB7 (codant pour Thpok) impliqués dans le développement des Tfh est trouvée pour tous les sous-types LT CD4 dans leur transition vers le profil Tfh¹³. Des souris déficientes en IRF4 témoignent d'un défaut de différenciation en Tfh³⁵⁴ et le rôle de ZBTB7 (Thpok) pour la différenciation des Tfh a été montré récemment, dans une étude où des LT CD4 n'exprimant pas ce FT ne génèrent pas de Tfh (CXCR5⁺PD-1⁺)⁷⁹. De manière intéressante, une expression plus importante de PRDM1 (codant pour Blimp-1) est également présente. Blimp-1 est associé à une inhibition de la mise en place d'un

phénotype Tfh⁷², et l'augmentation de son expression suggère ici la mise en place d'une balance d'expression de FT pour la mise en place du phénotype Tfh. Cette augmentation d'expression de Blimp-1 pourrait aussi être due à l'induction d'une population de Tfr, puisque l'expression de ce FT est importante pour le développement de ce sous-type cellulaire¹⁶⁴. D'autres molécules comme STAT1, connue pour son implication dans la signalisation pro-Tfh³⁵⁵, TNFRS4 (Ox40), SLAMF1, CXCL13 impliqués dans la fonction des Tfh^{89,115} présentent une expression augmentée dans la transition des sous-types LT CD4 vers le profil Tfh¹³. L'expression d'IL-2RA dont le signal est inhibiteur pour la génération de Tfh est augmentée, indiquant probablement la mise en place de contrôle dans la mise en place du phénotype Tfh. Renforçant l'idée d'une mise en place d'un programme transcriptionnel pro-Tfh, l'expression des FT inhibiteurs KLF2 et BACH2 est communément diminuée dans la transition des sous-types LT CD4 vers le profil Tfh¹³. KLF2 a été décrit comme un FT inhibiteur majeur de la génération des Tfh^{81,106}, dont l'action est inhibée par Bcl6⁷⁵. Une surexpression de BACH2 dans des Tfh murins conduit à une perte du phénotype Tfh et un maintien d'une expression faible est nécessaire pour le maintien d'un phénotype Tfh³⁵⁶. D'autres variations d'expressions géniques pro-Tfh ne sont pas partagées pour les transitions des LT CD4 vers un profil Tfh. La transition des LT CD4 naïfs, memPD-1⁻ et memPD-1^{pos} vers un profil Tfh¹³ s'accompagne d'une augmentation de l'expression de E2A. L'expression de E2A est associée à la promotion de l'expression de CXCR5 dans la littérature³⁵⁷, et apparaît de manière cohérente avec le gain de CXCR5 observé pour ces 3 populations en cytométrie de flux. D'autres facteurs de transcription sont exclusivement modulés dans la transition par un sous-type LT CD4 vers le profil Tfh¹³. C'est le cas de Bcl6 dont l'expression est significativement augmentée dans la transition memPD-1⁻ vers Tfh¹³ et de LEF-1 qui est exprimé dans la transition memPD-1^{pos} vers Tfh¹³. Une absence d'expression de LEF-1 conduit à des défauts dans le développement de Tfh³⁵⁸, montrant son importance pour l'établissement d'un profil Tfh. Pour finir, une baisse de l'expression du FT Prkd2 est observée pour les LT CD4 naïfs qui s'orientent vers un profil Tfh. Le rôle de Prkd2 dans l'inhibition de l'établissement d'un profil Tfh par les LT CD4 naïfs a été montré récemment⁸⁰ dans la transition des LT CD4 naïfs vers le profil Tfh¹³ dans un modèle murin. Parallèlement, une baisse de l'expression de CCR7 est également observée dans la transition vers un profil Tfh¹³ pour les LT CD4 naïfs, comme rapporté à un niveau protéique dans les travaux de N. Haynes⁸⁶.

Ces observations indiquent que la mise en place d'un profil Tfh est possible dans des LT CD4 naïfs et mémoires soumis à un environnement lymphoïde. De plus, aucune modulation dans l'expression de FT associés à d'autres Th (Tbet, GATA-3, RORγt et Foxp3) n'est mise en évidence dans notre

analyse, ce qui suggère que l'environnement lymphoïde apporté par nos conditions expérimentales privilégie une induction du phénotype Tfh.

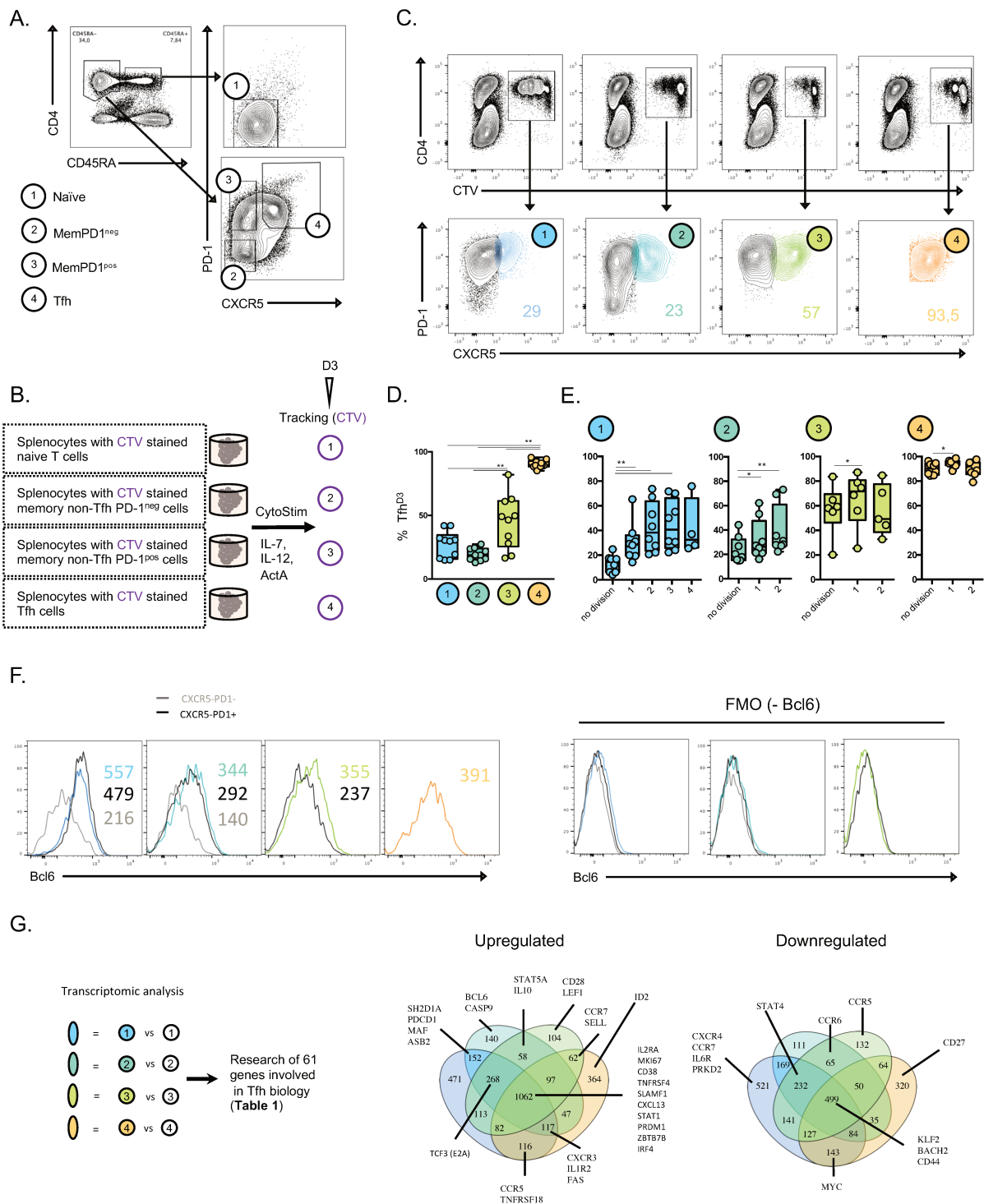


Figure 16 : Les LT CD4 naïfs et mémoires s'orientent vers un profil Tfh (A) Définition par cytométrie de flux de 4 populations de LT CD4 selon l'expression de CD45RA, CXCR5 et PD-1 : naïfs (CD4⁺CD45RA⁺CXCR5⁻PD-1⁻), mémoires non-activés memPD1^{neg} (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁻PD-1⁻), mémoires activés memPD1^{pos} (CD4⁺CD45RA⁺CXCR5⁻PD-1⁺) et Tfh (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺PD-1⁺) (B) Avant la stimulation les LT CD4 ont été triés selon la

stratégie de sélection indiquée en A. Les cellules ont été marquées au CTV puis réintroduites dans la fraction négative du tri. La stimulation et la culture ont ensuite été réalisées comme précédemment **(C)** Exemple de stratégie de sélection à 3 jours de culture des cellules CTV⁺ (haut) et analyse de l'expression de CXCR5 et PD-1 par les cellules marquées (bas). **(D)** Fréquence de cellules CXCR5⁺PD-1⁺ obtenues parmi les différentes populations de LT CD4 définies en A **(E)** Fréquence de cellules CXCR5⁺PD-1⁺ obtenues selon les divisions des différentes populations définies en A **(F)** Expression de Bcl6 par les cellules CXCR5⁺PD-1⁺ (ligne colorée), CXCR5⁺PD-1⁺ (noire) et CXCR5⁺PD-1⁻ (gris) issues des différentes populations définies en A **(G)** Un séquençage d'ARN a été réalisé sur les populations LT CD4 *ex vivo* et les Tfh³ respectifs générés après 3 jours de stimulation et culture de splénocytes avec des cytokines polarisantes (IL-7, IL-12, Activine A). Les gènes différentiellement exprimés (DEGs) entre les Tfh³ et la population LT CD4 *ex-vivo* relative ont été identifiés et 61 gènes connus pour leur rôle dans la biologie des Tfh ont été recherchés. Diagrammes de Venn représentant les DEGs partagés ou non, dont l'expression est augmentée ou diminuée dans la transition de chacune des populations LT CD4 *ex-vivo* vers leur profil Tfh-d3 respectif. Chaque point représente un donneur indépendant, n = 10. Test statistique de Wilcoxon, *p<0,05, **p<0,005, ***p <0,001

Transcription Factors			Functionality		Regulation	Positionning	Activation	Signaling
Enhancers	Repressors	Others	Cytokines/ Chimiokines	Co-stimulation				
BCL6	PRDM1	FoxP3	IL21	ICOS	IL1R1	CCR5	IL7R	STAT1
BATF	FOXO1	TBX21	CXCL13	CD28	IL2RA	CXCR4	MKI67	STAT3
IRF4	KLF2	RORC	IFNG	CD40LG	BTLA	CCR6	CD38	STAT4
MAF	PRKD2	GATA3	TNF	CTLA4	PDCD1	CCR7	CD44	STAT5A
ZBTB7B (Thpok)	BACH2		IL2	SH2D1A (SAP)	IL1R2	CXCR3	CD69	
TOX2	ID2		IL10	TNFRSF4 (Ox40)	IL6R	CXCR5		
ASB2			IL13	CD27	FAS	SELL		
TCF3 (E2A)			IL4	SLAMF1		S1PR1		
TCF7 (TCF-1)				TNFRSF18 (GITR)				
LEF1								

Table I : Gènes sélectionnés pour leur implication dans le développement et la fonction des Tfh.

II.1.b Effet de l'environnement polarisant pour l'induction de traits Tfh

Il est important de considérer que l'orientation d'un LT CD4 dépend des caractères phénotypiques (récepteurs aux chimiokines, molécules de co-stimulation et FT) qu'il exprime à l'instant où il est exposé à un nouvel environnement biologique. Par conséquent, les réponses des différents sous-types de LT CD4 aux cytokines polarisantes pourraient s'avérer distinctes. Afin d'investiguer cette question, nous avons tracé les différents sous-types LT CD4 dans des splénocytes cultivés dans un milieu supplémenté ou non en cytokines polarisantes.

Pour tous les sous-types LT CD4, l'ajout des 3 cytokines dans la culture de splénocytes permet d'augmenter la fréquence de Tfh³ obtenue. Un effet plus drastique de l'ajout des cytokines à la stimulation est cependant observé pour la génération de Tfh³ à partir des LT CD4 naïfs et memPD-1^{neg}, avec un rendement plus que doublé (x 3,1 pour les LT CD4 naïfs, x 2,7 pour le memPD-1^{neg})

(**Fig. 17 A**). Ces observations suggèrent d'une acquisition du CXCR5 et PD-1 majoritairement dépendante des cytokines pour les LT CD4 naïfs et memPD-1^{neg}, et majoritairement dépendante du signal TCR, apporté ici par le CytoStim, pour les memPD-1^{pos}. Ces résultats sont cohérents avec ceux précédemment obtenus montrant que l'acquisition du phénotype Tfh se fait plus précocement pour les memPD-1^{pos} après stimulation en comparaison aux autres sous-types LT CD4. Excepté pour les Tfh¹³ dérivées de LT CD4 naïfs, l'ajout des cytokines polarisantes permet une réduction des cellules qui sécrètent uniquement de l'IFN γ , au profit des cellules IL-21 productrices en combinaison avec l'IFN γ ou non. La sécrétion d'IL-21 par les Tfh¹³ est promue par le cocktail cytokinique quelle que soit leur origine (**Fig. 17 B**). Cet effet conservé est également observé pour l'expression d'ICOS (**Fig. 17 C**). L'effet des cytokines est plus drastique pour la potentialisation de l'expression d'ICOS par les Tfh¹³ dérivés de Tfh (x 2,3) et memPD-1^{pos} (x 1,8) en comparaison aux memPD-1^{neg} (x 1,5) et LT CD4 naïfs (x 1,2). Ces résultats suggèrent qu'un même environnement lymphoïde permet d'induire sur différents sous-types de LT CD4 l'expression de caractères phénotypiques Tfh identiques. Plus particulièrement, ces données supportent l'idée selon laquelle la génération au sein des tissus lymphoïdes pourrait relever d'une plasticité cellulaire, dans un contexte de stimulation antigénique et cytokinique approprié.

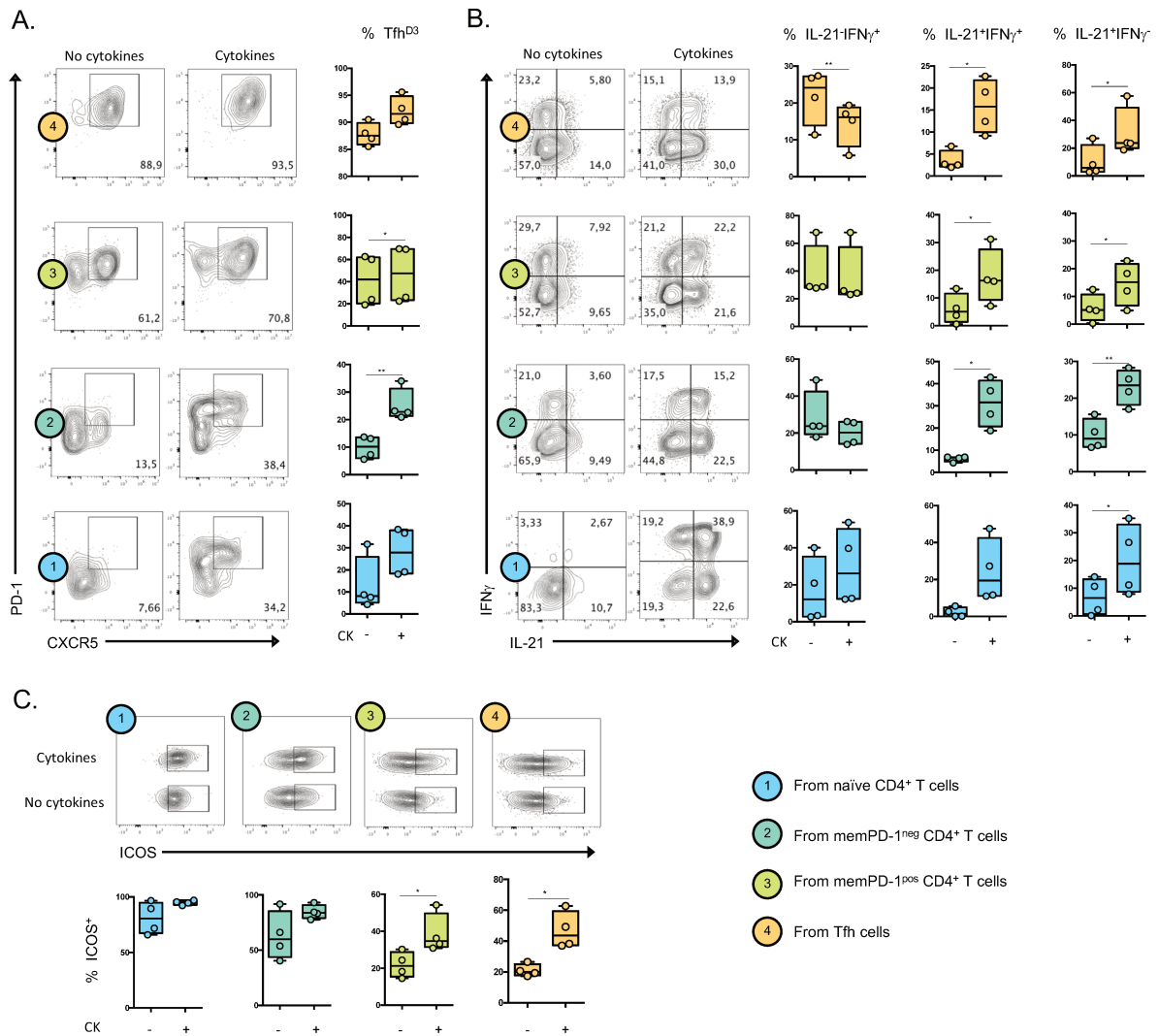


Figure 17 : Les cytokines polarisantes potentialisent le développement et la fonction de Tfh quel que soit le sous-type LT CD4. (A) Les différentes populations de LT CD4 (naïfs, memPD1^{neg}, memPD1^{pos} et Tfh) ont été tracées à l'aide du CTV dans une culture de splénocytes de 3 jours en présence ou non de cytokines (IL-7, IL-12, Activine A). Fréquence des Tfh^{D3} parmi les sous-populations de LT CD4 **(B)** Fréquence des cellules sécrétrices d'IL-21 et d'IFN γ par les Tfh^{D3} issues des différentes sous-populations LT CD4 **(C)** Fréquence des cellules ICOS⁺ parmi les cellules Tfh^{D3} issues des différentes sous-populations LT CD4. Chaque point représente un donneur indépendant (n = 4). T-test apparié de Student *p<0,05, **p<0,01.

II.1.c Contribution des LT CD4 naïfs et mémoires à l'hétérogénéité des Tfh

Au regard de la diversité de phénotypes fonctionnels décrite en cytométrie de masse et de la diversité des programmes transcriptionnels pro-Tfh mis en place pour chaque sous-type LT CD4 vers son orientation en Tfh^{D3}, nous avons comparé les phénotypes des différents Tfh^{D3} générés.

Nous avons dans un premier temps comparé l'expression de CXCR5 entre les différents Tfh^{J3} générés car celle-ci représente un bon indicateur de l'état de maturation des Tfh. L'expression de CXCR5 la plus intense est obtenue pour les Tfh^{J3} issus de Tfh alors que la plus faible est obtenue pour les Tfh^{J3} issus de LT CD4 naïfs. Ces données suggèrent que les Tfh présents dans la culture à J0 se sont orientés vers un phénotype GC, stade terminal de leur différenciation. Il est important de noter qu'une stimulation antigénique soutenue est nécessaire pour un passage d'un phénotype non-GC à GC^{96,98}. A l'inverse, la plus faible expression de CXCR5 est observée sur les Tfh^{J3} issus de LT CD4 naïfs, reflétant probablement un engagement vers un profil pré-Tfh. L'intensité d'expression de CXCR5 des Tfh^{J3} dérivés de memPD-1^{pos} est plus proche des Tfh^{J3} issus de Tfh en comparaison à celle des Tfh^{J3} dérivés de memPD-1^{neg} plus proche de celle des Tfh^{J3} issus des LT CD4 naïfs (**Fig. 18 A**).

Dans le but de questionner si ces différences d'expression de CXCR5 reflètent des phénotypes fonctionnels distincts, nous avons analysé les capacités de sécrétions cytokiniques des Tfh^{J3} générés. De manière cohérente, une sécrétion préférentielle d'IL-21 est associée aux Tfh^{J3} issus de Tfh alors que les Tfh^{J3} issus de LT CD4 naïfs sont préférentiellement associés à la sécrétion d'IFN γ , suggérant que les deux statuts Tfh classiquement décrits allant du pré-Tfh au GC Tfh sont présents dans notre système. Les profils de sécrétion des Tfh^{J3} dérivés des LT CD4 mémoires sont intermédiaires, avec une plus grande similarité des Tfh^{J3} dérivés des memPD-1^{pos} avec le phénotype Tfh plus mature (**Fig. 18 B**). L'expression de CXCR3 suit les mêmes variations que la sécrétion d'IFN γ (**Fig. 18 C**), en accord avec la littérature où l'expression de ces deux marqueurs est associée, à un profil Th1. Dans la littérature, certaines études rapportent que la population Tfh exprimant CXCR3 est associée à une expression plus faible de CXCR5 et une expression plus forte d'ICOS¹⁸⁵. De manière cohérente, la fréquence de cellules ICOS⁺ et CD40L⁺ est la plus importante parmi les Tfh^{J3} dérivant des LT CD4 naïfs, suivie des Tfh^{J3} dérivés des memPD-1^{neg}, memPD-1^{pos} et Tfh (**Fig. 18 D et E**). Cette proximité de phénotype entre les Tfh^{J3} dérivés de LT CD4 naïfs et de memPD-1^{neg} et les Tfh^{J3} dérivés de memPD-1^{pos} et de Tfh^{J3} est également observée pour l'intensité d'expression de CD28 (**Fig. 18 F**). En revanche, une fréquence plus faible de cellules OX40⁺ est observée dans les Tfh^{J3} dérivés de LT CD4 naïfs en comparaison aux autres populations de Tfh^{J3} (**Fig. 18 G**).

Ces données indiquent que l'orientation de différents sous-types de LT CD4 conduit à la génération de Tfh aux phénotypes fonctionnels distincts, que la cytométrie de masse nous avait précédemment permis d'appréhender.

Suite à ces observations, nous avons réalisé des co-cultures, avec des LB mémoires, de Tfh¹³ et de leur sous-type LT CD4 d'origine respectif. Pour ces expériences, les LT CD4 mémoires ont été considérés comme un seul et même phénotype, sans la distinction via le PD-1, du fait de la rareté du matériel cellulaire (**Fig. 18 H**). L'orientation des LT CD4 naïfs vers un profil Tfh¹³ s'accompagne d'un gain dans l'aide apportée à la maturation des LB CD19⁺ en plasmocytes CD27^{hi}CD38^{hi}, à la survie des LB et à la production d'immunoglobulines. En revanche, l'orientation des LT CD4 mémoires vers un profil Tfh¹³ s'accompagne uniquement d'un gain de survie mais la maturation des LB en plasmocyte CD27^{hi}CD38^{hi} est, quant à elle, inchangée. En effet, de manière intéressante, nos résultats montrent que les LT CD4 mémoires sont déjà capables à l'origine d'induire la différenciation de LB en plasmocyte. Pour finir, l'aide délivrée aux LB reste constante pour les Tfh avant ou après stimulation (**Fig. 18 I**). Ces résultats suggèrent que le gain de fonction Tfh (survie ou maturation) n'est pas identique selon l'origine du Tfh. Afin d'évaluer si les différences en phénotype fonctionnel observées sur les Tfh¹³ par cytométrie de flux pouvaient résulter d'une aide différente délivrée aux LB, nous avons mesuré les concentrations de différents sous-types d'Ig dans les surnageants des co-cultures réalisées. Si nous n'avons pu dégager de variations significatives, une tendance à plus d'IgG1 produites avec des co-cultures réalisées avec Tfh¹³ dérivés de LT CD4 mémoires et Tfh en comparaison à des co-cultures réalisées avec des Tfh¹³ issu de LT CD4 naïfs. A l'inverse, ces derniers sont associés à l'induction d'une production d'IgA plus intense (**Fig. 18 J**).

En résumé, ces résultats indiquent que l'orientation de différents sous-types de LT CD4 vers un profil Tfh conduit à des phénotypes fonctionnels distincts, desquels pourraient résulter des réponses LB spécifiques.

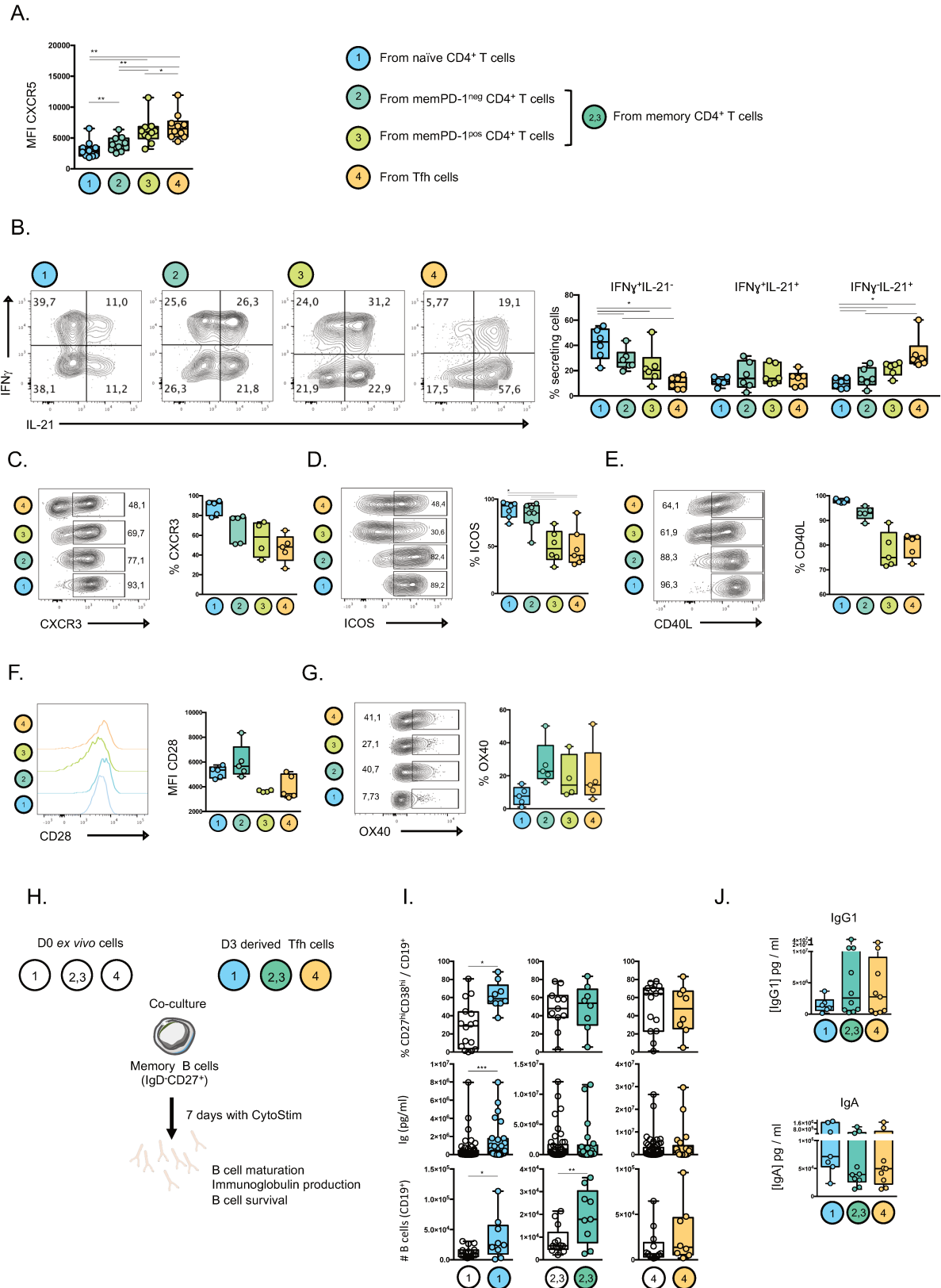


Figure 18 : Les Tfh générés à partir de différents LT CD4 présentent des phénotypes fonctionnels distincts. (A) Analyse des cellules sécrétrices d'IL-21 et d'IFN γ parmi les populations Tfh³ issus de (1) LT CD4 naïfs, (2) mémoires PD-1⁻, (3) mémoires PD-1⁺ et (4) Tfh. **(B)** Fréquence de cellules sécrétrices d'IL-21 et IFN γ parmi les Tfh- β 3 issus des différentes populations LT CD4 **(C)** Fréquence des cellules CXCR3⁺ parmi les Tfh β 3 issus des différentes

populations LT CD4 **(D)** Fréquence des cellules ICOS⁺ parmi les Tfh³ issus des différentes populations LT CD4 **(E)** Fréquence des cellules CD40L⁺ parmi les Tfh³ issus des différentes populations LT CD4 **(F)** Intensité d'expression de CD28 sur les Tfh³ issus des différentes populations LT CD4 **(G)** Fréquence des cellules OX40L⁺ parmi les Tfh³ issus des différentes populations LT CD4 **(H)** Les populations LT CD4 *ex-vivo* et leur Tfh³ relatif ont été triés et mis avec des LB mémoires pendant 7 jours. La maturation, le maintien et la production d'immunoglobulines ont été mesurés. **(I)** Fréquence de plasmocytes CD27^{hi}CD38^{hi} obtenus parmi les LB (CD19⁺), maintien des LB et concentration d'immunoglobulines totales produites après co-cultures avec les différents LT CD4. **(J)** Concentration d'IgG1 et IgA mesurée dans les surnageants de co-cultures de Tfh³ avec des LB mémoires. Chaque point représente un donneur indépendant, n = 14. Test statistique de Wilcoxon, *p<0,05, **p<0,005, ***p <0,001.

II.2 Conclusion de l'axe II

Le suivi de la dynamique de plusieurs sous-types de LT CD4 dans un modèle reproduisant les différents stades de différenciation d'une réponse Tfh des tissus lymphoïdes nous a permis de mettre plusieurs voies possibles de génération de Tfh. En effet, nos résultats indiquent dans un environnement lymphoïde que l'expression des principaux marqueurs définissant un phénotype Tfh (CXCR5, PD-1, Bcl6, ICOS, CD28 et IL-21) est possible par les LT CD4 mémoires, en plus des LT CD4 naïfs. De plus, cette orientation vers un phénotype Tfh s'accompagne par la mise en place d'un programme transcriptionnel relatif à une orientation des réponses LT CD4 vers un profil Tfh, que ce soit dans les LT CD4 naïfs mais également dans les LT CD4 mémoires. Plus particulièrement, nos travaux suggèrent que la capacité de réorientation des LT CD4 mémoires vers un profil Tfh dépend de leur état d'activation. La repolarisation des LT CD4 mémoires activés vers un profil Tfh est plus rapide et est associée à un phénotype Tfh plus mature. Enfin, nos résultats indiquent que la diversité dans les phénotypes rapportée au sein de la réponse Tfh globale résulte de la contribution de différents sous-types de LT CD4. Cette diversité de phénotypes pourrait conduire à des réponses LB diverses.

III. Axe III : Étude de l'impact de l'infection VIH sur la génération des Tfh

III.1 Altérations de l'expression de gènes relatifs aux Tfh dans les LT CD4 naïfs et mémoires spléniques de patients chroniquement infectés par le VIH

Suite aux observations précédentes, la question de savoir si les voies de génération des Tfh précédemment décrites sont différemment modulées dans un contexte pathologique est légitime. L'infection par le VIH est un contexte pathologique qui se prête particulièrement à l'étude de cette question. Notre équipe a précédemment rapporté une augmentation des non-GC et GC Tfh dans

les rates de patients chroniquement infectés par le VIH et non traités²³³. Cette augmentation apparaît dans un contexte où les acteurs tissulaires, cellulaires et moléculaires orientant la réponse LT CD4 vers une réponse Tfh sont altérés.

Afin de mieux comprendre les processus biologiques liés à l'augmentation de Tfh chez les patients infectés chroniquement, nous avons dans un premier temps trié et analysé l'expression 96 gènes relatifs à la biologie des Tfh dans plusieurs sous-types de LT CD4 : naïfs, mémoires, non-GC et GC Tfh spléniques. Les variations d'expressions ont été mesurées par la technologie microfluidique, qui repose sur des PCR en temps réel sur cellule unique (Biomark, Fluidigm). Les 4 sous-types de LT CD4 : naïfs, mémoires non-Tfh, Tfh et GC-Tfh ont été triés selon la stratégie de sélection présentée en **Fig. 19 A**. Une baisse dans l'expression de FT associés à une promotion d'un phénotype Tfh est observée, tels que IRF4 dans les non-GC Tfh et FOXO3 dans les GC Tfh, le rôle de ce dernier dans la promotion d'un phénotype Tfh ayant été montré récemment³⁵⁹. Un défaut partagé d'expression d'ICOS est observé dans les Tfh qu'ils soient associés au GC ou non chez les patients chroniquement infectés, supportant le défaut dans la fonction d'aide aux LB. L'expression d'autres facteurs de transcription associés à d'autres Th et à une inhibition du phénotype Tfh (ID2, RUNX3, Tbx21, FOXO1) est augmentée dans les non-GC et GC Tfh des patients. L'augmentation d'expression de FOXO1 est partagée avec les LT CD4 mémoires non-Tfh alors que celles d>ID2 et de TBX21 sont partagées avec les LT CD4 naïfs. Le récepteur de localisation S1PR1 est plus fortement exprimé dans les Tfh des patients chroniquement infectés, alors qu'une diminution de l'expression de ce récepteur est nécessaire pour une génération de Tfh⁸¹. A l'inverse, l'expression de S1PR1 est diminuée dans les LT CD4 naïfs et mémoires, suggérant que ces sous-types pourraient s'orienter vers un profil Tfh. Confortant cette idée, des expressions plus fortes de Bcl6 et de MAF sont observées dans les LT CD4 mémoires chez les patients infectés. Ces variations d'expression apparaissent alors que certains axes de régulation pour le contrôle de l'établissement d'un phénotype Tfh tels que STAT5A¹⁰⁴ sont moins exprimés. L'expression BTLA régulant négativement l'interaction des Tfh avec les LB¹⁴⁸ est augmentée dans les Tfh et diminuée dans les LT CD4 mémoires de patients chroniquement (Fig. 19 B).

Ces données suggèrent que si les Tfh sont associés à une perte d'identité et de fonction, les expressions de certaines molécules favorisant le développement et la fonction Tfh sont anormalement élevées dans les LT CD4 mémoires issus de patients infectés, posant la question de leur possible contribution à la génération des Tfh.

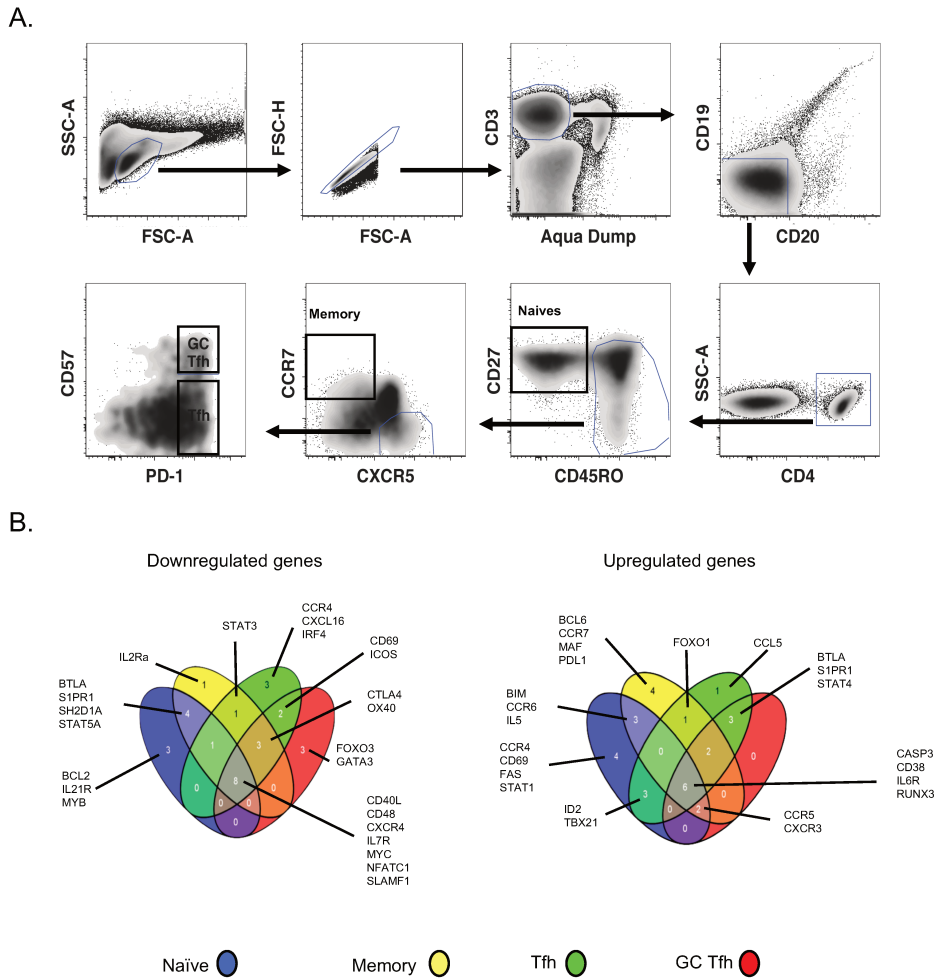


Figure 19 : Impact de l'infection par le VIH sur l'expression de gènes impliqués dans la génération de Tfh dans différents sous types de LT CD4 spléniques. (A) Les LT CD4 naïves, mémoires non Tfh, Tfh et GC Tfh ont été discriminés et triés selon leur niveau d'expression de CD27, CCR7, CXCR5, PD-1 et CD57. Les cellules sorties ont été analysées pour leur expression de 96 gènes sélectionnés impliqués dans la biologie des LT CD4, particulièrement Tfh, à l'aide d'une PCR en temps réel sur système microfluidique. Après nettoyage et normalisation des données, une analyse comparative statistique a été réalisée **(B)** Les gènes sous-exprimés et surexprimés dans les sous-types LT CD4 de patients infectés par le VIH, partagés ou non, sont représentés dans le diagramme de Venn. VIH⁻ = 4 ; VIH⁺ = 6

III.2 Étude des voies de générations des Tfh sous-infection VIH_{Yu2b} *in-vitro*

Tirant profit du modèle de stimulation et de culture de splénocytes, nous avons ensuite évalué la génération de Tfh sous une infection *in vitro*. Pour ce faire, nous avons exposé pendant 3 heures après stimulation les splénocytes à une souche de laboratoire Yu2b (à tropisme CCR5) et ceux-ci ont été cultivés comme précédemment, c'est à dire dans un contexte favorisant la génération de Tfh (**Fig. 20 A**). Une infection productive s'établit car la p24 est détectable dans les cellules par

cytométrie de flux après infection et n'est plus présente lorsque la culture est réalisée en présence d'antirétroviraux inhibant la transcriptase inverse (**Fig. 20 B**) sur tous les donneurs testés. Par ailleurs, une baisse de la fréquence des LT CD4 est observée en accord avec l'effet cytopathique du virus sur ces cellules (**Fig. 20 C**).

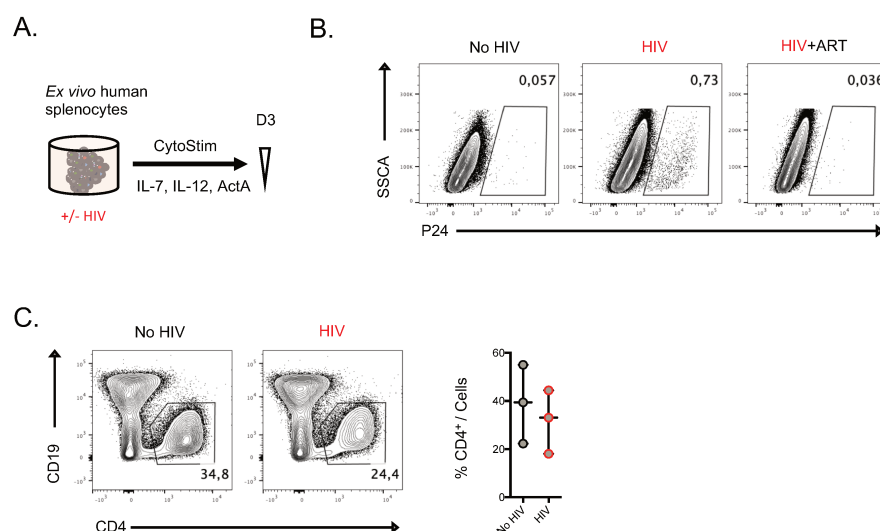


Figure 20 : L'infection par le VIH *in vitro* est productive dans les splénocytes et conduit à une baisse de la fréquence des LT CD4. (A) Après stimulation (CytoStim), les splénocytes ont été exposés à une souche de laboratoire (Yu2b). Les splénocytes ont ensuite été cultivés dans un milieu polarisant (IL-7, IL-12, Activine A) **(B)** Analyse de l'expression de p24 parmi les splénocytes après 3 jours de culture en condition non infectée et infectée, en présence ou non d'ART (inhibiteur transcriptase inverse) pour cette dernière **(C)** Analyse par cytométrie de flux et fréquence des LT CD4 dans la culture en présence de VIH ou non de splénocytes après 3 jours. Chaque point représente un donneur indépendant. Expérience représentative de 3 expériences réalisées sur les mêmes donneurs et reproductibles.

Afin d'investiguer l'impact du VIH_{Yu2b} sur les voies de génération des Tfh précédemment mises en évidence, nous avons réalisé un séquençage ARN sur les populations Tfh^{J3} générés à partir des différents sous-types LT CD4 (naïfs, memPD-1^{neg}, memPD-1^{pos} et Tfh). Après analyse multidimensionnelle des signatures transcriptomiques obtenues, nos résultats semblent indiquer un défaut dans le processus de l'établissement du phénotype Tfh puisque le profil transcriptomique des Tfh^{J3} générés sous infection *in vitro* se positionne entre celui des populations d'origine et celui des Tfh^{J3} générés sans VIH_{Yu2b} (**Fig. 21 A**).

En effet, des modulations dans l'expression de gènes impliqués dans la biologie Tfh (**Table I**) dans la transition de LT CD4 vers le profil Tfh sont observées dans le contexte d'infection *in vitro*. L'expression de TCF7 (codant pour TCF1) est diminuée dans la transition vers le profil Tfh pour tous les sous-types de LT CD4 dans la condition infectée (**Fig. 21 B**), suggérant un défaut dans la

mise en place du programme transcriptionnel Tfh puisque ce gène est impliqué dans l'expression précoce de Bcl6^{358,360}. De manière cohérente de nombreux FT impliqués dans l'établissement du phénotype Tfh sont différemment modulés dans l'infection. Une absence de baisse d'expression de BACH2 est présente pour les Tfh et les LT CD4 naïfs s'orientant vers le profil Tfh^{J3}, s'ajoutant à celle de Prkd2 pour ces derniers. A l'inverse, une absence d'augmentation d'expression de nombreux FT impliqués dans le développement de Tfh est observée. C'est le cas ZBTB7B dans la transition des memPD-1^{neg} et Tfh vers un profil Tfh^{J3}. Dans leur processus d'orientation vers un profil Tfh^{J3}, une absence d'augmentation de Bcl6 est observée pour les memPD-1^{neg}, de MAF pour les LT CD4 naïfs. Toutes ces données suggèrent de défauts dans l'établissement d'un programme transcriptionnel Tfh dans un contexte d'infection par le VIH. De manière intéressante, une absence d'augmentation de l'expression de STAT5A et PRDM1, deux molécules associées à l'inhibition d'un phénotype Tfh, est observée dans l'orientation des memPD-1^{pos} en condition infectieuse (**Fig. 21 B**). Une absence d'augmentation pour des molécules de co-stimulation tels que Ox40 (TNFRS4), CD28 est observée dans l'orientation de ces mêmes cellules vers un profil Tfh. Ces données montrent que le processus d'établissement d'un profil Tfh est qualitativement altéré dans les différents LT CD4 étudiés, suggérant que la génération des Tfh pourrait être quantitativement altérée. En traçant les population LT CD4, nous avons mis en évidence une augmentation significative de la fréquence des Tfh^{J3} dérivés de memPD-1^{neg} dans le contexte infectieux (**Fig. 21 C**). Bien que légère, cette augmentation sous-entend que l'infection par le VIH_{YU2b} pourrait moduler sélectivement la génération de Tfh à partir de différents LT CD4. De plus, si des défauts dans la mise en place des programmes transcriptionnels relatifs aux Tfh dans les différents sous-types LT CD4 apparaissent, la fréquence de Tfh^{J3} générée à partir de ces populations n'est pas réduite. Ces observations sous-entendent d'une génération de Tfh^{J3} au profil incomplet.

Comme les Tfh représentent un réservoir majeur de l'infection, nous avons ensuite évalué l'établissement d'infection productive dans les différents profils Tfh^{J3} générés. De manière intéressante, la fréquence de cellules p24⁺ est significativement plus importante parmi les Tfh^{J3} générés à partir de memPD-1^{neg} comparée à celle obtenue à partir de LT CD4 naïfs et memPD-1^{pos} (**Fig. 21 D**). La transition des memPD-1^{neg} vers un phénotype Tfh pourrait par conséquent s'avérer propice à l'établissement du réservoir viral, de manière plus importante que lors de l'orientation de LT CD4 naïfs et de memPD-1^{pos} vers un profil Tfh. Toutes ces données suggèrent que l'infection par le VIH_{YU2b} perturbe sélectivement la qualité, la quantité et l'établissement du réservoir dans la génération des Tfh suivant le sous-type LT CD4 précurseur.

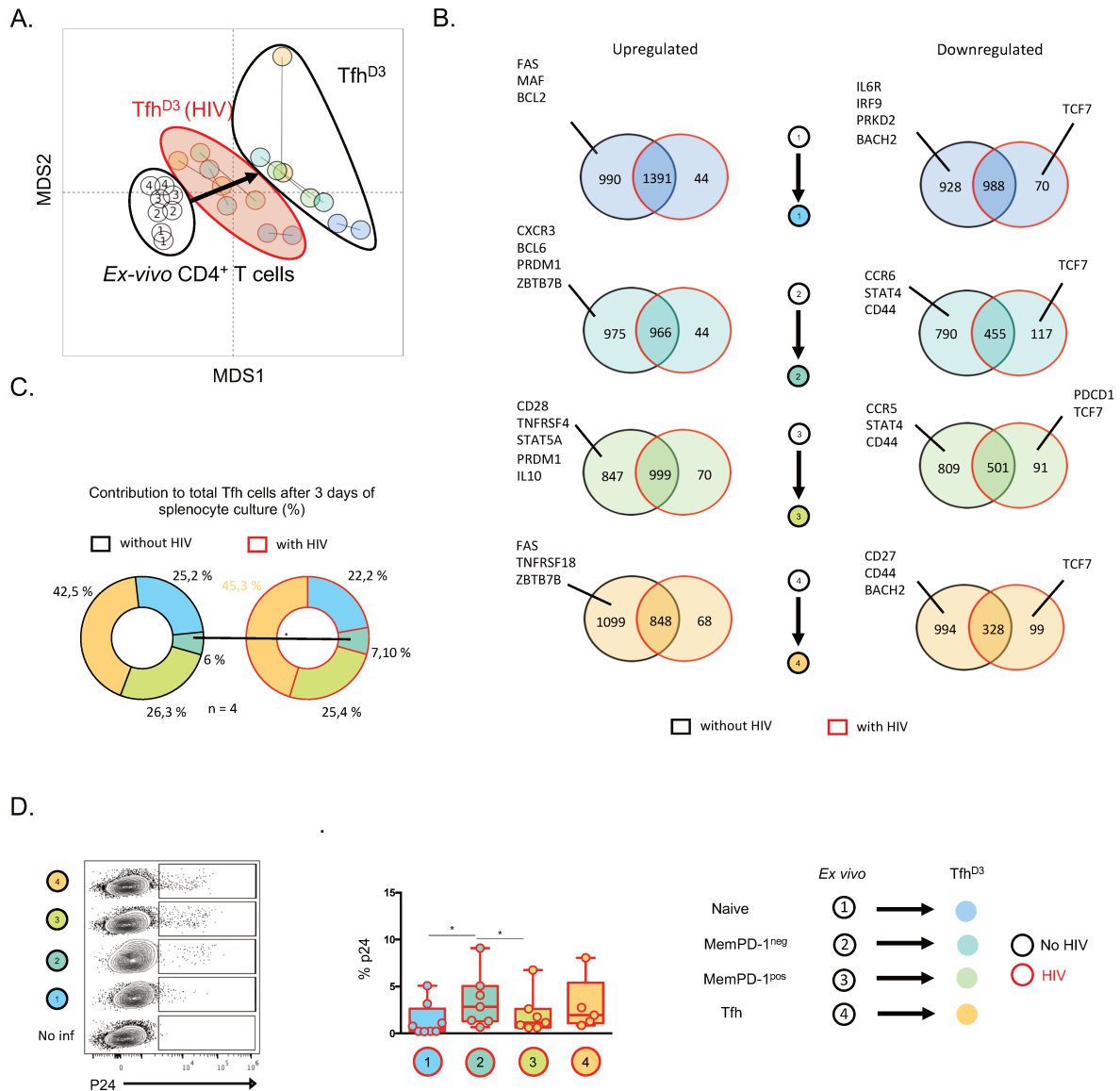


Figure 21 : L'infection *in vitro* par le VIH perturbe l'orientation des LT CD4 vers un profil Tfh. (A) Un séquençage ARN a été réalisé sur les Tfh^{D3} générés sous contexte d'infection par le VIH ou non. Une représentation multidimensionnelle a été réalisée afin de visualiser la proximité entre populations LT CD4 et Tfh^{D3} basée sur leur profil transcriptionnel **(B)** Diagrammes de Venn représentant les DEGs, dont l'expression est augmentée ou diminuée dans la transition de chacune des populations LT CD4 *ex-vivo* vers leur profil Tfh^{D3} respectif en contexte infectieux ou non. **(C)** Contribution de chaque population LT CD4 aux Tfh^{D3}. Les pourcentages affichés sont la moyenne de 4 expériences réalisées avec 4 donneurs différents **(D)** Analyse par cytométrie de flux et fréquence des cellules p24⁺ parmi les Tfh^{D3} générés à partir des différentes populations LT CD4. Chaque point représente un donneur indépendant. T-test apparié *p<0,05, **p<0,01 pour (C) ; test statistique de Wilcoxon pour (E), *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001.

III.3 Conclusion de l'axe III

A l'instar d'autres études scientifiques, notre équipe a précédemment rapporté une augmentation de Tfh dysfonctionnels dans les rates de patients infectés par le VIH. L'analyse de LT CD4

spléniques (naïfs, mémoires et Tfh) de patients chroniquement infectés montre que l'expression de gènes relatifs au développement des Tfh est modulée dans les différents sous-types. Plus particulièrement, les LT CD4 mémoires témoignent d'une expression exacerbée de gènes classiquement impliqués dans une orientation vers un profil Tfh. Ces données suggèrent qu'un programme Tfh est engagé dans les LT CD4 mémoires spléniques de patients infectés. A l'inverse, les Tfh présentent une identité moins aboutie chez les patients infectés, avec une expression plus faible de molécules communément associées à au profil Tfh. En parallèle, nos résultats *in vitro* montrent que la transition des LT CD4, qu'ils soient naïfs ou mémoires, vers un profil Tfh est perturbée après exposition à une souche virale. En effet, le profil des Tfh obtenu sous infection est intermédiaire en comparaison à une génération de Tfh sans infection, avec des défauts d'expression de gènes à la transition vers un profil Tfh. Ces données obtenues à partir du modèle *in vitro* suggèrent que le profil Tfh généré sous infection par le VIH n'est pas abouti, de manière cohérente avec l'observation précédente chez les patients. Par conséquent, le contexte infectieux peut moduler les voies de génération suivant le LT CD4 étudié (naïfs et mémoires), de manière quantitative et qualitative. Cela ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude de la causalité des variations quantitatives et qualitatives observées la génération des Tfh dans l'infection par le VIH. L'infection par le VIH pourrait favoriser l'orientation de LT CD4 mémoires vers un profil Tfh, tout en perturbant le programme transcriptionnel nécessaire à une transition vers ce profil.

MANUSCRIPT SOUMIS

En attente de soumission à “Journal of Experimental Medicine”, format Brief

Naïve and memory CD4⁺ T cell subsets from secondary lymphoid organs

contribute to the generation and heterogeneity of human Tfh cells

Raphaël Jeger-Madiot¹, Maud Heredia^{1,4}, Nicolas Tchitchek¹, Lisa Bertrand^{2,3}, Mathias Pereira^{2,3}, Océane Konza¹, Bruno Gouritin¹, Bénédicte Hoareau-Coudert⁴, Aurélien Corneau⁴, Catherine Blanc⁴, Adrien Six^{1,5}, David Klatzmann^{1,5}, Arnaud Moris^{2,3} and Stéphanie Graff-Dubois¹

Affiliations :

¹ Sorbonne Université, INSERM, UMRS 959, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (i3), Paris, France.

² Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell, 91198, Gif-sur-Yvette, France.

³ Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Center for Immunology and Microbial Infections, 75013, Paris, France.

⁴ INSERM UMS037 PASS, Cytometry facility (CyPS), Sorbonne Université, INSERM UMS037 PASS, Paris, France.

⁵ AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Biotherapy and Département Hospitalo-Universitaire Inflammation-Immunopathology-Biotherapy (i2B), Paris, France.

ABSTRACT

CD4⁺ T follicular helper cells (T_{fh}) promote B cell maturation and antibody production in secondary lymphoid organs. By using an innovative culture system based on Human splenocyte stimulation, we studied the dynamics of naïve and memory CD4⁺ T cells during the generation of a T_{fh} cell response. We find that both naïve and memory CD4⁺ T cells can acquire phenotypic and functional features of T_{fh} cells. Moreover, we show here that the transition of memory as well as naïve CD4⁺ T cell into T_{fh} cell profile is supported by the expression of pro-T_{fh} genes, including transcription factors known to orchestrate T_{fh} cell development. Regarding co-stimulatory molecules (ICOS, CD40L) and cytokine secretion (IL-21, IFN γ), our data suggest that phenotypic heterogeneity of T_{fh} cells results from the contribution of both naïve and memory CD4⁺ T cells. Finally, we provide pieces of evidence that HIV infection differentially alters these newly identified pathways of T_{fh} cell generation. Such a diversity in pathways of T_{fh} cell generation offers a new framework for the understanding of T_{fh} cell response heterogeneity under physiological and pathological contexts.

INTRODUCTION

Within germinal centers (GC), T follicular helper cells (Tfh) shape B cell responses by promoting the development of high-affinity antibodies, isotypic switch, and B cells maturation^{1,2}. Tfh cells are classically identified in secondary lymphoid organs (SLO) by the expression of CXCR5 and PD-1, which drive their positioning into SLO³. To control B cell maturation and GC maintenance, Tfh cells express costimulatory molecules including CD40L, ICOS and secrete cytokines such as IL-21 and IL-4¹. The establishment of Tfh phenotype is orchestrated by the transcription factor Bcl6⁴. Until recently, Tfh cell generation was mostly considered as a sequential process where Tfh cells arise after naive CD4⁺ T cell priming by dendritic cell (DC) in the T cell zone and acquisition, in the B cell zone, of full effector function following cognate interactions with B cells. However, several *in vitro* experiments showed that memory CD4⁺ T cells can acquire Tfh cell features upon stimulation⁵⁻⁷. Heterogeneous Tfh cell profiles might result from differential fates of naïve CD4⁺ T cells but also from cellular plasticity within other CD4⁺ T cell populations in lymphoid tissues. This is of particular interest regarding chronic diseases such as HIV infection, which is associated with architectural alterations of lymphoid tissues combined with CD4⁺ T cell exhaustion and depletion⁸. However, we previously reported a paradoxical increase of dysfunctional Tfh cells in chronically HIV-infected patients⁹.

Addressing pathways of Tfh cell generation is difficult in humans. Assuming that lymphoid cell cooperation synergize to generate Tfh cells, we developed an original culture system based on splenocyte stimulation. Using this strategy, we get a strong Tfh cell-like response including both non-GC and GC Tfh cells, as opposed to the use of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) which did not lead to generation of GC Tfh cells. Thanks to flow and mass cytometry combined with RNA sequencing, we found that naïve and memory CD4⁺ T cell subsets could differentiate towards a Tfh cell profile. Most importantly, the gain of Tfh cell phenotype by both naïve and memory CD4⁺ T cell subsets was associated with specific transcriptional reprogramming. The reprogramming of various CD4⁺ T cell subsets leads to distinct phenotypes of Tfh cells, with differential expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions. Finally, we showed that *in vitro* HIV infection modulates the acquisition of Tfh cell profile by naïve and memory CD4⁺ splenocytes subsets. Taken together our results indicate that the heterogeneity of Tfh cell responses likely reflects the differential contribution of several CD4⁺ T cell subsets to the Tfh cell pool. Our work provides a framework for the better understanding of human Tfh cell biology under physiological and pathogenic conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

Antigen-experienced splenocytes lead to the generation of Tfh cells. We first compare antigenic-like stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with that of splenocytes. Cell suspensions from healthy donors were stimulated using CytoStim (Miltenyi) that acts as a super-antigen and allows activation of T cells through TCR. Cells were then cultured for 3 days with IL-7, IL-12 and Activin A (**Fig. 1 A**), described as enhancers of Tfh cell generation¹⁰⁻¹³. For analysis, we discriminated Tfh cells on their amount of CXCR5 and PD-1 expression (**Fig. 1 A**), which reflects their anatomical localization in SLO and their level of maturation. As attested recently with histocytometry³, GC Tfh express high level of CXCR5 and PD-1 while non-GC Tfh are associated with a lower expression of these markers^{14,15}. Regarding splenocyte culture, the proportion of CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh cells was found doubled among CD4⁺T cells after 3 days (referred to as Tfh^{D3} hereafter) compared to *ex-vivo* splenocytes (referred to as Tfh^{ex-vivo} hereafter) (**Fig. 1 A and B**). More strikingly and in contrast to non-GC Tfh cells, GC Tfh cells greatly increased after antigen stimulation of splenocytes, while no such increment was obtained with PBMC stimulation (**Fig. 1 B**). Such an increase of GC Tfh cells strongly suggests that *in vitro* splenocytes stimulation reproduce a completed Tfh cell response occurring in an activated lymphoid environment, reminding the one of tonsils which are constantly exposed to antigens^{14,16}. Same observations were reported with the culture of cells from lymph nodes (not shown). Thus, the opportunity to interrogate Tfh cell biology appears more relevant with the stimulation of lymphoid cells. As reported for GC Tfh cells and non-GC Tfh cells from tonsils¹⁶, we found that GC Tfh^{D3} cells were preferentially associated with IL-21 secretion while their frequency was reduced among IFN γ secreting cells (**Fig. 1, C and D**). Coherently, Bcl6 expression was much more intense in GC Tfh^{D3} cells and non-GC Tfh^{D3} compared to non-Tfh cells (**Fig. 1 E**). No GC Tfh cells were generated without CytoStim showing that sustained TCR signal is needed (**Fig. S1 A and B**), as previously reported for the generation of GC Tfh cells¹⁷. Of note, GC Tfh^{D3} generation was potentialized by polarizing cytokines as their frequency was increased by 5.5% with the cytokine cocktail (**Fig. S1 A and B**). Moreover, the addition of the cytokine cocktail was required to induce IL-21 and ICOS expressions (**Fig. S1 C and D**). Hence, we designed a reproducible (n = 14 donors) experimental protocol that supports the establishment of a completed Tfh cell response.

To better characterize the phenotypic landscape of CD4⁺ T cells after splenocyte stimulation, we performed a deep immunophenotyping using mass cytometry with 27 different markers related to CD4⁺ T cell biology. A Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) representation

of the CD4⁺ T cells was performed. Using this representation, we defined two areas according to the intensity of CXCR5 expression (**Fig. 1 F**). We found that GC Tfh^{D3} cells were associated with a high co-expression of CXCR4, CD126 (IL-6R) and Fas (CD95) (**Fig. 1 G**), coherently with works showing an enhanced expression of these markers in tonsillar GC Tfh¹⁸. CXCR4 is involved with the positioning of Tfh cells in GC¹⁹ while CD126 plays a role in the maintenance of GC Tfh cell phenotype by keeping IL-2 hyporesponsiveness in mice²⁰. Clusters enriched in GC Tfh^{D3} cells were associated with higher memory phenotype including the expression of CD45RO while clusters enriched in non-GC Tfh^{D3} cells were associated with naïve phenotype displaying higher expression of CD45RA and CD62L (**Fig. 1 H**). We found that the expression levels of co-stimulatory molecules including CD40L, ICOS, CD28, OX40, BTLA and CD27 was variable in clusters enriched in non-GC Tfh^{D3} and GC Tfh^{D3} cell subsets (**Fig. 1 I**). Moreover, no overlap between expressions of costimulatory markers has been identified, suggesting a very diverse combination of phenotypes and functional heterogeneity. Regarding proliferation and activation markers, expression of KI67, CD38, HLADR, CD127 and CD25 was higher in clusters enriched in non-GC Tfh^{D3} compared to clusters enriched in GC Tfh^{D3} (**Fig. 1 J**). We also analysed the expression of CXCR3, usually associated to Th1 profile and thus to IFN γ production. Remarkably, the areas corresponding to GC Tfh^{D3} cells displayed clusters with reduced expression of CXCR3, as compared to non GC Tfh (**Fig. 1 K**), supporting our flow cytometry results showing that IFN γ producing cells are mostly related to non-GC Tfh^{D3} (**Fig. 1 C**). Overall, the deep immunophenotyping showed differential combination of co-stimulatory and activation molecule expression within each GC Tfh^{D3} and non-GC Tfh^{D3} cell subset.

Finally, we questioned the capacity of GC Tfh^{D3} to promote maturation of CD27^{hi}CD38^{hi} plasma cells. To this end, GC Tfh^{D3} and CXCR5⁺PD-1⁺ CD4⁺ T cells were sorted and co-cultured with autologous CD19⁺ B cells. After 7 days, compared with activated CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ cells, GC Tfh^{D3} sustained more efficiently CD27^{hi}CD38^{hi} plasma cell differentiation (**Fig. S1, E and F**). Altogether, these data indicate that GC Tfh^{D3} recapitulate phenotypically and functionally the features of *bona fide* Tfh cells. Thus, our experimental design appears suitable for the study of the dynamic of heterogenous Tfh cell responses consecutive to antigenic stimulation in lymphoid tissue.

Naïve and memory CD4⁺ T cells take different developmental pathways to become Tfh cells. We optimized our experimental design to monitor the evolution of distinct CD4⁺ T cell subsets in the lymphoid environment. We followed the dynamic of naïve CD4⁺ T cells and memory non-Tfh cells, as CD4⁺ T cell subsets exhibit phenotypic plasticity in response to environmental

stimuli. PD-1⁺ memory CD4⁺T cells (memPD-1^{pos}) were considered as activated cells while PD-1⁻ (memPD-1^{neg}) were defined as non-activated cells. Finally, we also studied the fate of Tfh cells that are mainly composed of non-GC Tfh *ex vivo* (**Fig. 2 A**). Each CD4⁺ T cell subset was isolated from whole splenocytes using flow cytometry, then labeled with trace violet (CTV) and re-incorporated into the negative fraction of splenocytes. Then, after splenocytes stimulation, we investigated the ability of the labeled CD4⁺ T cell subsets to express CXCR5 and PD-1 after 3 days of culture (n = 10 donors). Tfh^{*ex-vivo*} cells were still positive for expression of CXCR5 and PD-1 after 3 days of culture (**Fig. 2, C and D**). Remarkably, 27% ± 10.4 of naïve CD4⁺ T cells became Tfh cells after 3 days of culture. The proportion of Tfh^{D3} cells derived from memPD-1^{pos} cells was significantly higher (19.4% ± 4.8) than the one derived from memPD-1^{neg} cells (44.7% ± 20.9) (**Fig. 2, C and D**). This suggests differential contribution of memory CD4⁺ T cell to the Tfh cell pool according to their activation status.

Taking benefit of the CTV staining, we analyzed the expression of CXCR5 and PD-1 through the cell division cycles. First of all, the Tfh cells maintained their CXCR5 and PD-1 expression through all division cycles. Second, maximal percentage of Tfh^{D3} cells was reached after only one division cycle for memPD1^{pos} or Tfh cells, while three and two divisions were required for memPD1^{neg} cells and naïve CD4⁺ T cells, respectively (**Fig. 2 E**). These data demonstrate that Tfh^{D3} generation results from the transition of CD4⁺ T cells to Tfh cell profile and not from the outgrowth of a minor cell population. These findings are coherent with observations made in a murine model following specific antigenic stimulation in which acquisition of CXCR5 has been shown to be gradual through divisions of naïve CD4⁺ T cells²¹. Moreover, whatever the CD4⁺ T cells subsets, Bcl6 was more expressed in Tfh^{D3} cells as compared to non-Tfh cells derived from the same origin (**Fig. 2 F**), suggesting the induction of a transcriptional program for Tfh cell differentiation in all CD4⁺ T cell subsets.

To further define whether Tfh cell phenotype acquisition was associated with a Tfh-related genetic programming, we performed a transcriptomic analysis of *ex-vivo* isolated naïve, memory and Tfh CD4⁺ T cells and their Tfh^{D3} respective cell counterparts (n = 2 donors) (**Fig. 2 G**). During the transition from each CD4⁺ T cell subset to its respective Tfh^{D3} profile, numerous differentially expressed genes were identified : 3269 for Tfh cells, 3156 for memPD-1^{pos}, 3186 for memPD-1^{neg} and 4297 for naïve CD4⁺ T cells. Using gene set functional based on the KEGG and BioPlanet database, we found that major enriched pathways were associated with cell cycle, as reported for naïve and memory CD4⁺ T cells stimulated with CD3/CD28 beads compared to their respective

unstimulated counterparts²². We performed venn diagram representations to highlight overlap and specificities between sets of differentially expressed genes documented to be related to the Tfh cell biology (**Table 1**). A core of multiple genes involved in Tfh cell biology overlapped between the transition from *ex-vivo* CD4⁺ T cell subsets to their Tfh^{D3} cell relatives. Molecules involved in Tfh cell signaling as STAT1²³, in Tfh cell function as TNFRSF4 (Ox40), SLAMF1, CXCL13¹ and in Tfh cell transcription program as IRF4 and ZBTB7 (encoding for Thpok)^{24,25} were upregulated during the transition from *ex-vivo* CD4⁺ T cells to Tfh^{D3} cells. Molecules associated with Tfh cell regulation PRDM1 and IL2RA^{26,27} were also found upregulated, suggesting that establishment of Tfh cell program is concomitantly associated with expression of regulatory checkpoints. Additional Tfh cell transcription factors were exclusively upregulated for Tfh^{D3} cells derived from naïve and memPD-1^{neg} as MAF²⁸. Interestingly, Bcl6 was exclusively significantly upregulated in Tfh^{D3} cells derived from memPD1^{neg} cells. Regarding down-regulated genes, the transcription factors KLF2 and BACH2, two inhibitors of Tfh cell development^{4,29,30}, were found downregulated in the transition from each *ex-vivo* CD4⁺ T cell subsets to Tfh^{D3} cells. Tfh^{D3} cells derived from naïve CD4⁺ T cells were associated with downregulation of PRKD2, which inhibits the transition from naïve CD4⁺ T cells to Tfh cells³¹. CCR7 was downregulated in the transition from naïve CD4⁺ T cells to Tfh^{D3} cells, as previously reported¹⁵. Downregulation of STAT4, involved in Tfh/Th1 commitment, was shared between Tfh^{D3} cells derived from memory and from naïve CD4⁺ T cells. In sum, each CD4⁺ T cell subset is characterized by its own “original” transcriptional program, suggesting that the heterogeneous but specific Tfh cell profiles observed *in vitro* and *ex vivo* could be driven by the related CD4⁺ T cell subset.

Tfh cell origins sustain Tfh cell heterogeneity. To better characterize generated Tfh^{D3} cells, we first analyzed the intensity of CXCR5 expression, that mirrors Tfh cell maturation from non-GC to GC status. The lowest MFI was found in Tfh^{D3} cells deriving from naïve CD4⁺ T cells while the highest was obtained with Tfh^{D3} cells deriving from Tfh cells (**Fig. 3 A**). These data are in accordance with previous mass cytometry results regarding memory and naïve markers (**Fig. 1 I**). Interestingly, Tfh cells derived from memory CD4⁺ T cells expressed intermediate level of CXCR5 (**Fig. 3 A**). To test whether the level of CXCR5 expression might relate to specific functional profiles, we analyzed IL-21 and IFN γ secretion. Tfh^{D3} cells deriving from naïve CD4⁺ T cells were associated with more IFN γ secretion while Tfh^{D3} cell derived from Tfh cells were associated with abundant IL-21 secretion (**Fig. 3 B**). Cytokines secretion profile of Tfh^{D3} derived from memPD-1^{pos} was closer to the one derived from Tfh cells while Tfh^{D3} derived from memPD-1^{neg} harbor a cytokine secretion profile closer to the one derived from naïve CD4⁺ T cells. Coherently with study

showing that IFN γ secretion is related to the CXCR3 expression in tonsillar Tfh cells ¹⁶, we found that CXCR3 expression by Tfh^{D3} cells followed the same pattern of IFN γ secretion (**Fig. 3 C**). This higher expression of Th1 makers by Tfh^{D3} cells derived from naïve CD4⁺ T cells might reflect the hybrid Tfh/Th1 profile, described at early stage of Tfh cell differentiation ². Regarding ICOS expression, Tfh^{D3} cells deriving from naïve CD4⁺ T and memPD-1^{neg} cells were enriched in ICOS⁺ cells compared to Tfh^{D3} cells derived from memPD-1^{pos} and Tfh cells (**Fig. 3 C**). In mice, ICOS has been shown to be critical at early point for Tfh cell differentiation from a naïve CD4⁺ T cell commitment ³², which may explain this strong expression. We next evaluated expression of CD40L that is essential to the function of Tfh cells ¹ and for which we had observed expression heterogeneity in Tfh cell clusters (**Fig. 1 J**). CD40L expression followed the ICOS expression pattern, suggesting that Tfh^{D3} cells deriving from naïve CD4⁺ T and memPD-1^{neg} cells provide more costimulatory signals than the ones derived from memPD-1^{pos} and Tfh cells (**Fig. 3 D and E**). Overall our results suggest that the heterogeneous landscape of Tfh cells might result from the contribution of distinct naïve and memory CD4⁺ T cells to the global Tfh cell pool.

We next evaluated the functionality of Tfh^{D3} cells derived from the various CD4⁺ T cell subsets, focusing on B cell maturation, total immunoglobulin (Ig) production and B cell survival (**Fig. 3 F**). As compared to their naïve (*ex-vivo*) counterpart, Tfh^{D3} cells derived from naïve CD4⁺ T cells exhibited an increased capacity to provide signals required for B cell maturation and survival. Coherently with the increased frequency of CD27^{hi}CD38^{hi} plasma cells, Ig production was found higher in co-culture with Tfh^{D3} derived from naïve CD4⁺ T cells compared to their naïve counterpart (**Fig. 3 G**). Tfh^{D3} cells derived from memPD-1^{neg} and memPD-1^{pos} CD4⁺ T cells, that were grouped because of the limiting amount of memory cells available, were more efficient to help B cell survival than their precursors but did not promote higher B cell maturation and Ig production. Finally, Tfh^{D3} derived from Tfh cells showed similar capacities to provide B-cell help as compared to *ex-vivo* Tfh cells. Therefore, gain of B cell-help functions depend on the origin of Tfh cells. As Tfh^{D3} cells harbor phenotypic heterogeneous profiles, we hypothesized that distinct Tfh cell populations could promote distinct B cell responses. Thus, we measured Ig subtypes in the co-culture supernatant. Although we faced a great variability between donors (n = 9), we found that Tfh^{D3} cells derived from Tfh and memory CD4⁺ T cells induced a slight increase of IgG1 production in comparison with Tfh^{D3} cells derived from naïve CD4⁺ T cells (4-5 fold increase). Conversely, Tfh^{D3} cells derived from naïve CD4⁺ T cells were associated with the promotion of IgA production (1.8-2.8 fold increase) (**Fig. 3 H**). Altogether, these data suggest that naïve and memory CD4⁺ T cell

subsets contribute to the pool of Tfh cells resulting in the generation of heterogeneous Tfh functional profiles, that in turn, promote distinct B cell responses.

HIV(-1) infection shapes Tfh cell differentiation. In the context of HIV infection, others and we showed an accumulation of dysfunctional Tfh cells in SLO from chronically infected patients^{9,33}. Thus, we hypothesized that HIV infection provides a good model to assess whether and how the multiple pathways of Tfh generation are modulated in such infectious context. Stimulated splenocytes were exposed to HIV infection using a CCR5-tropic HIV-1 strain (HIV_{Yu2b}) (**Fig. 4 A**). First, we assessed that our protocol led to HIV_{Yu2b} infection of splenocytes by analyzing p24 expression (**Fig. 4 B**). Ranging from 0.15% to 2.97% of splenocytes were infected. p24⁺ cells were not detected in presence of reverse transcriptase inhibitor (not shown), indicating a productive infection. We then isolated the Tfh^{D3} cells generated under HIV_{Yu2b} infection and compared their transcriptome to uninfected controls (n=2 donors). A multidimensional scaling representation of the transcriptome revealed that HIV_{Yu2b} exposure strongly impacts the genetic program driving the Tfh cell differentiation. Tfh^{D3} cells generated under HIV_{Yu2b} infection showed an intermediate transcriptomic profile between *ex-vivo* CD4⁺ T cell subsets and Tfh^{D3} uninfected controls (**Fig. 4 C**). 990 genes were not upregulated in Tfh^{D3} cells derived from naïve T cells upon HIV_{Yu2b} infection compared to infection-free conditions (**Fig. 4 D**). An equivalent number of non-upregulated genes was found for other cell transitions from *ex-vivo* CD4⁺ T to Tfh^{D3} status. These genes were exclusive to each transition pathway suggesting that HIV_{Yu2b} infection selectively impacts the transcriptional program depending on the Tfh^{D3} cell precursor. Focusing on the expression of Tfh-related genes (**Table I**), we found that Tcf7, encoding for Tcf1 and involved in early induction of Bcl6^{34,35}, was downregulated under HIV_{Yu2b} infection in all CD4⁺ T cell transitions towards Tfh^{D3} profile (**Fig. 4 D**). During the transition from naïve CD4⁺ T cells to Tfh^{D3} profile under infection, we observed an absence of downregulation of PRDK2 and BACH2, two inhibitors of the Tfh cell program. Coherently, an absence of MAF upregulation was observed during the transition of naïve CD4⁺ T cells towards Tfh^{D3} cells, whereas this factor is implicated in early Tfh cell commitment after immunization²⁸. Similarly, we found an absence of upregulation of Bcl6, PRDM1, ZBTB7B (Thpok) in Tfh^{D3} cells derived from memPD-1^{neg} cells under infection. These results suggest that Tfh^{D3} cells derived from naïve CD4⁺ T cells and memPD-1^{neg} cells might harbor defective Tfh cell phenotype. Indeed, CD28, TNSFR4 (OX40) were not upregulated during the transition between memPD-1^{pos} cells and Tfh^{D3} cells (**Fig. 4 D**), which is in accordance with defective co-stimulatory functions reported on Tfh cells from chronically infected patients⁹. Absence of immune checkpoint in Tfh cells favors the emergence of low affinity B cells³⁶, showing that a lack of control

could lead to abnormal B cell responses. Hence, PDC1 was downregulated on Tfh^{D3} cells derived from memPD-1^{pos} cells. Moreover, STAT5A and PRDM1, key regulators Tfh cell development, were not upregulated under HIV infection in Tfh^{D3} derived from memPD-1^{pos} cells. Overall, our transcriptional analysis showed that Tfh cell developmental program and functions are altered under of HIV_{YU2b} infection, and that the effect of HIV infection on the Tfh^{D3} populations varies depending on their precursors. However, we did not observe major impact of infection on global Tfh cell abundance as well as regarding their origin after stimulation (**Fig. 4 E**). Lastly, we looked at the infectious status of each Tfh^{D3} cell and we found a preferential infection of Tfh cells derived from memPD-1^{neg} cells (**Fig. 4 F**), suggesting that these cells could preferentially contribute to the HIV reservoir. Interestingly, only memPD-1^{neg} cells were associated with upregulation of Bcl6 during transition towards Tfh in the absence of HIV (**Fig. 2 G**). Of note, Bcl6 expression was recently found to favor the maintenance of productive HIV infection³⁷. Altogether, these data suggest that quantitative and qualitative alterations observed in the Tfh cell compartment under HIV-1 infection could result from the differential impact of HIV infection on the various CD4⁺ T cell subsets endowed with specific capacities to differentiate into Tfh cells and to sustain HIV reservoir.

Conclusion. Integrating cellular and lymphoid molecular factors implicated in Tfh cell generation is challenging. We took advantage of antigen-experienced splenocytes for promoting Tfh cell responses which present similarities to those generated *in vivo*, as opposed to antigen-experienced PBMC. We showed that Tfh cell generation and heterogeneity rely on the origin of CD4⁺ T cells, naïve or memory. Interestingly, we found that the ability of activated memory CD4⁺ PD-1⁺ T cells to generate Tfh cells was higher in comparison with resting memory CD4⁺ PD-1⁻ T cells, showing that the capacity to generate Tfh cells differs according to the cell activation status. Moreover, our data suggest that Tfh cell heterogeneity drives differential B cell responses, despite we could not compare the function of Tfh cells derived from resting or activated memory CD4⁺ T cells. Contribution of various CD4⁺ T cells might favor heterogeneity in Tfh cell responses which in turn, might confer an evolutionary advantage in order to promptly sustain and diversify B cell responses. Of note, naïve T cells were associated with the generation of Tfh cell harboring a less mature phenotype compared to the one derived from memory CD4⁺ T cells. This could be due to a delay in the acquisition of Tfh cell features and/or the requirement of complementary signals to fully differentiate into GC Tfh cells. Unfortunately, the following of CD4⁺ T cell differentiation at later time points was not compatible with our experimental design. To evaluate whether pathways of Tfh cell generation are modulated under pathological lymphoid context, we focused on HIV

infection where qualitative and quantitative alteration of Tfh cells are reported. We found that HIV infection selectively impacts Tfh cell transcriptional programs, without impacting the yield of Tfh cell generation. Once again, later time point analysis could reveal Tfh cell quantitative alterations. Our work offers a new perspective for the comprehension of human Tfh cell generation, particularly in the context of lymphoid tissue alterations consecutive to chronic antigenic stimulation such as HIV infection.

MATERIAL AND METHODS

Spleen collection. Splens were obtained from healthy donors (n = 14). Informed consent and protocols were approved by the Biomedicine Agency. Fresh whole blood samples from healthy donors were obtained from the Etablissement Francais du Sang. All spleen samples included in the study were collected following national ethical guidelines regulating the use of human tissues.

Spleen processing and freezing. During delivery, splenic tissues were maintained at 15-22°C and RPMI 1640 (Thermo Fischer Scientific) supplemented with Penicillin-Streptomycin (100 U /ml, Thermo Fischer Scientific) was used as delivery medium. Splens were dilacerated mechanically in a culture dish containing RPMI with Penicillin-Streptomycin (100 U /ml, Thermo Fischer Scientific), filtrated on cell strainer (70 µm, Sigma Aldrich). After decantation, cell suspension was transferred in a 50 ml tube (Falcon) containing Pancoll (Pan Biotech) and centrifuged. Then, cells were washed twice with RPMI medium and frozen at -150°C in medium containing Foetal Bovine Serum (FBS) (Sigma Aldrich) containing 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich).

Splenocyte cultures. Cells were thawed and washed twice in pre-warm RPMI. Cells were resuspended in RPMI supplemented with 10% FBS , L-Glutamine 2 mM, penicillin 2 unit/ml, 1 mg/ml streptomycin (Complete RPMI) and DNase (10 ng/ml, Sigma Aldrich) overnight. Cells were washed and stimulated for 3 hours with CytoStim (Miltenyi, 2µl/1million cells) in complete RPMI at 37°C. After centrifugation, cells were resuspended in polarizing medium consisting in completed RPMI supplemented with 100 ng/ml Activin A, 5 ng/ml IL-12, 4 ng/ml IL-7 (Miltenyi, premium grade). Splenocytes were cultured in 24 well plate (Domnique Dutscher) at the concentration of 2 millions cells/1 ml/1 well for 3 days. For cell tracking experiment, CD4⁺ T cell subsets of interest were sorted, using a BD FACSAria II (BD bioscience). Then, CD4⁺ T cells stained with cell trace violet (Thermo Fischer Scientific) during 20 min at 37°C and mixed back with the conserved fraction containing all the others cells. The same protocol as before was applied.

Assessment of B cell help by T-B co-culture. CD4⁺ T cells of interest were isolated from *ex-vivo* or stimulated splenocytes using a BD FACSAria II (BD bioscience), with a yield of purity over 95%. Fresh autologous total or memory B cells were sorted (CD19⁺CD27⁺IgD⁻). 20 000 CD4⁺ T cells and 20 000 B cells were co-culture for seven days in presence of CytoStim. Medium of culture was containing ½ medium from previous splenocyte stimulation and ½ complete RPMI. After seven days, maturation of B cells (CD27 and CD38) was assessed by

flow cytometry and immunoglobulin concentrations were determined using Luminex with the antibody Isotyping 7-Plex Human ProcartaPlex™ Panel (ThermoFischer).

HIV production. Replicative HIV_{YU2b} lab strain (CCR5 tropic) was generated as previously (Cardinaud et al., 2017) by transfection of 293T cells with Calcium Phosphate Transfection kit (Sigma Aldrich). After transfection, cells were cultured in DMEM (Thermo Fischer Scientific) supplemented with 10% FBS, L-Glutamine 2 mM, penicillin 2 unit/ml, 1 mg/ml streptomycin. Supernatant containing HIV_{YU2b} were harvested 3 times every 12 hours from transfection. After centrifugation for removal of cellular debris, supernatants were filtered and then frozen at -80°C. The Gag-p24 content of all viral stocks was measured using an ELISA (PerkinElmer).

HIV infection of splenocytes. After CytoStim stimulation during 3 hours, splenocytes were exposed to HIV_{YU2b} at a concentration ranging from 150 to 700 ng/ml of p24 for 4 millions of splenocytes. Infections were done at 37°C for 3 hours in the presence of diethylaminomethyl (DEAE) – Dextran (Sigma Aldrich) at 4 ug /ml. Then, splenocytes were washed twice and then cultured for 3 days in polarizing medium as before.

Staining for flow cytometry and cell sorting. Before flow cytometry and cell sorting, splenocytes were systematically stained for cell viability using Viobility Dye (Miltenyi) at room temperature for 15 minutes. After two wash, splenocytes were stained in PBS 1X 5% FBS with antibody directed against chemokines receptor (CXCR5; CXCR3) (Miltenyi) for 10 minutes at 4°C. Splenocytes were washed and surface cell staining was performed (CD4, CD19, PD-1, ICOS) (Miltenyi). For detection of transcription factors (Bcl6), Foxp3 Fixation/Permeabilization kit (BD, bioscience) was used according to the manufacturer's instructions. For intra-cellular cytokine detection, cells were stimulated for 6h at 37°C with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma Aldrich 1ug/ml) and ionomycin (Sigma Aldrich, 1 ug/ml), brefeldin A was added after 1h of incubation (BFA, 5 ug/ml). Cells were fixed with the cytofix/cytoperm kit (BD bioscience) for detection of cytokines (IL-21, IFN γ and CD40L)(Miltenyi). Cells were analyzed on an LSR Fortessa Cell Analyzer (BD bioscience) or a CytoFLEX (Beckman Coulter). For cell sorting, cells were sorted using a BD FACSAria II (BD bioscience). For cell sorting, buffer of staining (PBS 1X 5% FBS) was supplemented in DNase (Sigma Aldrich) and EDTA (Thermo Fischer Scientific).

Mass cytometry profiling. Metal-conjugated antibodies are listed in **Table II**. Three million of cells per sample were stained. Cells viability was assessed by Cisplatin Cell-ID™ (Fluidigm). Cells

were washed with RPMI. Fc Block (Miltenyi) was diluted in staining buffer (SB) (PBS 1X, 5% FBS) and added to avoid unspecific staining, for 15 minutes at RT. After washing the cells, antibodies specific for chemokine markers (CXCR5, CXCR3, CXCR4, CCR5, CCR6, CCR7) were added in PBS 1X 5% FBS at room temperature for 15 minutes. Others membrane markers were next added (CD45, CD56, CD19, CD11b, CD8, CD4, CD45RA, CD62L, CD45RO, Tim-3, PD-1, CD25, Fas, HLADR ICOS, Ox40, CD28, BTLA, CD57, CD127, CD27, IL-1R1, IL-1R2) and splenocytes were incubated for 30 supplemental minutes at room temperature. After wash, splenocytes were fixed using PBS 1X containing 2% of paraformaldehyde (PFA) (Thermo Fischer Scientific) for 15 minutes at room temperature. After wash in SB, cells were resuspended in residual volume and incubated for 10 minutes on ice. One ml of -20°C methanol (Sigma Aldrich) was added for 10 minutes on ice. After wash, splenocytes were stained for intracellular markers (Foxp3, SH2D1a/SAP, CD40L, Ki67, CTLA4) for 60 minutes at room temperature. Then, splenocytes were washed and cellular DNA were stained with Cell-ID-Intercalator-Ir-125 μ M (Fluidigm) diluted in PBS 1X 2% PFA for 24 hours at 4°C. Samples were next frozen at) at -80°C and thawed before acquisition with Element EQ beads on Helios (Fluidigm) at the cytometry core facility of the Pitié-Salpêtrière.

Mass cytometry profiles were represented using the UMAP algorithm ³⁹ using default parameters. Cell clusters were identified using a k-means algorithm (k=50), and were represented using concave hulls.

Label	Target	Clone	Providers
89Y	CD45	HI30	Fluidigm
141Pr	CD196 (CCR6)	11A9	Fluidigm
142Nd	CD19	HIB19	Fluidigm
143Nd	CD45RA	HI100	Fluidigm
144Nd	CD38	HTT2	Fluidigm
145Nd	CD4	RPA-T4	Fluidigm
146Nd	CD8a	RPA-T8	Fluidigm
147Sm	CD195 (CCR5)	REA245 (IgG1)	Miltenyi
148Nd	CD197 (CCR7)	REA546	Fluidigm
149Sm	CD25 (IL-2R)	2A3	Fluidigm
150Nd	CD272 (BTLA)	Polyclonal (IgG)	RnD system
151Eu	CD278/ICOS	C398.4A	Fluidigm
152Sm	CD95/Fas	DX2	Fluidigm
153Er	Tim-3	F38- 2E2	Fluidigm
154Sm	IL1R1	Polyclonal (IgG)	RnD system
155Gd	CD279 (PD-1)	EH12.2H7	Fluidigm

156Gd	CD183 (CXCR3)	G025H7	Fluidigm
158Gd	CD134 (OX40)	ACT35	Fluidigm
159Tb	FoxP3	259D/C7	Fluidigm
160Gd	CD28	CD28.2	Fluidigm
161Dy	IL6Ralpha	REA291	Miltenyi
162Dy	CD27	L128	Fluidigm
163Dy	CD57	HCD57	Fluidigm
164Dy	CD45RO	UCHL1	Fluidigm
165Ho	CD127 (IL-7Ra)	A019D5	Fluidigm
166Er	IL1R2	34141	RnDsystems
167Er	SH2D1a	782702	RnDsystems
168Er	CD154 (CD40L)	24-31	Fluidigm
170Er	CD152 (CTLA-4)	14D3	Fluidigm
171Yb	CD185 (CXCR5)	RF8B2	Fluidigm
172Yb	Ki-67	B56	Fluidigm
173Yb	HLA-DR	L243	Fluidigm
174Yb	CD56 (NCAM)	REA196 (IgG1)	Miltenyi
175Lu	CD184 (CXCR4)	12G5	Fluidigm
176Yb	CD62L (L-selectin)	REA615	Miltenyi
209Bi	CD11b (Mac-1)	ICRF44	Fluidigm

Table II : CyTOF antibody listing : Manually coupled using Maxpar X8 Antibody Labeling Kit (Fluidigm), Coupled by the manufacturers

Transcriptomic profiling. Total RNA was purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). RNA integrity was assessed using TapeStation System (Agilent) and all RIN of analyzed samples were greater than 8. RNA was sequenced using Illumina Novaseq (Illumina, 80 millions reads per sample, length reads of 100 base pairs). Sequenced reads were trimmed for quality using Cutadapt⁴⁰ and aligned using Salmon⁴¹ on the Ensembl reference of the Human transcriptome (version GRCh38). Gene expressions were analyzed using DESeq2⁴² Functional enrichment analyses were performed using EnrichR⁴³.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pr. Brigitte Autran, Pr. Olivier Thaunat and Pr. Bertrand Bellier for discussions. This work was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS, n°ECTZ53265). We also thank INSERM and Sorbonne-Université for continuous support. The authors have no conflicting financial interests.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

SGD and RJM conceived the project, designed the experiments and wrote the manuscript. RJM performed the majority of experiments. MH contributed to experiments. LB and MP provided technical support. NT, OK, AS contributed to RNAseq analysis. NT contributed to mass cytometry analysis. BHC, AC and CB provided technical support for mass cytometry and cell sorting experiments. BG helped for cell sorting. MH, NT, DK and AM provided critical advices to the project and manuscript.

BIBLIOGRAPHY

1. Crotty, S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* **50**, 1132–1148 (2019).
2. Song, W. & Craft, J. T follicular helper cell heterogeneity: Time, space, and function. *Immunol. Rev.* **288**, 85–96 (2019).
3. Sayin, I. *et al.* Spatial distribution and function of T follicular regulatory cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* **215**, 1531–1542 (2018).
4. Choi, J. *et al.* Bcl-6 is the nexus transcription factor of T follicular helper cells via repressor-of-repressor circuits. *Nat. Immunol.* **21**, 777–789 (2020).
5. Jacquemin, C. *et al.* OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* **42**, 1159–1170 (2015).
6. Lu, K. T. *et al.* Functional and Epigenetic Studies Reveal Multistep Differentiation and Plasticity of In Vitro-Generated and In Vivo-Derived Follicular T Helper Cells. *Immunity* **35**, 622–632 (2011).
7. Pattarini, L. *et al.* TSLP-activated dendritic cells induce human T follicular helper cell differentiation through OX40-ligand. *J. Exp. Med.* **214**, 1529–1546 (2017).
8. Jeger-Madiot, R., Heredia, M. & Graff-Dubois, S. Germinal centers B-cell reaction and T follicular helper cells in response to HIV-1 infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* **1** (2019). doi:10.1097/COH.0000000000000557
9. Colineau, L. *et al.* HIV-Infected Spleens Present Altered Follicular Helper T Cell (Tfh) Subsets and Skewed B Cell Maturation. *PLoS One* (2015). doi:10.1371/journal.pone.0140978
10. Carnathan, D. G. *et al.* Harnessing Activin A Adjuvanticity to Promote Antibody Responses to BG505 HIV Envelope Trimers. *Front. Immunol.* **11**, 1–9 (2020).
11. Locci, M. *et al.* Activin A programs the differentiation of human TFH cells. *Nat. Immunol.*

- 17, 976–984 (2016).
12. Durand, M. *et al.* Human lymphoid organ cDC2 and macrophages play complementary roles in T follicular helper responses. *J. Exp. Med.* **216**, 1561–1581 (2019).
 13. Schmitt, N. *et al.* Human Dendritic Cells Induce the Differentiation of Interleukin-21-Producing T Follicular Helper-like Cells through Interleukin-12. *Immunity* **31**, 158–169 (2009).
 14. Vella, L. A. *et al.* T follicular helper cells in human efferent lymph retain lymphoid characteristics. *J. Clin. Invest.* **129**, 3185–3200 (2019).
 15. Haynes, N. M. *et al.* Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and Appearance of a Programmed Cell Death Gene-1 High Germinal Center-Associated Subpopulation. *J. Immunol.* **179**, 5099–5108 (2007).
 16. Brenna, E. *et al.* CD4+ T Follicular Helper Cells in Human Tonsils and Blood Are Clonally Convergent but Divergent from Non-Tfh CD4+ Cells. *Cell Rep.* **30**, 137-152.e5 (2020).
 17. Baumjohann, D. *et al.* Persistent Antigen and Germinal Center B Cells Sustain T Follicular Helper Cell Responses and Phenotype. *Immunity* **38**, 596–605 (2013).
 18. Ma, C. S. *et al.* Early commitment of naïve human CD4 + T cells to the T follicular helper (T FH) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol. Cell Biol.* **87**, 590–600 (2009).
 19. Weinstein, J. S. *et al.* TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat. Immunol.* **17**, 1197–1205 (2016).
 20. Papillion, A. *et al.* Inhibition of IL-2 responsiveness by IL-6 is required for the generation of GC-T FH cells. (2019).
 21. Baumjohann, D., Okada, T. & Ansel, K. M. Cutting Edge: Distinct Waves of BCL6 Expression during T Follicular Helper Cell Development. *J. Immunol.* **187**, 2089–2092 (2011).
 22. Cano-Gamez, E. *et al.* Single-cell transcriptomics identifies an effectorness gradient shaping the response of CD4+ T cells to cytokines. *Nat. Commun.* **11**, 1–15 (2020).
 23. Choi, Y. S., Eto, D., Yang, J. A., Lao, C. & Crotty, S. Cutting Edge: STAT1 Is Required for IL-6–Mediated Bcl6 Induction for Early Follicular Helper Cell Differentiation. *J. Immunol.* **190**, 3049–3053 (2013).
 24. Kwon, H. *et al.* Analysis of Interleukin-21-Induced Prdm1 Gene Regulation Reveals Functional Cooperation of STAT3 and IRF4 Transcription Factors. *Immunity* **31**, 941–952 (2009).
 25. Vacchio, M. S. *et al.* A Thpok-Directed Transcriptional Circuitry Promotes Bcl6 and Maf Expression to Orchestrate T Follicular Helper Differentiation. *Immunity* **51**, 465-478.e6 (2019).

26. Johnston, R. J. *et al.* Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science (80-.)*. **325**, 1006–1010 (2009).
27. DiToro, D. *et al.* Differential IL-2 expression defines developmental fates of follicular versus nonfollicular helper T cells. *Science (80-.)*. **361**, eaao2933 (2018).
28. Andris, F. *et al.* The transcription factor c-Maf promotes the differentiation of follicular helper T cells. *Front. Immunol.* **8**, 1–11 (2017).
29. Lee, J. Y. *et al.* The Transcription Factor KLF2 Restrains CD4+ T Follicular Helper Cell Differentiation. *Immunity* **42**, 252–264 (2015).
30. Lahmann, A. *et al.* Bach2 Controls T Follicular Helper Cells by Direct Repression of Bcl-6. *J. Immunol.* **202**, 2229–2239 (2019).
31. Misawa, T. *et al.* Mutual inhibition between Prkd2 and Bcl6 controls T follicular helper cell differentiation. *Sci. Immunol.* **5**, 1–14 (2020).
32. Choi, Y. S. *et al.* ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6. *Immunity* **34**, 932–946 (2011).
33. Cubas, R. A. *et al.* Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat. Med.* **19**, 494–499 (2013).
34. Xu, L. *et al.* The transcription factor TCF-1 initiates the differentiation of TFH cells during acute viral infection. *Nat. Immunol.* **16**, 991–999 (2015).
35. Choi, Y. S. *et al.* LEF-1 and TCF-1 orchestrate TFH differentiation by regulating differentiation circuits upstream of the transcriptional repressor Bcl6. *Nat. Immunol.* **16**, 980–990 (2015).
36. Mintz, M. A. *et al.* The HVEM-BTLA Axis Restrains T Cell Help to Germinal Center B Cells and Functions as a Cell-Extrinsic Suppressor in Lymphomagenesis. *Immunity* **51**, 310–323.e7 (2019).
37. Cai, Y. *et al.* BCL6 Inhibitor-Mediated Downregulation of Phosphorylated SAMHD1 and T Cell Activation Are Associated with Decreased HIV Infection and Reactivation. *J. Virol.* **93**, (2018).
38. Cardinaud, S. *et al.* Triggering of TLR-3, -4, NOD2, and DC-SIGN reduces viral replication and increases T-cell activation capacity of HIV-infected human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **47**, 818–829 (2017).
39. McInnes, L., Healy, J. & Melville, J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. (2018).
40. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads.

EMBnet.journal **17**, 10 (2011).

41. Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A. & Kingsford, C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat. Methods* **14**, 417–419 (2017).
42. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
43. Chen, E. Y. *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* **14**, 128 (2013).

FIGURE LEGENDS

Figure 1 legend

Figure 1 : Antigenic stimulation of Human splenic mononuclear cells induces heterogeneous Tfh cell subsets **(A)** Splenic mononuclear cells (splenocytes) and peripheral blood mononuclear cells were stimulated with CytoStim and cultured for 3 days in presence of cytokines (IL-7, IL-12, Activin A). Representative flow plots showing gating strategy allowing the identification of non-GC Tfh (CXCR5^{med}PD-1^{med}) and (CXCR5^{high}PD-1^{high}) GC Tfh among total Tfh (CXCR5⁺PD-1⁺) cells from *ex-vivo* splenocytes (left) and splenocytes cultured for 3 days (right) **(B)** Frequency of total Tfh cells, non-GC Tfh and GC Tfh cells among CD4⁺ T cells in *ex-vivo* and splenocytes cultured for 3 days (n=14), and GC Tfh cells among CD4⁺ T cells in PBMC cultured for 3 days **(D)** Representative flow plots showing IL-21 and IFN γ production by non-GC Tfh^{D3} and GC Tfh^{D3} cells 3 days after splenocyte stimulation **(E)** Frequency of IL-21 and/or IFN γ positive cells within non-GC Tfh^{D3} cells and GC Tfh^{D3} cells (n=9) **(F)** Representative flow plots showing gating strategy for analysis of Bcl6 expression into CD4⁺ T cells in GC Tfh^{D3}, non-GC Tfh^{D3} and CXCR5⁺PD-1⁻ CD4⁺ non-Tfh^{D3} cell subsets **(G-L)** Deep immunophenotyping was performed after 3 days of culture (n=4 independent donors). CD4⁺ T cell selection was based on the expression CD45, CD8, CD11c, CD56, CD19 and CD4. The Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) algorithm was used to represent the whole set of CD4⁺ T cells in a multiparametric manner. A k-means algorithm was used to identify clusters of cells having similar phenotypes. UMAP plots showing the intensity of expression for selected markers of each cell **(B-F)** Each symbol represents an individual donor (n = 9-14). Wilcoxon matched-pairs test was performed, *p<0,05, **p<0,005, ***p <0,001.

Figure 2 legend

Figure 2 : Naïve and memory CD4⁺ T cells can differentiate towards a Tfh cell profile **(A)** Representative flow plots showing gating strategy for the definition of four CD4⁺ T cell subsets from *ex-vivo* splenocytes : (1) naïve CD4⁺ CD45 RA⁺ T cells, (2) memory CD4⁺ CD45 RA⁻ PD-1⁻ T cells (MemPD-1^{neg}), (3) memory CD4⁺ CD45 RA⁻ PD-1⁺ T cells (MemPD-1^{pos}) and (4) Tfh cells **(B)** A day 0, CD4⁺ T cell subsets were sorted according the gating strategy presented in (A). Isolated CD4⁺ T cell subsets were stained with cell trace violet (CTV) and remix back to the negative cell fraction. Stimulation and culture next proceeded as previously described **(C)** Representative flow

plots showing CTV tracking for each stimulated CD4⁺ T cell subsets 3 days after antigenic stimulation (top), CXCR5 and PD-1 expression among CTV⁺ cells at day 3 (bottom) **(D)** Frequency of Tfh^{D3} cells among CTV⁺ CD4⁺ T cells **(E)** Frequency of Tfh^{D3} cells according to CTV⁺ CD4⁺ T cell division after stimulation **(F)** Representative histograms of Bcl6 expression for Tfh^{D3} (colored line) compared to CXCR5PD-1⁺ (black line) and CXCR5PD-1⁻ (grey line) derived from respective CD4⁺ T cell subsets naïve (blue), MemPD-1^{neg} (turquoise blue), MemPD-1^{pos} (green) and Tfh cells (orange) **(G)** RNA sequencing was performed on CD4⁺ T cell subsets (Day 0) and the corresponding derived Tfh^{D3} counterparts. Overlaps between expressions of genes specifically involved in Tfh cell biology during transition from *ex-vivo* CD4⁺ T cell subsets to Tfh^{D3} were studied using Venn diagrams (Table 1). (n=2) **(D-E)** Each symbol represents an individual donor (n = 10). Wilcoxon matched-pairs test was performed, *p<0,05, **p<0,005, ***p <0,001.

Figure 3 legend

Figure 3 : Tfh cell phenotype and B cell help associated functions depends of Tfh cell origin. **(A)** MFI of CXCR5 of Tfh^{D3} cells derived from the different labeled CD4⁺ T cell subsets (Fig. 2 A) (n=9) **(B)** Gating strategy using flow cytometry and frequency of IL-21 and/or IFN γ positive cells within Tfh^{D3} cells at day 3 (right panel) (n=9) **(C-E)** Representative flow plots showing gating strategy for CXCR3, ICOS, and CD40L expression by Tfh^{D3} cells (left panel) and frequency of CXCR3, ICOS, and CD40L positive cells among Tfh^{D3} cells at day 3 (right panel) (n=5) **(F)** *Ex-vivo* cells or their respective Tfh^{D3} counterparts obtained after 3 days of splenocyte culture are co-cultured with autologous B cells for 7 days. Box plot represent the frequency of CD27^{hi}CD38^{hi} plasma cells among CD19⁺ cells, the concentration of total immunoglobulins and the absolute number of alive B cells after co-culture (n = 8) **(F)** Quantification of IgG1, IgA and IgM in the co-cultures supernatants. **(A-F)** Each symbol represents an individual donor (n = 5 – 9). **(E)** Wilcoxon matched-pairs test was performed, *p<0,05, **p<0,005, ***p <0,001.

Figure 4 legend

Figure 4 : HIV infection shapes Tfh cell differentiation and functions. **(A)** After stimulation and before culture with polarizing cytokines (IL-7, IL-12, Activin A), splenocytes were exposed to a HIV lab strain (Yu2b). **(B)** Representative flow plots showing gating strategy for analysis of p24⁺ cells among splenocytes after 3 days of culture with or without HIV_{Yu2b}. **(C)** Transcriptome profiling via RNA sequencing was realized on Tfh^{D3} cell derived from distinct CD4⁺ T cell subsets

(naïves, memory and Tfh cells) without and with HIV (n = 2). Multidimensional scaling representation was performed to visualize similarities between different CD4⁺ T or Tfh^{D3} cells population based on their whole transcriptomes **(D)** Differentially expressed genes were identified between Tfh cells and their counterpart. Venn diagrams representing overlap in genes expressions between the list of downregulated and upregulated genes, and genes related to Tfh-cell biology (Table I) were sought **(E)** Contribution of each CD4⁺ T cell subset to total Tfh cell generated after 3 days of splenocyte culture (%). Data are plotted as mean percentage of contribution of each *ex-vivo* CD4⁺ T cells subsets (1) naïve CD4⁺ T cells (2)(3) memPD-1^{neg/pos} and (4) Tfh cells to total Tfh^{D3} cells after splenocyte culture (n=4) **(F)** Representative flow plot showing gating strategy and frequency of p24⁺ cells among Tfh^{D3} cells derived from each CD4⁺ T cell subset (n = 7)**(A-E)** Each symbol represents an individual donor (n = 4 – 7)**(C)** Paired student t-test was performed, *p<0,05, **p<0,01. **(E)** Wilcoxon matched-pairs test was performed, *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001.

Supplemental Figure 1

Supplemental Figure 1 : Lymphoid environment in polarizing conditions potentialize functional Tfh cell response **(A)** Representative flow plots showing CXCR5 and PD-1 expression on CD4⁺ T cells splenocytes unstimulated or stimulated with CytoStim and then cultured or absence of polarizing medium (IL-7, IL-12, Activin A) for 3 days. (n = 5 – 12) **(B)** Frequency of GC Tfh^{D3} cells among CD4⁺ T cells in conditions described in (C) **(C-D)** Frequency of IL-21 secreting cells (E) or ICOS⁺ cells among GC Tfh^{D3} cells generated in presence or no of polarizing cytokines. (n = 9-12) **(E)** After 3 days of antigenic stimulation, GC Tfh^{D3} and CXCR5⁺ PD-1⁺ CD4⁺ T cells were sorted and co-cultured with autologous CD19⁺ B cells for 7 days. Representative flow plots showing CD27 and CD38 expression on CD19⁺ cells after 7 days of culture. **(F)** Frequency of CD27 and CD38 positive cells among CD19⁺ cells (n = 9). Each symbol represents an individual sample from an independent donor. Wilcoxon matched-pairs test was performed, *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001.

Table I

Table I : Selected genes involved in Tfh cell biology. Based on literature, we reviewed several molecules which seminal role for Tfh cell development and function was shown.

FIGURES

FIGURE 1

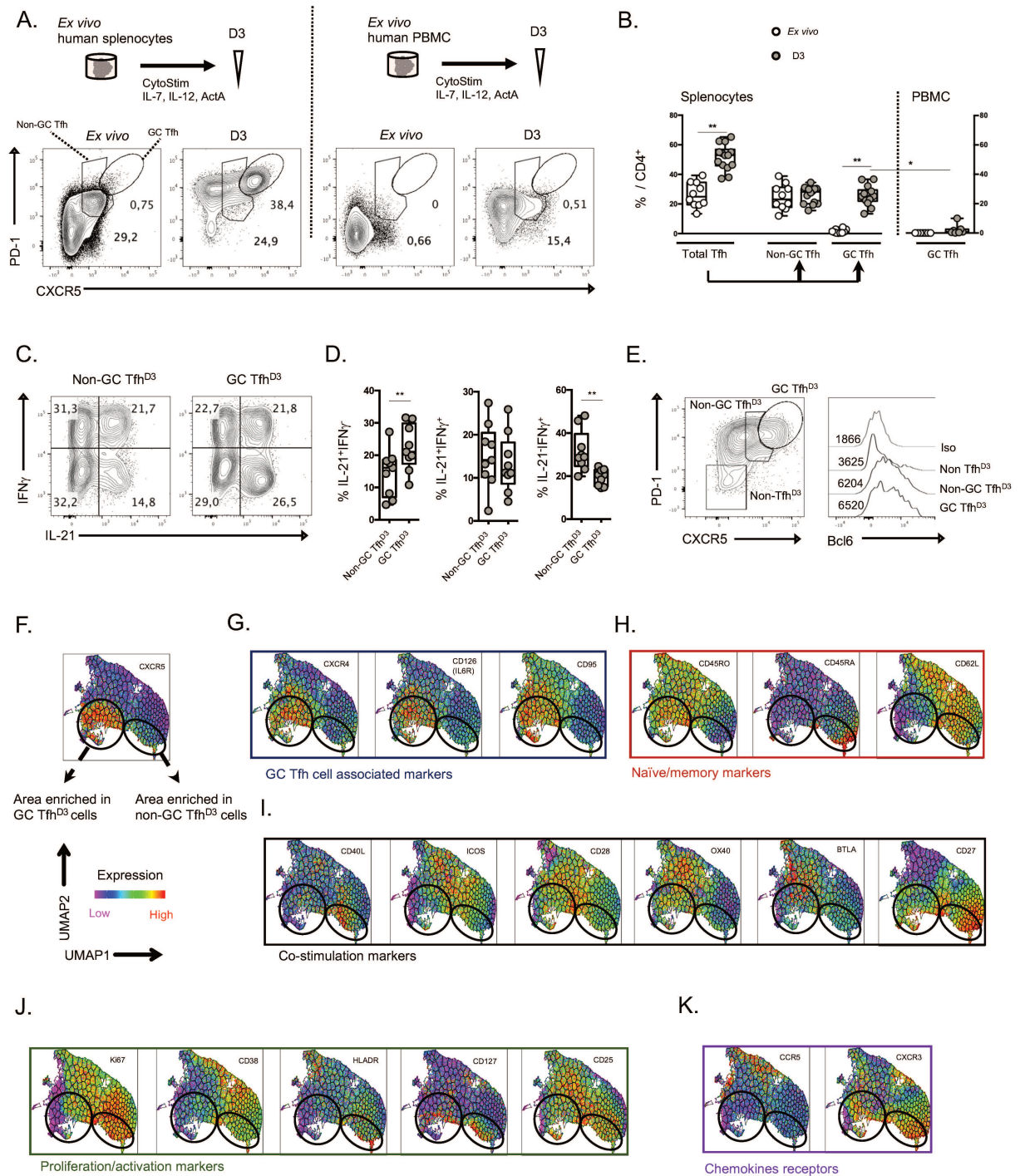


FIGURE 2

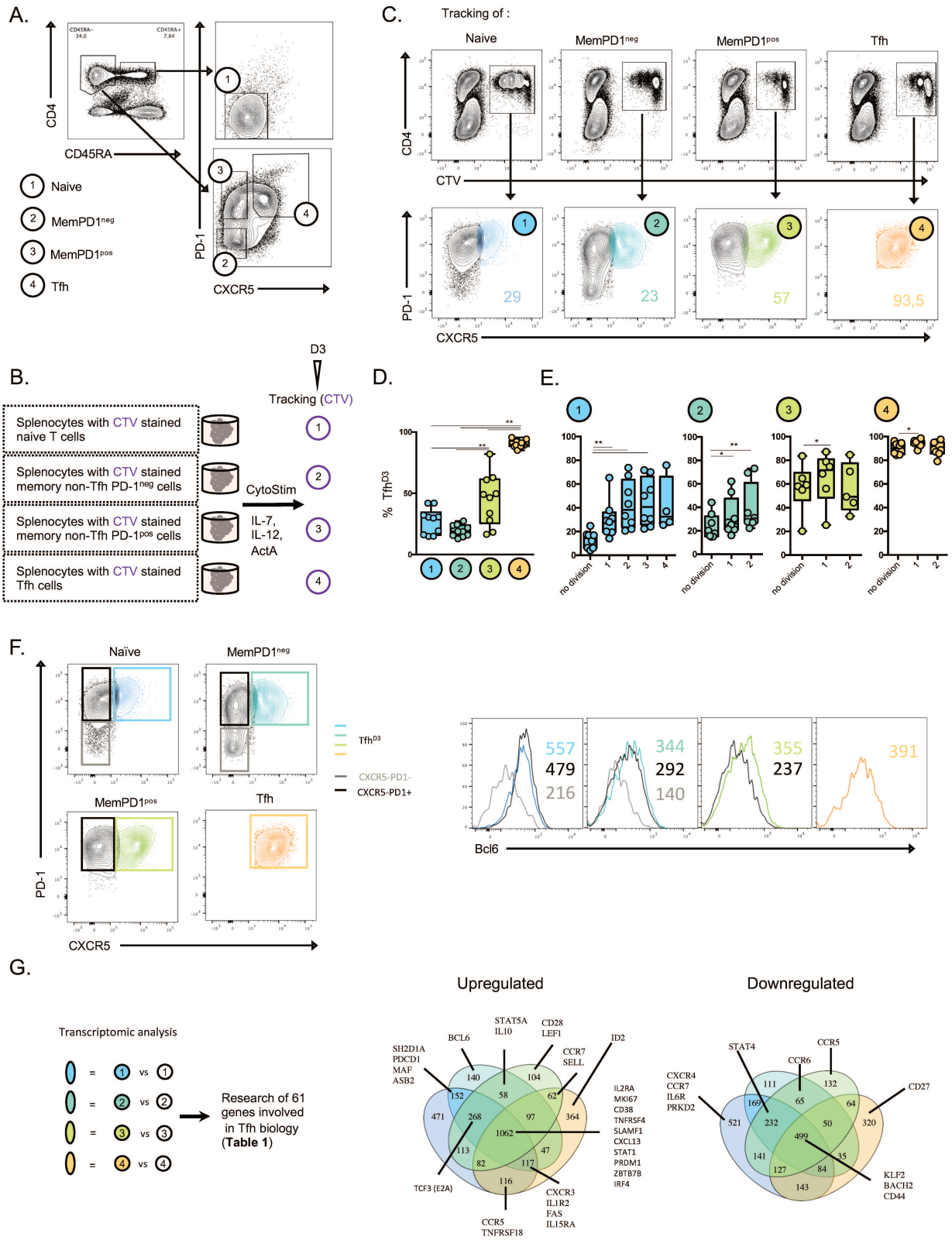
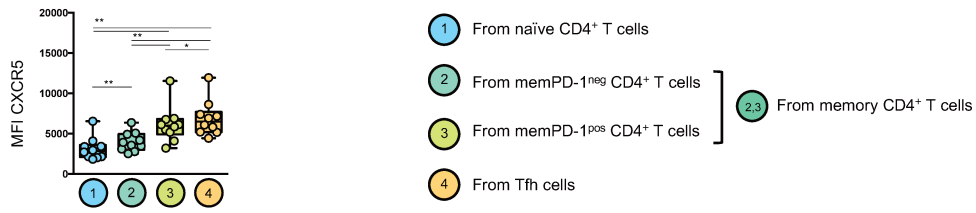
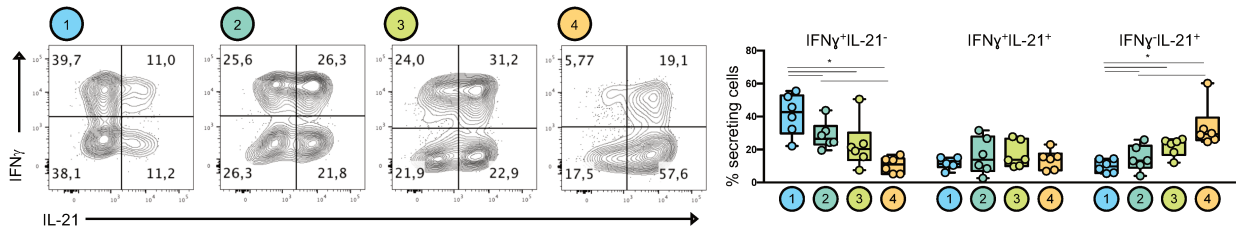


FIGURE 3

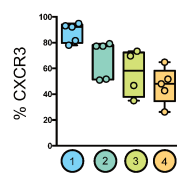
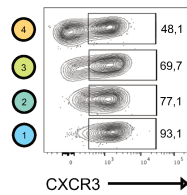
A.



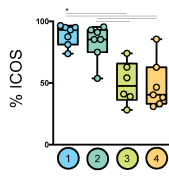
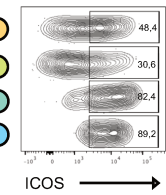
B.



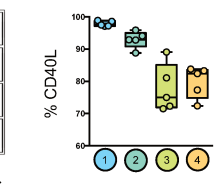
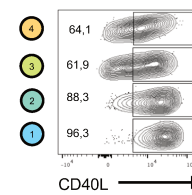
C.



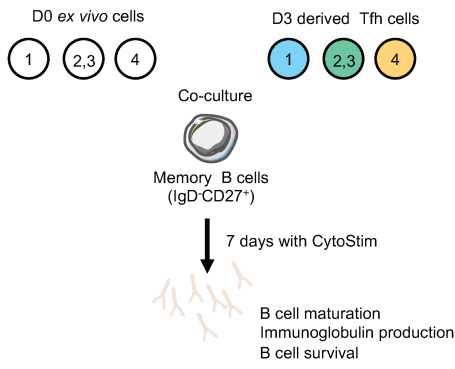
D.



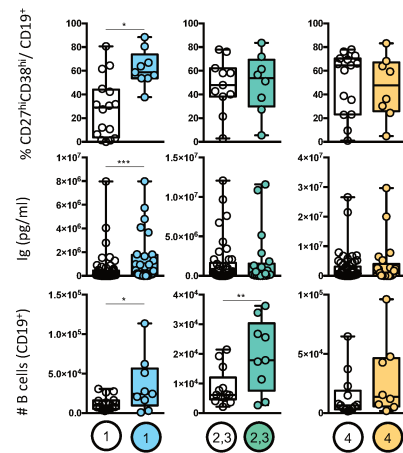
E.



F.



G.



H.

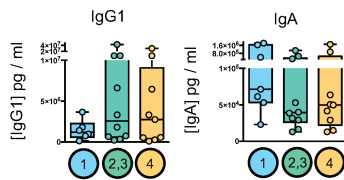
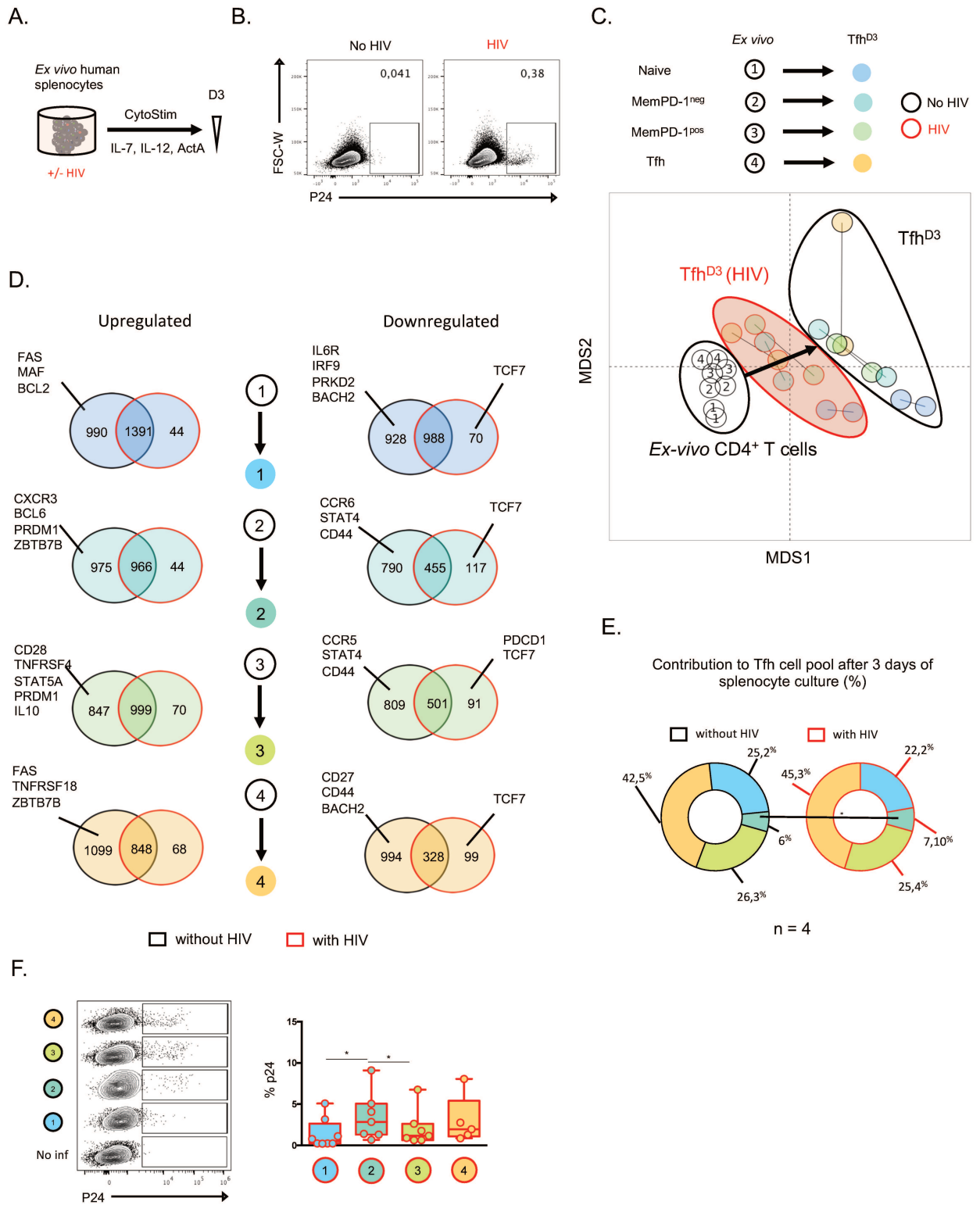


FIGURE 4



SUPPLEMENTAL FIGURE 1

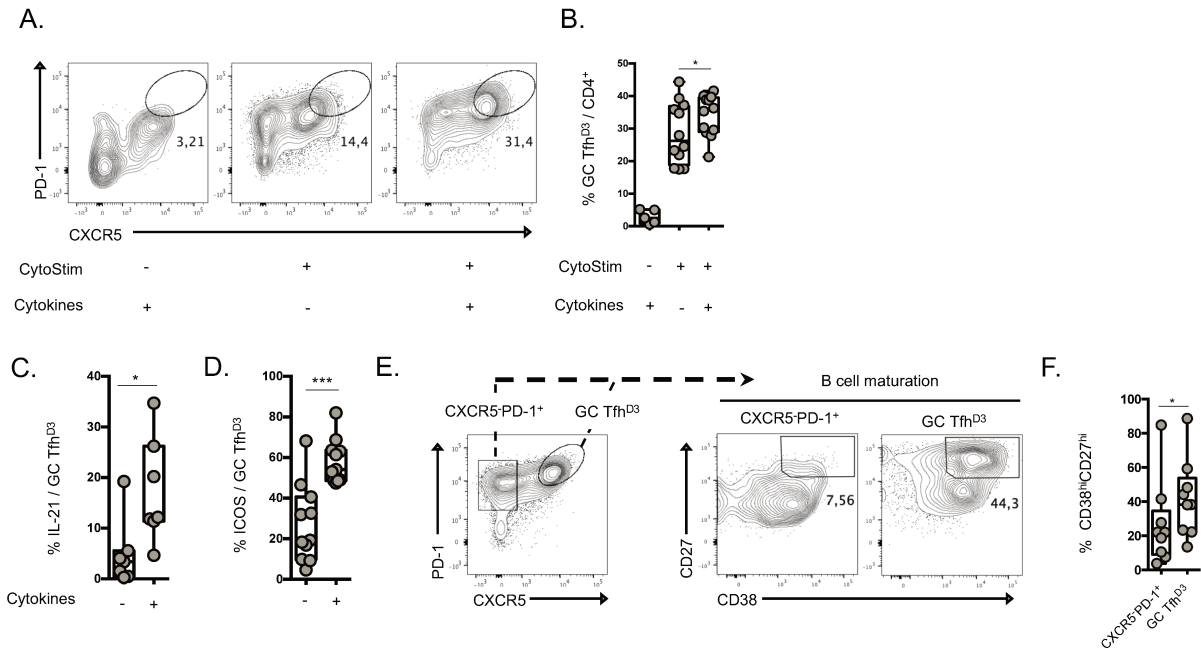


TABLE I

Transcription Factors			Functionality		Regulation	Positioning	Activation	Signaling
Tfh phenotype enhancers	Tfh phenotype repressors	Others	Cytokines/Chimiokines	Co-stimulation				
BCL6	PRDM1	FoxP3	IL21	ICOS	IL1R1	CCR5	IL7R	STAT1
BATF	FOXO1	TBX21	CXCL13	CD28	IL2RA	CXCR4	MKI67	STAT3
IRF4	KLF2	RORC	IFNG	CD40LG	BTLA	CCR6	CD38	STAT4
MAF	PRKD2	GATA3	TNF	CTLA4	PDCD1	CCR7	CD44	STAT5A
ZBTB7B (Thpok)	BACH2		IL2	SH2D1A (SAP)	IL1R2	CXCR3	CD69	
TOX2	ID2		IL10	TNFRSF4 (Ox40)	IL6R	CXCR5		
ASB2			IL13	CD27	FAS	SELL (CD62L)		
TCF3 (E2A)			IL4	SLAMF1		S1PR1		
TCF7 (TCF-1)				TNFRSF18 (GITR)				
LEF1								

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au sein des OLS, les Tfh sont hautement impliqués dans la mise en place de réponses LB efficaces. De fait, une meilleure compréhension des processus régissant leur génération est à fort potentiel scientifique et thérapeutique. Les aspects du développement des Tfh sont complexes car leur génération s'organise autour d'une multitude de signaux différents. Plus particulièrement, l'hétérogénéité phénotypique des réponses Tfh nous a conduit à penser que leur génération pouvait s'appuyer sur une plasticité cellulaire des LT CD4 mémoires. Cette hypothèse est particulièrement pertinente dans un contexte d'infection par le VIH, où les LT CD4 mémoires sont soumis à une persistance antigénique dans un environnement lymphoïde inflammé et altéré. Dans ce contexte, une accumulation inexplicée de Tfh dysfonctionnels est observée dans les OLS des patients chroniquement infectés. Dans ce travail, nous nous sommes attachés à mieux comprendre les voies de génération des Tfh chez l'Homme, dans un contexte physiologique et pathologique d'infection par le VIH.

Afin de répondre à cette problématique, nous avons développé un modèle d'étude inédit des réponses Tfh. Ce modèle repose sur la stimulation et la culture *in vitro* de cellules lymphoïdes humaines, plus particulièrement de splénocytes. Cette stimulation permet la génération de Tfh dont le phénotype se rapproche de celui observé dans les tissus lymphoïdes humains après stimulation antigénique. Ce nouvel outil offre aujourd'hui une alternative robuste pour l'étude du développement et de la fonction des Tfh humains. Ainsi, j'aimerais discuter dans un premier temps de sa complémentarité avec les autres approches aujourd'hui disponibles (Partie I).

Grâce à notre outil, nous avons pu étudier la dynamique de différentes populations LT CD4 lors de la génération de Tfh dans un environnement lymphoïde. Dans ce système intégrant l'environnement lymphoïde cellulaire et moléculaire, nos résultats montrent qu'une réponse Tfh peut être le fruit d'une orientation de LT CD4 naïfs et mémoires. Cette orientation vers un profil Tfh se traduit par l'expression des marqueurs canoniques relatifs à ce type cellulaire (CXCR5, PD-1, Bcl6, ICOS et IL-21) et est sous-tendue par l'établissement d'un programme transcriptionnel associé. Aussi, nos résultats suggèrent que la capacité à générer des Tfh diffère selon l'état d'activation des LT CD4 mémoires. Les LT CD4 mémoires activés, que nous avons désignés selon leur expression de PD-1, sont plus prompts à générer des Tfh hautement fonctionnels en comparaison à des LT CD4 mémoires non activés. Nos travaux soutiennent également l'idée que l'hétérogénéité phénotypique observée au sein d'une réponse Tfh globale résulte de la contribution des différents sous-types de LT CD4 naïfs et mémoires. Pour finir, nous faisons la preuve de concept que ces voies de génération de Tfh reposent sur la différenciation LT CD4 naïfs et

mémoires sont différenciellement modulées dans le contexte d'infection par le VIH. Mises en perspective de résultats visant à caractériser les LT CD4 spléniques de patients infectés chroniquement, mes observations apportent de nouvelles pistes quant aux causes de l'accumulation de Tfh dysfonctionnels dans les OLS de patients infectés par le VIH. Dans un second temps, ma discussion sera axée sur la pertinence d'une génération des Tfh basée sur une plasticité cellulaire *in vivo*, et ce particulièrement dans le contexte lymphoïde d'une infection par le VIH (Partie II).

Nous nous sommes concentrés dans ce travail sur l'étude de la contribution de différentes populations LT CD4 aux réponses Tfh. Nos travaux ouvrent également sur de nouvelles perspectives pour l'étude d'autres aspects fondamentaux de la génération des Tfh comme leurs partenaires cellulaires, leur régulation et leur cinétique. Par exemple, nos résultats mettent en évidence une dépendance aux LB pour la génération des Tfh. Par ailleurs, la réponse Tfh que nous générons ici semble s'accompagner d'une réponse régulatrice, avec la présence de LT CD4 CXCR5⁺PD-1⁺ exprimant le Foxp3 (Données non montrées). Cette observation est cohérente avec le gain d'expression de Blimp-1 que nous avons observé chez les populations Tfh obtenus à partir des différents sous-types de LT CD4 (**Résultats, II.1.a**). Cette population pourrait s'apparenter à des Tfr, ce qui offre une piste future pour l'étude de la régulation des réponses folliculaires. Dans une dernière partie, j'aimerais mettre en perspective ces différents aspects au regard de nos travaux (Partie III).

I. Quels outils pour l'étude de la génération des Tfh humains à l'avenir ?

La majorité des études sur le développement des Tfh humains est réalisée à l'aide de LT CD4 naïfs stimulés via un signal anti-CD3/CD28 et soumis à des cytokines purifiées, ou avec des co-cultures en présence de DC issues du sang. Avec comme critère initial de travailler avec des cellules résidentes des tissus lymphoïdes pour la génération de Tfh, nous avons testé 3 approches différentes : l'organoculture, la co-culture et la culture de cellules lymphoïdes. Au regard des limitations dues à la faible accessibilité des OLS humains, le développement d'un modèle d'étude de la biologie des Tfh humains reste un enjeu majeur pour la caractérisation de cette population. Dans cette partie, je replace mon travail à la lumière de travaux parus durant ma thèse et s'appuyant sur des approches analogues aux nôtres.

I.1 Organoculture

I.1.a Culture sur coupe d'organe

Lorsque l'on sait que la génération des Tfh dépend de territoires lymphoïdes précis, l'idée d'intégrer l'organe dans toutes ses dimensions dans un modèle d'étude est séduisante. Nous avons été confrontés à de nombreuses difficultés pour la mise au point de cultures de coupes de tissu splénique, avec une perte rapide de la viabilité cellulaire et une perte d'expression des molécules régissant le trafic cellulaire dans les OLS (**Résultats, I.1.a**). Un des freins à la réussite d'une culture de tissu splénique est probablement lié à l'activité métabolique de l'organe. En plus de son statut d'OLS, la rate assure des rôles dans la filtration des globules rouges ou le recyclage du fer. La culture d'organes sur des tissus à forte activité métabolique comme le rein ou le foie est connue pour être particulièrement difficile. Néanmoins, avec un protocole similaire à celui testé ici avec les coupes d'organes (**Résultats, I.1.a, Fig. 1 A**), un maintien de l'architecture et de la viabilité cellulaire splénique est possible pendant 48h avec des coupes de rate chez la souris. Si le ratio pulpe blanche/rouge est conservé, une baisse du pourcentage de LT CXCR4⁺ en comparaison au tissu frais est rapportée, laissant penser que le positionnement des LT pourrait être altéré. De manière intéressante, la réactivité cellulaire (mesure des cytokines produites) à un stimuli exogène (PMA/iono) est montrée³⁶¹, suggérant qu'une étude fonctionnelle sur les populations cellulaires spléniques est compatible avec ce type d'approche. Néanmoins, il est probable que les études cinétiques de la génération Tfh restent limitées à 48 heures avec ce genre d'approche, du fait d'une dégradation rapide de la viabilité cellulaire. A ma connaissance, seule une deuxième étude porte sur la culture de tissu splénique, avec la même stratégie de coupe splénique. Ces travaux impliquent l'ajout de supports biotechnologiques, avec un maillage de nanotubes en titane permettant de maintenir la structure splénique à partir de coupes pendant 5 jours. Peu de paramètres immunologiques sont cependant analysés dans cette étude³⁶². Une stratégie de coupe de tissu lymphoïde humain a par ailleurs été publiée récemment avec l'objectif d'y étudier la dynamique des Tfh. Sur des coupes d'adénoïdes humains, il a été montré pour la première fois l'interaction de Tfh entre eux à l'aide de microscopie confocale³⁶³, démontrant la faisabilité d'une culture de coupes d'organes lymphoïdes humains. Les adénoïdes, également appelés amygdales nasopharyngées, sont des structures lymphoïdes situées sur la paroi postérieure de la fosse nasale.

I.1.b Culture sur bloc d'organe

Très récemment, la réactivité des Tfh et LB a été comparée dans deux approches proches des nôtres, consistant en des suspensions de cellules lymphoïdes et des blocs d'organes issus d'adénoïdes. Les blocs d'adénoïdes ont été cultivés sur des matrices de collagène. Cette approche est identique à la deuxième stratégie de culture d'organe que nous avons eue (I.1.a. Fig. 2). Dans cette étude, en parallèle à la culture de bloc d'adénoïdes, des suspensions de cellules lymphoïdes issues du même organe ont été maintenues dans du milieu. A 3 jours de culture et sans stimulation, la viabilité cellulaire est plus faible dans les blocs avec 60% de mortalité en comparaison aux cellules en suspension où 20% de mortalité est observée. Lorsque de l'IL-4 ou du CD40L sont ajoutés dans le milieu de culture, un maintien des GC LB plus important est observé dans les suspensions cellulaires en comparaison aux blocs d'organes. Lorsque des inhibiteurs des voies JAK sont mis dans le milieu de culture, une baisse plus drastique de l'expression de Bcl6 est constatée dans les GC Tfh et GC LB issus des suspensions en comparaison aux blocs. De façon logique, une baisse de la fréquence des GC Tfh et GC LB est observée dans les suspensions cellulaires³⁶⁴. La plus faible modulation des populations Tfh et LB dans les blocs d'organes est probablement due à une pénétration moléculaire plus limitée et donc une accessibilité plus restreinte aux cellules lymphoïdes. Ces données font pencher la balance en faveur d'une utilisation de suspensions de cellules lymphoïdes pour l'étude de la génération des Tfh, qui nécessite un stimulus antigénique afin d'être initiée.

Une des questions majeures est de savoir si ces approches de culture de tissu lymphoïde sont compatibles avec des stimulations antigéniques, l'ajout de facteurs moléculaires ou encore des études à plus long terme. La culture d'organes lymphoïdes a un bel avenir devant elle et il y a fort à parier que nombreuses découvertes futures sur la biologie des Tfh reposeront sur notre capacité à développer ce type de système.

I.2 Co-culture

Notre système de culture permet l'intégration de multiples signaux cellulaires et moléculaires des tissus lymphoïdes requis pour la génération des Tfh. Cette approche présente les inconvénients de ses avantages, avec une perte de lisibilité due à la stimulation de suspensions cellulaires mixtes et complexes. Avec cette composition cellulaire complexe, la mise en évidence d'un effet moléculaire direct sur un type cellulaire est limitée. De même, la caractérisation précise des interactions régissant

un dialogue cellulaire donné (type DC-LT CD4 ou LT CD4-LB par exemple) n'est pas possible. Pour caractériser les effets moléculaires et les interactions cellulaires, les co-cultures sont et restent un outil puissant. Un exemple l'illustrant parfaitement vient d'une étude publiée récemment dans *Nature Immunology*. A partir d'un effet observé *in vitro* sur la génération des Tfh dans une co-culture de DC avec des LT CD4 naïfs, les chercheurs remontent le fil vers un effet *in vivo*. Dans une co-culture, des DC primaires ont une capacité à induire des Tfh à partir de LT CD4 naïfs plus importante si elles sont préalablement stimulées avec des bactéries vivantes plutôt que tuées. Cette stimulation passe par une reconnaissance des composants microbiens via le TLR8, qui induit la sécrétion d'IL-12 par la DC et donc la promotion de Tfh. Cette voie est également pertinente *in vivo*, car l'inoculation de bactéries vivantes à des porcs permet d'augmenter la proportion de Tfh générés (CXCR5, BCL6, IL-21) dans les ganglions et la rate à 30 jours. Bouclant la boucle, il est montré que les réponses vaccinales sont plus efficaces lorsque la voie dépendante du TLR8 est fonctionnelle chez des individus vaccinés au BCG, supportant une conservation de cette voie chez l'Homme¹²⁶. Cette étude illustre la pertinence des co-cultures, notamment pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Comme vu en introduction, les co-cultures permettent la décomposition des interactions régissant les communications cellulaires. Du fait de la diversité des moyens de communications entre cellules et de leur combinaison, une étude récente a relié à l'aide d'outils mathématiques et de résultats obtenus à partir de co-culture (i) les signaux intégrés par des DC, (ii) les signaux qu'elles transmettent au LT CD4 naïf et (iii) le profil cytokinique résultant du LT CD4¹²⁷. Il pourrait être judicieux de transposer ce genre d'approche en se focalisant sur (i) le développement et la modulation des Tfh dans un environnement lymphoïde soumis à différents modulateurs. Un lien pourrait être fait avec (ii) les différentes interactions impliquées dans le dialogue Tfh-LB et (iii) l'issue de la réponse LB (**Fig. 1**). Ce type d'étude pourrait permettre d'apporter un nouvel éclairage sur la communication entre les Tfh et les LB, qui reste à clarifier.

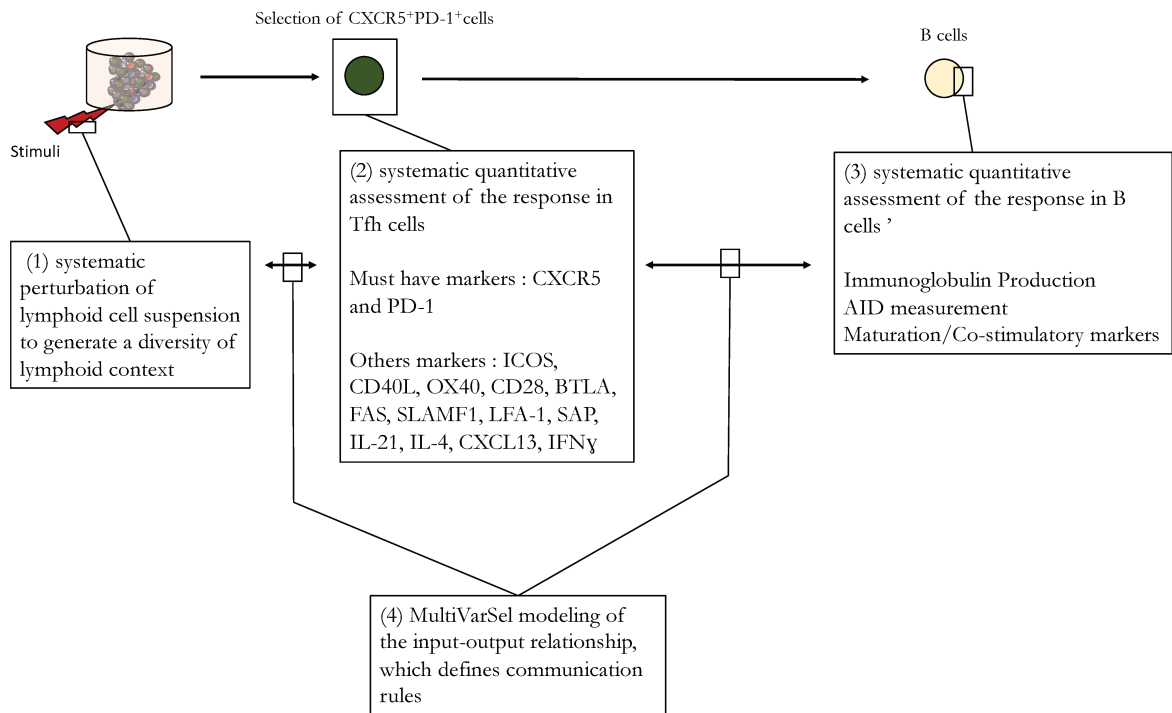


Figure 1 : Modèle d'intégration des signaux gouvernants la génération des Tfh, de leur impact sur le dialogue entre Tfh-LB et la réponse LB résultante. Basé sur ¹²⁷, où il est proposé un modèle dans lequel de nombreuses variables régissant les communications cellulaires entre les DC et les LT CD4 sont mesurées à la suite de différents stimuli de la DC. Les stimuli et les différentes communications cellulaires entre la DC et le LT CD4 sont ensuite corrélés au phénotype des LT CD4 résultant de la co-culture avec la DC. Ce genre d'approche pourrait être utile à l'avenir pour l'étude de la génération de profils Tfh dans un contexte lymphoïde soumis à différents modulateurs (1), des différentes variables liées aux dialogues Tfh-LB (2) et de l'issue des réponses LB (3). Les variables de la réponse LB étudiées pourraient être : la diversité de production des isotypes d'Ig (commutation de classe), la capacité d'hypermutation somatique (mesure de l'Activation-induced cytidine deaminase (AID)), et la maturation des LB. (4) Les variables mesurées pourraient ensuite être reliées entre elles à l'aide d'outils mathématiques.

I.3 Prélèvement des populations lymphoïdes avec une aspiration par aiguille

Une nouvelle approche pour l'étude des réponses Tfh *in situ* chez l'Homme s'inspire des techniques utilisées dans la médecine clinique pour les biopsies de ganglions anormaux. Habituellement, ces types de prélèvements sont peu utilisés pour monitorer les réponses immunes. La transposition de ces techniques pour l'étude des populations lymphoïdes a été faite récemment. Pour ce faire, les prélèvements sont obtenus grâce à l'aspiration de cellules résidentes des ganglions avec des aiguilles fines, dont le positionnement est guidé par des techniques ultrasonores. Testées comme preuve de concept chez des primates non humains, ces aspirations par aiguilles fines permettent une analyse quantitative et qualitative fiable des populations lymphoïdes. En effet, avec ce type de prélèvement,

les résultats de l'analyse des proportions cellulaires lymphoïdes (Tfh, LB) sont identiques à ceux obtenus sur des ganglions entiers^{365,366}. Cette approche a récemment été testée chez l'Homme (individus sains). Elle est relativement peu invasive, peu inconfortable et donc bien tolérée. Les suspensions cellulaires prélevées sont peu contaminées par des populations granulocytaires, ne polluant ainsi pas l'analyse des populations lymphoïdes³⁶⁷. Cette approche est à fort potentiel pour l'avenir et est compatible à celle que nous avons développé ici.

I.4 Nouvel outil proposé : Stimulation de cellules lymphoïdes

Dans ce travail, nous proposons un nouveau modèle d'étude de la génération des Tfh humains. Ce modèle repose sur la stimulation antigénique d'une culture de splénocytes. Notre choix de travailler sur du tissu splénique relève de l'expertise passée du laboratoire sur cet organe, notamment dans l'infection par le VIH. La question d'une utilisation de suspensions cellulaires issues d'autres tissus lymphoïdes est légitime puisque certains organes lymphoïdes sont relativement plus accessibles que les ganglions ou la rate, comme les amygdales ou les adénoïdes. Une des spécifications initiales pour notre modèle d'étude était de reproduire *in vitro* une réponse Tfh faisant suite à une activation antigénique. L'objectif sous-jacent était d'y étudier la dynamique des LT CD4 par la suite. Or, les amygdales et les adénoïdes ont le désavantage de présenter des réponses Tfh déjà hautement activées du fait d'une exposition constante aux antigènes des voies respiratoires. Dans des adénoïdes par exemple, la proportion de LT CD4 qui expriment le CXCR5 est considérable : 60% des LT CD4 sont CXCR5^{int} et 20% sont CXCR5^{hi}PD1^{hi}³⁶⁴. Par conséquent, cette « saturation » en Tfh laisse peu de place à l'étude d'une contribution des populations LT CD4 à la génération de Tfh. Dans notre étude, les tissus spléniques ne témoignent pas d'une forte réponse Tfh puisqu'ils abritent 20% de cellules non-GC Tfh et moins de 2% de cellules GC Tfh avant stimulation (**I.2.b.Fig. 8**). Confirmant cette absence d'activation, la sécrétion d'IL-21 par les Tfh spléniques est nulle et leur expression d'ICOS est très faible (Données non montrées). Ces observations ont fourni un argument supplémentaire pour l'utilisation de splénocytes en comparaison aux cellules lymphoïdes issues amygdales ou adénoïdes. En revanche, la génération d'une réponse Tfh à partir d'une stimulation de cellules lymphoïdes ganglionnaires aurait été intéressante à évaluer. L'obtention d'une génération de Tfh à partir de suspensions cellulaires issues de ganglions offrirait de belles perspectives d'étude car elle pourrait être combinée aux aspirations de suspensions cellulaires lymphoïdes par aiguilles décrites précédemment.

Nous montrons que la stimulation de splénocytes conduit à la génération d'une réponse Tfh présentant des similarités avec celle générée dans les OLS exposés à des antigènes. A 3 jours de stimulation, une forte représentation de GC Tfh (20%) et non-GC Tfh (20%) est observée parmi les LT CD4. A l'aide de la cytométrie de flux et de masse, nous retrouvons au sein de ces deux populations les variations d'expression de marqueurs observées dans les réponses Tfh *in vivo*^{177,353}. En effet, l'expression de CXCR5, de CXCR4, de l'IL-6R, de FAS et la sécrétion d'IL-21 est plus forte dans les GC Tfh générés en comparaison aux non-GC Tfh (**Résultats, I.2.b/f ; Fig. 8 et 15**). Ces résultats suggèrent que nous récapitulons *in vitro* la mise en place d'une réponse Tfh après stimulation antigénique, avec la présence des deux phénotypes associés : non-GC et GC. De plus, nous montrons que les GC Tfh générés aident préférentiellement à la maturation de LB en comparaison à des LT CD4 non-Tfh activés (PD-1⁺CXCR5). A l'issue d'une co-culture avec des LB mémoire, une survie et une fréquence plus forte de plasmocytes sont observées avec les GC Tfh générés en comparaison aux LT CD4 non-Tfh activés (**Résultats, I.2.c, Fig. 11**).

Notre approche permet de préserver les facteurs cellulaires et moléculaires lymphoïdes en gardant une maîtrise expérimentale des conditions de culture, comme l'ajout de modulateur de la réponse immune. L'intégration du contexte lymphoïde est un atout majeur puisque l'effet d'une cytokine sur un sous-type cellulaire, notamment LT CD4, dépend du contexte dans lequel elle se trouve⁵⁹. Ceci ne se confine probablement pas aux cytokines mais s'applique à tout élément (micro-organismes notamment) impliqués dans l'établissement d'une réponse immune. Notre système permet donc de rapporter les effets modulateurs d'un antigène ou d'une molécule sur la réponse immune, qu'il soit physiologique (cytokine) ou microbien (virus, bactéries, composant microbien) au plus près de l'environnement lymphoïde présent *in vivo*.

I.4.a Modulation moléculaire dans l'environnement lymphoïde

Dans ce travail, nous montrons l'apport de la combinaison de 3 cytokines (IL-7, IL-12, Activine A) pour la génération des Tfh. Si cette combinaison a déjà montré un effet promoteur pour l'orientation de LT CD4 naïfs vers un profil Tfh¹¹³, cet effet pro-Tfh sur d'autres populations de LT CD4 n'avait pas été décrit. Nous montrons que cette combinaison promeut la repolarisation de LT CD4 mémoires vers un profil Tfh ainsi que le maintien et l'activation de Tfh spléniques. De plus, nous intégrons l'effet de cette combinaison cytokinique à l'environnement cellulaire et moléculaire lymphoïde. Si l'effet promoteur de l'IL-12 et de l'activine A est intuitif au regard de la littérature, l'usage de l'IL-7 peut paraître paradoxal du fait d'une étude rapportant son effet

inhibiteur sur l'expression de gènes relatifs aux Tfh comme CXCR5 et Bcl6³⁶⁸. Néanmoins, l'inoculation d'un virus de la grippe inactivé adjuvantée avec de l'IL-7 permet l'augmentation du taux d'anticorps générés chez les souris immunisées, avec une plus forte génération de Tfh³⁶⁹. L'IL-7 est une cytokine des OLS produite par les FRC pour le maintien des LT CD4, ce qui peut suffire à justifier son usage. Nous n'avons observé aucun effet inhibiteur ou promoteur de l'IL-7 sur la génération des Tfh lorsque nous l'avons ajoutée seule dans la culture de splénocytes (Données non montrées). De manière cohérente à la fonction usuellement associée à cette cytokine, un effet bénéfique sur la survie des LT CD4 a été constaté (Données non montrées).

Nous confirmons le rôle modulateur de l'activine A dans les réponses Tfh chez l'Homme. Nous montrons un effet synergique de l'activine A combinée à l'IL-12 pour la génération de Tfh (**Résultats, I.2.d, Fig. 12**). De plus, nos données suggèrent que l'activine A promeut la sécrétion d'IL-21 par les Tfh (Données non montrées). Ces observations sur l'effet pro-Tfh de l'activine A sont cohérentes avec la littérature récente. Ajoutée à une formulation vaccinale chez des primates non humains, l'activine A permet d'induire une plus forte réponse Tfh, notamment avec la promotion d'un ratio GC-Tfh/Tfr plus important¹¹⁶. L'activine A est une cytokine de la famille du TGF β qui induit cependant une plus faible expression de Foxp3 que cette dernière¹¹³. Elle est produite par des cDC2 issues d'amygdales humaines et permet la sécrétion de CXCL13 par des LT CD4 naïfs¹¹⁵. La sécrétion de CXCL13 n'a pas été étudiée ici et l'inclure à l'avenir pour nos études serait pertinent.

D'autres combinaisons de cytokines auraient pu être testées et à d'autres concentrations. Du fait d'une contrainte de temps et de disponibilité des échantillons, le cocktail choisi dans ce travail est celui pour lequel nous avons obtenu une forte réponse Tfh avec une forte expression de molécules effectrices. Les cytokines sont des modulateurs de l'initiation des réponses LT CD4 naïfs et de la plasticité cellulaire des LT CD4 mémoires⁴⁶. De fait, la dynamique des LT CD4 naïfs et mémoires pourrait être différente dans des contextes cytokiniques différents, avec une variabilité dans leur capacité à générer des Tfh présentant un phénotype et des fonctions différents. Nos travaux fournissent déjà des pistes puisque nous observons par exemple une absence de génération de Tfh à partir de LT CD4 mémoires non-activés sans l'ajout de la combinaison de cytokines dans le milieu de culture. En revanche, la génération de Tfh à partir de LT CD4 mémoires activés apparaît sans les cytokines. Ces résultats sont la preuve de concept que les voies de génération des Tfh reposant sur l'orientation de LT CD4 naïfs et mémoires sont hautement modulables selon le contexte biologique, notamment cytokinique. Adresser la dynamique des différentes populations de LT CD4

soumises à différentes combinaisons cytokiniques dans l'environnement lymphoïde serait intéressant.

Dernièrement, nous avons validé le potentiel de notre approche pour l'étude d'une modulation de la génération des Tfh selon de nouveaux axes moléculaires. Dans notre laboratoire, un axe modulateur de la fonction des Tfh passant par l'IL-1 β a été identifié chez la souris. L'IL-1 β promeut la sécrétion d'IL-21 par les Tfh murins (**Fig. 2 A**). A l'aide de la stimulation de splénocytes humains, nous montrons que l'IL-1 β promeut également la sécrétion d'IL-21 par les Tfh humains générés (**Fig. 2 B**). Nous avons déjà des pistes concernant son effet sur les différentes voies de génération Tfh impliquant les LT CD4 naïfs et mémoires (Données non montrées). Ces travaux ouvrent la voie pour l'étude du rôle de l'IL-1 β sur le développement et la fonction des Tfh humains.

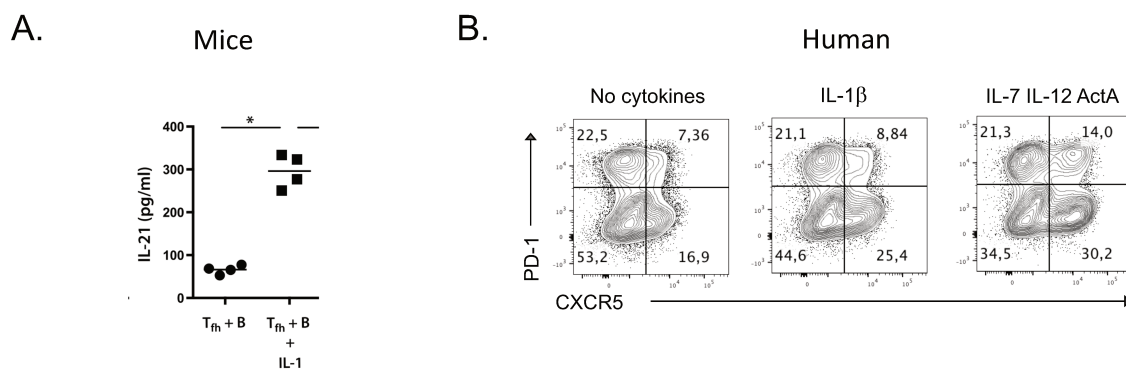


Figure 2 : Culture de suspensions cellulaires lymphoïdes pour l'étude de nouveaux axes modulateurs des Tfh. (A) Données tirées de travaux du laboratoire montrant une promotion de la sécrétion d'IL-21 par des Tfh soumis à de l'IL-1 β chez la souris¹⁶⁹ **(B)** Analyse de la sécrétion d'IL-21 par les Tfh générés *in vitro* à partir d'une stimulation et culture de splénocytes humains pendant 3 jours, sans cytokines, avec de l'IL-1 β ou de l'IL-7, IL-12 et activine A.

I.4.b Stimulation de cellules lymphoïdes issus de patients : exemple du VIH

Nos résultats indiquent que l'infection *in vitro* de suspensions de splénocytes par le VIH impacte fortement le développement des Tfh humains. En complément aux observations réalisées à partir de splénocytes de donneurs sains, nous avons testé la stimulation de splénocytes issus de patients chroniquement infectés (**Fig. 3 A et B**). Nous montrons que la génération de Tfh est possible suite à une stimulation de splénocytes issus de patients infectés (**Fig. 3 B**). Ainsi, des comparaisons entre les réponses Tfh générées à partir de splénocytes isolés dans différents contextes pathologiques et isolés à partir de tissus sains pourraient conduire à une meilleure compréhension de l'impact d'une pathologie infectieuse sur la génération de Tfh. Ces résultats sont particulièrement intéressants au

regard de la possibilité d'obtenir des cellules lymphoïdes grâce aux aspirations précédemment décrites.

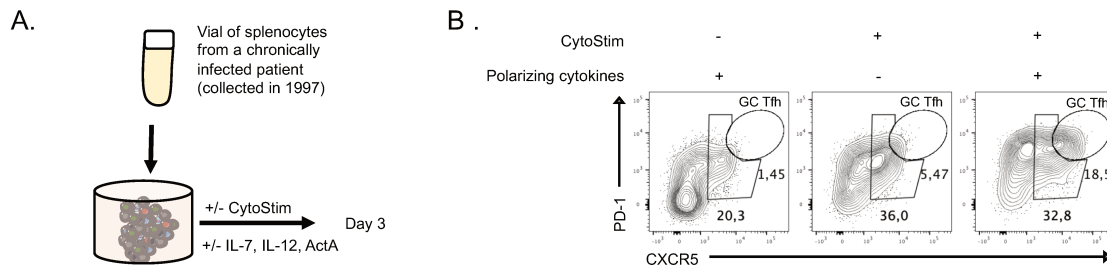


Figure 3 : Génération de Tfh à partir de cellules lymphoïdes issues de patients : exemple du VIH (A) Les splénocytes issus de patients chroniquement infectés par le VIH ont été stimulés ou non avec du CytoStim et cultivés pendant 3 jours en présence ou absence d'IL-7, d'IL-12 et d'actinine A **(B)** Analyse par cytométrie de flux des Tfh générés à 3 jours de la culture via l'expression de CXCR5 et PD-1.

I.4.c Génération d'une réponse Tfh spécifique d'un antigène

Dans ce travail, nous confirmons la nécessité d'un contact TCR-CMHII soutenu pour la génération de Tfh à partir d'une stimulation de splénocytes. Sans la liaison entre le TCR et le CMHII apportée par le superantigène, la génération de Tfh n'apparaît pas malgré la présence des cytokines polarisantes dans la culture. Cette donnée confirme le besoin d'une stimulation du TCR pour que les cytokines puissent guider l'orientation ou la repolarisation des différents types de LT CD4⁴⁶. Un des biais dans l'usage d'un super-antigène est qu'il induit un très fort signal, probablement peu physiologique. L'idée d'adresser la question de la repolarisation des LT CD4 mémoires vers un profil Tfh en intégrant la spécificité antigénique est particulièrement séduisante. Les variations dans l'intensité des signaux délivrés par le TCR façonnent les réponses LT CD4 et modulent la plasticité cellulaire⁴⁶. Nous avons envisagé une stratégie pour la mise en place d'une réponse Tfh spécifique d'un antigène et celle-ci me semble intéressante à exposer. Pour ce faire, nous avons évalué la positivité de donneurs pour le cytomégalovirus (CMV), infection chronique qui concerne environ 50% des individus. Une fois l'individu CMV⁺ identifié, notre volonté a été de générer une réponse Tfh spécifique en ajoutant la protéine pp65 du CMV à la culture de splénocytes. Avec ce protocole, nous n'avons pas mis en évidence de génération de Tfh à 3, 5 et 10 jours malgré l'établissement d'une réponse LT CD4 spécifique, attestée par la sécrétion d'IFN γ (Données non montrées). Des optimisations de protocoles sont nécessaires et valent la peine d'être poursuivies pour reproduire un signal TCR plus physiologique. La démonstration d'une repolarisation de LT CD4 mémoires vers un profil Tfh en condition de réponse spécifique d'un antigène serait un argument supplémentaire pour la génération de Tfh basée sur une plasticité cellulaire *in vivo*.

En résumé, l'ensemble des connaissances qui découleront de la complémentarité des différentes techniques citées dans cette partie permettront une meilleure compréhension de la biologie des Tfh (Fig. 4)

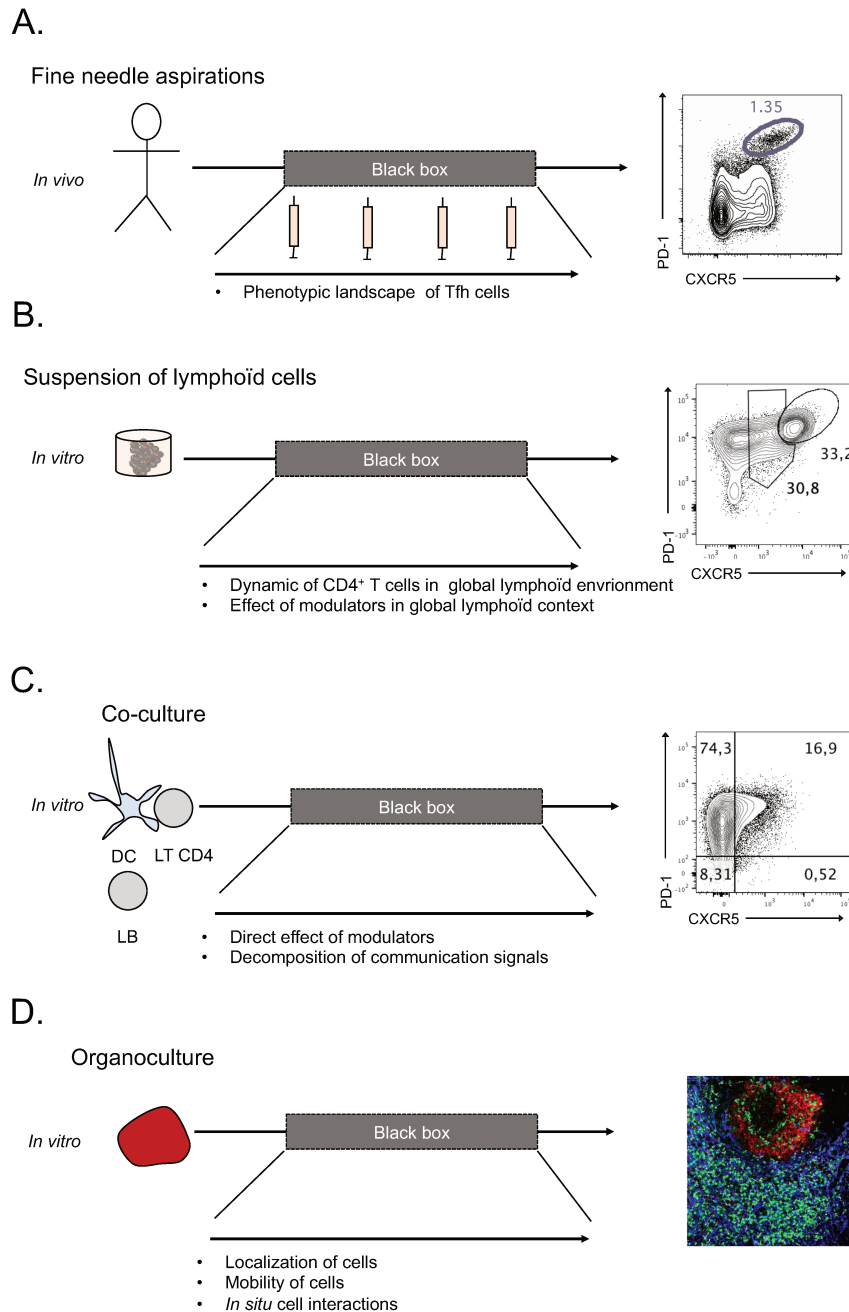


Figure 4 : Complémentarité des différentes approches pour l'étude de la biologie des Tfh. (A) Les aspirations par aiguilles fines pourront permettre de mieux caractériser le paysage phénotypique des réponses Tfh à différents temps chez des individus sains ou chez des patients. Marquage de Tfh sur des cellules lymphoïdes ganglionnaires obtenues par aspiration avec une aiguille fine³⁶⁷ **(B)** La génération de Tfh à partir d'une stimulation de cellules lymphoïdes pourra permettre de mieux déterminer la dynamique des LT CD4

et les effets de divers modulateurs dans un contexte lymphoïde conservé **(C)** Les co-cultures permettront la mise en évidence d'effets directs de modulateurs sur les populations cellulaires (DC, LB, LT CD4) et de la décomposition des interactions cellulaires impliquées dans les différents dialogue cellulaire **(D)** La culture d'organe permettra de mieux caractériser les comportements et interactions cellulaires *in situ*.

II. Rationnel d'une plasticité cellulaire pour la génération des Tfh *in vivo*

Par l'étude de la dynamique de LT CD4 naïfs et mémoires dans un environnement lymphoïde suite à une stimulation antigénique, nous avons montré que ces deux sous-types sont capables de s'orienter vers un profil Tfh. Nos résultats supportent l'idée selon laquelle différents sous-types LT CD4 (naïfs, mémoires non-activés et activés) soumis à un environnement lymphoïde peuvent acquérir des marqueurs relatifs aux Tfh (CXCR5, PD-1, ICOS, IL-21). Les signaux nécessaires pour l'acquisition de ces marqueurs et la capacité des différents LT CD4 à les acquérir sont cependant différents. Nous montrons qu'un signal TCR sans l'ajout de cytokines polarisantes suffit à induire l'expression de CXCR5 et PD-1 chez les LT CD4 mémoires activés. A l'inverse, l'expression de CXCR5 et de PD-1 par les LT CD4 naïfs et LT CD4 mémoires non-activés nécessite l'ajout du cocktail cytokinique polarisant. Ces observations suggèrent une « facilité » des LT CD4 mémoires activés à s'orienter vers un profil Tfh en comparaison aux autres LT CD4 étudiés. Appuyant cette hypothèse, un rendement plus important en Tfh est obtenu à partir de LT CD4 mémoires activés et leur phénotype se rapproche d'un phénotype Tfh associé au GC en comparaison aux LT CD4 naïfs et mémoires non activés.

Par une analyse transcriptomique, nous montrons que l'orientation de chacun des sous-types LT CD4 (naïfs, mémoires non-activés et activés) vers un profil Tfh s'appuie sur l'établissement d'un programme transcriptionnel associé. Dans la transition de chacun des LT CD4 vers son profil Tfh correspondant, l'expression de nombreux gènes favorisant le développement des Tfh est augmentée. A l'inverse, l'expression de nombreux gènes connus pour inhiber le développement des Tfh est diminuée. Ces observations montrent donc que la transition vers le phénotype Tfh s'accompagne bien d'un programme transcriptionnel connu pour favoriser ce profil effecteur. A ma connaissance, ces travaux sont les premiers montrant l'établissement d'une signature Tfh au niveau transcriptomique dans la transition de LT CD4 mémoires vers un profil Tfh chez l'Homme. Si les variations d'expressions de certains gènes sont partagées par toutes les transitions des LT CD4 vers le profil Tfh, d'autres ne le sont pas. Ces données montrent que durant la transition vers un profil Tfh, chaque LT CD4 établit un programme transcriptionnel qui lui est propre. Ce

programme transcriptionnel dépend probablement de l'identité « originale » du LT CD4, c'est à dire de sa capacité à intégrer les différents signaux environnementaux et à y répondre.

La plasticité des LT CD4 mémoires est souvent discutée car elle pourrait être le résultat d'une interprétation erronée, notamment de la prolifération exacerbée en réponse à la stimulation d'une population initialement faiblement représentée. Ici, le schéma expérimental qui repose sur un suivi des LT CD4 via un marqueur de prolifération nous permet d'exclure cette possibilité et d'affirmer que la population Tfh obtenues à partir des populations de LT CD4 mémoires implique leur repolarisation vers ce profil effecteur. Si la différenciation des LT CD4 naïfs vers un profil Tfh est connue, la repolarisation des LT CD4 mémoires est peu décrite. Transposer nos résultats *in vivo* et montrer que les réponses Tfh chez l'Homme peuvent s'appuyer sur une plasticité cellulaire est particulièrement difficile. Cette plasticité pourrait présenter un avantage évolutif des LT CD4 pour une réponse à des changements de l'environnement où l'antigène est présent, en vue de soutenir et diversifier rapidement les réponses LB. En effet, nos résultats montrent *in vitro* que l'hétérogénéité phénotypique au sein de la réponse Tfh générée est le reflet de la contribution des LT CD4 naïfs et mémoires à cette réponse. A l'inverse, la plasticité cellulaire pourrait être délétère dans des contextes pathologiques, notamment en cas d'une absence de contrôle des processus lymphoïdes impliqués dans la génération des Tfh. C'est le cas de l'infection par le VIH. J'aimerais exposer ici plusieurs arguments corroborant l'hypothèse d'une génération de Tfh *in vivo* basée sur une plasticité cellulaire, particulièrement dans le cadre de l'infection par le VIH.

II.1 Notion d'effectivité sous-jacente à l'hétérogénéité des réponses LT CD4, et Tfh ?

Une étude portant sur les réponses des LT CD4 naïfs et mémoires a récemment introduit la notion intéressante d'« effectorness », que je traduirai ici par effectivité. Cette effectivité reflète *« le potentiel des cellules à initier une réponse rapide et robuste à la stimulation, c'est-à-dire que les cellules qui expriment plus de chimiokines et de cytokines à l'état de repos seront capables de les sécréter rapidement après stimulation »*. Les LT CD4 peuvent être hiérarchisés selon cette effectivité. L'analyse transcriptomique en cellule unique de LT CD4 du sang permet la mise en évidence d'un continuum, allant de la population la moins effectrice à la plus effectrice (naïfs → Tcm → Tem → Temra). Il est montré *in vitro* que l'effectivité détermine les réponses des LT CD4 vis à vis d'une stimulation antigénique et de différents contextes cytokiniques. En conclusion de ces travaux, l'effectivité est avancée comme sous-jacente à la capacité d'adaptation des LT CD4 à l'environnement local lors d'une migration dans les tissus.

Il est supposé que les LT CD4 présentant une forte effectivité sont plus à même de répondre à l'environnement local du tissu dans lequel ils migrent⁵⁸.

Au vu de nos résultats, l'hypothèse d'une génération de réponses Tfh basées sur cette notion d'effectivité lymphocytaire apparaît séduisante. En effet, les différentes capacités des LT CD4 à s'orienter vers un profil Tfh pourrait être le reflet d'effectivité lymphocytaire plus ou moins forte. Nos résultats indiquent que les LT CD4 mémoires activés, définis via l'expression du PD-1, sont plus prompts à générer des Tfh au phénotype mature en comparaison aux LT CD4 mémoires non activés. Les LT CD4 mémoires non-activés conduisent quant à eux à la génération de Tfh au phénotype plus mature que ceux dérivés de LT CD4 naïfs. Dans un environnement lymphoïde, la capacité d'orientation vers un profil Tfh mature est donc graduellement plus importante partant des LT CD4 naïfs → LT CD4 mémoires non activés → LT CD4 mémoires activés. De fait, si l'on considère que la capacité d'adaptation à un environnement est le reflet de l'effectivité lymphocytaire, celle-ci devrait être graduellement plus importante partant des LT CD4 naïfs → LT CD4 mémoires non activés → LT CD4 mémoires activés. Plusieurs éléments viennent appuyer cette hypothèse. Premièrement, nous observons une capacité de prolifération plus faible pour les LT CD4 mémoires activés en comparaison aux LT CD4 non activés et aux LT CD4 naïfs (Données non montrées). Or, la synthèse ribosomale et les capacités prolifératives corréler négativement avec l'expression de cytokines, chimiokines et de granzymes³⁷⁰, autrement nommée ici effectivité. Deuxièmement, l'effectivité est inversement proportionnelle à la diversité clonotypique (répertoire TCR) retrouvée dans la population de LT CD4⁵⁸. Les LT CD4 naïfs se caractérisent par une diversité clonotypique plus grande que les LT CD4 mémoires, et donc par une effectivité plus faible. Notre définition de l'activation des LT CD4 mémoires repose sur l'expression de PD-1. L'expression de PD-1 fait suite à un signal TCR et un signal TCR conduit à une expansion clonale. De fait, il peut être assumé ici que la diversité clonotypique est plus faible dans les LT CD4 mémoires activés en comparaison aux LT CD4 mémoires non-activés.

Au final, les LT CD4 avec une effectivité forte sont sensibles aux variations de l'environnement biologique auxquels ils sont soumis. Dans un contexte biologique précis, lymphoïde dans notre cas, les LT CD4 activés pourraient être les plus à même d'intégrer les signaux environnementaux et d'évoluer vers le phénotype adéquate. L'orientation de LT CD4 non activés vers le phénotype promu par l'environnement biologique pourrait relever de temps plus longs, étant donné une faculté plus faible à intégrer spontanément les différents signaux environnementaux (**Fig. 5**).

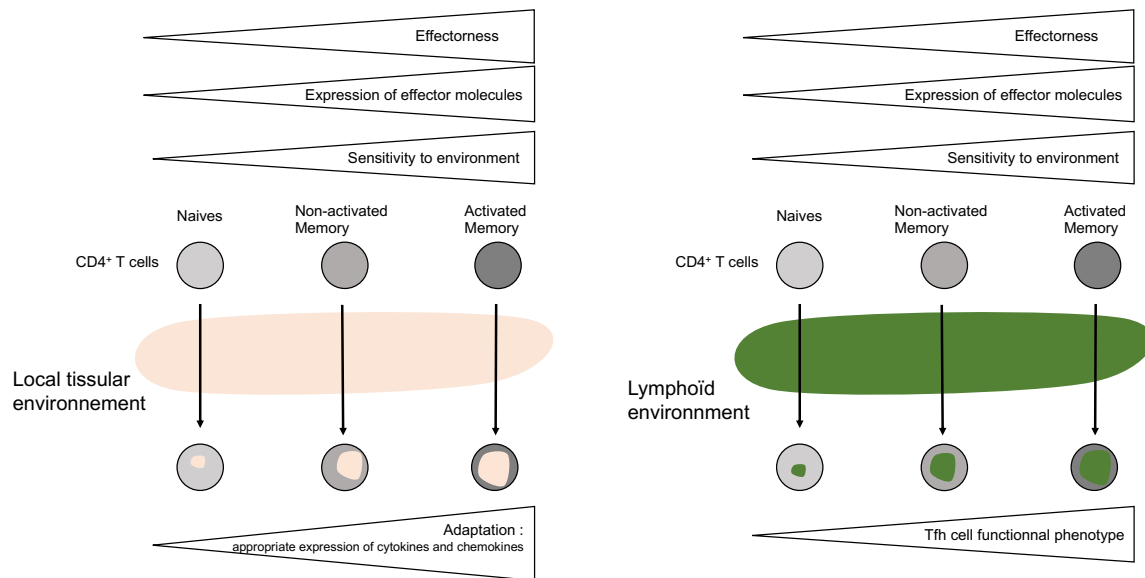


Figure 5 : Proposition d'une génération des Tfh basée sur l'effectivité cellulaire. Une effectivité graduelle de LT CD4, avec une expression croissante de molécules effectrices (ici LT CD4 naïves, mémoires non-activés, activés), pourrait par une sensibilité plus ou moins forte à l'environnement biologique (ici lymphoïde) régir l'adaptation rapide à celui-ci (ici pour une orientation vers un profil Tfh mature).

Cette notion d'adaptation des LT CD4 mémoires activés vers un profil Tfh dans un contexte tissulaire particulier est renforcée par la description de cellules Tfh-like qui résident dans des tissus non-lymphoïdes.

II.2 Tfh-like dans les conditions d'inflammation chroniques : résultat d'une plasticité ?

L'idée d'une génération de Tfh basée sur une plasticité lymphocytaire *in vivo* est renforcée par les Tfh-like retrouvés au niveau des sites inflammatoires dépourvus de structures lymphoïdes. Au niveau de tissus synoviaux de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, des cellules PD-1^{hi}CXCR5⁺ exprimant l'IL-21, le CXCL13, ICOS, MAF et soutenant la maturation des LB ont été identifiées³⁷¹. Dans le lupus, une population Tfh-like exprimant le PD-1, ICOS, CXCR4, de l'IL-21 et en contact avec des LB est observée dans le tissu rénal³⁷². Récemment, une population analogue aux Tfh exprimant le CXCR5, le PD-1, ICOS a été décrite au niveau de la peau dans le cadre de la sclérose systémique³⁷³. L'émergence de ces Tfh-like est probablement le résultat de l'infiltration de LB et de LT CD4 activés au niveau des tissus inflammés. Au niveau de ces réactions inflammatoires, les LB s'expandent clonalement et dépassent le nombre de DC³⁷⁴. Les LB activés peuvent efficacement capter l'antigène et promouvoir la différenciation des Th^{375,376}. Parallèlement, il est classiquement

admis que les lymphocytes infiltrant les tissus inflammés sont préférentiellement les LT CD4 mémoires activés. Ainsi, l'émergence de ces Tfh-like pourrait résulter d'une plasticité cellulaire des LT CD4 après interaction avec des LB dans un contexte de persistance antigénique et d'inflammation. Nous allons voir par la suite qu'un parallèle avec l'infection par le VIH est tentant, dans un contexte où l'organe lymphoïde est le siège d'une persistance antigénique et d'une inflammation.

II.3 Plasticité cellulaire dans les tissus lymphoïdes : relevance dans le VIH

Chez les patients chroniquement infectés par le VIH, un enrichissement d'une signature Tfh est observé dans les LT CD4 CXCR5⁺ spécifiques du virus chez des patients où la virémie est haute³¹¹(voir introduction II.3.c). De manière intéressante et cohérente, nous montrons au niveau de LT CD4 mémoires non Tfh spléniques de patients chroniquement infectés un enrichissement de la signature Tfh en comparaison à des individus non infectés. En effet, les facteurs de transcription Bcl6 et MAF guidant le développement d'un profil Tfh^{73,377} y sont surexprimés. A l'inverse, nous mettons en évidence dans les LT CD4 mémoires une altération d'expression de points de contrôle inhibant la mise en place d'un phénotype Tfh comme le CD25, STAT5A et S1PR1 (**Résultats, III.1. Fig 19**). Ces différentes observations pourraient être le reflet d'un début de réorientation des LT CD4 mémoires vers un profil Tfh dans les OLS de patients infectés. Une étude récente portant sur des ganglions de patients chroniquement infectés non traités renforce cette hypothèse. L'analyse des LT CD4 ICOS⁺PD-1⁺ révèle qu'ils sont plus proches des Tfh en comparaison aux LT CD4 ICOS⁻PD-1⁻ au niveau phénotypique et transcriptomique. Ces LT CD4 ICOS⁺PD-1⁺, par définition activés, expriment plus abondamment Bcl6 et MAF, comme observé dans notre étude dans les LT CD4 mémoires totaux. Les LT CD4 ICOS⁺PD-1⁺ sont capables d'aider à la mise en place d'une réponse LB spécifique et présentent des séquences TCR partagés avec les Tfh. Par la caractérisation des régions accessibles de la chromatine, il est montré que le site pour la promotion de l'expression du CXCR5 est particulièrement ouverte au sein de la population PD-1⁺ICOS⁺, suggérant que l'expression de ce marqueur est possible³⁷⁸. De façon intéressante, nous montrons *in vitro* en absence d'infection que les LT CD4 mémoires activés (PD-1⁺) sont particulièrement prompts pour la génération de Tfh dans un contexte lymphoïde. L'ensemble de ces données renforce l'idée que la génération des Tfh pourrait reposer sur une réorientation de LT CD4 mémoires, notamment activés.

Cependant, nous ne montrons pas de modulation quantitative sous une infection VIH *in vitro* de la génération de Tfh après 3 jours de stimulation, que ceux-ci soient générés à partir de LT CD4 mémoires activés (PD-1⁺) ou non activés (PD-1⁻). Il faut noter que toutes nos analyses ont été réalisées avec un marqueur de viabilité qui permet d'exclure les cellules mortes. Par conséquent, la perte de LT CD4 face à la stimulation et l'infection n'est pas prise en considération. Suivant leur état d'activation et leur statut de maturation, tous les LT CD4 n'ont pas la même susceptibilité à la mort cellulaire. Une évaluation de la perte cellulaire spécifiquement à chaque sous-type de LT CD4 vers leur transition respective vers un profil Tfh pourrait être un facteur intéressant à intégrer dans notre étude, notamment dans le contexte infectieux. Nos résultats montrent que l'infection par le VIH perturbe le programme transcriptionnel de la transition des LT CD4 mémoires vers un phénotype Tfh (**Résultats, III.2, Fig. 21**). Si le rendement en Tfh à partir de LT CD4 mémoires est identique à celui observé sous infection, leur qualité pourrait être altérée avec l'établissement d'un programme transcriptionnel incomplet relatif à l'infection. Nous avons focalisé notre analyse sur le pic de réponse Tfh à 3 jours mais il est possible que des variations quantitatives dues à l'infection apparaissent à des temps plus tardifs.

L'absence de variation quantitative *in vitro* dans la génération de Tfh à partir de LT CD4 mémoires pourrait s'expliquer par le fait que nous mimons déjà sans infection les processus pathologiques de l'infection par le VIH au sein des OLS. En effet, l'accumulation de Tfh basée sur une plasticité cellulaire pourrait reposer sur la perte des zones T et B au sein des OLS de patients chroniquement infectés. Nos suspensions cellulaires *in vitro* s'affranchissent de l'intégrité de l'organe et reproduisent déjà une décompartmentalisation du tissu lymphoïde. La décompartmentalisation pourrait se traduire par des interactions incontrôlées entre LB et LT, notamment avec les LT CD4 mémoires activés (PD-1⁺) particulièrement abondants chez les patients infectés. Nous montrons *in vitro* une forte capacité des LT CD4 mémoires activés à s'orienter vers un profil Tfh tandis que les études de cette population *in vivo* montrent qu'elle exprime des traits Tfh. Ainsi, ces résultats suggèrent que cette population pourrait s'orienter vers un profil Tfh, notamment après une interaction avec des LB. Nous avons montré avec d'autres que les plasmocytes sont particulièrement abondants dans les OLS de patients chroniquement infectés^{232,233}. Les plasmocytes promeuvent préférentiellement la génération de LT CD4 CXCR5⁺ICOS⁺IL-21⁺ à partir des LT CD4 naïfs en comparaison à des LB naïfs, LB mémoires, ou des monocytes. Cette promotion implique la sécrétion d'IL-6, qui est retrouvée à de forte concentration dans une culture de LB de patients infectés présentant une hypergammaglobulinémie³⁷⁹. Au final, des processus analogues à ceux conduisant à la génération de Tfh-like au niveau de tissus non-lymphoïdes chroniquement

inflammés pourraient apparaître au niveau des OLS, avec une persistance antigénique, de l'inflammation et la présence de LB (**Fig. 6**).

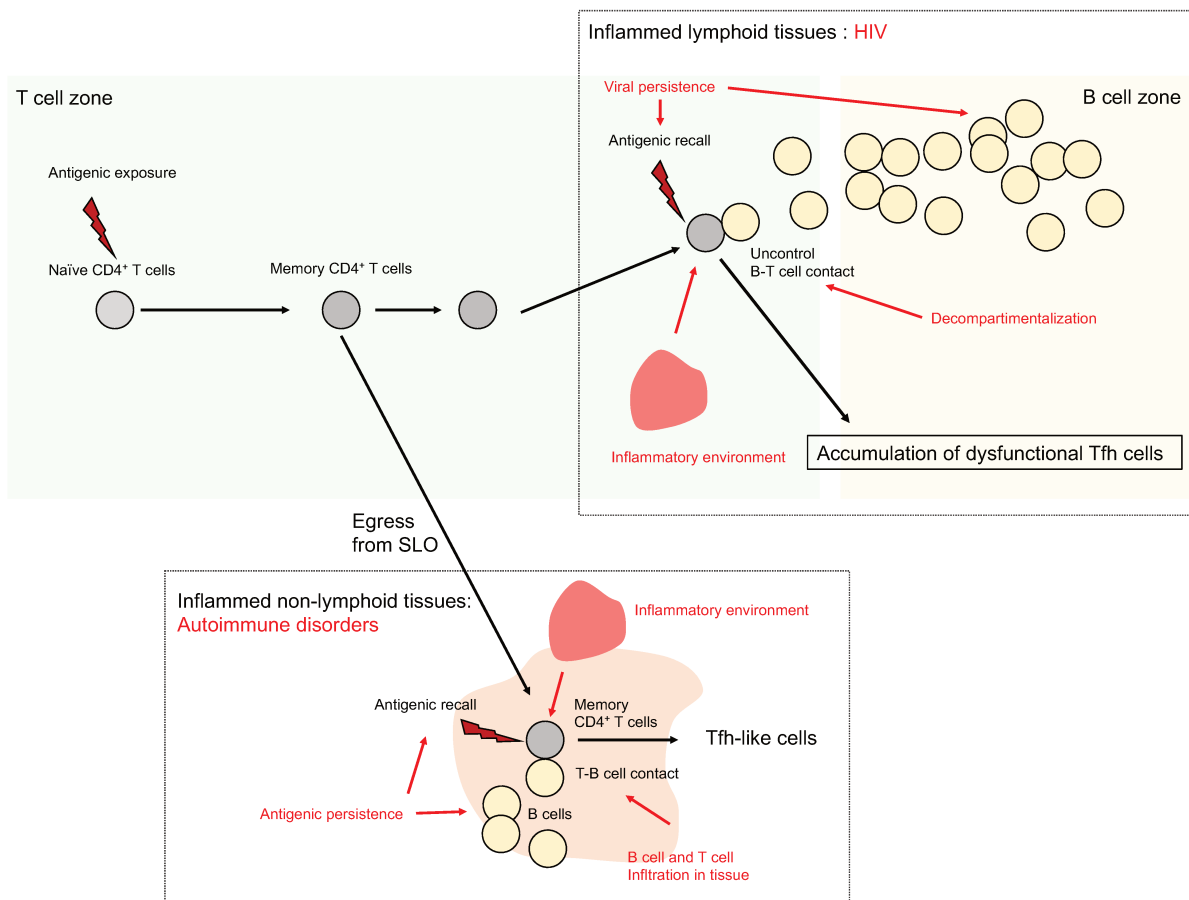


Figure 6 : Modèle proposé des causes de l'accumulation des Tfh dans l'infection par le VIH chronique. Des processus similaires promouvant des réponses Tfh pourraient avoir lieu au niveau des tissus non-lymphoïdes et lymphoïdes, avec une persistance antigénique, un environnement inflammatoire ainsi qu'une présence de LB. Dans le cas de l'infection par le VIH, la décompartmentalisation pourrait conduire à des interactions entre LB et LT CD4 mémoires incontrôlées, qui combinées à un environnement inflammatoire propice, conduiraient à l'accumulation de Tfh dysfonctionnels.

II.4 Contrôle de l'inflammation et préservation des structures lymphoïdes : des pistes pour limiter la réponse Tfh exacerbée

Les études sur les primates non humains qui contrôlent spontanément l'infection supportent l'hypothèse selon laquelle l'accumulation de Tfh résulterait d'une perte des territoires immunitaires couplée à de l'inflammation. Bien qu'infectés chroniquement, ces hôtes naturels présentent un faible niveau d'activation et d'inflammation, avec une préservation de l'intégrité structurelle de leurs

OLS. Une absence de lymphoadénopathie, de fibrose, de dépôt de collagène et une conservation du réseau de FDC sont observées dans les tissus lymphoïdes de ces hôtes naturels de l'infection. L'intégrité des follicules y est donc préservée. Il est supposé que cette conservation de l'intégrité architecturale reposerait notamment sur un niveau de réplication plus faible du virus dans les tissus lymphoïdes durant la phase chronique. En résultat, ces hôtes naturels ne témoignent pas d'une accumulation de Tfh en comparaison à des primates non humains ne contrôlant pas l'infection³⁸⁰. De manière cohérente, la prise précoce d'ART chez l'Homme permet de préserver des réponses Tfh et LB³⁸¹, limitant la persistance virale et la détérioration des structures lymphoïdes.

III. Quid de l'étude des partenaires cellulaires, de la régulation et de la cinétique ?

Nos données indiquent que la génération de Tfh dépend des LB puisqu'une génération de Tfh n'est pas obtenue à partir de suspension de splénocytes issus de patients traités au rituximab (**Résultats, I.2.e, Fig. 14**). Ces observations supportent l'idée selon laquelle les LB sont des acteurs majeurs de l'initiation des réponses Tfh et viennent appuyer les hypothèses précédemment exposées. Tous les types de LB n'ont pas la même capacité à induire l'expression de marqueurs Tfh, avec notamment un effet préférentiel des plasmocytes¹⁴³. Il serait intéressant de confirmer cette observation et d'aller plus loin, en questionnant leur capacité à induire l'établissement d'un phénotype Tfh chez des LT CD4 mémoires, notamment au regard de nos hypothèses précédentes. Parallèlement, il serait intéressant de comparer les réponses Tfh conduites par des LB ou des DC. Comme souligné en introduction, les dialogues des DC et LB avec les LT CD4 n'impliquent pas les mêmes molécules. Ces différents dialogues pourraient être sous-jacents à l'hétérogénéité des réponses Tfh observées. Les dialogues cellulaires favorisant le développement des Tfh ne se cantonnent pas aux interactions avec les DC et les LB. D'autres populations sont également impliquées tels que les macrophages, montrés comme promoteurs d'un phénotype Tfh mature chez l'Homme¹¹⁵. Plus surprenant, l'interaction de Tfh entre eux a été montrée *in situ* chez l'Homme³⁶³. L'ensemble de ces observations montre que les interactions directes ou indirectes des Tfh avec d'autres populations lymphoïdes restent à clarifier.

Dans cette étude, nous avons fait le choix de nous focaliser sur le versant effecteur des réponses LT CD4 folliculaires. *In vivo* et comme toute réponse effectrice, une régulation des réponses Tfh est nécessaire. De nombreuses données concordent sur le fait que les Tfr permettent de limiter les réponses auto-réactives après la mise en place de la réponse effectrice. Notre laboratoire a notamment montré que le répertoire TCR des Tfr est restreint aux antigènes du soi, contrairement

à celui des Tfh¹⁶⁷. Après stimulation de cellules lymphoïdes, les Tfh générés abritent une population Foxp3⁺, qui en représente 10-15% (Données non montrées). Nous pourrions interroger par l'étude du répertoire TCR la restriction de cette population aux antigènes du soi, ce qui permettrait de confirmer les données du laboratoire obtenues chez la souris. Le marquage de Foxp3 n'étant pas compatible avec les études fonctionnelles nécessitant les tris des cellules Tfh et Tfr, nous n'avons pas distingué les Tfr des Tfh dans cette étude. Nous sommes actuellement à la recherche de marqueurs qui permettraient de s'affranchir du Foxp3 et de questionner les propriétés immunorégulatrices des LT CD4 CXCR5⁺PD-1⁺Foxp3⁺ générés. Ces propriétés pourraient être évaluées par la comparaison entre les réponses induites suite à une co-culture Tfh-LB en présence ou non de cette population. Si les propriétés immunorégulatrices de cette population étaient avérées, la question de sa filiation avec les Tregs et les Tfh pourrait être posée. Les différentes données de la littérature s'accordent pour dire que les Tfr proviennent des Tregs¹⁶⁶. Les Tregs identifiables sans le Foxp3 (CD25⁺CD127⁻) pourraient être labélisés puis suivis dans un environnement lymphoïde conduisant une réponse Tfh. Nous avons fait le choix de nous focaliser sur le pic de la réponse effectrice apparaissant à 3 jours dans ce modèle. Nos données suggèrent que l'abondance de la population Foxp3⁺ parmi les Tfh générés est maximale au pic d'abondance et de fonctionnalité des Tfh (Données non montrées). La réponse Tfh que nous observons est transitoire, avec un pic de la génération de Tfh fonctionnels à 3 jours. Cette proportion diminue ensuite (**Résultats, I.2.a, Fig. 7**) et il serait intéressant d'interroger l'implication de populations Tfr dans cette baisse de Tfh fonctionnels.

Une alternative future pour l'étude cinétique fine des réponses folliculaires consécutives à une stimulation antigénique pourrait résider dans une analyse transcriptomique en cellule unique. Avec des temps d'analyse suffisamment rapprochés, une étude « phylogénique » cellulaire pourrait être faite en évaluant les proximités cellulaires d'un point de vue transcriptionnel (**Fig. 7**). L'étude des proximités cellulaires à différents temps pourrait notamment permettre de remonter vers l'identification des LT CD4 précurseurs des différentes populations Tfh et Tfr.

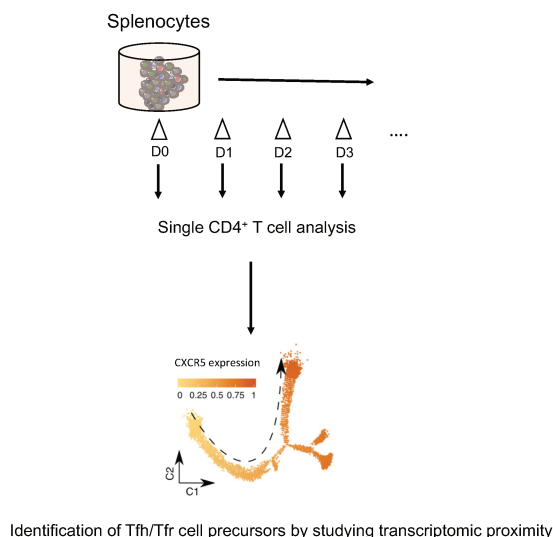


Figure 7 : Proposition d'une étude de la génération réponses LT CD4 folliculaires (Tfh/Tfr) par une analyse en cellule unique.

Les LT CD4 pourraient être analysés à des temps suffisamment rapprochés pour permettre par des études de proximité d'identifier les précurseurs des différents LT CD4, notamment en évaluant le gain d'expression de CXCR5 par différentes populations.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Grâce à la mise au point d'un modèle d'étude inédit, nous apportons ici de nouveaux arguments pour la génération d'une réponse Tfh basée une plasticité cellulaire. Nos résultats supportent l'idée selon laquelle l'hétérogénéité observée dans une réponse Tfh peut résulter de la contribution de LT CD4 naïfs et mémoires. La plasticité des LT CD4 mémoires en réponse à des environnements antigéniques changeants pourrait présenter un avantage pour rapidement soutenir et diversifier les réponses LB, mais s'avérer délétère dans certains contextes pathologiques comme le VIH. *In vitro*, nous montrons que les différentes voies de génération sont modulées dans un contexte d'infection par le VIH, notamment la voie s'appuyant sur la repolarisation de LT CD4 mémoires. De plus, les résultats obtenus à partir de tissus lymphoïdes de patients chroniquement infectés laissent penser que cette voie pourrait également être impliquée *in vivo*. L'ensemble de ces résultats ouvre sur de nouvelles perspectives pour la compréhension de l'accumulation de Tfh dysfonctionnels dans cette pathologie où les tissus lymphoïdes sont fortement impactés.

A l'avenir, le développement des technologies d'analyses en cellule unique permettra une compréhension des processus sous-jacents aux réponses Tfh, et plus globalement aux réponses LT CD4. Ces techniques pourraient amener à repenser la définition des réponses LT CD4, évoluant au gré de leur statut d'activation et de l'environnement cellulaire et moléculaire, conduisant à des états lymphocytaires plutôt que des sous-types lymphocytaires et figés.

BIBLIOGRAPHIE

1. McEndy DP, Boon MC, Furth J. On the Role of Thymus, Spleen, and Gonads in the Development of Leukemia in a High-Leukemia Stock of Mice. *Cancer Res.* 1944;4(6):377-383.
2. Miller JFAP. Studies on mouse leukaemia. The role of the thymus in leukaemogenesis by cell-free leukaemic filtrates. *Br J Cancer.* 1960;14(1):93-98. doi:10.1038/bjc.1960.11
3. Miller JFAP. Immunological Function of the Thymus. *Lancet.* 1961;278(7205):748-749. doi:10.1016/S0140-6736(61)90693-6
4. Miller JFAP. Immunological Significance of the Thymus of the Adult Mouse. *Nature.* 1962;195(4848):1318-1319. doi:10.1038/1951318a0
5. Govaerts A. Cellular antibodies in kidney homotransplantation. *J Immunol.* 1960;85(5253):516-522. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13707551>.
6. Cerottini J-C, Nordin AA, Brunner KT. In vitro Cytotoxic Activity of Thymus Cells sensitized to Alloantigens. *Nature.* 1970;227(5253):72-73. doi:10.1038/227072a0
7. Roitt IM, Greaves MF, Torrigiani G, Brostoff J, Playfair JH. The cellular basis of immunological responses. A synthesis of some current views. *Lancet.* 1969;2(7616):367-371. doi:10.1016/s0140-6736(69)92712-3
8. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495-497. doi:10.1038/256495a0
9. Cantor H, Boyse EA. Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *J Exp Med.* 1975;141(6):1376-1389. doi:10.1084/jem.141.6.1376
10. Cantor H, Boyse EA. Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. II. Cooperation between subclasses of Ly+ cells in the generation of killer activity. *J Exp Med.* 1975;141(6):1390-1399. doi:10.1084/jem.141.6.1390
11. Tada T, Takemori T, Okumura K, Nonaka M, Tokuhisa T. Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *J Exp Med.* 1978;147(2):446-458. doi:10.1084/jem.147.2.446
12. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136(7):2348-2357. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2419430>.
13. Seder RA, Paul WE. Acquisition of Lymphokine-Producing Phenotype by CD4+ T Cells. *Annu Rev Immunol.* 1994;12(1):635-673. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.003223
14. Zheng W, Flavell RA. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell.* 1997;89(4):587-596. doi:10.1016/S0092-8674(00)80240-8
15. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000;100(6):655-669. doi:10.1016/S0092-8674(00)80702-3
16. Allen JE, Maizels RM. Th1-Th2: Reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunol Today.* 1997;18(8):387-392. doi:10.1016/S0167-5699(97)01102-X
17. Steinman L. A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 2007;13(2):139-145. doi:10.1038/nm1551
18. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell.* 2006;126(6):1121-1133. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035
19. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med.* 1985;161(1):72-87. doi:10.1084/jem.161.1.72
20. Powrie F, Mason D. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: Prevention by the ox-22low subset. *J Exp Med.* 1990;172(6):1701-1708. doi:10.1084/jem.172.6.1701
21. Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, Liggitt D, Watson JD. CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *J Exp Med.* 1993;178(1):237-244. doi:10.1084/jem.178.1.237
22. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-1164. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636184>.
23. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998;188(2):287-296. doi:10.1084/jem.188.2.287
24. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science (80-).* 2003;299(5609):1057-1061. doi:10.1126/science.1079490
25. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330-336. doi:10.1038/ni904

26. Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev.* 2014;259(1):88-102. doi:10.1111/imr.12160
27. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest.* 2009;2(6):198-207. doi:10.1172/JCI40202
28. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from TH-17, TH1 and TH2 cells. *Nat Immunol.* 2009;10(8):864-871. doi:10.1038/ni.1770
29. Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(5):295-307. doi:10.1038/nri3824
30. Becattini S, Latorre D, Mele F, et al. Functional heterogeneity of human memory CD4+ T cell clones primed by pathogens or vaccines. *Science (80-).* 2015;347(6220):400-406. doi:10.1126/science.1260668
31. Löhning M, Hegazy AN, Pinschewer DD, et al. Long-lived virus-reactive memory T cells generated from purified cytokine-secreting T helper type 1 and type 2 effectors. *J Exp Med.* 2008;205(1):53-61. doi:10.1084/jem.20071855
32. Rosenblum MD, Way SS, Abbas AK. Regulatory T cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(2):90-101. doi:10.1038/nri.2015.1
33. McGeachy MJ. Th17 memory cells: live long and proliferate. *J Leukoc Biol.* 2013;94(5):921-926. doi:10.1189/jlb.0313113
34. Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PC, Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol.* 1988;140(7):2171-2178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2965180>.
35. Tian Y, Babor M, Lane J, et al. Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA. *Nat Commun.* 2017;8(1). doi:10.1038/s41467-017-01728-5
36. Arbonés ML, Ord DC, Ley K, et al. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity.* 1994;1(4):247-260. doi:10.1016/1074-7613(94)90076-0
37. Bromley SK, Thomas SY, Luster AD. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat Immunol.* 2005;6(9):895-901. doi:10.1038/ni1240
38. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401(6754):708-712. doi:10.1038/44385
39. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004;22(1):745-763. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702
40. Gebhardt T, Wakim LM, Eidsmo L, Reading PC, Heath WR, Carbone FR. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol.* 2009;10(5):524-530. doi:10.1038/ni.1718
41. Klicznik MM, Morawski PA, Höllbacher B, et al. Human CD4+CD103+ cutaneous resident memory T cells are found in the circulation of healthy individuals. *Sci Immunol.* 2019;4(37). doi:10.1126/sciimmunol.aav8995
42. Peine M, Rausch S, Helmstetter C, et al. Stable T-bet+GATA-3+ Th1/Th2 Hybrid Cells Arise In Vivo, Can Develop Directly from Naive Precursors, and Limit Immunopathologic Inflammation. *PLoS Biol.* 2013;11(8). doi:10.1371/journal.pbio.1001633
43. Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4 + T Cells Against Microbes . *Annu Rev Immunol.* 2016;34(1):317-334. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112056
44. Chen Y, Chauhan SK, Shao C, Omoto M, Inomata T, Dana R. IFN- γ -Expressing Th17 Cells Are Required for Development of Severe Ocular Surface Autoimmunity. *J Immunol.* 2017;199(3):1163-1169. doi:10.4049/jimmunol.1602144
45. Wang Y-H, Voo KS, Liu B, et al. A novel subset of CD4+ TH2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J Exp Med.* 2010;207(11):2479-2491. doi:10.1084/jem.20101376
46. DuPage M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(3):149-163. doi:10.1038/nri.2015.18
47. Koenecke C, Lee C-W, Thamm K, et al. IFN- γ Production by Allogeneic Foxp3 + Regulatory T Cells Is Essential for Preventing Experimental Graft-versus-Host Disease. *J Immunol.* 2012;189(6):2890-2896. doi:10.4049/jimmunol.1200413
48. Downs-Canner S, Berkey S, Delgoffe GM, et al. Suppressive IL-17A+ Foxp3+ and ex-Th17 IL-17Aneg Foxp3+ Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells. *Nat Commun.* 2017;8. doi:10.1038/ncomms14649
49. Yang WC, Hwang YS, Chen YY, et al. Interleukin-4 supports the suppressive immune responses elicited by regulatory T cells. *Front Immunol.* 2017;8(NOV):1-9. doi:10.3389/fimmu.2017.01508
50. Kunicki MA, Amaya Hernandez LC, Davis KL, Bacchetta R, Roncarolo M-G. Identity and Diversity of Human Peripheral Th and T Regulatory Cells Defined by Single-Cell Mass Cytometry. *J Immunol.* 2018;200(1):336-346. doi:10.4049/jimmunol.1701025
51. Wong MT, Ong DEH, Lim FSH, et al. A High-Dimensional Atlas of Human T Cell Diversity Reveals Tissue-Specific Trafficking and Cytokine Signatures. *Immunity.* 2016;45(2):442-456. doi:10.1016/j.immuni.2016.07.007
52. Miragaia RJ, Gomes T, Chomka A, et al. Single-Cell Transcriptomics of Regulatory T Cells Reveals Trajectories of Tissue Adaptation. *Immunity.* 2019;50(2):493-504.e7. doi:10.1016/j.immuni.2019.01.001

53. Panzer M, Sitte S, Wirth S, Drexler I, Sparwasser T, Voehringer D. Rapid In Vivo Conversion of Effector T Cells into Th2 Cells during Helminth Infection. *J Immunol.* 2012;188(2):615-623. doi:10.4049/jimmunol.1101164
54. Cosmi L, Cimaz R, Maggi L, et al. Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4+CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(8):2504-2515. doi:10.1002/art.30332
55. Liu HP, Cao AT, Feng T, et al. TGF- β converts Th1 cells into Th17 cells through stimulation of Runx1 expression. *Eur J Immunol.* 2015;45(4):1010-1018. doi:10.1002/eji.201444726
56. Mirlekar B. Co-expression of master transcription factors determines CD4+ T cell plasticity and functions in auto-inflammatory diseases. *Immunol Lett.* 2020;222(January):58-66. doi:10.1016/j.imlet.2020.03.007
57. Tough DF, Rioja I, Modis LK, Prinjha RK. Epigenetic Regulation of T Cell Memory: Recalling Therapeutic Implications. *Trends Immunol.* 2020;41(1):29-45. doi:10.1016/j.it.2019.11.008
58. Cano-Gamez E, Soskic B, Roumeliotis TI, et al. Single-cell transcriptomics identifies an effectorness gradient shaping the response of CD4+ T cells to cytokines. *Nat Commun.* 2020;11(1):1-15. doi:10.1038/s41467-020-15543-y
59. Touzot M, Grandclaudon M, Cappuccio A, et al. Combinatorial flexibility of cytokine function during human T helper cell differentiation. 2014. doi:10.1038/ncomms4987
60. Lindenmann J. SENIOR OVERVIEWS. *Scand J Immunol.* 1984;19(4):281-285. doi:10.1111/j.1365-3083.1984.tb00931.x
61. Grundbacher FJ. Behring's discovery of diphtheria and tetanus antitoxins. *Immunol Today.* 1992;13(5):188-190. doi:10.1016/0167-5699(92)90125-Q
62. Ribatti D. The discovery of plasma cells: An historical note. *Immunol Lett.* 2017;188(June):64-67. doi:10.1016/j.imlet.2017.06.006
63. Dougherty TF, Chase JH, White A. The Demonstration of Antibodies in Lymphocytes. *Exp Biol Med.* 1944;57(2):295-298. doi:10.3181/00379727-57-14789
64. Fagraeus A. The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *J Immunol.* 1948;58(1):1-13. doi:10.1038/115051a0
65. Cooper MD, Peterson RDA, Good RA. Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken. *Nature.* 1965;205(4967):143-146. doi:10.1038/205143a0
66. Claman HN, Chaperon EA, Triplett RF. Thymus-Marrow Cell Combinations. Synergism in Antibody Production. *Exp Biol Med.* 1966;122(4):1167-1171. doi:10.3181/00379727-122-31353
67. Rouse R V, Ledbetter Jeffrey A, Weissman IL. *Mouse Lymph Node Germinal Centers Contain a Selected Subset of T Cells--the Helper Phenotype.* Vol 128.; 1982. <http://www.jimmunol.org/>. Accessed January 8, 2020.
68. Schaerli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. Cxc Chemokine Receptor 5 Expression Defines Follicular Homing T Cells with B Cell Helper Function. *J Exp Med.* 2000;192(11):1553-1562. doi:10.1084/jem.192.11.1553
69. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med.* 2000;192(11):1545-1552. doi:10.1084/jem.192.11.1545
70. Förster R, Emrich T, Kremmer E, Lipp M. Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood.* 1994;84(3):830-840. doi:10.1182/blood.v84.3.830.bloodjournal843830
71. Chtanova T, Tangye SG, Newton R, et al. T Follicular Helper Cells Express a Distinctive Transcriptional Profile, Reflecting Their Role as Non-Th1/Th2 Effector Cells That Provide Help for B Cells. *J Immunol.* 2004;173(1):68-78. doi:10.4049/jimmunol.173.1.68
72. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, et al. Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science (80-).* 2009;325(5943):1006-1010. doi:10.1126/science.1175870
73. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, et al. Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. *Science (80-).* 2009;325(5943):1001-1005. doi:10.1126/science.1176676
74. Hollister K, Kusam S, Wu H, et al. Insights into the Role of Bcl6 in Follicular Th Cells Using a New Conditional Mutant Mouse Model. *J Immunol.* 2013;191(7):3705-3711. doi:10.4049/jimmunol.1300378
75. Choi J, Diao H, Faliti CE, et al. Bcl-6 is the nexus transcription factor of T follicular helper cells via repressor-of-repressor circuits. *Nat Immunol.* 2020;21(7):777-789. doi:10.1038/s41590-020-0706-5
76. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity.* 2019;50(5):1132-1148. doi:10.1016/j.immuni.2019.04.011
77. Qin L, Waseem TC, Sahoo A, et al. Insights Into the Molecular Mechanisms of T Follicular Helper-Mediated Immunity and Pathology. *Front Immunol.* 2018;9:1884. doi:10.3389/fimmu.2018.01884
78. Xu W, Zhao X, Wang X, et al. The Transcription Factor Tox2 Drives T Follicular Helper Cell Development via Regulating Chromatin Accessibility. *Immunity.* 2019;51(5):826-839.e5. doi:10.1016/j.immuni.2019.10.006
79. Vacchio MS, Ciucci T, Gao Y, et al. A Thpok-Directed Transcriptional Circuitry Promotes Bcl6 and Maf Expression to Orchestrate T Follicular Helper Differentiation. *Immunity.* 2019;51(3):465-478.e6. doi:10.1016/j.immuni.2019.06.023

80. Misawa T, SoRelle JA, Choi JH, et al. Mutual inhibition between Prkd2 and Bcl6 controls T follicular helper cell differentiation. *Sci Immunol.* 2020;5(43):1-14. doi:10.1126/sciimmunol.aaz0085
81. Lee JY, Skon CN, Lee YJ, et al. The Transcription Factor KLF2 Restrains CD4+ T Follicular Helper Cell Differentiation. *Immunity.* 2015;42(2):252-264. doi:10.1016/j.immuni.2015.01.013
82. Hatzi K, Nance JP, Kroenke MA, et al. BCL6 orchestrates Tfh cell differentiation via multiple distinct mechanisms. *J Exp Med.* 2015;212(4):539-553. doi:10.1084/jem.20141380
83. Choi YS, Kageyama R, Eto D, et al. ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6. *Immunity.* 2011;34(6):932-946. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.023
84. Xie MM, Koh BH, Hollister K, et al. Bcl6 promotes follicular helper T-cell differentiation and PD-1 expression in a Blimp1-independent manner in mice. *Eur J Immunol.* 2017;47(7):1136-1141. doi:10.1002/eji.201747034
85. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med.* 2001;193(12):1373-1381. doi:10.1084/jem.193.12.1373
86. Haynes NM, Allen CDC, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and Appearance of a Programmed Cell Death Gene-1 High Germinal Center-Associated Subpopulation. *J Immunol.* 2007;179(8):5099-5108. doi:10.4049/jimmunol.179.8.5099
87. Sayin I, Radtke AJ, Vella LA, et al. Spatial distribution and function of T follicular regulatory cells in human lymph nodes. *J Exp Med.* 2018;215(6):1531-1542. doi:10.1084/jem.20171940
88. Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med.* 2012;209(7):1241-1253. doi:10.1084/jem.20120994
89. Crotty S. Follicular Helper CD4 T Cells (TFH). *Annu Rev Immunol.* 2011;29(1):621-663. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101400
90. Kim CH, Lim HW, Kim JR, Rott L, Hillsamer P, Butcher EC. Unique gene expression program of human germinal center T helper cells. *Blood.* 2004;104(7):1952-1960. doi:10.1182/blood-2004-03-1206
91. Fletcher AL, Acton SE, Knoblich K. Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(6):350-361. doi:10.1038/nri3846
92. Fletcher AL, Acton SE, Knoblich K. Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat Publ Gr.* 2015;15. doi:10.1038/nri3846
93. Malhotra D, Fletcher AL, Turley SJ. Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: Partners in immunity. *Immunol Rev.* 2013;251(1):160-176. doi:10.1111/imr.12023
94. Ramos-Perez WD, Fang V, Escalante-Alcalde D, Cammer M, Schwab SR. A map of the distribution of sphingosine 1-phosphate in the spleen. *Nat Immunol.* 2015;16(12):1245-1252. doi:10.1038/ni.3296
95. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol.* 2019;4(33). doi:10.1126/sciimmunol.aau6085
96. Watanabe M, Fujihara C, Radtke AJ, et al. Co-stimulatory function in primary germinal center responses: CD40 and B7 are required on distinct antigen-presenting cells. *J Exp Med.* 2017;214(9):2795-2810. doi:10.1084/jem.20161955
97. Goenka R, Barnett LG, Silver JS, et al. Cutting Edge: Dendritic Cell-Restricted Antigen Presentation Initiates the Follicular Helper T Cell Program but Cannot Complete Ultimate Effector Differentiation. *J Immunol.* 2011;187(3):1091-1095. doi:10.4049/jimmunol.1100853
98. Baumjohann D, Preite S, Reboldi A, et al. Persistent Antigen and Germinal Center B Cells Sustain T Follicular Helper Cell Responses and Phenotype. *Immunity.* 2013;38(3):596-605. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.020
99. Fazilleau N, McHeyzer-Williams LJ, Rosen H, McHeyzer-Williams MG. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat Immunol.* 2009;10(4):375-384. doi:10.1038/ni.1704
100. Ditoro D, Winstead C, Pham D, et al. Differential IL-2 expression defines developmental fates of follicular versus nonfollicular helper T cells. *Science (80-).* 2018. doi:10.1126/science.aao2933
101. Jacquemin C, Schmitt N, Contain-Bordes C, et al. OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity.* 2015;42(6):1159-1170. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.012
102. Baumjohann D, Okada T, Ansel KM. Cutting Edge: Distinct Waves of BCL6 Expression during T Follicular Helper Cell Development. *J Immunol.* 2011;187(5):2089-2092. doi:10.4049/jimmunol.1101393
103. Ballesteros-Tato A, Leó B, Graf BA, et al. Interleukin-2 Inhibits Germinal Center Formation by Limiting T Follicular Helper Cell Differentiation. 2012. doi:10.1016/j.immuni.2012.02.012
104. Johnston RJ, Choi YS, Diamond JA, Yang JA, Crotty S. STAT5 is a potent negative regulator of T FH cell differentiation. 2012;209(2):243-250. doi:10.1084/jem.20111174
105. Li J, Lu E, Yi T, Cyster JG. EB12 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-quenching dendritic cells. *Nature.* 2016;533(7601):110-114. doi:10.1038/nature17947

106. Weber JP, Fuhrmann F, Feist RK, et al. ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2. *J Exp Med*. 2015;212(2):217-233. doi:10.1084/jem.20141432
107. Tahiliani V, Hutchinson TE, Abboud G, Croft M, Salek-Ardakani S. OX40 Cooperates with ICOS To Amplify Follicular Th Cell Development and Germinal Center Reactions during Infection. *J Immunol*. 2017;198(1):218-228. doi:10.4049/jimmunol.1601356
108. Pattarini L, Trichot C, Bogiatzi S, et al. TSLP-activated dendritic cells induce human T follicular helper cell differentiation through OX40-ligand. *J Exp Med*. 2017;214(5):1529-1546. doi:10.1084/jem.20150402
109. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, et al. Generation of T Follicular Helper Cells Is Mediated by Interleukin-21 but Independent of T Helper 1, 2, or 17 Cell Lineages. *Immunity*. 2008;29(1):138-149. doi:10.1016/j.immuni.2008.05.009
110. Nakayama S, Kanno Y, Takahashi H, et al. Early Th1 Cell Differentiation Is Marked by a Tfh Cell-like Transition. *Immunity*. 2011;35(6):919-931. doi:10.1016/j.immuni.2011.11.012
111. Schmitt N, Morita R, Bourdery L, et al. Human Dendritic Cells Induce the Differentiation of Interleukin-21-Producing T Follicular Helper-like Cells through Interleukin-12. *Immunity*. 2009;31(1):158-169. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.016
112. Schmitt N, Bustamante J, Bourdery L, et al. IL-12 receptor β 1 deficiency alters in vivo T follicular helper cell response in humans. *Blood*. 2013;121(17):3375-3385. doi:10.1182/blood-2012-08-448902
113. Locci M, Wu JE, Arumemi F, et al. Activin A programs the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol*. 2016;17(8):976-984. doi:10.1038/ni.3494
114. Schmitt N, Liu Y, Bentebibel S-E, et al. The cytokine TGF- β co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol*. 2014;15(9):856-865. doi:10.1038/ni.2947
115. Durand M, Walter T, Pirnay T, et al. Human lymphoid organ cDC2 and macrophages play complementary roles in T follicular helper responses. *J Exp Med*. 2019;216(7):1561-1581. doi:10.1084/jem.20181994
116. Carnathan DG, Kaushik K, Ellebedy AH, et al. Harnessing Activin A Adjuvanticity to Promote Antibody Responses to BG505 HIV Envelope Trimers. *Front Immunol*. 2020;11(June):1-9. doi:10.3389/fimmu.2020.01213
117. Krishnaswamy JK, Alsén S, Yrlid U, Eisenbarth SC, Williams A. Determination of T Follicular Helper Cell Fate by Dendritic Cells. *Front Immunol*. 2018;9(September):2169. doi:10.3389/fimmu.2018.02169
118. Calabro S, Liu D, Gallman A, et al. Differential Intrasplenic Migration of Dendritic Cell Subsets Tailors Adaptive Immunity. *Cell Rep*. 2016;16(9):2472-2485. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.076
119. Krishnaswamy JK, Gowthaman U, Zhang B, et al. Migratory CD11b + conventional dendritic cells induce T follicular helper cell-dependent antibody responses. *Sci Immunol*. 2017;2(18):eaam9169. doi:10.1126/sciimmunol.aam9169
120. Chakarov S, Fazilleau N. Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation. *EMBO Mol Med*. 2014;6(5):590-603. doi:10.1002/emmm.201403841
121. Levin C, Bonduelle O, Nuttens C, et al. Critical Role for Skin-Derived Migratory DCs and Langerhans Cells in TFH and GC Responses after Intradermal Immunization. *J Invest Dermatol*. 2017;137(9):1905-1913. doi:10.1016/j.jid.2017.04.016
122. Bouteau A, Kervecan J, Su Q, et al. DC subsets regulate humoral immune responses by supporting the differentiation of distinct TFH cells. *Front Immunol*. 2019;10(MAY):1-15. doi:10.3389/fimmu.2019.01134
123. Kato Y, Zaid A, Davey GM, et al. Targeting Antigen to Clec9A Primes Follicular Th Cell Memory Responses Capable of Robust Recall. *J Immunol*. 2015;195(3):1006-1014. doi:10.4049/jimmunol.1500767
124. Gudjonsson A, Lysén A, Balan S, et al. Targeting Influenza Virus Hemagglutinin to Xcr1 + Dendritic Cells in the Absence of Receptor-Mediated Endocytosis Enhances Protective Antibody Responses. *J Immunol*. 2017;198(7):2785-2795. doi:10.4049/jimmunol.1601881
125. Shin C, Han J-A, Koh H, et al. CD8 α ⁻ Dendritic Cells Induce Antigen-Specific T Follicular Helper Cells Generating Efficient Humoral Immune Responses. *Cell Rep*. 2015;11(12):1929-1940. doi:10.1016/j.celrep.2015.05.042
126. Ugolini M, Gerhard J, Burkert S, et al. Recognition of microbial viability via TLR8 drives TFH cell differentiation and vaccine responses. *Nat Immunol*. 2018;19(4):386-396. doi:10.1038/s41590-018-0068-4
127. Grandclaudon M, Perrot-Dockes M, Trichot C, et al. A Quantitative Multivariate Model of Human Dendritic Cell-T Helper Cell Communication. *Cell*. 2019;432-447. doi:10.1016/j.cell.2019.09.012
128. Greczmiel U, Kräutler NJ, Pedrioli A, et al. Sustained T follicular helper cell response is essential for control of chronic viral infection. *Sci Immunol*. 2017;2(18):eaam8686. doi:10.1126/sciimmunol.aam8686
129. Xu H, Li X, Liu D, et al. Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature*. 2013;496(7446):523-527. doi:10.1038/nature12058
130. Song W, Craft J. T follicular helper cell heterogeneity: Time, space, and function. *Immunol Rev*. 2019;288(1):85-96. doi:10.1111/imr.12740
131. Reif K, Eklund EH, Ohl L, et al. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature*. 2002;416(6876):94-99. doi:10.1038/416094a
132. Sacquin A, Gador M, Fazilleau N. The strength of BCR signaling shapes terminal development of follicular helper T cells in mice. *Eur J*

- Immunol.* 2017;47(8):1295-1304. doi:10.1002/eji.201746952
133. Paus D, Phan TG, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med.* 2006;203(4):1081-1091. doi:10.1084/jem.20060087
 134. Linterman MA, Denton AE, Divekar DP, et al. CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *Elife.* 2014;3(October2014):1-21. doi:10.7554/eLife.03180
 135. Qi H, Cannons JL, Klauschen F, Schwartzberg PL, Germain RN. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature.* 2008;455(7214):764-769. doi:10.1038/nature07345
 136. Liu D, Xu H, Shih C, et al. T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature.* 2015;517(7533):214-218. doi:10.1038/nature13803
 137. Shi J, Hou S, Fang Q, Liu X, Liu X, Qi H. PD-1 Controls Follicular T Helper Cell Positioning and Function. *Immunity.* 2018;49(2):264-274.e4. doi:10.1016/j.immuni.2018.06.012
 138. Kawamoto S, Tran TH, Maruya M, et al. The Inhibitory Receptor PD-1 Regulates IgA Selection and Bacterial Composition in the Gut. *Science (80-).* 2012;336(6080):485-489. doi:10.1126/science.1217718
 139. Dahlgren MW, Gustafsson-Hedberg T, Livingston M, et al. T Follicular Helper, but Not Th1, Cell Differentiation in the Absence of Conventional Dendritic Cells. *J Immunol.* 2015;194(11):5187-5199. doi:10.4049/jimmunol.1401938
 140. Hong S, Zhang Z, Liu H, et al. B Cells Are the Dominant Antigen-Presenting Cells that Activate Naive CD4+ T Cells upon Immunization with a Virus-Derived Nanoparticle Antigen. *Immunity.* 2018;49(4):695-708.e4. doi:10.1016/j.immuni.2018.08.012
 141. Arroyo EN, Pepper M. B cells are sufficient to prime the dominant CD4+ Tfh response to Plasmodium infection. *J Exp Med.* 2020;217(2):1-12. doi:10.1084/jem.20190849
 142. Kerfoot SM, Yaari G, Patel JR, et al. Germinal Center B Cell and T Follicular Helper Cell Development Initiates in the Interfollicular Zone. *Immunity.* 2011;34(6):947-960. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.024
 143. Chavele K-M, Merry E, Ehrenstein MR. Cutting Edge: Circulating Plasmablasts Induce the Differentiation of Human T Follicular Helper Cells via IL-6 Production. *J Immunol.* 2015;194(6):2482-2485. doi:10.4049/jimmunol.1401190
 144. Lu KT, Kanno Y, Cannons JL, et al. Functional and Epigenetic Studies Reveal Multistep Differentiation and Plasticity of In Vitro-Generated and In Vivo-Derived Follicular T Helper Cells. *Immunity.* 2011;35(4):622-632. doi:10.1016/j.immuni.2011.07.015
 145. Lau AW, Brink R. Selection in the germinal center. *Curr Opin Immunol.* 2020;63(Figure 1):29-34. doi:10.1016/j.coi.2019.11.001
 146. Akkaya M, Traba J, Roesler AS, et al. Second signals rescue B cells from activation-induced mitochondrial dysfunction and death. *Nat Immunol.* 2018;19(8):871-884. doi:10.1038/s41590-018-0156-5
 147. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal Centers. *Annu Rev Immunol.* 2012;30(1):429-457. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075032
 148. Mintz MA, Felce JH, Chou MY, et al. The HVEM-BTLA Axis Restrains T Cell Help to Germinal Center B Cells and Functions as a Cell-Extrinsic Suppressor in Lymphomagenesis. *Immunity.* 2019;51(2):310-323.e7. doi:10.1016/j.immuni.2019.05.022
 149. Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, et al. Germinal Center Dynamics Revealed by Multiphoton Microscopy with a Photoactivatable Fluorescent Reporter. *Cell.* 2010;143(4):592-605. doi:10.1016/j.cell.2010.10.032
 150. Yeh CH, Nojima T, Kuraoka M, Kelsoe G. Germinal center entry not selection of B cells is controlled by peptide-MHCII complex density. *Nat Commun.* 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-03382-x
 151. Papa I, Vinuesa CG. Synaptic interactions in germinal centers. *Front Immunol.* 2018;9(AUG). doi:10.3389/fimmu.2018.01858
 152. Han S, Hathcock K, Zheng B, Kepler TB, Hodes R, Kelsoe G. Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J Immunol.* 1995;155(2):556-567. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7541819>.
 153. Papa I, Saliba D, Ponzoni M, et al. TFH-derived dopamine accelerates productive synapses in germinal centres. *Nature.* 2017. doi:10.1038/nature23013
 154. Weinstein JS, Herman EI, Lainez B, et al. TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat Immunol.* 2016;17(10):1197-1205. doi:10.1038/ni.3554
 155. Xie MM, Fang S, Chen Q, Liu H, Wan J, Dent AL. Follicular regulatory T cells inhibit the development of granzyme B-expressing follicular helper T cells. *JCI Insight.* 2019;4(16). doi:10.1172/jci.insight.128076
 156. M. Fahey L, B. Wilson E, Elsaesser H, D. Fistonich C, B. McGavern D, G. Brooks D. Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *J Exp Med.* 2011. doi:10.1084/jem.20101773
 157. Hansen DS, Obeng-Adjei N, Ly A, Ioannidis IJ, Crompton PD. Emerging concepts in T follicular helper cell responses to malaria. *Int J Parasitol.* 2017;47(2-3):105-110. doi:10.1016/j.ijpara.2016.09.004
 158. Rodrigues V, Laforge M, Campillo-Gimenez L, et al. Abortive T Follicular Helper Development Is Associated with a Defective Humoral Response in Leishmania infantum-Infected Macaques. Silvestri G, ed. *PLoS Pathog.* 2014;10(4):e1004096. doi:10.1371/journal.ppat.1004096
 159. Gensous N, Charrier M, Duluc D, et al. T Follicular Helper Cells in Autoimmune Disorders. *Front Immunol.* 2018;9(JUL).

- doi:10.3389/fimmu.2018.01637
160. Cirelli KM, Carnathan DG, Nogal B, et al. Slow Delivery Immunization Enhances HIV Neutralizing Antibody and Germinal Center Responses via Modulation of Immunodominance. *Cell*. 2019;177(5):1153-1171.e28. doi:10.1016/j.cell.2019.04.012
 161. Lim HW, Hillsamer P, Kim CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell–driven B cell responses. *J Clin Invest*. 2004;114(11):1640-1649. doi:10.1172/JCI200422325
 162. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting Edge: Direct Suppression of B Cells by CD4 + CD25 + Regulatory T Cells . *J Immunol*. 2005;175(7):4180-4183. doi:10.4049/jimmunol.175.7.4180
 163. Chung Y, Tanaka S, Chu F, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med*. 2011;17(8):983-988. doi:10.1038/nm.2426
 164. Linterman MA, Pierson W, Lee SK, et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med*. 2011;17(8):975-982. doi:10.1038/nm.2425
 165. Wu H, Chen Y, Liu H, et al. Follicular regulatory T cells repress cytokine production by follicular helper T cells and optimize IgG responses in mice. *Eur J Immunol*. 2016;46(5):1152-1161. doi:10.1002/eji.201546094
 166. Botta D, Fuller MJ, Marquez-Lago TT, et al. Dynamic regulation of T follicular regulatory cell responses by interleukin 2 during influenza infection. *Nat Immunol*. 2017;18(11):1249-1260. doi:10.1038/ni.3837
 167. Ritvo P-G, Saadawi A, Barennes P, et al. High-resolution repertoire analysis reveals a major bystander activation of Tfh and Tfr cells. 2018;115(38). doi:10.1073/pnas.1808594115
 168. Wing JB, Tekgüç M, Sakaguchi S. Control of Germinal Center Responses by T-Follicular Regulatory Cells. *Front Immunol*. 2018;9(August):1-12. doi:10.3389/fimmu.2018.01910
 169. Ritvo P-GG, Churlaud G, Quiniou V, et al. Tfr cells lack IL-2R α but express decoy IL-1R2 and IL-1Ra and suppress the IL-1–dependent activation of T fh cells. *Sci Immunol*. 2017;2(15):eaan0368. doi:10.1126/sciimmunol.aan0368
 170. Laidlaw BJ, Lu Y, Amezquita RA, et al. Interleukin-10 from CD4+ follicular regulatory T cells promotes the germinal center response. *Sci Immunol*. 2017;2(16):1-11. doi:10.1126/sciimmunol.aan4767
 171. León B, Bradley JE, Lund FE, Randall TD, Ballesteros-Tato A. FoxP3+ regulatory T cells promote influenza-specific Tfh responses by controlling IL-2 availability. *Nat Commun*. 2014;5(1):3495. doi:10.1038/ncomms4495
 172. Achour A, Simon Q, Mohr A, et al. Human regulatory B cells control the Tfh cell response. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(1):215-222. doi:10.1016/j.jaci.2016.09.042
 173. Yao C, Zurawski SM, Jarrett ES, et al. Skin dendritic cells induce follicular helper T cells and protective humoral immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(5):1387-1397.e7. doi:10.1016/j.jaci.2015.04.001
 174. Morita R, Schmitt N, Bentebibel S-E, et al. Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity*. 2011;34(1):108-121. doi:10.1016/j.immuni.2010.12.012
 175. Bentebibel S-E, Khurana S, Schmitt N, et al. ICOS+PD-1+CXCR3+ T follicular helper cells contribute to the generation of high-avidity antibodies following influenza vaccination. *Sci Rep*. 2016;6(1):26494. doi:10.1038/srep26494
 176. Heit A, Schmitz F, Gerdt S, et al. Vaccination establishes clonal relatives of germinal center T cells in the blood of humans. *J Exp Med*. 2017;214(7):2139-2152. doi:10.1084/jem.20161794
 177. Brenna E, Davydov AN, Ladell K, et al. CD4+ T Follicular Helper Cells in Human Tonsils and Blood Are Clonally Convergent but Divergent from Non-Tfh CD4+ Cells. *Cell Rep*. 2020;30(1):137-152.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.12.016
 178. Vella LA, Buggert M, Manne S, et al. T follicular helper cells in human efferent lymph retain lymphoid characteristics. *J Clin Invest*. 2019;129(8):3185-3200. doi:10.1172/JCI125628
 179. Asrir A, Aloulou M, Gador M, Pérals C, Fazilleau N. Interconnected subsets of memory follicular helper T cells have different effector functions. *Nat Commun*. 2017;8(1):847. doi:10.1038/s41467-017-00843-7
 180. Crotty S. T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity*. 2014;41(4):529-542. doi:10.1016/J.IMMUNI.2014.10.004
 181. Powell MD, Read KA, Sreekumar BK, Jones DM, Oestreich KJ. IL-12 signaling drives the differentiation and function of a TH1-derived TFH1-like cell population. *Sci Rep*. 2019;9(1):13991. doi:10.1038/s41598-019-50614-1
 182. Weinstein JS, Laidlaw BJ, Lu Y, et al. STAT4 and T-bet control follicular helper T cell development in viral infections. *J Exp Med*. 2018;215(3):999-999. doi:10.1084/jem.2017045702062018c
 183. Fang D, Cui K, Mao K, et al. Transient T-bet expression functionally specifies a distinct T follicular helper subset. *J Exp Med*. 2018;215(11):2705-2714. doi:10.1084/jem.20180927
 184. Crotty S. T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity*. 2014;41(4):529-542. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.004
 185. Velu V, Mylvaganam G, Ibegbu C, Amara RR. Tfh1 Cells in Germinal Centers During Chronic HIV/SIV Infection. *Front Immunol*.

- 2018;9:1. doi:10.3389/fimmu.2018.01272
186. Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, et al. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol.* 2009;10(2):167-175. doi:10.1038/ni.1690
 187. Wichner K, Stauss D, Kampfrath B, et al. Dysregulated development of IL-17- and IL-21-expressing follicular helper T cells and increased germinal center formation in the absence of ROR γ t. *FASEB J.* 2016;30(2):761-774. doi:10.1096/fj.15-274001
 188. Ueno H. T follicular helper cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2016;43:24-31. doi:10.1016/j.coi.2016.08.003
 189. Benteibibel S-E, Lopez S, Obermoser G, et al. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH Cells Correlates with Antibody Responses to Influenza Vaccination. *Sci Transl Med.* 2013;5(176):176ra32-176ra32. doi:10.1126/scitranslmed.3005191
 190. Huber JE, Ahlfeld J, Scheck MK, et al. Dynamic changes in circulating T follicular helper cell composition predict neutralising antibody responses after yellow fever vaccination. 2020;9:1-16. doi:10.1002/cti.2.1129
 191. Wong MT, Chen J, Narayanan S, Curotto de Lafaille MA, Poidinger M, Newell EW. Mapping the Diversity of Follicular Helper T Cells in Human Blood and Tonsils Using High-Dimensional Mass Cytometry. *CellReports.* 2015;11:1822-1833. doi:10.1016/j.celrep.2015.05.022
 192. Crotty S. Do Memory CD4 T Cells Keep Their Cell-Type Programming: Plasticity versus Fate Commitment? *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(3):a032102. doi:10.1101/cshperspect.a032102
 193. Masur H, Michelis MA, Greene JB, et al. An outbreak of community-acquired pneumocystis carinii pneumonia. *N Engl J Med.* 1981.
 194. Hymes KB, Cheung T, Greene JB, et al. Kaposi's sarcoma in homosexual men—a report of eight cases. *Lancet.* 1981;317(8247):598-600.
 195. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Rev Investig Clin.* 1983;56(2):126-129.
 196. Klatzmann D, Barré-Sinoussi F, Nugeyre M thérèse, et al. Selective Tropism of Lymphadenopathy Associated cin with those stained with Hoechst- Virus (LAV) for Helper-Inducer T Lymphocytes. *Science.* 1984;7(JULY 1984):6-10.
 197. Klatzmann D, Champagne E, Guetard D, et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature.* 1984;312(5996):767-768. doi:10.1038/312767a0
 198. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, M M. Rapid Turnover of Plasma Virions and CD4 Lymphocytes in HIV-1 Infection. *Nature.* 1995;373:123-126.
 199. Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: Quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med.* 1995;1(12):1284-1290. doi:10.1038/nm1295-1284
 200. Moore JP, Trkola A, Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr Opin Immunol.* 1997;9(4):551-562. doi:10.1016/S0952-7915(97)80110-0
 201. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med.* 2011;365(6):493-505. doi:10.1056/NEJMoa1105243
 202. Ghosn J, Taiwo B, Seedat S, Autran B, Katlama C. Hiv. *Lancet.* 2018;392(10148):685-697. doi:10.1016/S0140-6736(18)31311-4
 203. Kelley CF, Barbour JD, Hecht FM. The Relation Between Symptoms, Viral Load, and Viral Load Set Point in Primary HIV Infection. *J AIDS J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45(4):445-448. doi:10.1097/QAI.0b013e318074ef6e
 204. Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: Infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(11):859-868. doi:10.1038/nri1960
 205. Moukambi F, Rabazanahary H, Rodrigues V, et al. Early Loss of Splenic Tfh Cells in SIV-Infected Rhesus Macaques. Silvestri G, ed. *PLOS Pathog.* 2015;11(12):e1005287. doi:10.1371/journal.ppat.1005287
 206. Moukambi F, Rabazanahary H, Fortier Y, et al. Mucosal T follicular helper cells in SIV-infected rhesus macaques: contributing role of IL-27. *Mucosal Immunol.* 2019;12(4):1038-1054. doi:10.1038/s41385-019-0174-0
 207. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1(1):15035. doi:10.1038/nrdp.2015.35
 208. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature.* 2005;434(7037):1093-1097. doi:10.1038/nature03501
 209. Estes JD. Pathobiology of HIV/SIV-associated changes in secondary lymphoid tissues. *Immunol Rev.* 2013;254(1):65-77. doi:10.1111/imr.12070
 210. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science (80-).* 1996;272(5265):1167-1170. doi:10.1126/science.272.5265.1167
 211. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med.* 1999;5(5):512-517. doi:10.1038/8394
 212. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med.* 2003;9(6):727-728. doi:10.1038/nm880
 213. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med.* 2009;15(8):893-900. doi:10.1038/nm.1972

214. Pantaleo G, Fauci AS. Tracking HIV during disease progression. *Curr Opin Immunol.* 1994;6(4):600-604. doi:10.1016/0952-7915(94)90148-1
215. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature.* 1993;362(6418):355-358. doi:10.1038/362355a0
216. Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature.* 2016;530(7588):51-56. doi:10.1038/nature16933
217. Colby DJ, Trautmann L, Pinyakorn S, et al. Rapid HIV RNA rebound after antiretroviral treatment interruption in persons durably suppressed in Fiebig i acute HIV infection brief-communication. *Nat Med.* 2018;24(7):923-926. doi:10.1038/s41591-018-0026-6
218. Wong JK, Yukl SA. Tissue reservoirs of HIV. *Curr Opin HIV AIDS.* 2016;11(4):362-370. doi:10.1097/COH.0000000000000293
219. Alòs L, Navarrete P, Morente V, et al. Immunoarchitecture of lymphoid tissue in HIV-infection during antiretroviral therapy correlates with viral persistence. *Mod Pathol.* 2005;18(1):127-136. doi:10.1038/modpathol.3800267
220. North TW, Higgins J, Deere JD, et al. Viral Sanctuaries during Highly Active Antiretroviral Therapy in a Nonhuman Primate Model for AIDS. *J Virol.* 2010;84(6):2913-2922. doi:10.1128/JVI.02356-09
221. Horiike M, Iwami S, Kodama M, et al. Lymph nodes harbor viral reservoirs that cause rebound of plasma viremia in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy. *Virology.* 2012;423(2):107-118. doi:10.1016/j.virol.2011.11.024
222. Fletcher C V., Staskus K, Wietgreffe SW, et al. Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(6):2307-2312. doi:10.1073/pnas.1318249111
223. McManus WR, Bale MJ, Spindler J, et al. HIV-1 in lymph nodes is maintained by cellular proliferation during antiretroviral therapy. *J Clin Invest.* 2019;129(11):4629-4642. doi:10.1172/JCI126714
224. Chun T, Nickle DC, Justement JS, et al. Persistence of HIV in Gut-Associated Lymphoid Tissue despite Long-Term Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis.* 2008;197(5):714-720. doi:10.1086/527324
225. Henderson LJ, Reoma LB, Kovacs JA, Nath A. Advances toward Curing HIV-1 Infection in Tissue Reservoirs. *J Virol.* 2019;94(3):1-21. doi:10.1128/jvi.00375-19
226. Doitsh G, Greene WC. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost during HIV Infection. *Cell Host Microbe.* 2016;19(3):280-291. doi:10.1016/j.chom.2016.02.012
227. Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med.* 1995;1(2):129-134. doi:10.1038/nm0295-129
228. Doitsh G, Cavrois M, Lassen KG, et al. Abortive HIV Infection Mediates CD4 T Cell Depletion and Inflammation in Human Lymphoid Tissue. *Cell.* 2010;143(5):789-801. doi:10.1016/j.cell.2010.11.001
229. Muñoz-Arias I, Doitsh G, Yang Z, Sowinski S, Ruelas D, Greene WC. Blood-Derived CD4 T Cells Naturally Resist Pyroptosis during Abortive HIV-1 Infection. *Cell Host Microbe.* 2015;18(4):463-470. doi:10.1016/j.chom.2015.09.010
230. Cheyner R, Henrichswark S, Hadida F, et al. HIV and T cell expansion in splenic white pulps is accompanied by infiltration of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cell.* 1994. doi:10.1016/0092-8674(94)90417-0
231. Mikulak J, Oriolo F, Zaghi E, Di Vito C, Mavilio D. Natural killer cells in HIV-1 infection and therapy. *AIDS.* 2017;31(17):2317-2330. doi:10.1097/QAD.0000000000001645
232. Cubas RA, Mudd JC, Savoye A-L, et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med.* 2013;19(4):494-499. doi:10.1038/nm.3109
233. Colineau L, Rouers A, Yamamoto T, et al. HIV-Infected Spleens Present Altered Follicular Helper T Cell (T_{fh}) Subsets and Skewed B Cell Maturation. *PLoS One.* 2015. doi:10.1371/journal.pone.0140978
234. Coffin JM, Wells DW, Zerbato JM, et al. Clones of infected cells arise early in HIV-infected individuals. *JCI Insight.* 2019;4(12):0-15. doi:10.1172/jci.insight.128432
235. Kreisberg JF, Yonemoto W, Greene WC. Endogenous factors enhance HIV infection of tissue naive CD4 T cells by stimulating high molecular mass APOBEC3G complex formation. *J Exp Med.* 2006;203(4):865-870. doi:10.1084/jem.20051856
236. Haase AT. POPULATION BIOLOGY OF HIV-1 INFECTION: Viral and CD4 + T Cell Demographics and Dynamics in Lymphatic Tissues. *Annu Rev Immunol.* 1999;17(1):625-656. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.625
237. Chun T, Carruth L, Finzi D, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature.* 1997;387(6629):183-188. doi:10.1038/387183a0
238. Shan L, Deng K, Gao H, et al. Transcriptional Reprogramming during Effector-to-Memory Transition Renders CD4+ T Cells Permissive for Latent HIV-1 Infection. *Immunity.* 2017;47(4):766-775.e3. doi:10.1016/j.immuni.2017.09.014
239. Ait-Ammar A, Kula A, Darcis G, et al. Current Status of Latency Reversing Agents Facing the Heterogeneity of HIV-1 Cellular and Tissue Reservoirs. *Front Microbiol.* 2020;10(January). doi:10.3389/fmicb.2019.03060
240. Cantero-Pérez J, Grau-Expósito J, Serra-Peinado C, et al. Resident memory T cells are a cellular reservoir for HIV in the cervical mucosa.

- Nat Commun.* 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-12732-2
241. Kwon KJ, Timmons AE, Sengupta S, et al. Different human resting memory CD4+ T cell subsets show similar low inducibility of latent HIV-1 proviruses. *Sci Transl Med.* 2020;12(528):1-14. doi:10.1126/scitranslmed.aax6795
 242. Lee GQ, Orlova-Fink N, Einkauf K, et al. Clonal expansion of genome-intact HIV-1 in functionally polarized Th1 CD4+ T cells. *J Clin Invest.* 2017;127(7):2689-2696. doi:10.1172/JCI93289
 243. Tran TA, de Goër de Herve MG, Hendel-Chavez H, et al. Resting regulatory CD4 T cells: A site of HIV persistence in patients on long-term effective antiretroviral therapy. *PLoS One.* 2008;3(10). doi:10.1371/journal.pone.0003305
 244. Chege D, Sheth PM, Kain T, et al. Sigmoid Th17 populations, the HIV latent reservoir, and microbial translocation in men on long-term antiretroviral therapy. *AIDS.* 2011;25(6):741-749. doi:10.1097/QAD.0b013e328344cefb
 245. Pardons M, Baxter AE, Massanella M, et al. Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection. *PLoS Pathog.* 2019;15(2):1-28. doi:10.1371/journal.ppat.1007619
 246. Hani L, Chaillon A, Nere ML, et al. Proliferative memory SAMHD1low CD4+ T cells harbour high levels of HIV-1 with compartmentalized viral populations. *PLoS Pathog.* 2019;15(6):1-25. doi:10.1371/journal.ppat.1007868
 247. Sun H, Kim D, Li X, et al. Th1/17 Polarization of CD4 T Cells Supports HIV-1 Persistence during Antiretroviral Therapy. Silvestri G, ed. *J Virol.* 2015;89(22):11284-11293. doi:10.1128/JVI.01595-15
 248. Lai SH, Starke CE, Flynn JK, et al. Simian Immunodeficiency Virus Infects Functionally Polarized Memory CD4 T Cells Equivalently In Vivo. Kirchhoff F, ed. *J Virol.* 2019;93(9):1-11. doi:10.1128/JVI.02163-18
 249. Rallón N, García M, García-Samaniego J, et al. Expression of PD-1 and Tim-3 markers of T-cell exhaustion is associated with CD4 dynamics during the course of untreated and treated HIV infection. Speck RF, ed. *PLoS One.* 2018;13(3):e0193829. doi:10.1371/journal.pone.0193829
 250. Fromentin R, DaFonseca S, Costiniuk CT, et al. PD-1 blockade potentiates HIV latency reversal ex vivo in CD4 + T cells from ART-suppressed individuals. *Nat Commun.* 2019;10(1):1-7. doi:10.1038/s41467-019-08798-7
 251. Darcis G, Kootstra NA, Hooibrink B, et al. CD32+CD4+ T Cells Are Highly Enriched for HIV DNA and Can Support Transcriptional Latency. *Cell Rep.* 2020;30(7):2284-2296.e3. doi:10.1016/j.celrep.2020.01.071
 252. Descours B, Petitjean G, López-Zaragoza JL, et al. CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature.* 2017;543(7646):564-567. doi:10.1038/nature21710
 253. Noto A, Procopio FA, Banga R, et al. CD32 + and PD-1 + Lymph Node CD4 T Cells Support Persistent HIV-1 Transcription in Treated Aviremic Individuals. Silvestri G, ed. *J Virol.* 2018;92(20):901-919. doi:10.1128/JVI.00901-18
 254. Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, et al. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. *J Clin Invest.* 1989;84(6):1892-1899. doi:10.1172/JCI114376
 255. Harari A, Petitpierre S, Vallerian F, Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: Changes after antiretroviral therapy. *Blood.* 2004;103(3):966-972. doi:10.1182/blood-2003-04-1203
 256. Palmer BE, Blyveis N, Fontenot AP, Wilson CC. Functional and Phenotypic Characterization of CD57 + CD4 + T Cells and Their Association with HIV-1-Induced T Cell Dysfunction. *J Immunol.* 2005;175(12):8415-8423. doi:10.4049/jimmunol.175.12.8415
 257. Jiang W, Younes S-A, Funderburg NT, et al. Cycling Memory CD4+ T Cells in HIV Disease Have a Diverse T Cell Receptor Repertoire and a Phenotype Consistent with Bystander Activation. *J Virol.* 2014;88(10):5369-5380. doi:10.1128/JVI.00017-14
 258. Younes S-A, Yassine-Diab B, Dumont AR, et al. HIV-1 Viremia Prevents the Establishment of Interleukin 2–producing HIV-specific Memory CD4+ T Cells Endowed with Proliferative Capacity. *J Exp Med.* 2003;198(12):1909-1922. doi:10.1084/jem.20031598
 259. Sieg SF, Bazdar DA, Harding C V., Lederman MM. Differential Expression of Interleukin-2 and Gamma Interferon in Human Immunodeficiency Virus Disease. *J Virol.* 2001;75(20):9983-9985. doi:10.1128/jvi.75.20.9983-9985.2001
 260. Fenwick C, Joo V, Jacquier P, et al. T-cell exhaustion in HIV infection. *Immunol Rev.* 2019;292(1):149-163. doi:10.1111/imr.12823
 261. Palmer BE, Boritz E, Wilson CC. Effects of Sustained HIV-1 Plasma Viremia on HIV-1 Gag-Specific CD4 + T Cell Maturation and Function. *J Immunol.* 2004;172(5):3337-3347. doi:10.4049/jimmunol.172.5.3337
 262. Colle JH, Moreau JL, Fontanet A, et al. Regulatory dysfunction of the interleukin-7 receptor in CD4 and CD8 lymphocytes from HIV-infected patients - Effects of antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;42(3):277-285. doi:10.1097/01.qai.0000214823.11034.4e
 263. David D, Bani L, Moreau JL, et al. Regulatory dysfunction of the interleukin-2 receptor during HIV infection and the impact of triple combination therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(19):11348-11353. doi:10.1073/pnas.95.19.11348
 264. Pothlichet J, Rose T, Bugault F, et al. PLA2G1B is involved in CD4 energy and CD4 lymphopenia in HIV-infected patients. *J Clin Invest.* 2020;130(6):2872-2887. doi:10.1172/JCI131842

265. Song CB, Zhang L, Wu X, et al. CD4+CD38+ central memory T cells contribute to HIV persistence in HIV-infected individuals on long-term ART. *J Transl Med.* 2020;18(1):1-10. doi:10.1186/s12967-020-02245-8
266. Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol.* 2008;214(2):231-241. doi:10.1002/path.2276
267. Sokoya T, Steel HC, Nieuwoudt M, Rossouw TM. HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. *Mediators Inflamm.* 2017;2017(II). doi:10.1155/2017/6825493
268. Pasquereau S, Kumar A, Herbein G. Targeting TNF and TNF receptor pathway in HIV-1 infection: From immune activation to viral reservoirs. *Viruses.* 2017;9(4):1-17. doi:10.3390/v9040064
269. Ruffin N, Hani L, Seddiki N. From dendritic cells to B cells dysfunctions during HIV-1 infection: T follicular helper cells at the crossroads. *Immunology.* 2017;151(2):137-145. doi:10.1111/imm.12730
270. Gringhuis SI, Kaptein TM, Wevers BA, et al. Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via DC-SIGN-dependent IL-27 production. *Nat Commun.* 2014;5:5074. doi:10.1038/ncomms6074
271. Gringhuis SI, Van Der Vlist M, Van Den Berg LM, Den Dunnen J, Litjens M, Geijtenbeek TBH. HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nat Immunol.* 2010;11(5):419-426. doi:10.1038/ni.1858
272. Meães HZ, Haug M, Beckwith MS, et al. Sensing of HIV-1 by TLR8 activates human T cells and reverses latency. *Nat Commun.* 2020;11(1):1-16. doi:10.1038/s41467-019-13837-4
273. Mehndru S, Poles MA, Tenner-Racz K, et al. Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4+ T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med.* 2004;200(6):761-770. doi:10.1084/jem.20041196
274. Veazey RS. Gastrointestinal Tract as a Major Site of CD4+ T Cell Depletion and Viral Replication in SIV Infection. *Science (80-).* 1998;280(5362):427-431. doi:10.1126/science.280.5362.427
275. Brechley JM, Price DA, Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006;12(12):1365-1371. doi:10.1038/nm1511
276. Boulougoura A, Sereti I. HIV infection and immune activation. *Curr Opin HIV AIDS.* 2016;11(2):191-200. doi:10.1097/COH.0000000000000241
277. Deeks SG, Tracy R, Douek DC. Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. *Immunity.* 2013;39(4):633-645. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.001
278. Hernández-Walías F, Ruiz-de-León MJ, Rosado-Sánchez I, et al. New signatures of poor CD4 cell recovery after suppressive antiretroviral therapy in HIV-1-infected individuals: involvement of miR-192, IL-6, sCD14 and miR-144. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-11. doi:10.1038/s41598-020-60073-8
279. Neuhaus J, Jacobs, Jr DR, Baker J V., et al. Markers of Inflammation, Coagulation, and Renal Function Are Elevated in Adults with HIV Infection. *J Infect Dis.* 2010;201(12):1788-1795. doi:10.1086/652749
280. Biancotto A, Grivel J-C, Iglehart SJ, et al. Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. *Blood.* 2007;109(10):4272-4279. doi:10.1182/blood-2006-11-055764
281. Schacker TW, Nguyen PL, Beilman GJ, et al. Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *J Clin Invest.* 2002;110(8):1133-1139. doi:10.1172/JCI16413
282. Zeng M, Paiardini M, Engram JC, et al. Critical role of CD4 T cells in maintaining lymphoid tissue structure for immune cell homeostasis and reconstitution. *Blood.* 2012;120(9):1856-1867. doi:10.1182/blood-2012-03-418624
283. Zeng M, Southern PJ, Reilly CS, et al. Lymphoid Tissue Damage in HIV-1 Infection Depletes Naïve T Cells and Limits T Cell Reconstitution after Antiretroviral Therapy. Silvestri G, ed. *PLoS Pathog.* 2012;8(1):e1002437. doi:10.1371/journal.ppat.1002437
284. Estes JD, Reilly C, Trubey CM, et al. Antifibrotic therapy in simian immunodeficiency virus infection preserves CD4+ T-cell populations and improves immune reconstitution with antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2015;211(5):744-754. doi:10.1093/infdis/jiu519
285. Schacker TW, Reilly C, Beilman GJ, et al. Amount of lymphatic tissue fibrosis in HIV infection predicts magnitude of HAART-associated change in peripheral CD4 cell count. *AIDS.* 2005;19(18):2169-2171. doi:10.1097/01.aids.0000194801.51422.03
286. Wilson EMP, Sereti I. Immune restoration after antiretroviral therapy: the pitfalls of hasty or incomplete repairs. *Immunol Rev.* 2013;254(1):343-354. doi:10.1111/imr.12064
287. Diaz LK, Murphy RL, Phair JP, Variakojis D. The AIDS autopsy spleen: A comparison of the pre-Anti-retroviral and highly active anti-retroviral therapy eras. *Mod Pathol.* 2002;15(4):406-412. doi:10.1038/modpathol.3880538
288. Schacker TW, Nguyen PL, Martinez E, et al. Persistent Abnormalities in Lymphoid Tissues of Human Immunodeficiency Virus–Infected Patients Successfully Treated with Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis.* 2002;186(8):1092-1097. doi:10.1086/343802
289. Hong JJ, Di Volpe Silveira EL, Amancha PK, et al. Early initiation of antiretroviral treatment postSIV infection does not resolve lymphoid tissue activation. *Aids.* 2017;31(13):1819-1824. doi:10.1097/QAD.0000000000001576
290. Moysi E, Pallikkuth S, De Armas LR, et al. Altered immune cell follicular dynamics in HIV infection following influenza vaccination. *J*

- Clin Invest.* 2018. doi:10.1172/JCI99884
291. Miller EA, Spadaccia MR, O'Brien MP, et al. Plasma factors during chronic HIV-1 infection impair IL-12 secretion by myeloid dendritic cells via a virus-independent pathway. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012;61(5):535-544. doi:10.1097/QAI.0b013e31826afbce
 292. Frleta D, Ochoa CE, Kramer HB, et al. HIV-1 infection-induced apoptotic microparticles inhibit human DCs via CD44. *J Clin Invest.* 2012;122(12):4685-4697. doi:10.1172/JCI64439
 293. Buisson S, Benlahrech A, Gazzard B, Gotch F, Kelleher P, Patterson S. Monocyte-Derived Dendritic Cells from HIV Type 1-Infected Individuals Show Reduced Ability to Stimulate T Cells and Have Altered Production of Interleukin (IL)-12 and IL-10. *J Infect Dis.* 2009;199(12):1862-1871. doi:10.1086/599122
 294. Miller E, Bhardwaj N. Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection. *Immunol Rev.* 2013;254(1):170-189. doi:10.1111/imr.12082
 295. Hertoghs N, van der Aar AMG, Setiawan LC, Kootstra NA, Gringhuis SI, Geijtenbeek TBH. SAMHD1 Degradation Enhances Active Suppression of Dendritic Cell Maturation by HIV-1. *J Immunol.* 2015;194(9):4431-4437. doi:10.4049/jimmunol.1403016
 296. Chaudhry A, Das SR, Hussain A, et al. The Nef Protein of HIV-1 Induces Loss of Cell Surface Costimulatory Molecules CD80 and CD86 in APCs. *J Immunol.* 2005;175(7):4566-4574. doi:10.4049/jimmunol.175.7.4566
 297. Nasi A, Amu S, Göthlin M, et al. Dendritic cell response to HIV-1 is controlled by differentiation programs in the cells and strain-specific properties of the virus. *Front Immunol.* 2017;8(MAR):1-10. doi:10.3389/fimmu.2017.00244
 298. Qiao X, He B, Chiu A, Knowles DM, Chadburn A, Cerutti A. Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nat Immunol.* 2006;7(3):302-310. doi:10.1038/ni1302
 299. De Milito A, Nilsson A, Titanji K, et al. Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood.* 2004;103(6):2180-2186. doi:10.1182/blood-2003-07-2375
 300. Malaspina A, Moir S, Kottlilil S, et al. Deleterious Effect of HIV-1 Plasma Viremia on B Cell Costimulatory Function. *J Immunol.* 2003;170(12):5965-5972. doi:10.4049/jimmunol.170.12.5965
 301. Rieckmann P, Poli G, Fox CH, Kehrl JH, Fauci AS. Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor-alpha production and Ig secretion in B lymphocytes from HIV-infected individuals but not from seronegative donors. *J Immunol.* 1991;147(9):2922-2927. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1918999>.
 302. Cagigi A, Mowafi F, Phuong Dang L V., et al. Altered expression of the receptor-ligand pair CXCR5/CXCL13 in B cells during chronic HIV-1 infection. *Blood.* 2008;112(12):4401-4410. doi:10.1182/blood-2008-02-140426
 303. Perreau M, Savoye A-L, De Crignis E, et al. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med.* 2013;210(1):143-156. doi:10.1084/jem.20121932
 304. Kohler SL, Pham MN, Folkvord JM, et al. Germinal Center T Follicular Helper Cells Are Highly Permissive to HIV-1 and Alter Their Phenotype during Virus Replication. *J Immunol.* 2016. doi:10.4049/jimmunol.1502174
 305. Banga R, Procopio FA, Noto A, et al. PD-1+ and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat Med.* 2016;22(7):754-761. doi:10.1038/nm.4113
 306. Aid M, Dupuy FP, Moysi E, et al. Follicular CD4 T Helper Cells As a Major HIV Reservoir Compartment: A Molecular Perspective. *Front Immunol.* 2018;9(JUN):1-8. doi:10.3389/fimmu.2018.00895
 307. Cai Y, Abdel-Mohsen M, Tomescu C, et al. BCL6 Inhibitor-Mediated Downregulation of Phosphorylated SAMHD1 and T Cell Activation Are Associated with Decreased HIV Infection and Reactivation. Silvestri G, ed. *J Virol.* 2018;93(2). doi:10.1128/JVI.01073-18
 308. Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, et al. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest.* 2012;122(9):3271-3280. doi:10.1172/JCI64314
 309. Petrovas C, Yamamoto T, Gerner MY, et al. CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. *J Clin Invest.* 2012;122(9):3281-3294. doi:10.1172/JCI63039
 310. Xu H, Wang X, Malam N, Lackner AA, Veazey RS. Persistent Simian Immunodeficiency Virus Infection Causes Ultimate Depletion of Follicular Th Cells in AIDS. *J Immunol.* 2015;195(9):4351-4357. doi:10.4049/jimmunol.1501273
 311. Morou A, Brunet-Ratnasingham E, Dubé M, et al. Altered differentiation is central to HIV-specific CD4+ T cell dysfunction in progressive disease. *Nat Immunol.* 2019;20(8):1059-1070. doi:10.1038/s41590-019-0418-x
 312. Muir R, Metcalf T, Tardif V, et al. Altered Memory Circulating T Follicular Helper-B Cell Interaction in Early Acute HIV Infection. Douek DC, ed. *PLOS Pathog.* 2016;12(7):e1005777. doi:10.1371/journal.ppat.1005777
 313. Ben S, Wendel, del Alcazar D, He C, et al. The receptor repertoire and functional profile of follicular T cells in HIV-infected lymph nodes. *Sci Immunol.* 2018. doi:10.1126/sciimmunol.aan8884
 314. Velu V, Mylvaganam GH, Gangadhara S, et al. Induction of Th1-Biased T Follicular Helper (Tfh) Cells in Lymphoid Tissues during Chronic Simian Immunodeficiency Virus Infection Defines Functionally Distinct Germinal Center Tfh Cells. *J Immunol.* 2016;197(5):1832-1842. doi:10.4049/jimmunol.1600143
 315. Baiyegunhi O, Ndlovu B, Ogunshola F, et al. Frequencies of Circulating Th1-Biased T Follicular Helper Cells in Acute HIV-1 Infection

- Correlate with the Development of HIV-Specific Antibody Responses and Lower Set Point Viral Load. *J Virol.* 2018;92(15):1-15. doi:10.1128/jvi.00659-18
316. Niessl J, Baxter AE, Morou A, et al. Persistent expansion and Th1-like skewing of HIV-specific circulating T follicular helper cells during antiretroviral therapy. *EBioMedicine.* 2020;54:102727. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102727
317. Susan Moir and Anthony S. Fauci. B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009. doi:10.1038/nri2524
318. Moir S, Fauci AS. B-cell responses to HIV infection. *Immunol Rev.* 2017;275(1):33-48. doi:10.1111/imir.12502
319. Moris A, Pereira M, Chakrabarti L. A role for antibodies in natural HIV control. *Curr Opin HIV AIDS.* 2019;1. doi:10.1097/COH.0000000000000554
320. Buckner CM, Kardava L, Zhang X, et al. Maintenance of HIV-Specific Memory B-Cell Responses in Elite Controllers Despite Low Viral Burdens. *J Infect Dis.* 2016;214(3):390-398. doi:10.1093/infdis/jiw163
321. Rouers A, Klingler J, Su B, et al. HIV-Specific B Cell Frequency Correlates with Neutralization Breadth in Patients Naturally Controlling HIV-Infection. *EBioMedicine.* 2017;21:158-169. doi:10.1016/j.ebiom.2017.05.029
322. Buranapraditkun S, Pissani F, Teigler JE, et al. Preservation of Peripheral T Follicular Helper Cell Function in HIV Controllers. *J Virol.* 2017;91(14):1-14. doi:10.1128/jvi.00497-17
323. Claireaux M, Galperin M, Benati D, et al. A High Frequency of HIV-Specific Circulating Follicular Helper T Cells Is Associated with Preserved Memory B Cell Responses in HIV Controllers. Simon V, Palese P, eds. *MBio.* 2018;9(3). doi:10.1128/mBio.00317-18
324. Cubas R, van Grevenynghe J, Wills S, et al. Reversible Reprogramming of Circulating Memory T Follicular Helper Cell Function during Chronic HIV Infection. *J Immunol.* 2015;195(12):5625-5636. doi:10.4049/jimmunol.1501524
325. Martin-Gayo E, Cronin J, Hickman T, et al. Circulating CXCR5+CXCR3+PD-1^{lo} T_{fh}-like cells in HIV-1 controllers with neutralizing antibody breadth. *JCI Insight.* 2017;2(2). doi:10.1172/jci.insight.89574
326. Martin-Gayo E, Gao C, Chen HR, et al. Immunological Fingerprints of Controllers Developing Neutralizing HIV-1 Antibodies. *Cell Rep.* 2020;30(4):984-996.e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.12.087
327. Caskey M, Klein F, Nussenzweig MC. Broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibodies in the clinic. *Nat Med.* 2019;25(April). doi:10.1038/s41591-019-0412-8
328. Gautam R, Nishimura Y, Pegu A, et al. A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges. *Nature.* 2016;533(7601):105-109. doi:10.1038/nature17677
329. Parsons MS, Chung AW, Kent SJ. Importance of Fc-mediated functions of anti-HIV-1 broadly neutralizing antibodies. *Retrovirology.* 2018;15:58. doi:10.1186/s12977-018-0438-x
330. Cohen K, Altfeld M, Alter G, Stamatatos L. Early Preservation of CXCR5+ PD-1+ Helper T Cells and B Cell Activation Predict the Breadth of Neutralizing Antibody Responses in Chronic HIV-1 Infection. *J Virol.* 2014;88(22):13310-13321. doi:10.1128/JVI.02186-14
331. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, et al. Human Circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ Memory T_{fh} Cells Are Highly Functional and Correlate with Broadly Neutralizing HIV Antibody Responses. *Immunity.* 2013;39(4):758-769. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.031
332. Havenar-Daughton C, Lindqvist M, Heit A, et al. CXCL13 is a plasma biomarker of germinal center activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(10):2702-2707. doi:10.1073/pnas.1520112113
333. Cirelli KM, Carnathan DG, Nogal B, et al. Slow Delivery Immunization Enhances HIV Neutralizing Antibody and Germinal Center Responses via Modulation of Immunodominance. *Cell.* 2019;177(5):1153-1171.e28. doi:10.1016/j.cell.2019.04.012
334. Keréveur A, McIlroy D, Samri A, Oksenhendler E, Clauvel JP, Autran B. Up-regulation of adhesion and MHC molecules on splenic monocyte/macrophages in adult haemophagocytic syndrome. *Br J Haematol.* 1999;104(4):871-877. doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01247.x
335. Gratton S, Cheyrier R, Dumaurier M-J, Oksenhendler E, Wain-Hobson S. Highly restricted spread of HIV-1 and multiply infected cells within splenic germinal centers. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(26):14566-14571. doi:10.1073/pnas.97.26.14566
336. McInnes L, Healy J, Melville J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. 2018. <http://arxiv.org/abs/1802.03426>.
337. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.* 2011;17(1):10. doi:10.14806/ej.17.1.200
338. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods.* 2017;14(4):417-419. doi:10.1038/nmeth.4197
339. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
340. Chen EY, Tan CM, Kou Y, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics.* 2013;14(1):128. doi:10.1186/1471-2105-14-128
341. Cardinaud S, Urrutia A, Rouers A, et al. Triggering of TLR-3, -4, NOD2, and DC-SIGN reduces viral replication and increases T-cell activation capacity of HIV-infected human dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2017;47(5):818-829. doi:10.1002/eji.201646603

342. Davies EG, Cheung M, Gilmour K, et al. Thymus transplantation for complete DiGeorge syndrome: European experience. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(6):1660-1670.e16. doi:10.1016/j.jaci.2017.03.020
343. Markert ML, Devlin BH, Alexieff MJ, et al. Review of 54 patients with complete DiGeorge anomaly enrolled in protocols for thymus transplantation: outcome of 44 consecutive transplants. *Blood*. 2007;109(10):4539-4547. doi:10.1182/blood-2006-10-048652
344. Bhakta NR, Oh DY, Lewis RS. Calcium oscillations regulate thymocyte motility during positive selection in the three-dimensional thymic environment. *Nat Immunol*. 2005;6(2):143-151. doi:10.1038/ni1161
345. Ehrlich LJR, Oh DY, Weissman IL, Lewis RS. Differential Contribution of Chemotaxis and Substrate Restriction to Segregation of Immature and Mature Thymocytes. *Immunity*. 2009;31(6):986-998. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.020
346. Le Borgne M, Ladi E, Dzhagalov I, et al. The impact of negative selection on thymocyte migration in the medulla. *Nat Immunol*. 2009;10(8):823-830. doi:10.1038/ni.1761
347. Halkias J, Melichar HJ, Taylor KT, et al. Opposing chemokine gradients control human thymocyte migration in situ. *J Clin Invest*. 2013;123(5):2131-2142. doi:10.1172/JCI67175
348. Dzhagalov IL, Chen KG, Herzmark P, Robey EA. Elimination of Self-Reactive T Cells in the Thymus: A Timeline for Negative Selection. Bhandoola A, ed. *PLoS Biol*. 2013;11(5):e1001566. doi:10.1371/journal.pbio.1001566
349. Arakelyan A, Fitzgerald W, Grivel J-C, Vanpouille C, Margolis L. Histocultures (tissue explants) in human retrovirology. *Methods Mol Biol*. 2014;1087:233-248. doi:10.1007/978-1-62703-670-2_19
350. Glushakova S, Baibakov B, Margolis LB, Zimmerberg J. Infection of human tonsil histocultures: A model for HIV pathogenesis. *Nat Med*. 1995;1(12):1320-1322. doi:10.1038/nm1295-1320
351. Introini A, Vanpouille C, Grivel J, Margolis L. An ex vivo Model of HIV-1 Infection in Human Lymphoid Tissue and Cervico-vaginal Tissue. *BIO-PROTOCOL*. 2014;4(4). doi:10.21769/BioProtoc.1047
352. Grivel J-C, Margolis L. Use of human tissue explants to study human infectious agents. 2009. doi:10.1038/nprot.2008.245
353. Ma CS, Suryani S, Avery DT, et al. Early commitment of naïve human CD4 + T cells to the T follicular helper (T_{FH}) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(8):590-600. doi:10.1038/icb.2009.64
354. Bollig N, Brusić A, Kellner K, et al. Transcription factor IRF4 determines germinal center formation through follicular T-helper cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(22):8664-8669. doi:10.1073/pnas.1205834109
355. Choi YS, Eto D, Yang JA, Lao C, Crotty S. Cutting Edge: STAT1 Is Required for IL-6-Mediated Bel6 Induction for Early Follicular Helper Cell Differentiation. *J Immunol*. 2013;190(7):3049-3053. doi:10.4049/jimmunol.1203032
356. Lahmann A, Kuhrau J, Fuhrmann F, et al. Bach2 Controls T Follicular Helper Cells by Direct Repression of Bcl-6. *J Immunol*. 2019;202(8):2229-2239. doi:10.4049/jimmunol.1801400
357. Shaw LA, Bélanger S, Omilusik KD, et al. Id2 reinforces TH1 differentiation and inhibits E2A to repress TFH differentiation. *Nat Immunol*. 2016;17(7):834-843. doi:10.1038/ni.3461
358. Choi YS, Gullicksrud JA, Xing S, et al. LEF-1 and TCF-1 orchestrate TFH differentiation by regulating differentiation circuits upstream of the transcriptional repressor Bcl6. *Nat Immunol*. 2015;16(9):980-990. doi:10.1038/ni.3226
359. Qi H, Tian D, Li M, et al. Foxo3 Promotes the Differentiation and Function of Follicular Helper T Cells. *Cell Rep*. 2020;31(6):107621. doi:10.1016/j.celrep.2020.107621
360. Xu L, Cao Y, Xie Z, et al. The transcription factor TCF-1 initiates the differentiation of TFH cells during acute viral infection. *Nat Immunol*. 2015;16(9):991-999. doi:10.1038/ni.3229
361. Finetti F, Capitani N, Manganaro N, et al. Optimization of Organotypic Cultures of Mouse Spleen for Staining and Functional Assays. *Front Immunol*. 2020;11(March):471. doi:10.3389/fimmu.2020.00471
362. Kallendrusch S, Merz F, Bechmann I, Mayr SG, Zink M. Long-Term Tissue Culture of Adult Brain and Spleen Slices on Nanostructured Scaffolds. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(9):1601336. doi:10.1002/adhm.201601336
363. Donnadieu E, Reisinger KB, Michel Y, et al. Landscape of T Follicular Helper Cell Dynamics in Human Germinal Centers. *J Immunol*. 2020. doi:10.4049/jimmunol.1901475
364. Schmidt A, Huber JE, Sercan Alp Ö, et al. Complex human adenoid tissue-based ex vivo culture systems reveal anti-inflammatory drug effects on germinal center T and B cells. *EBioMedicine*. 2020;Manuscript:provisionally-accepted. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102684
365. Havenar-Daughton C, Carnathan DG, Torrents De La Peñ A, et al. Direct Probing of Germinal Center Responses Reveals Immunological Features and Bottlenecks for Neutralizing Antibody Responses to HIV Env Trimer. *Cell Rep*. 2016;17:2195-2209. doi:10.1016/j.celrep.2016.10.085
366. Pauthner M, Havenar-Daughton C, Sok D, et al. Elicitation of Robust Tier 2 Neutralizing Antibody Responses in Nonhuman Primates by HIV Envelope Trimer Immunization Using Optimized Approaches. *Immunity*. 2017;46:1073-1088. doi:10.1016/j.immuni.2017.05.007
367. Havenar-Daughton C, Newton IG, Zare SY, et al. Normal human lymph node T follicular helper cells and germinal center B cells accessed via fine needle aspirations. *J Immunol Methods*. 2020;479(October 2019):112746. doi:10.1016/j.jim.2020.112746

368. W. McDonald P, A. Read K, E. Baker C, et al. IL-7 signalling represses Bcl-6 and the TFH gene program. *Nat Commun.* 2016. doi:10.1038/ncomms10285
369. Seo YB, Im SJ, Namkoong H, et al. Crucial Roles of Interleukin-7 in the Development of T Follicular Helper Cells and in the Induction of Humoral Immunity. *J Virol.* 2014;88(16):8998-9009. doi:10.1128/JVI.00534-14
370. Gutierrez-Arcelus M, Teslovich N, Mola AR, et al. Lymphocyte innateness defined by transcriptional states reflects a balance between proliferation and effector functions. *Nat Commun.* 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-08604-4
371. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature.* 2017;542(7639):110-114. doi:10.1038/nature20810
372. Liarski VM, Kaverina N, Chang A, et al. Cell Distance Mapping Identifies Functional T Follicular Helper Cells in Inflamed Human Renal Tissue. *Sci Transl Med.* 2014;6(230):230ra46-230ra46. doi:10.1126/scitranslmed.3008146
373. Taylor DK, Mittereder N, Kuta E, et al. T follicular helper-like cells contribute to skin fibrosis. *Sci Transl Med.* 2018;10(431):1-16. doi:10.1126/scitranslmed.aaf5307
374. Van Dana V, Bauer L, Kroczeck RA, Hutloff A. ICOS costimulation differentially affects T cells in secondary lymphoid organs and inflamed tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018;59(4):437-447. doi:10.1165/rcmb.2017-0309OC
375. Leon B, Ballesteros-Tato A, S. Misra R, Wojciechowski W, E. Lund F. Unraveling Effector Functions of B Cells During Infection: The Hidden World Beyond Antibody Production. *Infect Disord - Drug Targets.* 2012;12(3):213-221. doi:10.2174/187152612800564437
376. A. Barr T, Gray M, Gray D. B Cells: Programmers of CD4 T Cell Responses. *Infect Disord - Drug Targets.* 2012;12(3):222-231. doi:10.2174/187152612800564446
377. Andris F, Denanglaire S, Anciaux M, Hercor M, Hussein H, Leo O. The transcription factor c-Maf promotes the differentiation of follicular helper T cells. *Front Immunol.* 2017;8(APR):1-11. doi:10.3389/fimmu.2017.00480
378. Del Alcazar D, Wang Y, He C, et al. Mapping the Lineage Relationship between CXCR5+ and CXCR5- CD4+ T Cells in HIV-Infected Human Lymph Nodes. *Cell Rep.* 2019;28(12):3047-3060.e7. doi:10.1016/j.celrep.2019.08.037
379. Rieckmann P, Poli G, Kehrl JH, Fauci AS. Activated B lymphocytes from human immunodeficiency virus-infected individuals induce virus expression in infected T cells and a promonocytic cell line, U1. *J Exp Med.* 1991;173(1):1-5. doi:10.1084/jem.173.1.1
380. Huot N, Bosinger SE, Paiardini M, Reeves RK, Müller-Trutwin M. Lymph node cellular and viral dynamics in natural hosts and impact for HIV cure strategies. *Front Immunol.* 2018;9(APR):1. doi:10.3389/fimmu.2018.00780
381. Planchais C, Hocqueloux L, Ibanez C, et al. Early Antiretroviral Therapy Preserves Functional Follicular Helper T and HIV-Specific B Cells in the Gut Mucosa of HIV-1-Infected Individuals. *J Immunol.* 2018;200(10):3519-3529. doi:10.4049/jimmunol.1701615
382. Von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(11):867-878. doi:10.1038/nri1222
383. Rouers A, Jeger-Madiot R, Moris A, Graff-Dubois S. Lymphocytes T folliculaires helper et VIH. *médecine/ sciences.* 2017;33(10):878-886. doi:10.1051/medsci/20173310020

ANNEXES

“ Germinal centers B-cell reaction and T follicular helper cells in response to HIV-1 infection ” , Revue publiée dans « Current opinion in HIV and AIDS », 2019

REVIEW



Germinal centers B-cell reaction and T follicular helper cells in response to HIV-1 infection

Raphaël Jeger-Madiot, Maud Heredia, and Stéphanie Graff-Dubois

Purpose of review

This review aims to summarize the recent findings on germinal center B-cell reaction and Tfh cells in HIV-1 infection, with particular emphasis on the spatial organization of the germinal center, follicular cell regulation, and cellular alterations resulting from HIV infection.

Recent findings

HIV-specific bNAbs are generated by iterative cycles of B-cell maturation supported by GC environment. Recent observations underline that germinal center structural alterations at the earliest stages of HIV infection could impact Tfh cell and germinal center B-cell homeostasis, thus preventing the rise of efficient humoral immunity. Moreover, despite ART treatment, HIV-derived antigens persist, particularly in follicular CD4+ T cells. Antigenic persistence and variability lead to unregulated chronic stimulation. In this context, regulation of the germinal center appears of special interest. In addition to follicular T-regulatory cells (Tfr), new potent regulators of germinal center reaction, such as follicular CD8 T and NK cells have been recently identified.

Summary

Altogether these new data provide a better understanding on how HIV infection severely impacts germinal center reaction. Here we propose several therapeutic approaches to promote the bNAb development in HIV-infected patients by improving the preservation of germinal center architecture and its regulation.

Keywords

germinal center reaction, T follicular helper cells, T follicular regulatory cells, follicular CD8 T cells

INTRODUCTION

Within secondary lymphoid organs, germinal centers are highly specialized structures, which develop in B follicles in response to antigenic challenge. Germinal centers house follicular immune cells, which closely cooperate and create the optimal microenvironment for high-affinity antibody production. Among follicular cells, T-follicular helper (Tfh) cells migrate to the T-B border and provide the B cell help required for B-cell maturation into memory and long-lived plasma cells. In addition, follicular dendritic cells (FDC) are essential to coordinate germinal center-cell positioning and to participate to the selection of high-affinity B cells by presenting antigens [1].

HIV infection severely impacts the lymph node structure, its cellular composition and consequently, the germinal center development [2]. In the acute phase, HIV infection leads to germinal center disorganization and B-cell dysfunctions. Despite antiretroviral therapy (ART) treatment, chronic immune activation and inflammation persist in lymphoid organs, leading to profound structural changes of

germinal center, including collagen deposition in the T-cell zone and fibrosis [3]. In result, HIV-infected (HIV+) patients develop impaired humoral immunity in response to antigenic challenge [4**]. The local persistence of viral antigens is the result of a high susceptibility of follicular CD4+ T-cell subsets to HIV [5]. Antigen persistence deeply impacts the functions and the quantity of germinal center Tfh and germinal center B cells, resulting in a sustained activation of the germinal center and inappropriate antibody production. Indeed, autoimmune syndromes and B-cell lymphomas are frequently described in HIV infection, suggesting a defective germinal center regulation under antigen persistence [6].

Sorbonne Université, Inserm, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses Cimi-Paris, Paris, France

Correspondence to Stéphanie Graff-Dubois, UMRS - 959 Inserm - Sorbonne Université, GH Pitié Salpêtrière - Bat. Cervi, 83 Bd de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France. . Tel: +33 1 42 17 74 77; e-mail: stephanie.graff-dubois@sorbonne-universite.fr

Curr Opin HIV AIDS 2019, 14:000-000

DOI:10.1097/COH.0000000000000557

KEY POINTS

- HIV infection rapidly alters the germinal center structure.
- FDC network alterations impair Tfh cell homeostasis.
- Germinal center B-cell reaction is overactivated by viral persistence.
- Tfh/Tfr cell ratio seems to be an indicative marker of bNAbs development.
- Promising strategies aim at promoting antigen persistence in structurally preserved germinal center.

HIV-1 broadly neutralizing antibodies (bNAbs) require high levels of somatic mutations for optimal neutralization potency [7]. Thus, their development needs sustained antigenic activation that promotes germinal center reaction and iterative cycles of B-cell maturation [8], suggesting a crucial role of Tfh cells. Indeed, recent studies associated bNAbs development with blood subsets that are clonally and functionally related to Tfh cells. Frequency of circulating Tfh cells defined through their expression of PD-1 and CXCR3 were associated with bNAbs generation in several studies [9–11].

In this review, we propose to present recent studies providing a better understanding of germinal center reaction impairments in the context of HIV infection. Hereafter, we discuss the therapeutic approaches aiming at maintaining optimal balance between antigenic persistence and germinal center regulation while preserving the germinal center structure.

THE GERMINAL CENTER REACTION DYNAMICS IN RESPONSE TO ANTIGEN STIMULATION

Protective humoral immunity relies on the induction of highly antigen-specific antibodies and B-cell memory. Germinal center reaction is highly regulated by the spatiotemporal coordination of complex cellular interactions. Recent studies based on high-resolution live-cell imaging combined with single-cell analysis approaches bring breakthroughs in the comprehension of cellular dynamics shaping antibody affinity [12–14].

After antigen recognition, B cells migrate at the T–B border where they establish a cognate antigenic interaction with CXCR5⁺ CD4⁺ T cells. This interaction results in the differentiation of B cells in short-lived extrafollicular plasmablasts and the maturation of T cells that up-regulate BCL-6, Inducible costimulator (ICOS), PD-1 and CXCR5. A small

fraction of activated T and B cells migrate into the follicle, through the CXCL13 chemokine gradient provided by the FDC network, giving rise to the early germinal center [15,16].

Germinal center is characterized by two anatomical compartments, the light zone and the dark zone. The light zone is the place of antigen-driven B-cell selection and the dark zone is the place of intensive B-cell proliferation, somatic hypermutation and class switching [13]. In the light zone, germinal center B cells bind antigen trapped on FDC and interact with Tfh cells resulting in the selection of high-affinity B cells. By displaying different cell-surface densities of peptide–MHCII complexes, B cells compete for interaction with a limited number of Tfh cells, which provide signaling for B-cell survival. Tfh cells express costimulatory molecules, which reinforce their interaction with germinal center B cells. ICOS is implicated in the recruitment of Tfh cells as well as in their help-delivering functions [17]. Recently, dopamine has been identified as a mediator of the Tfh–B-cell interaction where dopamine binds to dopamine receptors expressed by germinal center B cells and induces ICOS-L translocation to the cell surface [18]. Tfh cells produce cytokines, such as IL-21 and IL-4, which are necessary for germinal center formation and B-cell differentiation into long-lived plasma cells, respectively [19,20]. Germinal center Tfh cells are characterized by the expression of the exhaustion marker PD-1, which limits the Tfh cell recruitment into the germinal center through the interaction with PD-L1 expressed on bystander B cells [21**]. Meanwhile, with abundant T-cell help, bystander (i.e. noncognate) B cells could participate in germinal centers and persist long enough to acquire specificity to antigen [22,23*], demonstrating that preimmune BCR engagement is dispensable for germinal center B-cell selection [22]. Interestingly, when T-cell help is limited, BCR signaling can synergize to potentiate germinal center B-cell selection [23*]. Hence, the selection of high-affinity B cells is ensured by highly regulated cognate antigen or bystander T:B-cell interactions. Dark zone stroma consist of CXCL12-expressing reticular cells (CRCs) that maintain dark zone B cells outside the light zone. Within dark zone, B cells undergo somatic hypermutation and class switching to promote antibody diversity while enhancing antigen affinity. Newly generated B-cell clones are then selected by germinal center Tfh cells and FDC in the light zone [24]. To achieve their affinity maturation, germinal center B cells undergo iterative rounds of cyclic re-entry and proliferation of positively selected germinal center B cells, thus maintaining the germinal center reaction until the antigen clearance.

GERMINAL CENTER REACTION HOMEOSTASIS AND POTENT HUMORAL IMMUNITY

Germinal center homeostasis is critical for the induction of high-affinity antibody responses devoided of self-reactivity. Uncontrolled germinal center reaction leads to the production of autoantibodies, showing the need for a tight regulation of Tfh–B-cell interactions [25]. A subset of lymphoid CD4+ regulatory T (Treg) cells termed follicular regulatory T (Tfr) cells are characterized by the expression of both Tregs and Tfh cell-associated markers such as Foxp3, CTLA-4, IL-10 and CXCR5. CTLA-4 is a potent regulator of B-cell responses by suppressing Tfh cell help via CD28 interaction [26]. Once the immune response resolved, concomitant with the reduction of IL-2 concentration, Tfr cells arise from Treg cell population [27,28–30]. By expressing the IL-1 decoy receptor IL-1R2 and the IL-1 antagonist IL-1Ra receptor, Tfr cells limit the IL-1-induced activation of Tfh cells [29]. Thus, IL-1 axis appears as a new potent regulator of the Tfh/Tfr homeostasis. Tfr cells are found in low numbers in secondary lymphoid organs at the steady state, whereas their frequency largely increases with antigenic persistence and ongoing germinal center reaction [31]. Using multiplexed immunohistochemistry, Sayin *et al.* showed that Tfr cells express low levels of PD-1 and are found at the T-B border outside of the germinal center [32]. Their findings suggest that Tfr cells prevent inadequate T–B cell interactions, thus controlling the germinal center entry point. Finally, a recent work on Tfr cells reports an unexpected ‘helper’ effect of Tfr cell-derived IL-10 on germinal center reaction [33].

In sum, tissue-imaging technologies highlight the complex spatial organization of the germinal center that sustains highly regulated cellular interactions.

HIV INFECTION AND GERMINAL CENTER DISRUPTION

HIV-1 (hereafter HIV) infection dramatically affects germinal center architecture during the acute phase, thus dampening the rise of potent humoral immunity. In the absence of ART treatment, follicular CD4+ T cells are rapidly and continuously exposed to HIV, which shows extremely high mutation rate *in vivo*. HIV disseminates within follicles to constitute latent reservoir after ART treatment introduction. Depending on the delay of ART introduction, severe involution of follicles and ultimate destruction of lymphoid tissues are reported in HIV+ patients [34] where a correlation has been established between the destruction of lymph nodes

and the disease progression [35]. Unfortunately, introduction of ART reverses only partially structural alterations of the follicles [36].

As previously described [37,38], Tfh cells and IgG+ follicular memory B cells were found in higher proportions in lymph nodes from HIV+ volunteers as compared with those from healthy controls. To better understand the follicular dynamics in ART-treated patients, Moysi *et al.* [4] investigated by histocytometry Tfh and B-cell-dynamics before and after trivalent seasonal influenza immunization in HIV+ volunteers on combined ART (cART). HIV+ individuals showed higher Tfh cell frequencies despite a global alteration of the follicular architecture with the loss of germinal center polarity. Interestingly, the preservation of the FDC network correlated with higher Tfh frequencies before vaccination and the strength of humoral immunity induced by vaccination [4]. However, after influenza vaccination in HIV+ patients, Tfh cell frequency decreased, associated with a loss of FDCs network. Taken together, these observations suggest that, in HIV infection, Tfh and B-cell dynamics are conditioned by the maintenance of the FDC network and the preservation of the germinal center architecture. Thus, early ART introduction appears critical to limit HIV-induced alterations of the germinal center.

HIV INFECTION SUPPORTS GERMINAL CENTER ACTIVATION

Follicular CD4+ T cells constitute a major compartment for HIV infection, replication and production of viral particles in lymph nodes of viremic individuals [38–40]. By being highly permissive to HIV, Tfh cells are targeted early after infection [5,41]. However, tissue-resident Tfh cells accumulate during the chronic phases of infection [38,39,42] suggesting that HIV infection promotes Tfh cell development within a propitious lymphoid environment. HIV persistence in lymphoid tissues promotes immune activation, which exacerbates secretion of proinflammatory cytokines as tumor necrosis factor- α , interferon- γ , IL-10 and IL-6 [34]. Interestingly, IL-6 has been recently shown to promote extracellular matrix protein 1 (ECM1), which is critical for Tfh cell differentiation [43]. Thus, in every stages of HIV infection, immune activation creates a cytokine environment supporting Tfh cell development.

HIV infection alters Tfh cell gene signature [4,38,39]. In line with previous studies, Moysi *et al.* reported an increased frequency of Tfh cells expressing cell surface markers, such as ICOS and SLAM molecules, which are implicated in B-cell helper functions. By combining TCR sequencing

and mass cytometry analysis, Wendel *et al.* interrogated the functional phenotype and TCR repertoire composition of Tfh cells isolated from lymph nodes of HIV+ individuals. They evidenced an expansion of gag-reactive TCR in Tfh cell subset [44]. HIV-specific Tfh cells presented an activated phenotype and were less polyfunctional as they produced only IL-21, resulting in defective B-cell development.

Altogether, these results underline the overall activation resulting from the persistence of viral antigens in the GCs of ART-treated patients [4**]. HIV infection dramatically impacts the homeostasis of lymphoid tissue-resident Tfh cells, which are increased in frequency and functionally impaired. Keeping in mind that optimal Tfh cell frequency favors survival of high-affinity B-cell clones devoid of self-reactivity, Tfh cell regulation appears critical for the induction of high-affinity antibodies.

T FOLLICULAR HELPER/T FOLLICULAR REGULATORY CELL RATIO AS A KEY PARAMETER OF REGULATED GERMINAL CENTER REACTION

After their discovery in 2011 [30,45,46], Tfr cells have been extensively studied in HIV infection. We and others showed that Tfr cells frequency is higher in secondary lymphoid organs of HIV+ individuals compared with uninfected individuals [38]. As Tfr cells are important regulators of the germinal center reaction, Tfh and Tfr cell dynamics are strongly interrelated. After immunization, Tfh/Tfr cell ratio first increases and then progressively decreases because of the expansion of Tfr cell and to the reduction of Tfh cells (Fig. 1). Even if the mechanisms implicated in the fine regulation of the Tfh/Tfr cell ratio remain unclear, Tfh/Tfr cell homeostasis appears to depend on the antigen

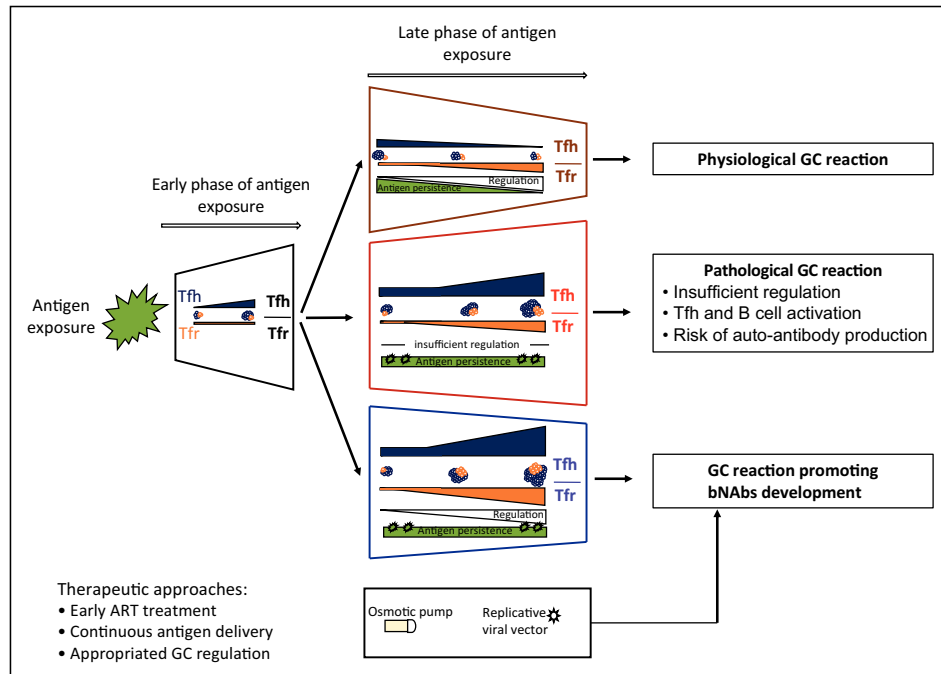


FIGURE 1. Key role of regulation in germinal centers reaction for broadly neutralizing antibodies' emergence under antigenic persistence. In physiological situation, germinal centers reaction resolution appears after antigen clearance and regulation. Tfh/Tfr cell ratio decreases in time with Tfh cells reduction and Tfr cells increase. HIV infection leads in most patients to a pathological germinal centers' reaction where antibody responses are inadequate and sometimes associated with autoimmunity. This pathological germinal centers reaction seems to appear because of antigen persistence combined with a lack of regulation, reflected by continuously increased Tfh/Tfr cell ratio during disease progression. bNAbs development is associated with efficient germinal centers regulation reflected by a decreased Tfh/Tfr cell ratio over time. Thus, therapeutics approaches allowing an optimal balance between antigen persistence and germinal centers regulation appear attractive. Tfh, T follicular helper; Tfr, T regulatory cells.

persistence. In a murine model of viral infection, virus with higher replicative capacity induced higher Tfh/Tfr cell ratio, which was, during the peak of the germinal center response, indicative of the protective, long-lived antibody response [47]. In this way, Tfh/Tfr cell ratio is an essential parameter to take into account for the study of germinal center function and regulation in the context of HIV infection.

In simian immunodeficiency virus (SIV) infection, monkeys show an increase of Tfh/Tfr cell ratio, from acute to chronic phase of the disease [48]. In humans, such longitudinal studies are more difficult to conduct in secondary lymphoid organs. However, using tonsils from HIV+ patients, Roeder *et al.* [49] showed that children, who are known to be particularly potent to develop bNAbs, present a higher frequency of follicular Tfh and Tfr cells but a smaller Tfh/Tfr cell ratio than adults, suggesting a central role of the germinal center regulation for bNAb emergence. Germinal center activation is first characterized by an increase of the Tfh cells, which have to be regulated by a proportionate increase of Tfr cells. Indeed, Fan *et al.* [50] recently showed the development of auto-immune antibodies in SIV+ monkeys with persistent high Tfh/Tfr cell ratio. The persistence of a high Tfh/Tfr cell ratio could result from a continuous germinal center priming with neoantigens deriving from high rate of mutation associated with HIV replication. Interestingly, autoreactivity associated with HIV-infection correlate with bNAb development [51,52] (Fig. 1). This emphasizes the ambivalent role of antigenic persistence and ongoing germinal center reaction in the development of efficient humoral immunity against HIV. Altogether, these studies support the need for a Tfh cell regulation, easily measurable by evaluation of the Tfh/Tfr cell ratio. In addition to Tfr cells, new follicular cell subsets have been identified to play a role in germinal center regulation.

CXCR5+ CD8+ T AND NATURAL KILLER CELLS IN THE CONTROL OF GERMINAL CENTER REACTION

CXCR5+ CD8+ T cells have been recently identified as potent regulators of the germinal center reaction under HIV infection. A recent study confirmed the presence of CXCR5+ CD8+ T cells in secondary lymphoid organs from SIV+ monkeys [53]. Follicular CD8+ T cells have also been evidenced in lymph nodes from HIV+ individuals where local immune activation drives their accumulation [54^{***}]. However, the role of CXCR5+ CD8+ T cells in germinal center reaction under HIV infection is not fully understood. Using in-vitro tonsils HIV infection as

well as in-vivo SIV infection, Miles *et al.* evidenced regulatory functions associated with this cell subset. In human tonsils, CXCR5+ CD8+ T cells limit Tfh B-helper functions through a tim-3 dependent axis. Additionally, CXCR5+ CD8+ T cells induce Tfh cell apoptosis through a HLA-E dependent pathway [55]. Interestingly, the overall frequency of CXCR5+ CD8+ T cells is similar in both children and adults but the frequency of HIV-specific CXCR5+ CD8+ T cells is higher in children [49]. Children with high neutralization breadth display more polyfunctional circulating CXCR5+ CD8+ T cells than those with low neutralization breadth [49]. Altogether, these data suggest a strong relationship between follicular CD8+ T cells, Tfh cell regulation and the neutralization breadth. CXCR5+ CD8+ T cells also play a crucial role in the elimination of HIV-infected cells. Petrovas *et al.* [54^{***}] showed that CXCR5+ CD8+ T cells presented higher cytotoxic abilities compared with conventional CXCR5- CD8+ T cells. By eliminating HIV-infected cells, HIV-specific CXCR5+ CD8+ T cells are supposed to limit viral antigen persistence [54^{***}]. Cytotoxic CXCR5+ CD8+ T cells appear as strong regulators of germinal center regulation through Tfh/Tfr cell ratio modulation by killing HIV-infected Tfh and Tfr cells and thus limiting antigen persistence. Finally, showing that CXCR5+ CD8+ T cells is a heterogenous population, Shen *et al.* [56] recently identified a CXCR5+CD8+ T-cell subset that does not express cytotoxic molecules but instead supports B-cell maturation through IL-21 secretion and CD40L expression. CXCR5+ CD8+ T cells appear as new actors of germinal center reaction dynamics but their functions remain complex.

Already known for their antiviral activity, natural killer cells are taking a growing importance for their role during HIV infection. In HIV+ individuals, a loss of cytotoxic abilities in a blood natural killer cell subset is associated with neutralizing antibody responses [57]. This study suggests that, in blood, the decrease of activated Tfh cell killing mediated by natural killer cells leads to a higher Tfh cell availability and bNAb emergence [57]. Consistently with this work, Rydzynski *et al.* [58] showed in mice the natural killer cell role in the regulation of germinal center reaction where natural killer cells could limit Tfh cell frequency through a perforin-dependent mechanism. In nonpathogenic SIV infection of African green monkeys, Huot *et al.* revealed the presence of CXCR5+ natural killer cells in virus-free lymph nodes where FDC produce high level of IL-15. Anti-IL-15 treatment results in natural killer cell depletion within lymph nodes and leads to viral DNA increase [59]. Potentiality of natural killer/IL-15 pathway was recently evidenced in

human by Garrido *et al.* [60] who showed that blood natural killer cells of HIV⁺ patients stimulated with IL-15 were more able to limit viral replication by killing infected cells, as compared with unstimulated natural killer cells. By limiting viral reservoir, natural killer cells could act on germinal center reaction by modulating antigenic persistence. If the decrease of natural killer cell cytotoxicity preserves Tfh cell compartment for high neutralizing breadth, natural killer cell cytotoxicity appears essential for controlling reservoir establishment in secondary lymphoid organs.

Altogether, these data underline the critical role of these cell actors in germinal center reaction but future work is required to better understand their role under HIV infection. CXCR5⁺ CD8⁺ T and natural killer cells probably include functionally distinct subsets, and the use of single cell approaches would help to decipher the various functions of germinal centers.

CONCLUSION

The development of HIV-specific bNAbs requires sustained antigenic activation that promotes iterative cycles of B-cell maturation and germinal center reaction. In the absence of ART treatment, HIV rapidly invades follicles. Consequently, germinal centers are dramatically altered in their structure and cell distribution, leading to inappropriate activated germinal center reaction. Production of cytokines and chemokines promote the development of functionally altered Tfh cells. Tfh cell increase may dampen the selection of high-affinity HIV-specific B cells and in some extent, promotes the induction of autoreactive B cells. Lessons from recent studies indicate that early ART introduction would preserve the Tfh cell functions. As a consequence, the frequencies of HIV Env gp140-reactive intestinal B cells is higher in patients who were treated early as compared with patients who were treated during the chronic phase of HIV infection [61]. Another, non-exclusive idea is that the presence of viral antigens within the follicles is required to maintain ongoing germinal center reaction and favor bNAb development. Therefore, the goal for ART treatment introduction is to reach the right balance between on the one hand, low-antigen persistence incompatible with the maintenance of the germinal center reaction and, on the other hand, the establishment of HIV reservoir resulting in unregulated ongoing germinal center reaction. In the latter case, one approach is to reinforce the regulation of germinal center in order to control altered Tfh cells. Thus, the use of replicative-based virus vectors is a promising vaccine strategy to promote antigen persistence and

the induction of Tfh/Tfr cell ratio compatible with the induction of bNAbs. Therefore, strategies promoting expansion of regulatory cell subsets combined with systems allowing constant antigen delivery appear to be particularly attractive (Fig. 1).

Acknowledgements

We apologize to authors and colleagues whose work was not cited. We thank lab members, Dr A. Moris and Professor B. Aufran for discussions. We also thank ANRS, Sidaction, Sorbonne Université and INSERM for continuous support.

Financial support and sponsorship

This work was supported by Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:429–457.
2. Estes JD. Pathobiology of HIV/SIV-associated changes in secondary lymphoid tissues. *Immunol Rev* 2013; 254:65–77.
3. Zeng M, Carlis JV, Haase AT, *et al.* Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections. Find the latest version: Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections. *J Clin Invest* 2011; 121:998–1008.
4. Moysi E, Pallikkath S, De Armas LR, *et al.* Altered immune cell follicular dynamics in HIV infection following influenza vaccination. *J Clin Invest* 2018; 128:3171–3185.
- Using histocytometry, this article describes structural and cellular alterations within lymph node biopsies of HIV-infected patients before and after influenza vaccination.
5. Miller SM, Miles B, Guo K, *et al.* Follicular regulatory T cells are highly permissive to R5-tropic HIV-1. *J Virol* 2017; 91:pii: e00430-17.
6. Moody MA, Pedroza-Pacheco I, Vandergriff NA, *et al.* Immune perturbations in HIV-1-infected individuals who make broadly neutralizing antibodies. *Sci Immunol* 2016; 1:aag0851.
7. Mouquet H. Antibody B cell responses in HIV-1 infection. *Trends Immunol* 2014; 35:549–561.
8. Victora GD, Mouquet H. What are the primary limitations in B-cell affinity maturation, and how much affinity maturation can we drive with vaccination? Lessons from the antibody response to HIV-1. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; 10: pii: a029389.
9. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, *et al.* Human circulating PD-1⁺CXCR3⁺CXCR5⁺ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* 2013; 39: 758–769.
10. Cohen K, Altfeld M, Alter G, Stamatatos L. Early preservation of CXCR5⁺ PD-1⁺ helper T cells and B cell activation predict the breadth of neutralizing antibody responses in chronic HIV-1 infection. *J Virol* 2014; 88: 13310–13321.
11. Havenar-Daughton C, Lee JH, Crotty S. Tfh cells and HIV bnAbs, an immunodominance model of the HIV neutralizing antibody generation problem. *Immunol Rev* 2017; 275:49–61.
12. Pasqual G, Chudnovskiy A, Tas JMJ, *et al.* Monitoring T cell-dendritic cell interactions in vivo by intercellular enzymatic labelling. *Nature* 2018; 553:496–500.
13. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal center B cell dynamics. *Immunity* 2016; 45:471–482.
14. Dufaud CR, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Deconstructing the germinal center, one cell at a time. *Curr Opin Immunol* 2017; 45: 112–118.

15. Ballesteros-Tato A, León B, Graf BA, *et al.* Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity* 2012; 36:847–856.
16. McDonald PW, Read KA, Baker CE, *et al.* IL-7 signalling represses Bcl-6 and the TFH gene program. *Nat Commun* 2016; 7:10285.
17. Liu D, Xu H, Shih C, *et al.* T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature* 2015; 517: 214–218.
18. Papa I, Saliba D, Ponzoni M, *et al.* TFH-derived dopamine accelerates productive synapses in germinal centres. *Nature* 2017; 547:318–323.
19. Vogelzang A, McGuire HM, Yu D, *et al.* A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity* 2008; 29:127–137.
20. Ohara J, Paul WE. Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:8221–8225.
21. Shi J, Hou S, Fang Q, *et al.* PD-1 controls follicular T helper cell positioning and function. *Immunity* 2018; 49:264.e4–274.e4.
- This study identified for the first time the role of the PD-1 expression on Tfh cells. They showed that PD-1 acts by limiting Tfh cell recruitment into the germinal center entry.
22. Silver J, Zuo T, Chaudhary N, *et al.* Stochasticity enables BCR-independent germinal center initiation and antibody affinity maturation. *J Exp Med* 2018; 215:77–90.
23. Turner JS, Ke F, Grigoriou IL. B cell receptor crosslinking augments germinal center B cell selection when T cell help is limiting. *Cell Rep* 2018; 25: 1395.e4–1403.e4.
- Using murine models that allow discrimination of the two signals required for B-cell maturation (BCR and T-cell help), authors deciphered the impact of signals combination or not, on germinal center reaction.
24. Qi H. T follicular helper cells in space-time. *Nat Rev Immunol* 2016; 16: 612–625.
25. Lintnerman MA, Rigby RJ, Wong RK, *et al.* Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 2009; 206:561–576.
26. Sage PT, Paterson AM, Lovitch SB, Sharpe AH. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity* 2014; 41:1026–1039.
27. Botta D, Fuller MJ, Marquez-Lago TT, *et al.* Dynamic regulation of T follicular regulatory cell responses by interleukin 2 during influenza infection. *Nat Immunol* 2017; 18:1249–1260.
- Using multiplexed quantitative imaging, this study characterized the biology of Tfr cells in human lymph nodes at basal state, showing that Tfr act mostly at the T:B border.
28. Wing JB, Kitagawa Y, Locci M, *et al.* A distinct subpopulation of CD25⁺ T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. *Proc Natl Acad Sci* 2017; 114:E6400–E6409.
29. Ritvo P-GG, Churlaud G, Quiniou V, *et al.* T_H cells lack IL-2R α but express decoy IL-1R2 and IL-1Ra and suppress the IL-1–dependent activation of T_H cells. *Sci Immunol* 2017; 2; pii: eaan0368.
30. Lintnerman MA, Pierson W, Lee SK, *et al.* Foxp3(+) follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med Nature Publishing Group*; 2011; 17:975–982.
31. Wing JB, Tekgüç M, Sakaguchi S. Control of germinal center responses by T-follicular regulatory cells. *Front Immunol* 2018; 9:1910.
32. Sayin I, Radtke AJ, Vella LA, *et al.* Spatial distribution and function of T follicular regulatory cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 2018; 215:1531–1542.
33. Laidlaw BJ, Lu Y, Amezquita RA, *et al.* Interleukin-10 from CD4⁺ follicular regulatory T cells promotes the germinal center response. *Sci Immunol* 2017; 2:1–11.
34. Stanley S, Weissman D, Fauci A S, Pantaleo G. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med* 1996; 124:654–663.
35. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, *et al.* HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; 362:355–358.
36. Moysi E, Petrovas C, Koup RA. The role of follicular helper CD4 T cells in the development of HIV-1 specific broadly neutralizing antibody responses. *Retrovirology* 2018; 15:1–10.
37. Lindqvist M, Lunzen F Van, Soghoian DZ, *et al.* Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest* 2012; 122:3271–3280.
38. Colineau L, Rouers A, Yamamoto T, *et al.* HIV-infected spleens present altered follicular helper T cell (Tfh) subsets and skewed b cell maturation. *PLoS One* 2015; 10:e0140978.
39. Perreau M, Savoye A-L, De Crignis E, *et al.* Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* 2013; 210:143–156.
40. Xu Y, Phetsouphanh C, Suzuki K, *et al.* HIV-1 and SIV predominantly use CCR5 expressed on a precursor population to establish infection in T follicular helper cells. *Front Immunol* 2017; 8:376.
41. Kohler SL, Pham MN, Folkvord JM, *et al.* Germinal center T follicular helper cells are highly permissive to HIV-1 and alter their phenotype during virus replication. *J Immunol* 2016; 196:2711–2722.
42. Graff-Dubois S, Rouers A, Moris A. Impact of chronic HIV/SIV infection on T follicular helper cell subsets and germinal center homeostasis. *Front Immunol* 2016; 7:501.
43. He L, Gu W, Wang M, *et al.* Extracellular matrix protein 1 promotes follicular helper T cell differentiation and antibody production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115:8621–8626.
44. Wendel BS, Alcazar D del, He C, *et al.* The receptor repertoire and functional profile of follicular T cells in HIV-infected lymph nodes. *Sci Immunol* 2018; 3:eaan8884.
45. Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernandez A, *et al.* Regulation of the germinal center reaction by Foxp3⁺ follicular regulatory T cells. *J Immunol* 2011; 187:4553–4560.
46. Chung Y, Tanaka S, Chu F, *et al.* Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med* 2011; 17:983–988.
47. Eldi P, Chaudhri G, Nutt SL, *et al.* Viral replicative capacity, antigen availability via hematogenous spread and high T_H1/T_H2 ratios drive induction of potent neutralizing antibody responses. *J Virol* 2019; 339; pii: e01795-18.
48. Chowdhury A, Del Rio Estrada PM, Tharp GK, *et al.* Decreased T follicular regulatory cell/T follicular helper cell (TFH) in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques may contribute to accumulation of TFH in chronic infection. *J Immunol* 2015; 195:3237–3247.
49. Roeder J, Maehara T, Ngeope A, *et al.* High-frequency, functional HIV-specific T-follicular helper and regulatory cells are present within germinal centers in children but not adults. *Front Immunol* 2018; 9:1–14.
50. Fan W, Demers AJ, Wan Y, Li Q. Altered ratio of T follicular helper cells to T follicular regulatory cells correlates with autoreactive antibody response in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Immunol* 2018; 200:3180–3187.
51. Kobie JJ, Alcena DC, Zheng B, *et al.* 9G4 autoreactivity is increased in HIV-infected patients and correlates with HIV broadly neutralizing serum activity. *PLoS One* 2012; 7; e35356.
52. Bonsignori M, Wiehe K, Grimm SK, *et al.* An autoreactive antibody from an SLE/HIV-1 individual broadly neutralizes HIV-1. *J Clin Invest* 2014; 124:1835–1843.
53. Ferrando-Martinez S, Petrovas C, Koup RA. Accumulation of follicular CD8⁺ T cells in pathogenic SIV infection. *J Clin Invest* 2018; 128:2089–2103.
54. Petrovas C, Ferrando-Martinez S, Gerner MY, *et al.* Follicular CD8⁺ T cells accumulate in HIV infection and can kill infected cells in vitro via bispecific antibodies. *Sci Transl Med* 2017; 9; pii: eaag2285.
- This study identified the singular cytotoxic role of follicular CD8⁺ cells showing their therapeutic potential by limiting the viral reservoir in SLO.
55. Miles B, Miller SM, Folkvord JM, *et al.* Follicular regulatory CD8 T cells impair the germinal center response in SIV and ex vivo HIV infection. *PLOS Pathog* 2016; 12:e1005924.
56. Shen J, Luo X, Wu Q, *et al.* A subset of CXCR5⁺CD8⁺T cells in the germinal centers from human tonsils and lymph nodes help B cells produce immunoglobulins. *Front Immunol* 2018; 9:2287.
57. Bradley T, Peppas D, Pedroza-Pacheco I, *et al.* RAB11FIP5 expression and altered natural killer cell function are associated with induction of HIV broadly neutralizing antibody responses. *Cell Elsevier Inc* 2018; 175:387.e17–399.e17.
58. Rydzynski CE, Cranert SA, Zhou JQ, *et al.* Affinity maturation is impaired by natural killer cell suppression of germinal centers. *Cell Rep* 2018; 24:3367.e4–3373.e4.
59. Huot N, Jacquelin B, Garcia-Tellez T, *et al.* Natural killer cells migrate into and control simian immunodeficiency virus replication in lymph node follicles in African green monkeys. *Nat Med* 2017; 23:1277–1286.
60. Garrido C, Abad-Fernandez M, Tuyishime M, *et al.* Interleukin-15-stimulated natural killer cells clear HIV-1-infected cells following latency reversal ex vivo. *J Virol* 2018; 92:e00235–e318.
61. Planchais C, Hocqueloux L, Ibanez C, *et al.* Early antiretroviral therapy preserves functional follicular helper T and HIV-specific B cells in the gut mucosa of HIV-1-infected individuals. *J Immunol* 2018; 200:3519–3529.

RÉSUMÉ

Ce travail de thèse vise à mieux caractériser les voies de génération des T folliculaires helpers (Tfh) chez l'Homme, dans un contexte physiologique et un contexte pathologique d'infection par le VIH. La génération des Tfh est majoritairement décrite comme reposant sur l'engagement d'un LT CD4 naïf. Cependant, l'hétérogénéité phénotypique au sein des réponses Tfh permet de considérer la possibilité d'une génération basée sur une plasticité des LT CD4 mémoires. Afin d'évaluer cette éventualité, nous avons développé un modèle inédit de génération d'une réponse Tfh basé sur la stimulation de splénocytes humains. La réponse Tfh ainsi générée présente de nombreuses similarités avec celle observée suite à une stimulation antigénique dans les tissus lymphoïdes. Grâce à cet outil, nous montrons les LT CD4 naïfs et mémoires sont capables de s'orienter vers un profil Tfh dans un environnement lymphoïde. Nos résultats suggèrent que l'hétérogénéité observée au sein des réponses Tfh est le reflet d'une contribution des différents sous-types de LT CD4. Ces différentes voies de génération de Tfh sont différenciellement impactées dans un contexte d'infection par le VIH *in vitro*. Combinées à des analyses sur d'échantillons spléniques issus de patients chroniquement infectés par le VIH, nos données apportent de nouvelles perspectives pour l'étude des processus impliqués dans l'accumulation de Tfh dysfonctionnels relatif à cette pathologie. Plus globalement, ce travail permet de considérer plusieurs voies possibles pour la génération des réponses Tfh chez l'Homme.

ABSTRACT

This thesis work aims to better characterize the generation pathways of human follicular T helpers cells (Tfh) in physiological context and pathological context of HIV infection. The generation of Tfh is mostly described as relying on the commitment of a naïve CD4⁺ T cells. However, the phenotypic heterogeneity within the Tfh responses allows to postulate that a Tfh cell generation pathway based on a plasticity of CD4 LT memory is possible. In order to evaluate this eventuality, we have developed a novel model of Tfh response generation based on the stimulation of human splenocytes. The resulting Tfh response shows many similarities with the one generated in lymphoid tissues following antigenic stimulation. Using this tool, we show that naïve and memory CD4⁺ T cells are able to orient themselves towards a Tfh profile in a lymphoid environment. Our results suggests that the heterogeneity observed in the Tfh response could rely on the contribution from different CD4⁺ T cell subtypes. These various generation pathways are differentially impacted with *in vitro* HIV infection. Combined with the analysis of splenic samples from chronically HIV-infected patients, our data provide new perspectives for the study of the processes involved in the accumulation of dysfunctional Tfh related to this pathology. More generally, this work offers a new framework for the understanding of human Tfh cell generation.