



HAL
open science

Évaluation du rôle de l'interleukine 1 dans la régulation des lymphocytes T folliculaires helpers et des lymphocytes T folliculaires régulateurs

Aude Belbézier

► To cite this version:

Aude Belbézier. Évaluation du rôle de l'interleukine 1 dans la régulation des lymphocytes T folliculaires helpers et des lymphocytes T folliculaires régulateurs. Bio-informatique [q-bio.QM]. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS555 . tel-04224019

HAL Id: tel-04224019

<https://theses.hal.science/tel-04224019>

Submitted on 1 Oct 2023

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

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

Thèse de doctorat de Sorbonne Université

École doctorale Sorbonne Université

Évaluation du rôle de l'interleukine 1 dans la régulation des lymphocytes T folliculaires helpers et des lymphocytes T folliculaires régulateurs

Présentée par **Aude Belbézier**

pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences de Sorbonne Université

Dirigée par Madame le Professeur **Stéphanie Graff-Dubois** et

Monsieur le Professeur **David Klatzmann**

Présentée et soutenue publiquement le vendredi 30 septembre 2022

Devant un jury composé de :

M Arsène **MEKINIAN**

Président

Mme Sophie **CANDON**

Rapporteur

M. Nicolas **FAZILLEAU**

Rapporteur

M. Bertrand **HUARD**

Examineur

M Hugo **MOUQUET**

Examineur

Mme Stéphanie **GRAFF-DUBOIS**

Directeur de thèse

M. David **KLATZMANN**

Directeur de thèse

"L'histoire n'est pas l'étude des origines mais plutôt l'analyse de toutes les influences que le passé a pu avoir sur notre présent" H. Butterfield

Avant-Propos

Je voulais tout d'abord remercier Pr. David Klatzmann et Pr. Stéphanie Graff Dubois de m'avoir encadré pendant ces 3 (voire plutôt 4) années de thèse ! Merci à David de m'avoir offert l'opportunité d'initier ce projet et merci Stéphanie d'avoir accepté de m'encadrer en milieu de thèse.

Je remercie Pr. Arsène Mekinian qui a accepté de présider mon jury de thèse.

Je remercie les Prs Cécile Delarasse et Nicolas Fazilleau pour leurs conseils durant la thèse ainsi que-pour le Pr. Nicolas Fazilleau – d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Je remercie aussi chaleureusement le Pr Sophie Candon d'avoir accepté d'être rapportrice de ce travail ainsi que le Dr. Bertrand Huard et le Pr. Hugo Mouquet d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Table des matières

Avant-Propos.....	3
Index des figures	6
Abréviations	7
Résumé de la thèse	9
Abstract	10
Introduction	11
1. L'immunité humorale.....	12
a. L'immunité humorale : une immunité en pleine évolution	12
b. L'immunité humorale : une immunité adaptative	12
c. Les immunoglobulines	13
d. Les lymphocytes B (LB) : du progéniteur lymphoïde commun au plasmablaste.....	15
e. Le lymphocyte T follicular helper (Tfh)	19
f. Le lymphocyte T folliculaire régulateur (Tfr).....	23
2. Implication des T folliculaires dans la physiopathologie et la thérapie.....	28
a. Dysrégulation de l'immunité : les différentes formes	28
b. Maladie auto-immune et auto-inflammatoire	30
c. Cancer.....	31
d. Déficit immunitaire	32
e. Allergie.....	32
f. Greffe	33
g. Vaccination.....	33
3. L'Axe IL-1	33
a. La grande famille de l'IL-1	33
b. L'IL-1 : une cytokine qui est en fait deux cytokines : l'IL-1 α et l'IL-1 β	36
c. Le récepteur IL-1R1	40
d. Le récepteur IL-1R2	42
e. Le récepteur IL-1Ra	43
f. Cibler l'IL-1 : une voie thérapeutique intéressante	44
Objectifs poursuivis.....	45
Résultats	48
Article 1 – Rôle de l'expression des récepteurs IL-1R1, IL-1R2 et IL-1Ra sur la population T folliculaire	49
Article 2 – Rôle de l'IL-1 β dans l'allergie	85
Discussion	134
1. Rôle de l'IL-1 dans la réponse physiologique humorale.....	135
a. Rôle de l'IL-1 sur le Tfh.....	135
b. Rôle de l'IL-1 sur le Tfr	136
2. Rôle de l'IL-1 dans la réponse pathologique auto-immune	138
3. Rôle de l'IL-1 dans la réponse allergique.....	140

4. Perspectives	142
Références Bibliographiques.....	143

Index des figures

Figure 1 : Cinétique de la réponse immunitaire adaptative après immunisation d'après Kuby, Immunology 7th edition	13
Figure 2 : Structures des Immunoglobulines d'après Colostrumbkk site	15
Figure 3 : Structure anatomique d'un ganglion d'après Janeway, Immunobiology, 7ed.	16
Figure 4: Dynamique de la réponse B post immunisation après immunisation au sein du centre germinatif d'après Crotty, Immunity, 2020	19
Figure 5 : Interaction cellulaire entre les LT et les LB d'après Gong, Frontiers in Immunology, 2019.....	21
Figure 6 : Population T folliculaire : origine et description moléculaires, d'après Gong, Frontiers in Immunology, 2019.....	23
Figure 7 : Origine et expression moléculaire des Treg, d'après Sharabi, NatRev, 2018	25
Figure 8 : Description de la grande famille de l'IL-1 d'après Dinarello, Nature, 2019	34
Figure 9 : Fonction de l'IL-1 d'après Garlanda, Immunity Review, 2013	35
Figure 10 : Voie d'activation de l'IL-1 d'après Chan, JEM, 2019	38
Figure 11 : Cinétique de production de l'IL-1 α / β d'après Mantovani, Immunity, 2020.....	40
Figure 12 : Voie de signalisation de l'IL-1R1 d'après Luis, Int J Mol Sci, 2022.....	42
Figure 13 : Effet de l'IL-1 sur la réaction du centre germinatif à des temps précoces et tardifs	51
Figure 14 : Rôle de l'IL-1 β dans la réponse allergique.....	87

Abréviations

Ac	Anticorps
AID	<i>Activation Induced cytidine Deaminase</i>
AIM2	<i>Absent In Melanoma 2</i>
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated Specklike Protein containing a CARD</i>
BAFF	<i>B cell Activating Factor</i>
BCG	Cellules B du Centre Germinatif
Bcl6	<i>B-cell lymphoma 6</i>
Blimp1	<i>B Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1</i>
BCR	<i>B-Cell Receptor</i> , récepteur de cellules B
CARD	<i>Caspase Activation and Recruitment Domain</i>
CG	Centre Germinatif
CDF	Cellules Dendritiques Folliculaires
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CTLA4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte associated Antigen-4</i>
CXCR5	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 5</i>
DSA	<i>Donor Specific Antigen</i> , antigène spécifique du donneur
EAE	Encéphalomyélite Allergique Expérimentale
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>
Fab	<i>Fragment Antigen Binding</i>
Fc	Fragment Constant
Foxp3	<i>Forkhead/winged-helix Protein 3</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-Induced TNFR-Related</i>
GSDMD	Gasdermin D
ICOS	<i>Inducible T Cell Costimulator</i>
IFN-	Interféron-
Ig	Immunoglobuline
IL-	Interleukine-
IL-1RacP	<i>Interleukin-1 receptor accessory protein</i>

IRF	<i>Interferon -regulatory factor</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KO	<i>Knock-Out pour déficient</i>
LT	<i>lymphocyte T</i>
MAPKs	<i>Mitogen-Associated Protein kinases</i>
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
OLS	<i>Organes Lymphoïdes Secondaires</i>
PD1	<i>Programmed cell Death protein 1</i>
PI3K	<i>PhosphoInositol 3Kinase</i>
PYD	<i>domaine Pyrine</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2</i>
S1P2	<i>Sphingosine 1-Phosphate receptor 2</i>
SIDA	<i>Stade d'ImmunoDéficiency Acquis</i>
SiRNA	<i>small interfering RiboNucleic Acid</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STIM	<i>Stromal Interaction Molecule</i>
Tcf1	<i>T cell factor 1</i>
TCR	<i>T-Cell Receptor, récepteur de cellules T</i>
Tfh	<i>T follicular helper cell</i>
Tfr	<i>T follicular regulatory cell</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
Th	<i>T helper cell</i>
TIGIT	<i>T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
Treg	<i>Regulatory T cell</i>
VIH	<i>Virus de l'Immunodéficiency Humaine</i>
WT	<i>Wild Type</i>

Résumé de la thèse

La production d'anticorps par les plasmocytes et la génération de cellules B mémoire à longue demi-vie sont régulées positivement par les T folliculaire helpers (Tfh) et négativement par T folliculaires régulateurs (Tfr) dans les centres germinaux. Cependant, le rôle précis des cellules Tfr dans le contrôle de la production d'anticorps n'est pas clairement élucidé. Nous avons précédemment montré que les Tfh expriment l'IL-1R1, récepteur agoniste de l'IL-1, alors que les Tfr expriment l'IL-1R1 ainsi que les récepteurs leurre et antagoniste de l'IL-1 : l'IL-1R2 et l'IL-1Ra respectivement. Afin d'étudier le rôle de l'IL-1 sur l'expression de ces récepteurs par les cellules Tfh et/ou Tfr, nous avons développé des modèles de délétion spécifique des récepteurs IL-1 dans les cellules Tfh et/ou Tfr. En utilisant le modèle d'immunisation à l'OVA, nous avons montré que l'IL-1R1 est important pour l'activation des cellules Tfh mais aussi des cellules Tfr alors que l'IL-1R2 et l'IL-1Ra empêchent l'activation des cellules Tfr. Des résultats similaires sont obtenus dans un modèle de pathologie auto-immune à médiation humorale qu'est le lupus, avec des souris présentant une maladie moins marquée lorsque les Tfr sont plus actifs. Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de cet axe IL-1 au sein de la réponse humorale dans un modèle d'allergie. Nous avons pu observer à nouveau que les souris présentant une population Tfr plus active présentaient un taux amoindri d'anticorps IgE spécifiques. Par contre, ces souris présentaient des manifestations anaphylactiques plus marquées ainsi qu'une majoration de la production d'IgE totale. La réactivité des IgE étant connue pour être contrôlée par les anticorps IgG qui inhibent l'activation des mastocytes et des basophiles - principales cellules responsables des manifestations cliniques dans l'allergie - via le récepteur aux IgG FcγRIIb inhibiteur, nous avons ensuite exploré l'expression du récepteur FcγRIIb à la surface de ces cellules. Nous avons observé qu'il existait lors d'une suractivation des Tfr (induit par défaut d'expression d'IL-1R2 à leur surface), un défaut d'expression du récepteur FcγRIIb à la surface des mastocytes. A l'inverse, lors d'immunisation des souris en présence de l'IL-1β, il existait une hausse de l'expression de FcγRIIb dans les mastocytes, réduisant ainsi leur potentiel d'activation. L'ensemble de ces travaux est en faveur de l'implication de l'interaction des IgG/FcγRIIb dans la protection contre l'anaphylaxie allergique et révèle ainsi le rôle délétère des Tfr dans cette régulation.

Mon travail de thèse a permis de démontrer un rôle nouveau de l'IL-1 important dans la régulation de la réponse humorale tant physiologique que pathologique. Il ouvre des perspectives thérapeutiques tant le domaine de l'allergie que dans le domaine des maladies auto-immunes.

Abstract

Antibody production by plasma cells and generation of long-term memory B cells are positively regulated by follicular helper T cells (Tfh) and, negatively regulated by follicular regulatory T cells (Tfr) in germinal centers. However, the precise role of Tfr cells in the control of antibody production is not clearly elucidated. We have previously shown that Tfh cells express IL-1R1, an agonist receptor for IL-1, whereas Tfr cells express IL-1R1 as well as the IL-1 decoy and antagonist receptors: IL-1R2 and IL-1Ra respectively. In order to study the role of the expression of these receptors by Tfh and/or Tfr cells, we have developed models of specific deletion of IL-1 receptors in Tfh and/or Tfr cells. Using the OVA immunization model, we have shown that IL-1R1 is important for the activation of Tfh cells but also Tfr cells while IL-1R2 and IL-1Ra prevent the activation of Tfr cells. Similar results were obtained in a humoral autoimmune disease model, lupus, with mice showing less disease when Tfr cells are more active.

We then looked at the role of this IL-1 axis in the humoral response in an allergy model. We were able to observe again that mice with a more active Tfr population had a lower level of specific IgE antibodies. On the other hand, these mice showed more pronounced anaphylactic manifestations and an increase in total IgE production. As IgE reactivity is known to be controlled by IgG antibodies which inhibit the activation of mast cells and basophils - the main cells responsible for clinical manifestations in allergy - via the inhibitory IgG receptor Fc γ RIIb, we then explored the expression of the Fc γ RIIb receptor at the surface of these cells. We observed that there was a defect in the expression of the Fc γ RIIb receptor on the surface of mast cells when Tfr were overactivated. Conversely, when mice were immunized in presence of IL-1 β , there was an increase in the expression of Fc γ RIIb in mast cells, thus reducing their activation potential. All these works are in favor of a predominant role of IL-1 in the regulation mediated by IgG/Fc γ RIIb interaction in the protection against allergic anaphylaxis and thus the deleterious role of Tfr in this regulation.

My thesis work has revealed an important IL-1 axis in both physiological and pathological humoral response. It opens therapeutic perspectives in the field of allergy as well as in the field of autoimmune diseases.

Introduction

1. L'immunité humorale

a. *L'immunité humorale : une immunité en pleine évolution*

L'immunité humorale fut décrite pour la première fois au 19^{ème} siècle par Emil Von Behring et Katazato Shibasaburo. Ces derniers découvrent en effet en 1890 que les animaux, immunisés au préalable avec de la toxine tétanique, deviennent résistants à la maladie. Ces résultats amènent la première preuve qu'une protection spécifique est présente dans le sérum.

Auparavant, les travaux de Rhazes (880-932 av. JC) sur la variole et ceux de Thucydide (460-395 av. JC) sur le typhus sous-tendaient l'existence d'un « état immun » (du latin *immunitas*, « exempt de charge », Marcus Annaeus Lucanus (39-65 av JC), procurant une résistance à la maladie, sans que celui-ci ne soit compris. Grâce aux travaux de Von Behring et de Shibasaburo, cet état immun se précise : celui-ci ou du moins une partie de ce dernier siégerait dans le sérum. Sept ans plus tard, Paul Ehrlich, supputa que cette immunité sérique pourrait être liée à des entités sériques, les « chaînes latérales » : ces dernières, résidant dans le sérum, reconnaîtraient et se lieraient spécifiquement aux agents pathogènes. En 1939, Arne Tiselius valide cette hypothèse en identifiant deux types de « chaînes latérales » (aujourd'hui appelées anticorps (Ac)) dans le sérum : les Immunoglobulines (Ig) G et des IgM. Les découvertes se sont ensuite enchaînées, permettant de connaître la structure précise de ces immunoglobulines, leur production mais aussi leurs fonctions.

b. *L'immunité humorale : une immunité adaptative*

Le système immunitaire est classiquement divisé en 2 catégories : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Alors que la première catégorie vise à fournir une réponse immunitaire immédiate, la seconde, plus tardive, vise à créer une réponse spécifique et mémoire. Une réponse est dite spécifique lorsqu'elle est dirigée vers un antigène donné (composant du pathogène). Elle est dite mémoire, lorsque la réponse, après seconde rencontre avec le pathogène est plus rapide et plus efficace que lors de la première rencontre (Figure 1). L'immunité humorale fait partie de la réponse spécifique. En effet, la réponse humorale est, comme nous avons commencé à le voir, hautement spécifique de l'antigène. Elle est également « douée » de mémoire : lors d'une seconde rencontre avec un antigène, les anticorps produits seront plus affins et produits plus rapidement. Ce principe est utilisé en vaccination : un antigène venant d'un pathogène est présenté au système immunitaire afin que ce dernier développe une réponse immunitaire spécifique et rapide lors de la rencontre avec le pathogène.

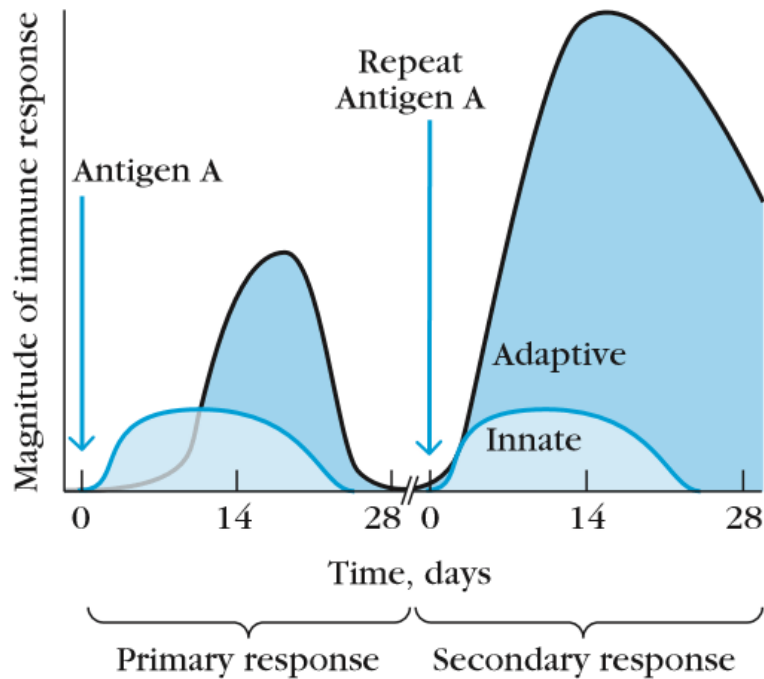


Figure 1 : Cinétique de la réponse immunitaire adaptative après immunisation d'après Kuby, Immunology 7th edition Après immunisation avec un Antigène A, la réponse immunitaire innée (courbe bleue) se met en place rapidement. Elle est suivie par la réponse adaptative (courbe noire). Lors d'une nouvelle exposition, la réponse adaptative se met en place plus rapidement que lors de la première exposition et de façon amplifiée.

c. Les immunoglobulines

Cinq classes d'immunoglobulines (IgD, IgM, IgA, IgE et IgG) sont actuellement connues (Figure 2). Toutes sont constituées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères, qui s'assemblent pour former une partie variable et une partie constante (Fab). La partie variable a pour rôle de reconnaître l'antigène de façon spécifique. Une fois cette reconnaissance réalisée, la partie constante devient compétente pour exercer sa fonction. Trois principales fonctions sont décrites :

- neutralisation
- opsonisation
- activation du complément
- agglutination
- cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, généralement abrégée ADCC (de l'anglais Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)

Chaque classe d'immunoglobuline exerce des fonctions particulières et a une distribution unique.

Par exemple,

- les IgM, premières immunoglobulines produites au cours d'une réponse immunitaire humorale sont peu spécifiques. Elles ont pour rôle principal d'activer le complément et l'agglutination (Ehrenstein and Notley, 2010)
- les IgE, immunoglobulines retrouvées essentiellement en intra-tissulaire, ont pour rôle principal d'activer la dégranulation d'acteurs de l'immunité innée antiparasitaire présents au sein des tissus (Galli and Tsai, 2012). Cette dernière est assurée en partie par des cellules de l'immunité innée résidente des tissus : les mastocytes, les éosinophiles et les basophiles. Ces cellules présentent à leur surface les récepteurs de forte ($Fc\epsilon RI$) et/ou faible affinité ($Fc\epsilon RII$) de l'IgE leur permettant de se lier au Fc de l'IgE. Ainsi, lorsque l'IgE présente à la surface des cellules résidentes reconnaît spécifiquement un antigène, la cellule porteuse de cette IgE va s'activer, dégranuler et ainsi sécréter des médiateurs pro-inflammatoires notamment nécessaires à la défense antiparasitaire tissulaire (Sutton and Gould, 1993).
- les IgA, immunoglobulines retrouvées principalement dans les muqueuses et les sécrétions, ont pour rôle principal de neutraliser les bactéries (Schroeder and Cavacini, 2010)
- les IgG, immunoglobulines principalement retrouvées dans le sang et les fluides extracellulaires, assurent la neutralisation, l'opsonisation, la sensibilisation à la lyse ADCC ainsi que l'activation du complément. Cette dernière classe est subdivisée en 4 sous-types chez l'homme, chacun ayant des propriétés de neutralisation, d'opsonisation et d'activation du complément propres (Vidarsson et al., 2014). Chez la souris, il existe seulement 3 sous classes d'IgG : les IgG1, IgG2a/b/c et IgG3 (Wang et al., 2022)
- les IgD, présentes à la surface des lymphocytes B, ont une fonction non encore élucidée (Edholm et al., 2011).

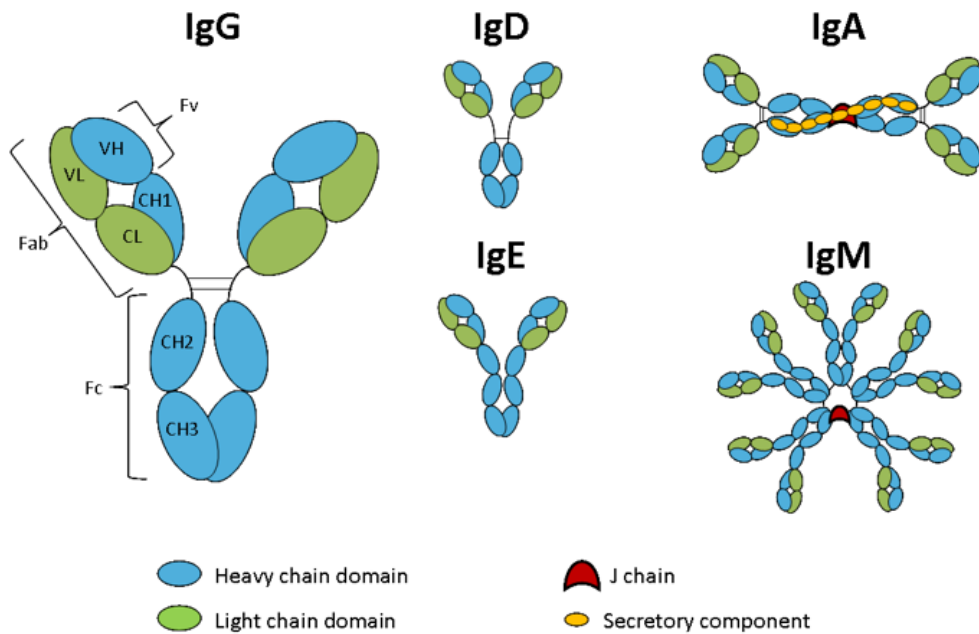


Figure 2 : Structures des Immunoglobulines d'après Colostrumbkk site. Les anticorps sont de 5 types : les immunoglobulines (Ig)G, les IgD, les IgA, les IgE et les IgM. Toutes ces immunoglobulines sont formées de chaînes légères et de chaînes lourdes. Elles sont aussi toutes constituées d'une fraction constante (formée de deux chaînes lourdes) et de 2 fractions de liaison à l'antigène : le Fab (formé d'un fragment de chaîne lourde et d'une chaîne légère). Ce dernier est lui-même composé d'un fragment variable permettant l'interaction spécifique avec l'antigène : le Fv. Les IgA présentent comme particularité de présenter un composant sécrétoire, les IgM de prendre une forme pentamérique liée notamment avec une chaîne J.

Les anticorps sont produits principalement par des lymphocytes B matures, les plasmocytes (De Silva and Klein, 2015).

d. Les lymphocytes B (LB) : du progéniteur lymphoïde commun au plasmablaste

Le LB prend naissance au niveau de la moelle à partir d'un progéniteur lymphoïde commun. Au sein de la moelle, il subira plusieurs réarrangements de ses gènes d'immunoglobulines afin de produire une association unique de chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines. Cette immunoglobuline sera au départ exprimée à la surface du LB, et nommée B-Cell Receptor (BCR). Une fois ce BCR acquis, le lymphocyte B sera dit mature, et pourra migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS) (Figure 3) afin d'entrer potentiellement en contact avec un antigène grâce à son BCR (Pieper et al., 2013).

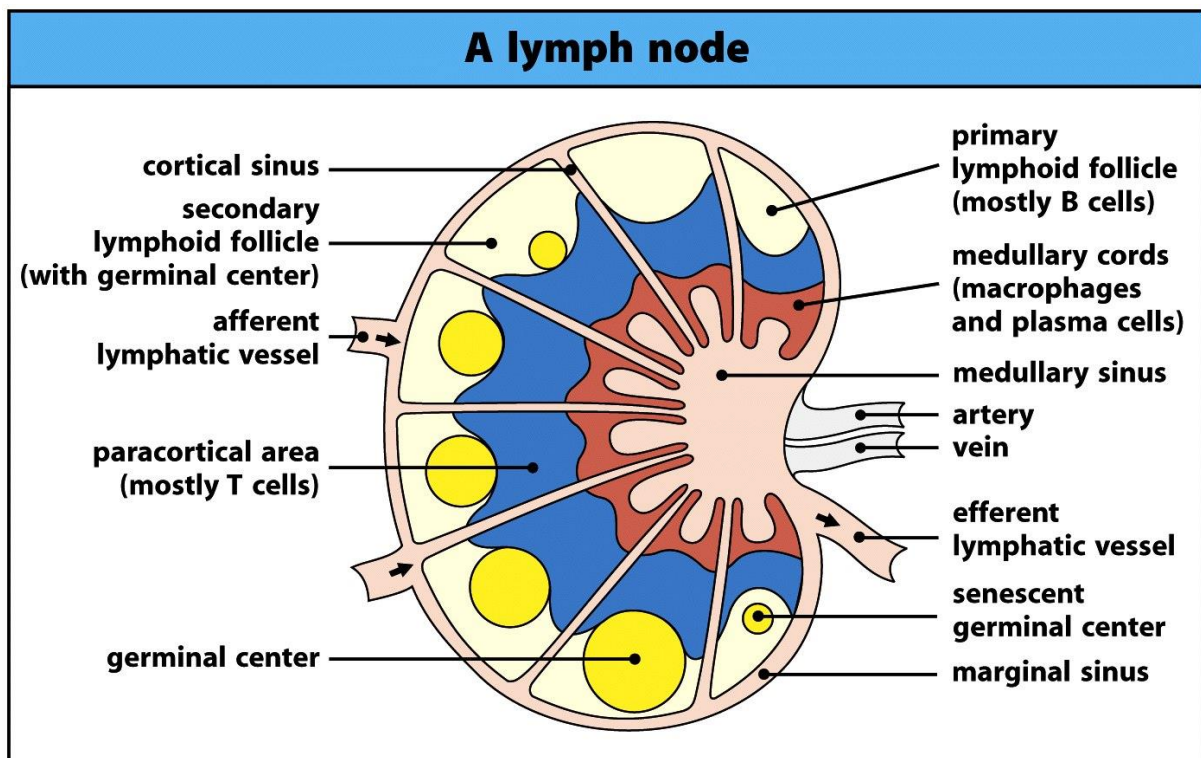


Figure 3 : Structure anatomique d'un ganglion d'après Janeway, Immunobiology, 7ed. Un ganglion est constitué (i) d'un hile permettant l'abouchement de la circulation artérioveineuse, (ii) d'un sinus capsulaire, permettant l'arrivée des antigènes par les vaisseaux lymphatique, (iii) d'un cortex, formé de follicules et de centres germinatifs où a lieu la prolifération et la différenciation des lymphocytes B ; (iv) d'une zone paracorticale qui abrite les lymphocytes T et (v) d'une zone médullaire avec des cordons médullaires où sont présents les plasmocytes quiescents et les macrophages, et un sinus médullaires qui est en contact avec le circuit lymphatique efférent.

Deux types d'OLS existent : la rate, les ganglions lymphatiques et les organes lymphoïdes associés aux muqueuses. Ils sont structurellement organisés de façon similaire, avec des zones riches en lymphocytes B naïfs, les follicules et des régions riches en lymphocytes T, les régions interfolliculaires (De Silva and Klein, 2015).

Au sein des OLS, le LB mature nouvellement formé, migre au niveau des follicules. Cette localisation est possible grâce à un phénomène de « homing ». Cet homing est possible grâce à l'expression à la surface du LB d'un récepteur de chimiokine, le CXCR5. Celui-ci, attiré par son ligand, la chimiokine CXCL13 exprimée par les cellules stromales du follicule, permet l'entrée du LB dans le follicule (Reif et al., 2002). Une fois présent dans cet espace, le LB peut interagir avec un antigène si son BCR le reconnaît spécifiquement. Cet antigène lui arrive soit directement par diffusion, soit est présenté par d'autres types de cellules résidant dans la zone B (les macrophages ou les cellules dendritiques folliculaires (CDF)) (Heath et al., 2019). Le LB après ce contact avec l'antigène, le capture, le dégrade puis le présente sous forme de peptides sur des molécules de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II qu'il exprime à sa surface. Il acquiert des récepteurs de chimiokines comme CCR7 (Reif et al., 2002) lui

permettant de se diriger à la frontière avec la zone T en région inter-folliculaire, et d'entrer ainsi en contact avec un lymphocyte T (LT) particulier, le T folliculaire helper (Tfh). Ce dernier ne peut entrer en interaction avec lui que s'il est spécifique de son complexe CMH-peptide. Grâce à cette interaction, notamment via la liaison du CD40 qu'il exprime au CD40L présent sur le LT (Liu et al., 1995; MacLennan, 1994), mais aussi grâce à l'environnement cytokinique (Muramatsu et al., 1999; Shulman et al., 2014), le LB et le LT partenaires s'activent mutuellement, prolifèrent et se différencient. Suite à cette interaction, une partie des LB se meut vers les cordons médullaires, pour se différencier en plasmablastes de courte durée de vie, sécrétant des Ac de faible affinité contre les pathogènes. Ces anticorps, rapidement produits, ont comme fonction principale l'opsonisation (Zhang et al., 2016). Le reste des LB, a pour rôle de produire des anticorps de forte affinité afin de réaliser une neutralisation effective des toxines et pathogènes. Cette affinité est le fruit de nombreux remaniements rendus possibles par une interaction prolongée avec le LT. Ces modifications comprennent (i) l'hypermutation somatique qui consiste à modifier l'affinité de l'Ac exprimé par le LB et (ii) la commutation isotypique de l'Ac qui consiste à passer de l'IgM à une IgG par exemple (Victoria and Nussenzweig, 2012). Ainsi, après contact avec l'antigène, la majorité des LB rentre à nouveau au sein des follicules afin de former les centres germinatifs (De Silva and Klein, 2015). Cette nouvelle migration est rendue possible par la persistance de l'expression du CXCR5 et d'Ebi2 mais aussi par la perte du signal CCR7 (Gatto and Brink, 2013; Zhang et al., 2016). Une fois entrés dans les follicules, les LB se mettent à exprimer Sphingosine 1-phosphate receptor 2 (S1P2) ce qui leur permet de se regrouper afin de former un centre germinatif au sein du follicule (Zhang et al., 2016). Ils perdent parallèlement l'expression d'Ebi2 (Zhang et al., 2016). Le centre germinatif nouvellement formé repousse en périphérie les cellules B au repos présentes dans le follicule, formant une nouvelle zone : la zone du manteau (Zhang et al., 2016). Le LB activé, quant à lui, dès son entrée dans le centre germinatif, entre dans un cycle de prolifération rapide créant ainsi une zone à forte densité cellulaire, la zone sombre. Il se fait alors appeler (du fait d'un fort index de prolifération) centroblaste. Durant cette étape, le centroblaste subit des remaniements dans les gènes codant pour le BCR grâce au fonctionnement de l'enzyme d'Activation Induced cytidine Déaminase (AID) (Rajewsky et al., 1987) (Figure 4). Ces remaniements, communément appelés hypermutations somatiques conduisent à la formation de nombreux clones dont la plupart présentent, malgré l'objectif initial d'améliorer l'affinité pour l'antigène, une réduction de l'affinité de leur BCR pour l'antigène. Après cette étape, les différents clones migrent vers une zone contenant des CDF et des Tfh en bordure, nommée la zone claire, où ils subissent une sélection négative selon le niveau d'affinité de leur nouveau BCR :

- Si l'affinité du nouveau BCR est haute, le LB devient sensible aux signaux de survie, notamment B cell Activating Factor (BAFF) exprimé par les CDF et il se met alors à exprimer Bcl2 et peut ainsi compléter sa maturation. Il est souvent admis que la commutation de classe se fera à ce moment (et dans cette zone) pour les LB possédant un BCR très affin (Victoria and Nussenzweig, 2012).
- A l'inverse, un LB faiblement affin, ne développera pas d'expression de Bcl2, molécule indispensable pour empêcher l'interaction de son récepteur de mort cellulaire Fas avec son ligand FasL présent à la surface du Tfh. Sans cette expression de Bcl2, le LB entre en apoptose.
- Si le LB exprime un niveau d'affinité intermédiaire, la commutation de classe ne pourra se faire et le LB devra ré-exprimer le CXCR4, ce qui va l'amener à réentrer dans la zone sombre, celle-ci présentant une forte expression du récepteur au CXCR4, le CXCL12 (produit par les cellules stromales de l'interface centre germinatif-zone T), afin de subir un nouveau cycle d'hypermutations somatiques.

Les LB, commutés et hypermutés, avec une bonne affinité pour l'antigène sortent alors du centre germinatif. Ils deviendront :

- soit de cellules B mémoires commutées en IgG, A ou E ; ces dernières re-circuleront dans les OLS et pourront être ainsi activés très rapidement lors de nouveau contact avec l'antigène.
- soit après une expansion et une différenciation supplémentaire en plasmocytes à courte durée de vie capable de sécréter des IgG, IgA, IgE.

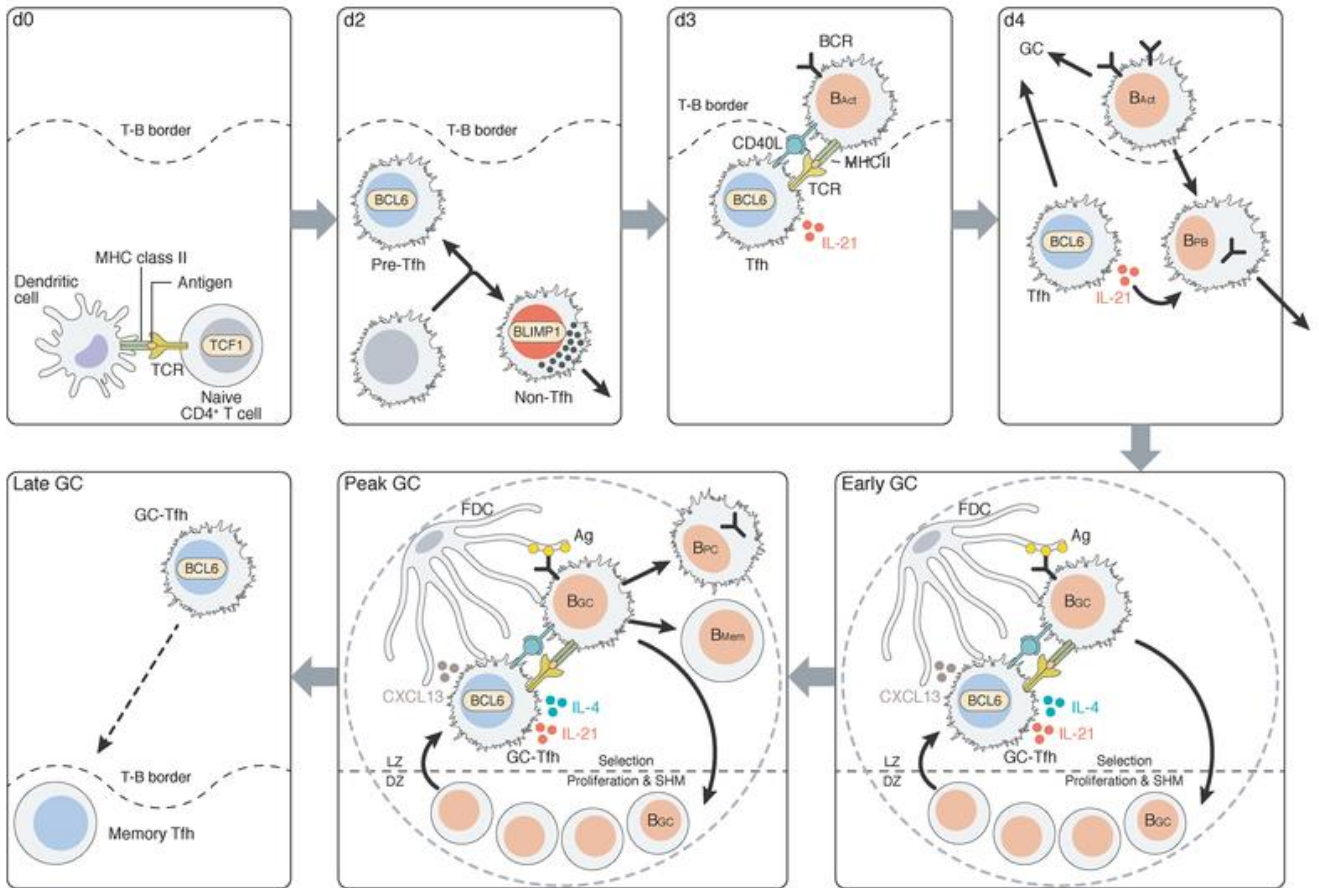


Figure 4: Dynamique de la réponse B post immunisation après immunisation au sein du centre germinatif d'après Crotty, Immunity, 2020 La cellule T CD4⁺ naïve, après contact avec une cellule dendritique (si son TCR est spécifique du complexe CMH-peptide présent sur la cellule dendritique) va s'activer et exprimer Bcl6 ou Blimp1. Si elle exprime Bcl6, elle va devenir un préTfh. Ce préTfh deviendra Tfh qu'après contact avec un LB exprimant le complexe peptide-CMH spécifique de son TCR mais aussi la molécule de costimulation CD40. Une fois le Tfh activé ce dernier va exprimer à sa surface CD40L et sécréter l'IL-21, ce qui va permettre au LB préalablement activé par la liaison de son BCR avec l'Ag présenté par la cellule dendritique de proliférer. Un centre germinatif est alors formé où a lieu des phénomènes d'hypermutation somatique et de sélection. Une fois la réaction inflammatoire terminée, le Tfh quittera le centre germinatif pour aller dans la bordure T-B et devenir un Tfh mémoire.

e. Le lymphocyte T follicular helper (Tfh)

Le LB, comme nous l'avons vu plus haut, a besoin pour se différencier en plasmocytes, du soutien d'un lymphocyte T particulier, le lymphocyte Tfh.

Le Tfh, est un LT CD4⁺ prenant, comme toutes cellules T, origine au sein du thymus (Santana and Esquivel-Guadarrama, 2006). Il y mature afin d'obtenir son récepteur spécifique, appelé T cell receptor (TCR), fonctionnel de façon similaire au LB dans la moelle osseuse. Ce TCR, à la différence du BCR, ne reconnaît pas l'antigène sous forme native, mais l'antigène présenté par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) et présenté à la surface de cette dernière sous forme d'un complexe peptide- CMH de type 2 (CMHII) (Santana and Esquivel-Guadarrama, 2006). Une fois muni d'un TCR fonctionnel, le LT naïf sort du thymus et se dirige vers les OLS afin

d'entrer en contact, comme le LB, avec l'antigène présenté sous forme de peptide-CMH par une CPA spécifique de son TCR. Cette unité de lieu de rencontre de l'antigène pour les LB et les LT naïfs permet de rendre possible un contact entre un LT et un LB naïf spécifique du même antigène qui serait à priori quasi impossible autrement (1/10 000 à 1/100 000 pour chacun).

Ainsi, dans l'OLS, la première étape nécessaire à la différenciation du LT en Tfh est le contact avec une CPA, souvent une cellule dendritique (mais cela peut aussi être un LB) (Arroyo and Pepper, 2020), exprimant à sa surface le complexe CMH-peptide spécifique de son TCR. La force de la liaison TCR-CMH-peptide semble importante pour la différenciation en Tfh (Merkenschlager et al., 2021) mais n'apparaît pas comme suffisante. L'environnement cytokinique et la présence de signaux de costimulation (notamment donnés par le LB) semblent jouer un rôle primordial dans cette différenciation. L'IL-6, par exemple participe à cet environnement pro-Tfh (Crotty, 2019). En effet, lorsqu'une souris est rendue déficiente en IL-6, le nombre de Tfh est fortement diminué (Harker et al., 2011; Papillion et al., 2019). Cette interleukine semble être produite par les cellules dendritiques mais aussi par les lymphocytes B activés (Chavele et al., 2015). Elle semble permettre l'induction de l'expression par le LT naïf d'un facteur de transcription essentiel pour la différenciation et la survie du Tfh : le Bcl6 (Nurieva et al., 2009). La voie de signalisation permettant son expression est encore incomplètement élucidée mais semble faire intervenir de nombreux facteurs tels TCF1 (Choi et al., 2015; Shao et al., 2019), LEF1 (Choi et al., 2015), STAT1 (Choi et al., 2013) et STAT3 (Ray et al., 2014) mais aussi Ezh2 (Chen et al., 2019).

Bcl6 est essentiel pour l'induction et la survie du Tfh. En effet, il permet l'induction de l'expression de CXCR5 (Nurieva et al., 2009) et la diminution de l'expression des récepteurs CCR7 et PSGL1 (Haynes et al., 2007; Kroenke et al., 2012) lui assurant ainsi la possibilité de migrer près de la zone B dans le ganglion et d'entrer en contact avec le LB. Bcl6 a aussi pour rôle d'inhiber d'autres facteurs de transcription délétères pour la survie du Tfh tel Blimp1 (Johnston et al., 2009). Une autre molécule fortement exprimée par le Tfh est la molécule PD1. Celle-ci semble importante pour induire l'inhibition de CXCR3 et ainsi permettre la localisation du Tfh au sein du follicule. Elle semble aussi essentielle à la production d'IL-21 par le Tfh (Crotty, 2019; Kawamoto et al., 2012).

Un autre point important pour la survie du Tfh est, comme pour celle du LB, le contact LB-LT (Figure 5). Le LB sans contact avec le LT meurt en effet en 24 heures (Akkaya et al., 2018). Comme nous l'avons vu plus haut, le Tfh fournit l'IL-21 et le signal CD40L requis au LB pour se différencier et proliférer (Crotty, 2019). Le LB fournit quant à lui le premier signal nécessaire à l'activation du LT en tant que CPA mais aussi d'autres signaux de costimulation tel ICOS-L

(Arroyo and Pepper, 2020). ICOS, présent rapidement à la surface du Tfh (Nurieva et al., 2009; Weber et al., 2015), semble impliqué, après liaison à son ligand ICOS-L, dans l'expression de CD40L (Crotty, 2019) par le Tfh mais aussi dans la production et la libération dans le milieu extracellulaire d'IL-21 (Chavele et al., 2015) et d'IL-4 (Reinhardt et al., 2009). Enfin, le LB est une des sources majeures d'IL-6, molécule permettant l'induction de l'expression de Bcl6 par le Tfh comme nous l'avons vu plus haut. Le Tfh activé exprime ensuite le récepteur Ebi2 ce qui va l'amener à rester au sein du centre germinatif. D'autres molécules semblent aussi importantes dans le maintien de l'interaction LB-LT, telles :

- SLAM (signaling lymphocyte activation molecule) (Ma et al., 2007; McCausland et al., 2007; Yusuf et al., 2010), présent à la surface des LB,
- et son ligand SAP (SLAM associated protein), présent à la surface du Tfh.

Une véritable synapse immunologique se met ainsi en place et permet la survie du centre germinatif.

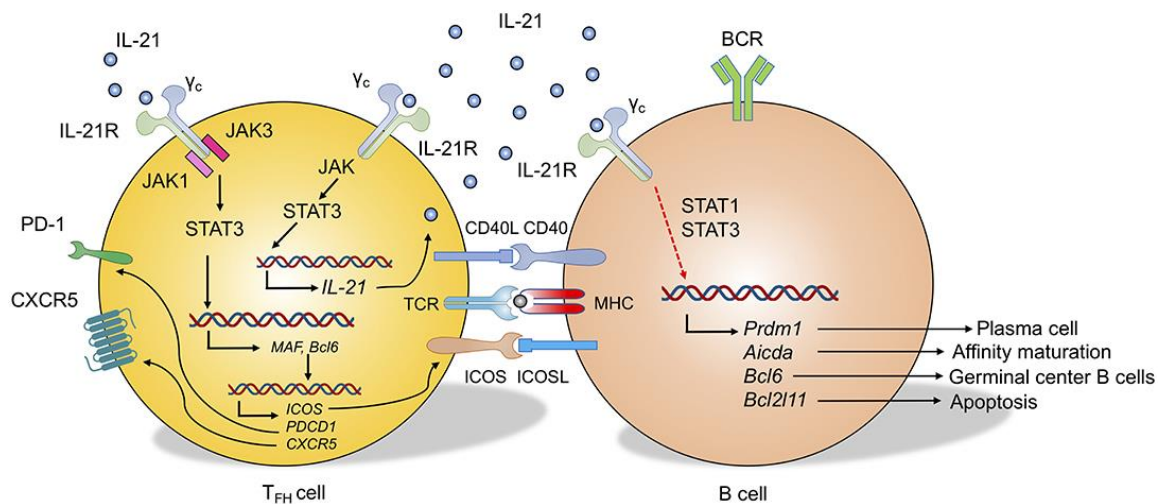


Figure 5 : Interaction cellulaire entre les LT et les LB d'après Gong, *Frontiers in Immunology*, 2019. Les Tfh et B interagissent grâce à des contacts directs notamment via la liaison d'ICOS, du TCR et de CD40L présents sur le Tfh avec (respectivement) ICOSL, le complexe peptide-CMH et CD40 présents sur le lymphocyte B. Ils interagissent aussi via des contacts indirects, notamment via l'axe IL-21. L'IL-21 se lie au récepteur de l'IL-21 (IL-21R), qui se dimérise avec le récepteur commun de la cytokine à chaîne γ (γ c) pour former le complexe IL-21R. Dans les cellules Tfh, la signalisation de l'IL-21 active la Janus kinase 1 (JAK1) et JAK3 pour induire la phosphorylation de STAT3. La protéine STAT3 se transloque dans le noyau cellulaire et régule la transcription de gènes cibles, notamment IL-21, Maf et Bcl6. Cette régulation conduit à l'IL-21 autocrine par les cellules Tfh et au programme transcriptionnel qui régule à la hausse les gènes codant pour CXCR5, ICOS et PD-1. Dans les cellules B, au moins partiellement par l'intermédiaire de STAT1 et STAT3, la signalisation de l'IL-21 peut réguler l'expression génétique de Prdm1 (différenciation des cellules plasmiques), Aicda (maturation par affinité), Bcl6 (cellules B du centre germinatif) et Bcl2l11 (apoptose des cellules B), ce qui conduit à la différenciation des cellules B dans de multiples directions.

L'ensemble des mécanismes mis en jeu dans la naissance et la survie du CG n'est pas entièrement compris mais une régulation fine semble exister. Il est en effet retrouvé que le type d'antigène rencontré modifie la cinétique de développement du CG : Arroyo et al. (Arroyo and Pepper, 2020) montrent qu'après infection à *P. Falciparum*, la souris développe des lymphocytes Tfh dans la rate plus rapidement, et de façon plus prolongée que lorsqu'elle est infectée par le virus LCMV. Cette réponse dynamique semble faire intervenir des cytokines, comme IL-4 et IL-21, dont l'expression varie au cours du temps (Weinstein et al., 2016) mais aussi des cellules particulières : les LT folliculaires régulateurs (Tfr) que nous étudierons ensuite.

L'objectif final est d'adapter au mieux la réponse immunitaire humorale. Par exemple, lors d'un processus infectieux, si l'infection est contrôlée, les centres germinatifs sont amenés à disparaître. Néanmoins, en prévention d'une nouvelle infection, des Tfh mémoires (présentant le marqueur CCR7) sont produits dès un stade précoce de l'infection (Arroyo and Pepper, 2020). A l'inverse, si l'infection se chronicise, certains Tfh semblent quitter le centre germinatif afin de reformer d'autres centres germinatifs au sein du même OLS (Asrir et al., 2017; Seth and Craft, 2019), ou à distance. Ils regagneraient alors la circulation sanguine avant de migrer dans d'autres ganglions ou tissus, moyennant une diminution de l'expression de marqueurs folliculaires tels ICOS et Bcl6 (Asrir et al., 2017; van Besouw et al., 2019). Cette hypothèse reste débattue mais de plus en plus d'expériences convergent dans ce sens. Des Tfh sanguins sont en effet décrits chez l'homme comme présents dans beaucoup de pathologies dysimmunes (Fortea-Gordo et al., 2019; Saito et al., 2005; Simpson et al., 2010a), pathologies infectieuses chroniques (Quebrada Palacio et al., 2020; Ruffin et al., 2017; Wu et al., 2018), pathologies cancéreuses (Guo et al., 2017; Lechner et al., 2019; Shi et al., 2014) mais aussi en post-transplantation (Zhang et al., 2019a). Ces Tfh « circulants » peuvent posséder des profils d'expression in vitro cytokiniques différents selon la pathologie dans laquelle ils sont retrouvés. En effet, il a été retrouvé que certains Tfh circulants exprimeraient majoritairement l'IL-4 alors que d'autres de l'INF γ et enfin, un troisième sous-groupe de l'IL-17 (Bentebibel et al., 2013; Locci et al., 2013). De cette observation est née le concept de « Tfh like » avec la classification en quatre sous-groupes de Tfh circulants : des Tfh1 (exprimant CXCR3⁺ et INF γ et étant CCR6 négatifs) (Lederer et al., 2022; Malhotra et al., 2020; Quebrada Palacio et al., 2020), Tfh2 (exprimant CCR6⁺ et IL-4 et étant CXCR3 négatifs) (Miyajima et al., 2020), des Tfh13 (exprimant IL-4 et l'IL-13) et Tfh17 (exprimant CXCR3, CCR6 et IL-17) (Bentebibel et al., 2013; Seth and Craft, 2019) (Figure 6). Dans tous les cas, ces Tfh circulants semblent pouvoir réentrer au sein de OLS et pouvoir former secondairement de nouveaux centres germinatifs (Asrir et al., 2017). Ils pourraient être aussi à l'origine de la formation d'organe lymphoïde tertiaire (Bell et al., 2020; Townsend et al., 2019).

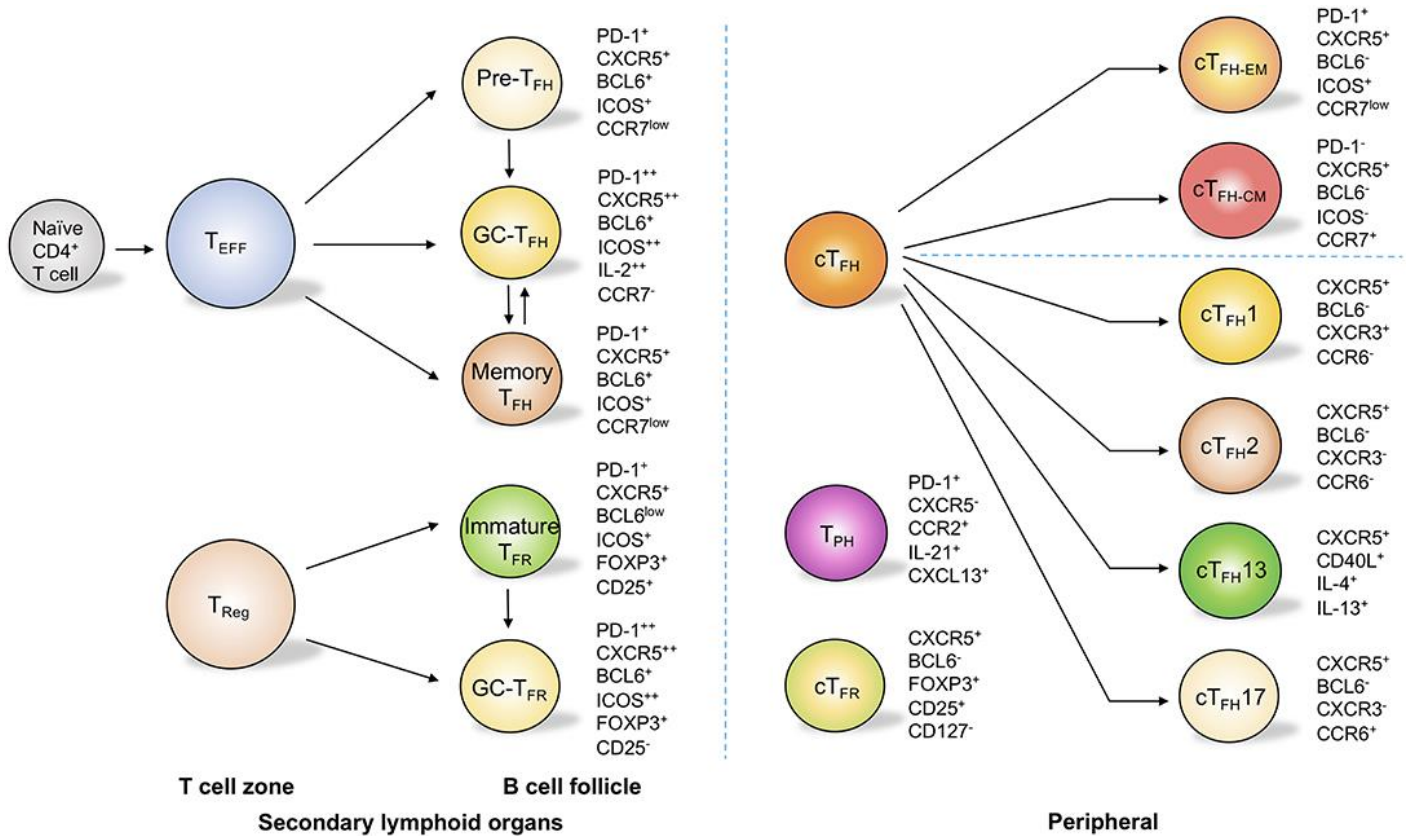


Figure 6 : Population T folliculaire : origine et description moléculaires, d'après Gong, *Frontiers in Immunology*, 2019. Dans les organes lymphoïdes secondaires, les Tfh sont composées de sous-ensembles aux phénotypes distincts. Ces sous-ensembles comprennent les cellules pré-Tfh, les cellules Tfh du centre germinatif et les cellules Tfh mémoires. Grâce à la régulation à la hausse de la protéine PD-1 et de CXCR5, les cellules T régulatrices (Treg) migrent dans les follicules et deviennent des cellules Tfr immatures et des cellules Tfr de centre germinatif. Dans la circulation périphérique, les cellules Tfh circulantes (cTfh) peuvent être classées en cellules mémoires effectrices (cTfh-em) et en cellules mémoire centrales (cTfh-cm) sur la base de l'expression de PD-1 et du récepteur CC-chemokine 7 (CCR7). Les cellules cTfh peuvent également être sous-groupées en cellules cTfh1, cTfh2, cTfh13 et cTfh17 sur la base de l'expression différentielle de CXCR3 et CCR6 ainsi que de la sécrétion d'interleukine-4 (IL-4) et IL-13. Les cellules Tfr circulantes sont similaires aux cellules Treg mais expriment CXCR5. Notamment, les cellules T auxiliaires périphériques (Tph) n'expriment pas CXCR5 mais peuvent produire IL-21 et CXCL13, ce qui leur permet d'apporter une aide aux cellules B.

Une autre cytokine retrouvée comme potentiellement activatrice des Tfh est l'IL-1. En effet, Paul Gédéon Ritvo (Ritvo et al., 2017a) a retrouvé que le récepteur agoniste de l'IL-1, l'IL-1R1 est fortement exprimé par les Tfh et que, lorsque des Tfh étaient mis en co-culture avec de l'IL-1 ils produisaient plus d'IL-4 et d'IL-21. Cette découverte nous a fait nous questionner, comme nous le verrons par la suite, sur l'implication réelle de ce récepteur dans l'activation du Tfh.

f. Le lymphocyte T folliculaire régulateur (Tfr)

Récemment, une nouvelle population de LT, régulatrice, siégeant au sein des ganglions, a été décrite : les Tfr (Lim et al., 2004a). Cette population semble en effet réguler la réponse immunitaire en diminuant l'avidité et le taux d'anticorps spécifiques produits après une immunisation, du moins lorsque ces anticorps sont des IgG (Wu et al., 2016a).

Cette population, comme celle des Tfh, prend son origine au niveau thymique où elle y acquiert un TCR fonctionnel. Ce TCR a une particularité : il est potentiellement auto-réactif. Une autre population partage les mêmes propriétés de TCR : les lymphocytes T régulateurs, Treg (Hori et al., 2003; Sakaguchi et al., 1995). Les analyses transcriptomiques (Maceiras et al., 2017a; Ritvo et al., 2018) ont en effet mis en évidence une forte homologie de TCR entre les Tfr et les Treg, population mieux décrite de LT régulatrice, faisant supposer une origine commune. Elles partagent aussi l'expression d'un facteur de transcription important pour le développement d'un profil régulateur : la Forkhead Foxp3 (Maceiras and Graca, 2015; Maceiras et al., 2017a; Ritvo et al., 2018; Wing et al., 2017; Wollenberg et al., 2011). Foxp3 se lie en effet à plus de 700 gènes (Zheng et al., 2007) et induit ainsi un profil transcriptomique « régulateur » à la cellule l'exprimant. Il permet notamment l'expression de CD25, récepteur de haute affinité à l'IL-2, chez le Treg, ayant un véritable rôle chez le Treg.

Comme les Treg, les Tfr pourraient ainsi présenter une origine thymique ou périphérique (Figure 7) :

- dans la majorité des cas, l'uprégulation de Foxp3 se ferait dès le stade thymique (Maceiras and Graca, 2015; Maceiras et al., 2017b; Ritvo et al., 2018).
- une minorité acquerrait ce marqueur en périphérie dans certaines conditions assurant ainsi une certaine plasticité (Aloulou et al., 2016).

En suivant cette hypothèse, deux profils de développement chez les Tfr induiraient, comme pour les Treg, deux sous-populations différentes, les Tfr thymiques et les Tfr périphériques ou inductibles (Figure 7). Ces deux sous-populations possèderaient la même fonction, celle de favoriser la tolérance immunitaire mais à un degré différent : les Tfr thymiques, à l'inverse des Treg périphériques, exerceraient leur fonction de cellule régulatrice quel que soit l'environnement cytokinique présent (Sharabi et al., 2018).

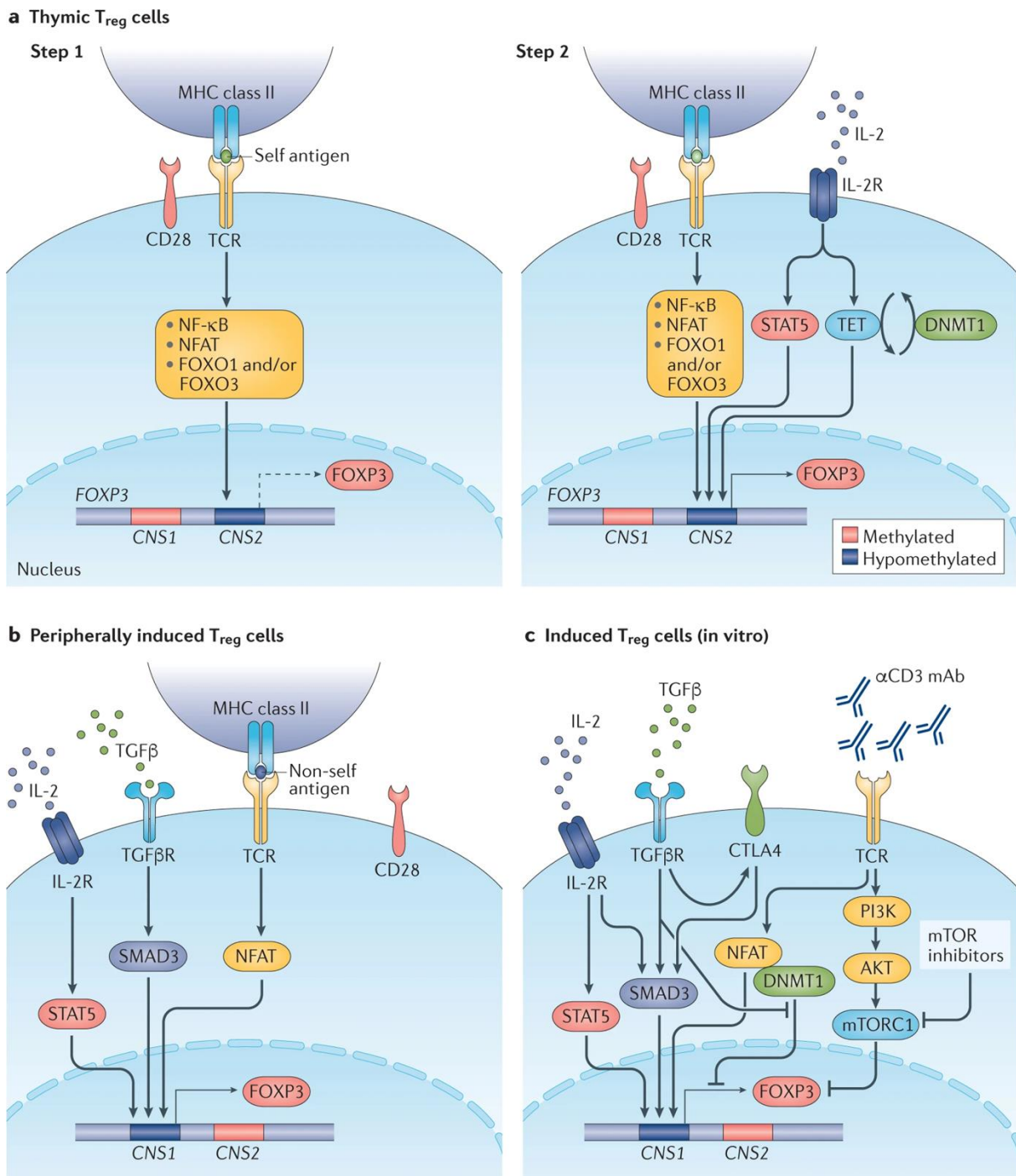


Figure 7 : Origine et expression moléculaire des Treg, d'après Sharabi, NatRev, 2018.

a | Le développement des cellules T régulatrices (Treg) dans le thymus se fait par étapes et nécessite l'expression du TCR suivie de l'expression du récepteur de l'interleukine 2 (IL-2R). Lorsque le TCR et les auto-antigènes interagissent à un niveau d'avidité modéré (juste en dessous du seuil de sélection négative), la chaîne α de l'IL-2R (CD25) est exprimée et s'accumule à la surface des cellules ; l'IL-2 joue alors un rôle central dans le développement des cellules Treg indépendamment du TCR. L'expression de la boîte de forkhead P3 (FOXP3) augmente après l'interaction TCR-peptide - CMH. Les facteurs de transcription en aval de l'engagement du TCR sont activés et se lient au promoteur du gène et à la région non codante conservée 2 (CNS2) de FOXP3. L'expression de FOXP3 est maintenue dans les cellules Treg sensibles à l'IL-2. La signalisation par IL-2R préserve le statut hypométhylé de CNS2 en recrutant TET. La signalisation par IL-2R active également le transducteur de signal et l'activateur de transcription 5 (STAT5) pour augmenter davantage l'expression de FOXP3.

b | Les cellules Treg qui sont générées in vivo en dehors du thymus proviennent de cellules T CD4⁺ naïves en réponse au facteur de croissance transformant- β (TGF β) et à l'IL-2 dans les

tissus périphériques. L'expression de FOXP3 dans ces cellules provient principalement des interactions entre le TCR et le CMH non-antigène et de la signalisation IL-2R, qui affectent le CNS1, avec des contributions mineures de la signalisation TGFβ. c | L'expression de FOXP3 dans les cellules Treg induites in vitro (iTreg) est dépendante de l'activation et de courte durée. L'ajout de TGFβ ou d'IL-2 au milieu entraîne une hypométhylation de CNS1, car l'ADN (cytosine-5)-méthyltransférase 1 (DNMT1) est exclue du noyau. Les deux cytokines activent SMAD3 et STAT5, ce qui augmente l'expression de FOXP3. Les inhibiteurs mécanistes ou de la cible mammalienne de la rapamycine (mTOR) peuvent contribuer à l'activation des cellules Treg in vitro. Le CNS2 des cellules iTreg n'est que partiellement hypométhylé, et par conséquent, l'expression de FOXP3 est quelque peu instable.

Une fois acquis son TCR, le futur Tfr quitte le thymus et migre vers les OLS afin de poursuivre sa différenciation en cellule Tfr mature. En effet, comme le Tfh, le Tfr ne devient compétent qu'après la succession de deux étapes :

- la rencontre avec une CPA présentant le peptide-CMH spécifique de son TCR (Sage et al., 2016).
- l'interaction avec le LB dans le follicule (Linterman et al., 2011).

Grâce à ces deux étapes, le Tfr, va exprimer des molécules de signalisation indispensables à sa survie et sa localisation au sein du ganglion, tel Bcl6 (Johnston et al., 2009) (Figure 7) mais aussi des molécules de signalisation indispensables à ses fonctions de régulation.

Grâce à l'engagement de son TCR, les canaux calciques stromal interaction molecule 1 (STIM1) et STIM2 s'ouvrent et favorisent l'influx de calcium intra-cellulaire. Cet influx favorise l'activation du facteur NFAT2 qui active à son tour IRF4, BATF et ainsi favorise l'expression de Bcl6 (Vaeth et al., 2016). Bcl6 favorise, comme vu précédemment, conjointement à NFAT2 (Vaeth et al., 2014), l'expression de marqueurs indispensables au « homing » folliculaire, tel le récepteur au chimiokine CXCR5 (Sage and Sharpe, 2016). D'autres molécules, telles PD1 (Sage and Sharpe, 2016) ou ICOS (Xu et al., 2017b) apparaissent aussi à la surface du Tfr après activation. ICOS permet l'activation de la phosphoinositol 3 kinase (PI3K), qui, à son tour active mTOR1 (Xu et al., 2017b), molécule indispensable pour activer ensuite la voie Stat3-Tcf1-Bcl6 et ainsi assurer la persistance de l'expression du facteur de transcription Bcl6 (Wu et al., 2016b; Xu et al., 2017b). Bcl6 va aussi permettre d'inhiber l'expression de la molécule CD25, molécule semblant délétère à la survie des Tfol (soit les Tfh et Tfr) (Papillion et al., 2019). Le rôle de l'expression de PD1 à la surface des Tfr n'est pas encore totalement compris à l'heure actuelle (Sage et al., 2013; Sayin et al., 2018).

Un autre facteur important dans le développement du Tfr est, de façon inattendue, B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp1) (Linterman et al., 2011). Blimp1 et Bcl6 sont en effet connus pour s'inhiber mutuellement (Johnston et al., 2009). L'apparition de ce

facteur au sein du Tfr, exprimant rapidement le Bcl6, semble donc compromise. Néanmoins, plusieurs études convergent à retrouver une expression importante de Blimp1 dans les Tfr (Linterman et al., 2011; Wing et al., 2017; Yang et al., 2018) avec une perte des fonctions régulatrices du Tfr s'il existe une déficience de Blimp1 au sein de cette dernière (Yang et al., 2018). Cette molécule est par ailleurs connue au sein des Treg pour favoriser sa fonction inhibitrice (Bankoti et al., 2017), en promouvant notamment l'expression d'IL-10 (Cretney et al., 2011). Elle pourrait donc jouer un rôle dans le développement des fonctions régulatrices du Tfr.

D'autres molécules de régulation et d'activation communes au Treg apparaissent après activation du TCR. Parmi elles, CTLA4 (Sage et al., 2014; Wing et al., 2014), GITR (Alexander et al., 2011; Amiezer and Phan, 2016; Lim et al., 2004b), TIGIT (Amiezer and Phan, 2016; Cretney et al., 2011), TGF β (Holm Hansen et al., 2019), CD73 (Xu et al., 2017b) sont fréquemment décrites. La molécule CTLA4, ligand de CD80 et CD86, est par exemple connue pour être exprimée fortement par les Treg. Lorsque CTLA4 se lie à ses ligands présents sur les T effecteurs, ces derniers perdent leur possibilité d'activation via un défaut d'interaction de ces mêmes ligands avec la molécule de costimulation CD28 (Walker and Sansom, 2011). Une délétion du CTLA4 au sein des Tfr induit une majoration du taux de Tfh et de LB au sein du centre germinatif faisant fortement suspecter un rôle de cette molécule similaire dans ces deux populations (Sage et al., 2014). Enfin les Tfr pourraient inhiber la réponse humorale via la sécrétion d'IL-10 (Laidlaw et al., 2017).

Le Tfr, une fois activé, peut ainsi jouer son rôle : celui de réguler la réponse humorale. Plusieurs expériences tendent en effet à montrer qu'une déplétion de cette population induit une majoration de LB au sein du CG (Clement et al., 2019; Linterman et al., 2011), une majoration du taux d'Ac spécifiques après une immunisation (Wu et al., 2016a) mais aussi une propension à développer des stigmates d'auto-immunité (Fu et al., 2018). A l'inverse, un ajout de cette population, *in vitro*, induit une diminution du taux de Tfh, ainsi qu'une inhibition du taux de LB au sein du CG (Hou et al., 2019; Lim et al., 2004b; Ritvo et al., 2017a; Wollenberg et al., 2011). D'autres tendent à mettre en évidence que cette population pourrait permettre d'améliorer l'affinité des Ac post-immunisation (Wu et al., 2016a), mais aussi de limiter la formation d'auto-Ac (Fazilleau and Aloulou, 2018). En effet, dans plusieurs modèles, cette population semble induire une amélioration de la réponse post-vaccinale (Wu et al., 2016a), de la réponse anti-néoplasique (Lee et al., 2018) mais aussi inhiber le développement de pathologies auto-immunes (Fazilleau and Aloulou, 2018; Wen et al., 2016).

Les mécanismes impliqués dans la régulation des Tfr sur la voie humorale ne sont pas clairement compris à l'heure actuelle mais semblent mettre en jeu plusieurs voies (Fazilleau

and Aloulou, 2018), comme lors de la régulation des lymphocytes T conventionnels par les Treg.

Le Tfr, comme énoncé plus haut, possède de nombreuses molécules en commun avec le Treg. Celles-ci pourraient donc permettre une régulation du Tfh par le Tfr. Néanmoins, mise à part le CTLA4, aucune molécule n'a encore démontré son rôle dans la fonction régulatrice du Tfr (Sage et al., 2014). De plus, certaines différences existent entre les Tfr et les Treg pouvant souligner des mécanismes d'action différents. En effet, à l'inverse du Treg exprimant fortement le CD25, sous-unité alpha du récepteur de l'IL-2, le Tfr l'exprime à différents niveaux (Hou et al., 2019; Maceiras and Graca, 2015; Ritvo et al., 2017a; Wing et al., 2017). La régulation via la capture de l'IL-2 par le LT régulateur à l'instar du T effecteur et donc l'inhibition de l'activation de ce dernier (Sakaguchi et al., 2008) comme régulation des Tfh par les Tfr est faiblement probable. Ce d'autant que l'IL-2 est connue pour inhiber la production de Tfh (León et al., 2014). D'autres mécanismes de régulation semblent donc importants à rechercher.

Une analyse transcriptomique effectuée par notre équipe à cette fin a révélé que les Tfr et les Tfh expriment des récepteurs à l'IL-1 : les Tfh, l'IL-1R1, récepteur agoniste de l'IL-1 alors que les Tfr, l'IL-1R1 mais aussi l'IL-1R2, récepteur decoy de l'IL-1 et l'IL-1Ra, récepteur antagoniste de l'IL-1 (Ritvo et al., 2017b). Cette découverte, allant dans le sens de travaux antérieurs (Rasheed et al., 2006) a motivé notre équipe à poursuivre ses travaux de recherche sur cet axe. Notre équipe a ensuite montré qu'un traitement par IL-1 in vitro ou in vivo active les Tfh, et que cette activation est inhibée par l'adjonction de Tfr (Ritvo et al., 2017b). Ceci renforce notre engouement à étudier cette voie.

2. Implication des lymphocytes T folliculaires dans la physiopathologie et la thérapie

a. *Dysrégulation de l'immunité : les différentes formes*

L'immunité innée comme humorale peuvent se déréguler. Selon le mécanisme mis en jeu, différents types de pathologies sont induits : les déficits immunitaires (i), les maladies auto-inflammatoires (ii), les maladies auto-immunes (iii), les allergies (iv) et les cancers (v) (dont les hémopathies).

(i) Les déficits immunitaires apparaissent lorsqu'il existe un défaut de fonctionnement du système immunitaire. Ils peuvent toucher l'ensemble des acteurs de l'immunité. On distingue schématiquement :

-les déficits de l'immunité adaptative affectant systématiquement l'immunité humorale et pouvant affecter l'immunité cellulaire (LT).

-les déficits de l'immunité innée affectant les acteurs de l'immunité innée, notamment l'IL-1.

(ii) Les maladies auto-inflammatoires, définies comme « des troubles cliniques causés par une ou plusieurs déficiences ou dérèglements du système immunitaire inné. Elles sont caractérisées par une inflammation récurrente ou continue (réactifs de phase aiguë élevés) et l'absence d'un rôle pathogène primaire du système immunitaire adaptatif (cellules T autoréactives ou production d'auto-anticorps) » (Ben-Chetrit et al., 2018).

(iii) Les maladies auto-immunes résultent quant à elle d'une rupture de la tolérance au soi du système immunitaire adaptatif (Eisenberg, 2003). Celle-ci peuvent être localisées à un organe ou être systémiques (tableau 1). Dans les deux cas, il existe fréquemment des auto-anticorps retrouvés.

Maladies auto-immunes spécifiques d'organes	Maladies auto-immunes non spécifiques d'organes (maladies auto-immunes systémiques)
<p>Glandes endocrines :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ thyroïdites : maladie de Hashimoto et maladie de Basedow ; ✓ maladie d'Addison ; ✓ diabète de type 1 ; ✓ Ovarite auto-immune. <p>Foie et tube digestif :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ hépatites auto-immunes ; ✓ cirrhose biliaire primitive ; ✓ maladie de Biermer ; ✓ maladie coeliaque. <p>Système nerveux :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Myasthénie ; ✓ Lambert-Eaton ; ✓ Guillain-Barré ; ✓ Sclérose en plaques. <p>Œil :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Ophtalmie sympathique. <p>Peau :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Pemphigus ; ✓ Pemphigoïdes ; ✓ Pelade ; ✓ Vitiligo. 	<p>Connectivites :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Polyarthrite rhumatoïde ✓ Lupus systémique ✓ Sclérodermie systémique. ✓ Syndrome de Gougerot-Sjögren. ✓ Myopathies inflammatoires (dont syndrome des antisynthétases) ✓ Connectivite mixte <p>Vascularites primitives :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Artérite à cellules géantes ✓ Maladie de Takayasu ✓ Maladie de Kawasaki ✓ Périartérite noueuse ✓ Granulomatose avec polyangéite (anciennement maladie de Wegener) ✓ Granulomatose éosinophilique avec polyangéite (anciennement maladie de Churg-Strauss) ✓ Polyangéite microscopique ✓ Vascularite à IgA (anciennement purpura rhumatoïde) ✓ Vascularite à Ac anti-MBG ✓ Maladie de Behçet <p>Autre :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Polychondrite atrophiante ✓ Syndrome des antiphospholipides.

Tableau 1: Classification des maladies auto-immunes d'après maladie-autoimmune.fr

(iv) Les allergies correspondent à une réaction immunitaire inhabituelle et excessive spécifique à une substance étrangère (un allergène) rencontrée préalablement par l'organisme (sensibilisation). Ces substances, ou allergènes peuvent pénétrer dans l'organisme par trois voies : cutanée, respiratoire (haute ou basse) ou digestive. Les manifestations cliniques sont le

plus souvent localisés. Dans les formes les plus sévères, la réaction immunitaire est telle que les manifestations affectent l'ensemble de l'organisme : on parle alors d'anaphylaxie.

D'un point de vue mécanistique, il apparaît que l'anaphylaxie est provoquée par la dégranulation des mastocytes suite à la réticulation de leurs IgE de surface, ce qui entraîne la libération de molécules biologiquement actives à l'origine d'une maladie allergique. Il est intrigant de constater que c'est la production d'IgE de haute affinité, et non d'IgE totales, qui est nécessaire à la dégranulation des mastocytes et à l'anaphylaxie, ce qui implique que cette maladie est dérivée du centre germinatif car elle nécessite le processus d'hypermutation somatique et de sélection par affinité.

(v) Enfin, les cancers sont des maladies caractérisées par la prolifération incontrôlée de cellules, liée à un échappement aux mécanismes de régulation qui assurent le développement harmonieux de notre organisme. L'immunité joue ainsi un rôle important pour prévenir le développement de tumeur.

A côté de ces pathologies, l'immunité peut aussi être mise en défaut dans certaines pathologies notamment les pathologies infectieuses ou post greffe. Elles favorisent alors la chronicisation des infections ou le rejet respectivement.

b. Maladie auto-immune et auto-inflammatoire

Nous avons pu voir précédemment que les Tfh favorisaient la sécrétion d'anticorps. Dans les pathologies dysimmunes, ces derniers sont souvent décrits, si ce n'est comme impliqués, du moins comme augmentés.

En effet, un taux augmenté circulant de Tfh, est fréquemment décrit dans les pathologies auto-immunes systémiques -telles la spondylarthrite ankylosante (Ma et al., 2012; Shan et al., 2015a), la polyarthrite rhumatoïde (Fortea-Gordo et al., 2019) (2 pathologies inflammatoires rhumastismales), la myasthénie (Saito et al., 2005), le lupus ou encore le syndrome de Gougerot-Sjogren (Simpson et al., 2010b) - mais aussi dans les maladies spécifiques d'organes -telles le diabète de type 1, la sclérose en plaque, le vitiligo, le pemphigus ou la thyroïdite (Jacquemin et al., 2019; Kim et al., 2019; Lechner et al., 2019; Ma and Deenick, 2014; Puthenparampil et al.)-. Plusieurs modèles murins de maladies auto-immunes ont été développés afin de vérifier la réelle implication des Tfh dans ces maladies : toutes convergent vers un accroissement des Tfh associé à l'apparition de la maladie (Baumjohann et al., 2013; Cui et al., 2019; Ding et al., 2013; Faliti et al., 2019). Dans les pathologies à anticorps médiées, telles que le lupus, une corrélation entre auto-anticorps sériques et taux de Tfh est décrite (Han

et al., 2019; Kim et al., 2020; Ma et al., 2012; Simpson et al., 2010a). Des Tfh infiltrants les tissus sont aussi retrouvés (Bell et al., 2020; Otsuka et al., 2019).

Dans les maladies auto-inflammatoires, le rôle des Tfh semble moins probable. Il est néanmoins décrit dans la maladie de Crohn une majoration du taux de Tfh aussi bien circulants que digestifs (Wang et al., 2014b). Il serait donc intéressant de rechercher leur présence dans ce type de maladies.

Les Tfr, quant à eux, sont retrouvés à des taux variables selon les pathologies étudiées. En effet, ils sont fréquemment décrits comme augmentés dans la circulation sanguine au cours de la maladie de Gougerot-Sjögren, maladie auto-immune affectant particulièrement les glandes salivaires, mais sans aggravation de la pathologie (Fonseca et al., 2018; Ivanchenko et al., 2019; Kim et al., 2019). Leur présence serait plutôt le témoin d'une dysrégulation immunitaire. En effet, au niveau des glandes salivaires, il n'est pas retrouvé de Tfr. De même, dans un modèle murin de syndrome sec type Gougerot-Sjögren, lorsque les souris sont délétées spécifiquement en Tfr, il existe une aggravation de la maladie avec une majoration du taux d'auto-Ac et une diminution du flux salivaire (Fu et al., 2018).

De même, dans la spondylarthrite ankylosante, il est retrouvé une majoration du taux de Tfr circulants, mais celle-ci est concomitante à la majoration du taux de Tfh, témoignant à nouveau d'une présence probablement induite par une rupture de tolérance. De plus, lorsque les patients sont traités efficacement, le taux de Tfr se majore (Shan et al., 2015b).

Dans d'autres pathologie, telles que le lupus (Wu et al., 2016a; Xu et al., 2017a), la myasthénie (Wen et al., 2016) ou encore la polyarthrite rhumatoïde (Liu et al., 2018), le taux de Tfr est retrouvé comme toujours abaissé.

Au total, les Tfr semblent dans les maladies auto-immunes avoir un rôle plutôt protecteur.

c. Cancer

Les Tfh sont décrits comme présents dans plusieurs cancers, qu'ils soient solides ou non (Cha et al., 2017; Gu-Trantien et al., 2013; Roncador et al., 2007; Shi et al., 2014; Wu et al., 2018). Leur rôle protecteur ou délétère est par contre débattu. En effet, le groupe de Gu-Trantien. (Gu-Trantien et al., 2013) décrit un potentiel rôle protecteur des Tfh, la présence de Tfh infiltrants la tumeur (ICOS⁺PD1⁺) étant corrélé à un meilleur pronostic de survie. Niogret et al. retrouve aussi chez la souris une diminution du volume tumoral après transfert de population Tfh (Niogret et al., 2021). A l'inverse, des Tfh circulants sont retrouvés en plus grande quantité chez les patients présentant un cancer pulmonaire non à petites cellules évolué (Shi et al., 2014).

De même, le rôle des Tfr, tant dans les cancers solides que les hémopathies, reste à confirmer. Ils sembleraient pathogènes dans les cancers solides (Wang et al., 2014a; Wu et al., 2018) alors qu'ils pourraient avoir un effet anti-tumoral (Lee et al., 2018) dans les hémopathies malignes. Cependant, trop peu d'études ont été réalisées pour conclure.

d. Déficit immunitaire

Les Tfh peuvent être affectés par les déficits immunitaires aussi bien acquis que congénitaux.

Le Virus de l'immunodéficience humaine (VIH), principal pourvoyeur de déficit immunitaire à l'âge adulte, infecte la population CD4⁺, particulièrement les Tfh (Colineau et al., 2015; Perreau et al., 2013). Il induit ainsi un déficit cellulaire T mais aussi B. Néanmoins, malgré une population fortement touchée par le virus, cette population semble impliquée dans la défense immunitaire élaborée contre le VIH, avec un taux d'anticorps neutralisant le virus corrélé au taux de Tfh circulants (Locci et al., 2013; Moody et al., 2016)

Les déficits immunitaires congénitaux ciblant l'interaction T-B avec notamment les mutations affectant CD40L, ICOS ou ciblant encore les facteurs de transcriptions nécessaires à l'induction et la survie des Tfh tels que STAT3 sont aussi associés à une diminution ou une modification phénotypique de la population Tfh (Ma et al., 2015).

e. Allergie

Le rôle des Tfh dans l'orchestration de la production systémique d'IgE chez les patients allergiques est assez clair (Gowthaman et al., 2019) tant chez les patients présentant une allergie respiratoire (Foerster and Molęda, 2020; Miyajima et al., 2020) qu'ORL (Wang and Tan, 2019) ou anaphylactique (Gowthaman et al., 2019).

La fonction spécifique des cellules Tfr dans l'allergie est moins bien comprise. Il a été récemment démontré qu'il existe des associations négatives entre la fréquence et la fonction des cellules Tfr circulantes et les niveaux d'IgE spécifiques de l'antigène ou la gravité de la maladie chez les patients atteints de rhinite allergique (Yao et al., 2019). De plus, les fréquences et la fonction des cellules Tfr circulantes semblent améliorées après une immunothérapie allergénique et semblent positivement associées à la rémission de la maladie (Yao et al., 2019).

Dans un modèle de souris dépourvues de cellules Tfr, il a été démontré que les Tfr régulent la production d'IL-13 par les Tfh et contrôlent les réponses IgE. Il est intéressant de noter que la délétion des Tfr in vivo pendant la sensibilisation aux allergènes d'acariens (HDM) a entraîné une augmentation des IgE spécifiques et de l'inflammation pulmonaire (Clement et al., 2019). L'ensemble de ces résultats démontre que Tfh et Tfr sont des régulateurs clés de l'immunité allergique en contrôlant les réponses du CG précoces (Yao et al., 2021).

f. Greffe

La première tentative de greffe à partir de donneur vivant a été réalisée en 1952 à l'hôpital Necker par l'équipe du Professeur Jean Hamburger. Celle-ci mène au décès du patient 21 jours après du fait d'un rejet.

Le rejet est en effet la première cause de perte de greffon.

Le rejet pouvant être humoral avec présence d'anticorps anti-DSA (donor specific antigen), la recherche de Tfh dans le greffon et dans le sang de patient présentant un rejet fut rapidement réalisée et retrouvée. En effet, il est décrit une majoration de Tfh infiltrants le greffon lors du rejet aussi bien chez les patients transplantés de greffe hépatique (Zhang et al., 2019a) que rénale (van Besouw et al., 2019; de Graav et al., 2015). De même certains auteurs décrivent un taux de Tfh circulants majoré (Zhang et al., 2019b), proportionnel au taux d'anticorps anti-DSA (Danger et al., 2019) chez les patients greffés considérés en rejet. Les études effectuées chez la souris confortent le rôle pathogène potentiel des Tfh avec une majoration du taux de Tfh circulants et intra-ganglionnaires associée à une majoration de plasmablastes et de cellules B du centre germinatif (BCG) lors de la réalisation d'une xénogreffe de peau de souris BALB/c à une souris C57/BL6 (La Muraglia et al., 2020).

L'implication des Tfr dans les rejets en encore peu étudiée. Il semblerait que cette population soit présente au sein du tissu greffé lors de rejet chronique (Codarri et al., 2007).

g. Vaccination

Les Tfh peuvent aussi être utilisés comme témoins d'une efficacité vaccinale. En effet, ils sont retrouvés comme majorés post vaccination efficace notamment contre l'H.Influenza (Asrir et al., 2017; Pallikkuth et al., 2019) ou contre le *P.falciparum* (Moon et al., 2012). Certains envisageraient même de cibler cette population afin d'amplifier la réponse vaccinale (Laguna-Goya et al., 2019; Linterman and Hill, 2016).

La contribution des Tfr dans la vaccination reste peu étudiée.

3. L'Axe IL-1

a. La grande famille de l'IL-1

L'IL-1 fait partie de la grande famille de l'IL-1 (Auron et al., 1984; Garlanda et al., 2013a; March et al., 1985) (Figure 8). Son histoire remonte à 1948 avec la découverte d'un facteur

soluble, produit par certains leucocytes, pouvant jouer le rôle d'inducteur thermique (Beeson, 1948).

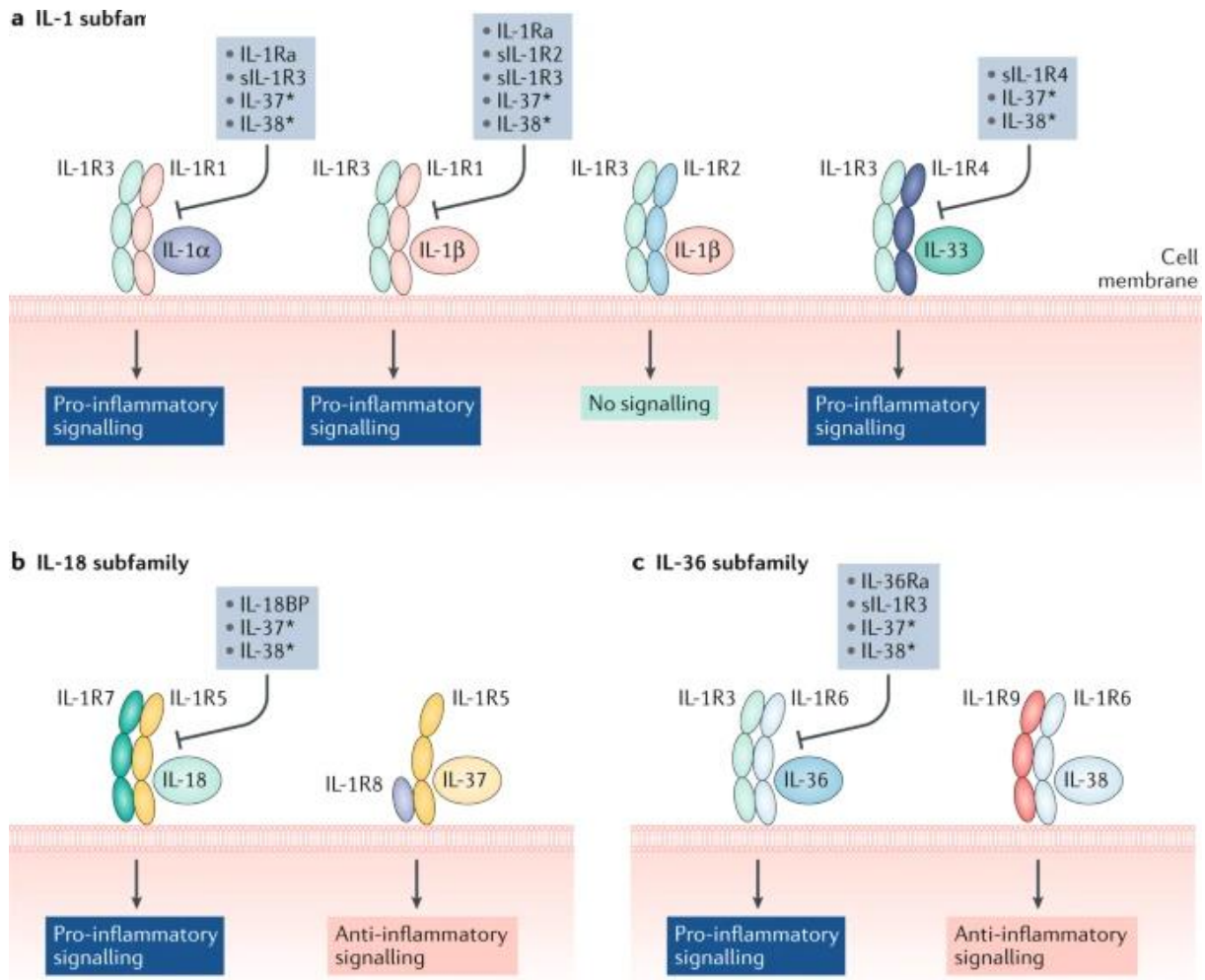


Figure 8 : Description de la grande famille de l'IL-1 d'après Dinarello, Nature, 2019. La famille des cytokines IL-1 peut être divisée en trois sous-familles sur la base du partage des récepteurs et de la liaison des corécepteurs : la sous-famille IL-1, la sous-famille IL-18 et la sous-famille IL-36. a | La sous-famille IL-1 se compose de IL-1 α , IL-1 β et IL-33, qui partagent le corécepteur IL-1 receptor 3 (IL-1R3). Les cytokines de la sous-famille IL-1 favorisent les voies de signalisation pro-inflammatoires qui induisent la production d'autres cytokines et chimiokines. En revanche, l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) réduit spécifiquement les activités de l'IL-1 α et de l'IL-1 β . L'activité de l'IL-1 β peut également être réduite en se liant au récepteur leurre IL-1R2, qui ne produit aucun signal en aval, plutôt qu'à l'IL-1R1. Il existe également des versions solubles des récepteurs de la famille de l'IL-1, comme l'IL-1R2 soluble (sIL-1R2) et le sIL-1R3. Le sIL-1R2 se lie spécifiquement à l'IL-1 β et le neutralise ; toutefois, l'affinité du sIL-1R2 pour l'IL-1 β augmente de plusieurs fois en présence du sIL-1R3. b | La sous-famille de l'IL-18 comprend l'IL-18 et l'IL-37, qui partagent le récepteur IL-1R5. L'IL-18 induit des voies de signalisation pro-inflammatoires. L'IL-18 est spécifiquement antagonisée par la protéine de liaison de l'IL-18 (IL-18BP), qui a une affinité exceptionnellement élevée pour l'IL-18. Contrairement à l'IL-18, qui se lie au corécepteur IL-1R7, l'IL-37 favorise les effets anti-inflammatoires via le corécepteur IL-1R8. c | La sous-famille IL-36 se compose de l'IL-36 α , l'IL-36 β , l'IL-36 γ et l'IL-38, qui partagent l'IL-1R6. Les cytokines IL-36 (représentées dans la figure par IL-36) favorisent les voies de signalisation pro-inflammatoires qui sont spécifiquement antagonisées par l'antagoniste du récepteur de l'IL-36 (IL-36Ra).

Paul Beeson découvre en effet qu'une protéine libérée par les leucocytes après infection peut induire de la fièvre, lorsqu'elle est injectée par voie intraveineuse à des lapins (Beeson, 1948). Les études qui ont suivi ont permis de montrer que ce facteur avait d'autres propriétés, notamment l'induction de l'extravasation sanguine ou l'activation lymphocytaire (Dinarello, 1998) (Figure 9). En 1981, Murphy identifie que ce facteur est en réalité deux facteurs, chacun présentant un pH différent (Murphy et al., 1981). Il faudra attendre 1984, pour que l'ADN du premier facteur au pH neutre (l'IL-1 β) soit identifié (Auron et al., 1984) et 1985 pour le second, au pH acide (IL-1 α) (March et al., 1985).

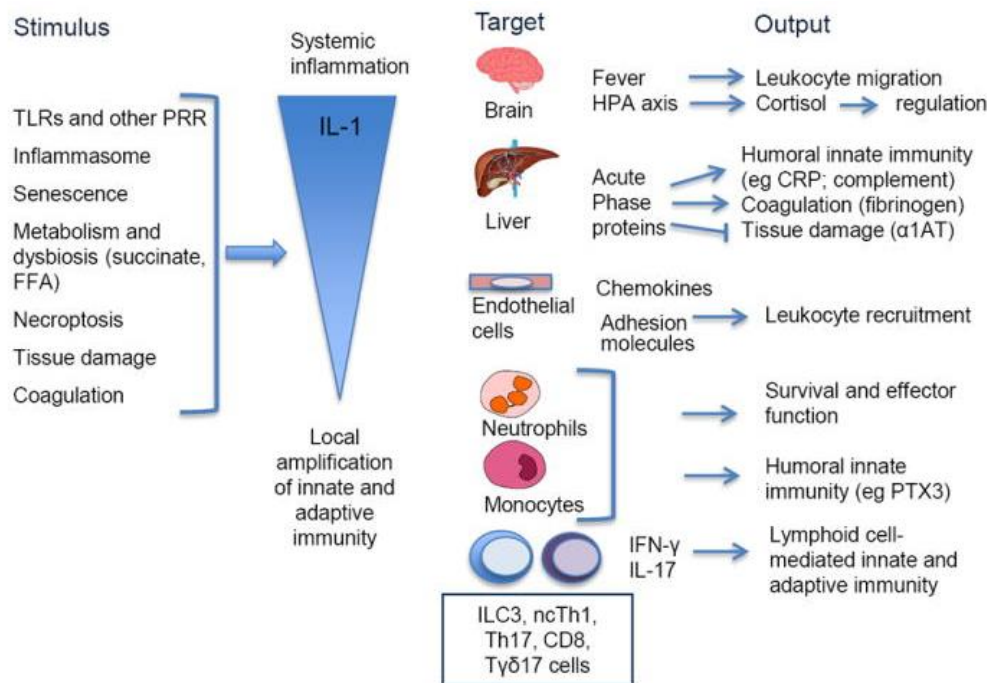


Figure 9 : Fonction de l'IL-1 d'après Garlanda, Immunity Review, 2013. La production de l'IL-1 est favorisée par l'inflammation. Elle est déclenchée par de nombreux stimuli dont les TLR, l'inflammasome ou encore la senescence. Une fois produite, celle-ci va jouer sur de nombreuses cellules aussi bien les neurones, les hépatocytes, les cellules endothéliales que sur les cellules sanguines telles les neutrophiles, les monocytes mais aussi les cellules T (telles Th17 ou CD8). L'ensemble va favoriser l'amplification de la réponse inflammatoire avec notamment l'induction de fièvre, de recrutement leucocytaire au site inflammatoire et la stimulation de la survie et la prolifération des cellules immunitaires.

Depuis, plusieurs molécules ont été décrites avec une structure similaire, ce qui a donné naissance à la grande famille de l'IL-1 (Auron et al., 1984; March et al., 1985). Cette famille dénombre actuellement 11 molécules solubles (associées à 10 récepteurs) possédant toutes une multitude d'activités biologiques aussi bien inflammatoires qu'immunologiques (Chan and Schroder, 2019). Elles ont en commun, excepté l'IL-1Ra, un domaine AXD, localisé après le site de clivage, indispensable à leur fonctionnalité (Mantovani et al., 2019). L'IL-1 α et β sont

connues pour leur rôle pro-inflammatoire se manifestant principalement au sein de l'immunité innée (Chan and Schroder, 2019; Dinarello, 2011a; Garlanda et al., 2013a).

b. L'IL-1 : une cytokine qui est en fait deux cytokines : l'IL-1 α et l'IL-1 β

L'IL-1 α , petite cytokine de 17kDa, a été décrite pour la première fois par March (March et al., 1985). Elle a pour principale fonction d'être une alarmine, ie une protéine, qui, une fois libérée dans le milieu extracellulaire par des cellules endommagées, agit sur le système immunitaire. Elle est produite dans ces conditions de dommage cellulaire (d'origine inflammatoire ou nécrotique (Chen et al., 2007; Cohen et al., 2010; Mantovani et al., 2019)) par de nombreuses cellules (Chan and Schroder, 2019; Colotta et al., 1992), sous la forme de pro-IL-1 α , précurseur de l'IL-1 α (Figure 10).

Afin d'acquérir sa forme mature, elle subit secondairement, tout comme l'IL-1 β , un clivage protéolytique. Par contre, à l'inverse de cette dernière, la pro-IL1 α (soit pré-clivage, p33) possède une activité biologique (Yazdi and Ghoreschi, 2016), mais moindre que la forme mature (Burzynski et al., 2019). Le clivage est assuré aussi bien en intra- qu'en extra-cellulaire. En intracellulaire, elle ferait principalement intervenir les calpaïnes (Kobayashi et al., 2013; Wang, 2000). En extracellulaire, les mécanismes de clivage sont moins bien connus mais feraient intervenir diverses protéases extracellulaires telles que la thrombine ou encore le granzyme B (Afonina et al., 2011; Burzynski et al., 2019).

L'IL-1 α est aussi produite par les cellules myéloïdes telles les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques lorsque ces dernières sont activées (Colotta et al., 1992; Fenton, 1992). Sa forme est principalement soluble. Néanmoins, une forme membranaire, présente sur les macrophages a aussi été décrite (Dinarello, 2009; Garlanda et al., 2013a; Mantovani et al., 2019).

La pro-IL-1 β , quant à elle, est produite par les cellules hématopoïétiques uniquement, telles les monocytes et les macrophages tissulaires (Garlanda et al., 2013a). Sa transcription, comme celle de l'IL-1 α (dans ces mêmes cellules), est induite par des marqueurs inflammatoires tels le TNF α , le PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate), les TLR activés, ou encore le récepteur IL-1R1 activé (Chan and Schroder, 2019; Yazdi and Ghoreschi, 2016). Sa maturation en forme active (Figure 10) est possible grâce à un clivage enzymatique. Celui-ci peut avoir lieu au sein de la cellule immunitaire grâce des protéines nommées caspases, ou en extracellulaire, après libération de la pro-IL-1 β dans le milieu suite à une lyse cellulaire (Sitia and Rubartelli, 2020). Le principal acteur du clivage intracellulaire est la caspase 1 qui est elle-même activée grâce à l'inflammasome canonique (Yazdi and Ghoreschi, 2016). Ce complexe protéique

intracytosolique est composé de protéines senseurs et de protéines adaptatrices, ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing the caspase activation and recruitment domain (CARD)). Les protéines senseurs ont pour rôle de détecter les signaux de danger cellulaire tels les stigmates d'infection, de dommage cellulaire ou de stress cellulaire (Chan and Schroder, 2019). Elles sont de deux types : les NOD-like receptor (NLR) tels NLRP1, NLRP3, NLRP6 ou NLRC4 et les non-NLR tels AIM2 (non-NLR protein absent in melanoma 2) et PYRIN. Chaque protéine permet de répondre à un type de signal. Lors d'un signal de danger, les protéines senseurs s'oligomérisent, s'activent ainsi, puis recrutent les protéines ASC qui à leur tour recrutent, grâce à des interactions PYD-PYD (domaine pyrine), la caspase 1. Parallèlement, la caspase 1 permet la génération de pores GSDMD via la maturation des protéines GSDMD, pores indispensables à la libération extracellulaire de l'IL-1 β .

A côté de cet inflammasome canonique, d'autres voies d'activation de l'IL-1 β existent, passant soit par des inflammasomes non canoniques (dont les caspases finales sont les caspases 4 et 5 pour l'homme, la caspase 11 pour la souris et la caspase 8 pour les 2 espèces) (Chan and Schroder, 2019), soit, comme vue plus haut, par des protéinases extracellulaires telles la protéinase 3 (Garlanda et al., 2013a). La première voie est surtout utile lors d'infection intracellulaire, par le virus de la grippe par exemple, alors que la seconde voie est utilisée lorsque la pro-IL-1 β est libérée dans le milieu extracellulaire du fait d'une lyse cellulaire. L'objectif final de cette redondance est de permettre d'induire une réponse immunologique au moindre signal de danger.

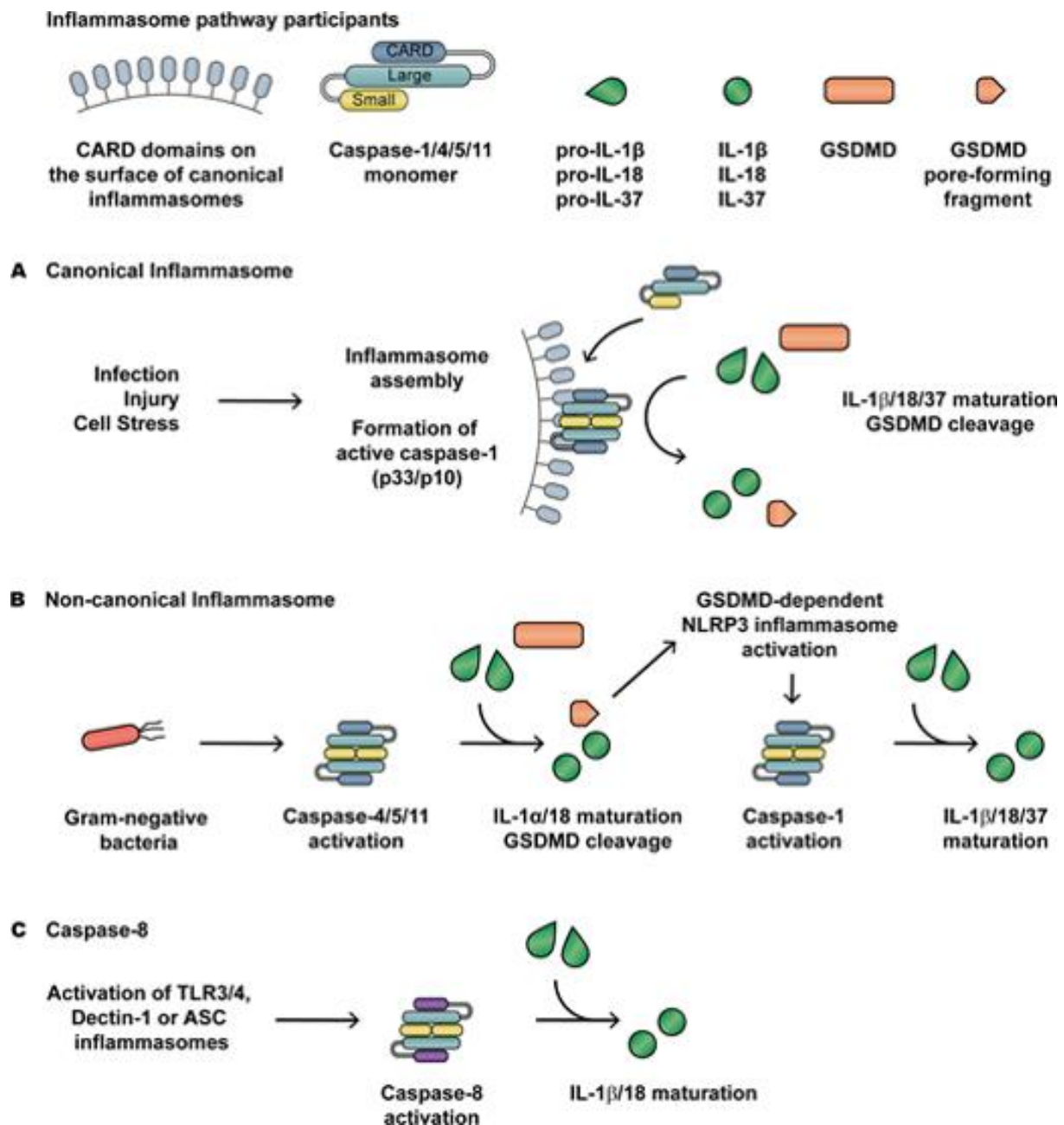


Figure 10 : Voie d'activation de l'IL-1 d'après Chan, JEM, 2019. (A) L'infection, les lésions cellulaires et les signaux de stress cellulaire déclenchent la formation d'inflammasomes canoniques, qui recrutent la caspase-1 monomère par le biais d'interactions CARD-CARD. La caspase-1 se dimérise et s'auto-clive pour générer l'espèce p33/p10 pleinement active qui clive et active l'IL-1 β , l'IL-18 et l'IL-37. La Caspase-1 traite également la GSDMD, ce qui conduit à la formation de pores de GSDMD. (B) L'inflammasome non canonique détecte le LPS bactérien cytosolique, active la caspase-4 et la caspase-5 chez l'homme et la caspase-11 chez la souris, et induit la formation de pores de GSDMD. La caspase-5 et la caspase-11 clivent directement l'IL-1 α , tandis que la caspase-4 et la caspase-11 clivent directement l'IL-18. La signalisation par l'axe GSDMD/NLRP3 induit l'activation de la caspase-1, conduisant à une transformation supplémentaire des cytokines. (C) Dans certaines conditions, la caspase-8 active peut traiter directement l'IL-1 β et l'IL-18, soit via l'inflammasome, soit indépendamment de la voie de l'inflammasome.

L'IL-1 α comme l'IL-1 β ont en commun leur fonction pléiotropique. De par leur voie de production différente, elles permettent de répondre à différents signaux de danger : l'une avec

une action plus locale, l'autre plus générale (Figure 11). Elles sont produites durant les infections et les maladies inflammatoires principalement afin de permettre l'activation des cellules de l'immunité innée mais aussi d'assurer d'autres fonctions telles l'induction de la fièvre, la production cortisolique, la stimulation hépatique et/ou hématopoïétique, l'attraction leucocytaire, l'extravasation sanguine (Figure 9) (Chan and Schroder, 2019; Ritvo and Klatzmann, 2019). L'ensemble de ces fonctions est médié grâce à l'interaction de l'IL-1 avec son ligand : le récepteur agoniste de l'IL-1 : l'IL-1R1 (Dower et al., 1985). L'utilisation du même récepteur pour 2 cytokines différentes soulève la question de l'intérêt d'une redondance moléculaire (Mantovani et al., 2019). Les analyses phylogéniques indiquent que l'IL-1 α proviendrait d'une duplication du gène de l'IL-1 β étant survenu il y a environ 200 millions d'années (Rivers-Auty et al., 2018).

L'interaction entre l'IL-1 et son récepteur est finement régulée par deux autres récepteurs de l'IL-1 : IL-1Ra, un récepteur antagoniste de l'IL-1 qui lie l'IL-1R1 prévenant ainsi sa liaison à IL-1 α / β et l'IL-1R2, un récepteur decoy à l'IL-1R1 qui lie l'IL-1 et prévient sa liaison à l'IL-1R1 (Garlanda et al., 2013a) (Figure 12).

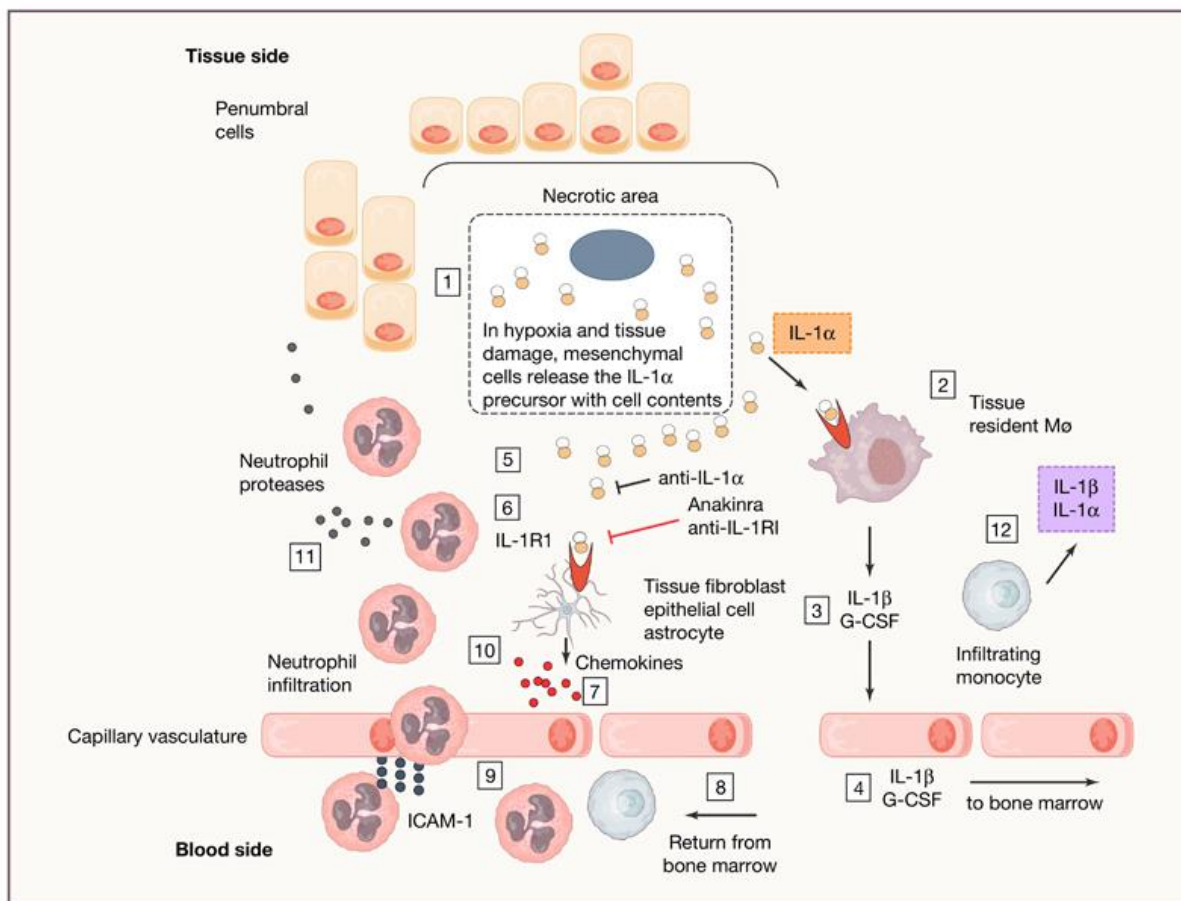


Figure 11 : Cinétique de production de l'IL-1 α / β d'après Mantovani, Immunity, 2020. L'ischémie est présentée comme une cause prototypique de lésion tissulaire. 1. Soumises à un faible taux d'oxygène et à une acidité accrue, les cellules des tissus ischémiques ou endommagés perdent leur intégrité membranaire et le précurseur de l'IL-1 α , présent de manière constitutive, quitte la cellule. 2. L'IL-1 α se lie à l'IL-1R1 sur les macrophages résidents. 3. IL-1 β est libéré via l'activation de l'inflammasome NLRP3 avec l'ATP dérivé de la cellule hypoxique. Le G-CSF est également libéré. À ce stade, l'Anakinra, l'anti-IL-1 α et l'anti-IL-1R1 réduisent l'inflammation. 4. L'IL-1 β et le G-CSF entrent dans la circulation veineuse et dans le ventricule droit. Du cœur, le sang artériel atteint la moelle osseuse et l'IL-1 β et le G-CSF induisent la libération de neutrophiles et de monocytes dans le drainage veineux. 5. Le précurseur de l'IL-1 α s'accumule dans l'espace extracellulaire du tissu ischémique. 6. L'IL-1 α se lie à l'IL-1R1 sur les fibroblastes tissulaires, les cellules épithéliales, les astrocytes dans le type de tissu respectif. Les anti-IL-1 α , l'Anakinra ou les anti-IL-1R1 réduisent le processus inflammatoire à ce stade. 7. Production de chimiokines telles que CCL1. 8. La circulation artérielle atteint le tissu ischémique avec des neutrophiles et des monocytes provenant de la moelle osseuse. 9. Les neutrophiles se lient à ICAM-1 et traversent la barrière endothéliale avec l'aide de chimiokines. 10. Les neutrophiles s'accumulent dans le tissu. 11. Dommages causés par les neutrophiles aux cellules pénumbrales. 12. En plus de l'IL-1 α , les monocytes infiltrants produisent de l'IL-1 β et le site ischémique devient dominé par l'IL-1 β , qui contribue aux étapes 6 à 11 entretenant la cascade inflammatoire.

c. Le récepteur IL-1R1

L'IL-1R1 fait partie de la superfamille des TIR (Toll-like/IL-1 receptor), récepteurs caractérisés par la présence d'un domaine extracellulaire Ig-like (Mantovani et al., 2019). Il est exprimé par

de nombreuses cellules, notamment les cellules conjonctivales telles les cellules épithéliales, les fibroblastes et les kératinocytes. Il est aussi exprimé, à un moindre degré par les cellules T (Chizzonite et al., 1989; Garlanda et al., 2013a; Tran et al., 2009; Vasilyev et al., 2015), avec une expression variable selon la population T rencontrée. En effet, son expression est décrite comme importante dans les T folliculaires, alors qu'elle est décrite comme quasi inexistante dans les Treg (Rasheed et al., 2006; Ritvo and Klatzmann, 2019; Ritvo et al., 2017a) .

De façon similaire aux Toll-like récepteurs (Figure 12), l'IL-1R1 transduit son signal après liaison à son récepteur, grâce à l'adaptateur protéique Myd88 (Yazdi and Ghoreschi, 2016). Ce récepteur, décrit pour la première fois par Dower en 1985 (Dower et al., 1985) est constitué de 3 parties : une extracellulaire se fixant à son ligand, une membranaire et une intracytosolique (Sims et al., 1988). Il nécessite par ailleurs le support d'une autre protéine membranaire afin de lier l'IL-1 : le récepteur accessoire de l'IL-1 : IL-1RAcP (Interleukin-1 receptor accessory protein) (Greenfeder et al., 1995). Cette protéine est aussi connue comme protéine constituant le récepteur complexe de l'IL-33 (Martin, 2013) (Figure 9). L'IL-1R1 se lie, comme dit précédemment aux deux isoformes de l'IL-1 : l'IL-1 α et l'IL-1 β (Dower et al., 1985). Une fois lié à l'IL-1, la voie Myd88/IRAK (Akira et al., 2006; Stylianou et al., 1992) est mise en jeu. Celle-ci active à son tour différents facteurs de transcription, tels Nuclear factor- κ B (NF κ B), activator protein-1 (AP-1), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 et les membres de la voie interferon (IFN)-regulatory factor (IRF) (Mantovani et al., 2019) permettant d'induire la transcription de nombreux gènes, notamment pro-inflammatoires, tels que celui codant pour l'IL-1 β (Akira et al., 2006). L'ensemble des gènes soumis à cette régulation n'est pas entièrement connu et semble varier selon le type cellulaire (portant le récepteur). Les gènes dont l'expression est uprégulée dans les LT ne sont par exemple pas encore connus à ce jour. Le devenir du récepteur après liaison à son ligand reste aussi à clarifier. Stylianou et al. décrivent une internalisation du récepteur (Stylianou et al., 1992) faisant suspecter un recyclage du récepteur. Cependant, ces résultats n'ont pas été retrouvés à ma connaissance par d'autres équipes et restent donc à confirmer.

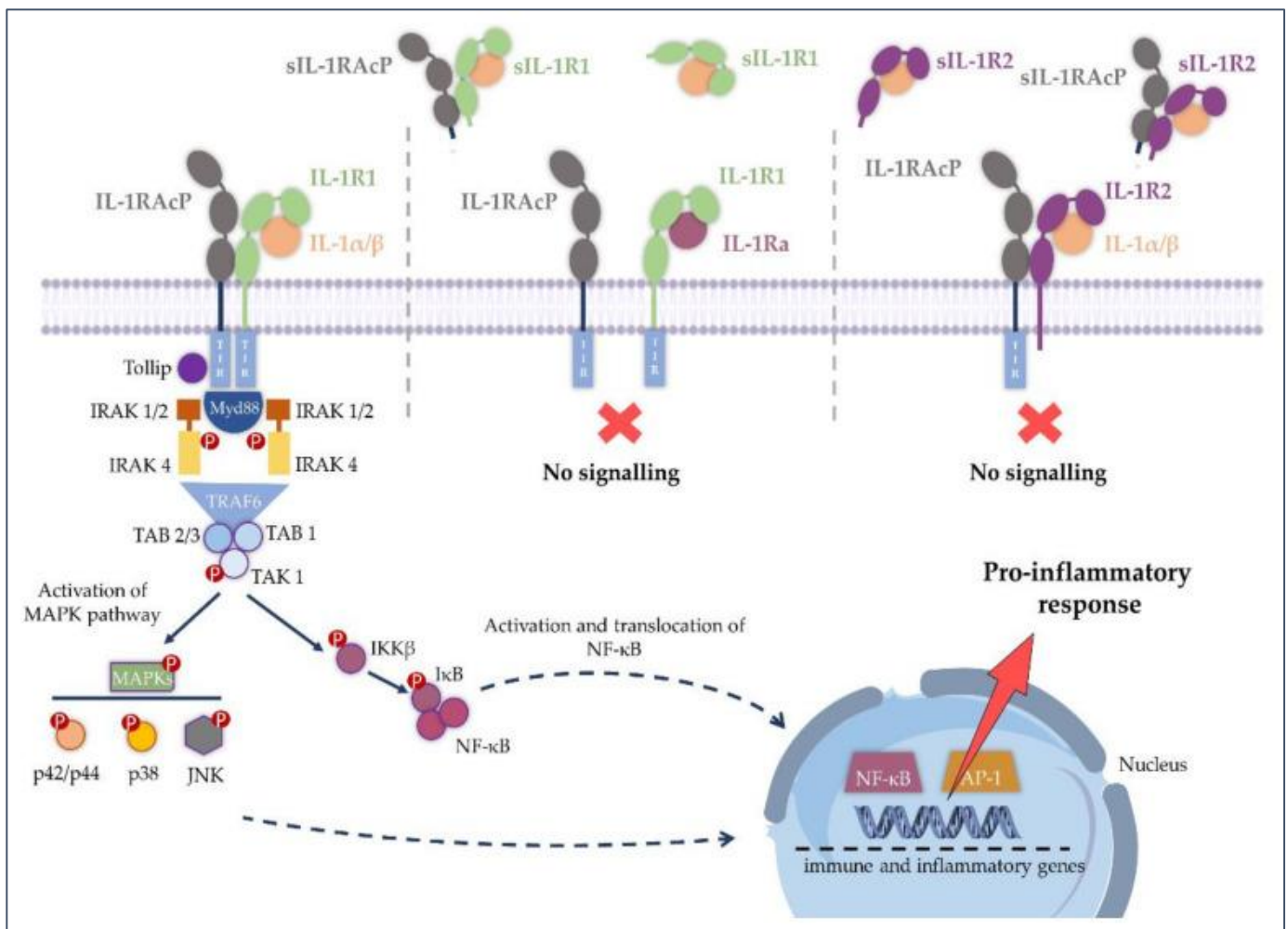


Figure 12 : Voie de signalisation de l'IL-1R1 d'après Luis, *Int J Mol Sci*, 2022. Lors de la liaison de l'IL-1 α/β au domaine extracellulaire du récepteur membranaire IL-1R1, l'IL-1RAcP est recruté et la signalisation est initiée par l'interaction des domaines TIR intracellulaires des deux chaînes polypeptidiques. Lorsque l'IL-1Ra se lie à IL-1R1, IL-1RAcP n'est pas recruté, ce qui bloque la signalisation. De même, lorsque l'IL-1 β se lie à IL-1R2, aucune signalisation ne se produit car IL-1R2 ne possède pas de domaine TIR cytoplasmique. La signalisation de l'IL-1 peut également être inhibée par des formes solubles du récepteur, sIL-1R1 et sIL-1R2, dépourvues des régions transmembranaires et intracellulaires de la forme native, liant à la fois l'IL-1 α , l'IL-1 β et le sIL-1RAcP.

d. Le récepteur IL-1R2

Le récepteur IL-1R2, récepteur decoy de l'IL-1, a été décrit pour la première fois par Bird en 1988 (Bird et al., 1988). Il est principalement exprimé par les lymphocytes B, les neutrophiles et les macrophages (Iwai and Inaba, 2012; Molgora et al., 2018). Il est aussi retrouvé à la surface de certaines cellules T régulatrices (Iwai and Inaba, 2012; Tran et al., 2009), les T folliculaires régulateurs (Nikolouli et al., 2020; Ritvo and Klatzmann, 2019), et, à un moindre degré, les Treg (Nikolouli et al., 2020). Il est enfin retrouvé, en condition pathologique, à la surface de cellules tumorales (De Simone et al., 2016). Il se présente sous la forme d'un monomère présentant un domaine membranaire et un domaine extracellulaire lui permettant de se lier à l'IL-1 α et β (avec une affinité plus forte pour IL1- β) (Re et al., 1994; Scapigliati et al., 1989). Il agit alors comme antagoniste compétitif en diminuant le taux d'IL-1 disponible dans le

milieu. Il semble aussi pouvoir se lier à l'IL-1Ra avec une affinité moindre (De Simone et al., 2016). Ce monomère semble aussi pouvoir exercer ses fonctions antagonistes par 3 autres voies. En effet, il peut se complexer à l'IL-1RAcP à la surface de la cellule et ainsi posséder un domaine intracellulaire (Figure 13) capable d'inhiber la voie de signalisation de l'IL-1R1. Il semble aussi pouvoir perdre sa partie membranaire, et être libéré dans le milieu extracellulaire. Devenu soluble, il agirait à nouveau comme antagoniste compétitif de l'IL-1R1 (Ponce et al., 2019; Re et al., 1994) de façon paracrine (Lang et al., 1998). Une forme intracellulaire est aussi décrite (Zheng et al., 2013). Elle se lierait à la pro-IL-1 α et empêcherait ainsi son clivage par la calpaïne en IL-1 α mature. Ainsi, elle permettrait d'inhiber la libération d'IL-1 α par les cellules immunitaires, telles les macrophages en condition physiologique. Une fois un stimuli pro-inflammatoire présent, le récepteur IL-1R2 serait clivé par la caspase 1 ce qui libérerait la pro-IL-1 α , la rendant ainsi sensible au clivage de la calpaïne (Zheng et al., 2013).

Les mécanismes d'action de l'IL-1R2 semblent donc multiples, l'ensemble convergeant à inhiber l'interaction IL-1-IL-1R1.

e. Le récepteur IL-1Ra

L'IL-1Ra fut décrit pour la première fois en 1985 dans le surnageant de culture de monocyte humain (Arend et al., 1985). Cette petite molécule de 25kDA est connue pour être un antagoniste de l'IL-1R1. Elle est sécrétée par les cellules épithéliales et les cellules de l'immunité innée telles les monocytes/macrophages (Arend, 1991). Une fois présente dans le milieu extracellulaire, elle se fixe au récepteur IL-1R1 et inhibe le recrutement de l'IL1RAcP. Par cette action, elle inhibe la transduction du signal intracellulaire (Garlanda et al., 2013b). Il semble qu'à côté de cette forme soluble, une forme intracellulaire existe. Elle serait sécrétée passivement lors de la mort cellulaire et limiterait ainsi la réponse pro-inflammatoire de l'IL-1 sécrétée concomitamment (Garlanda et al., 2013b). La voie de sécrétion de cette molécule n'est pas encore bien comprise. Plusieurs études montrent par contre que cette molécule est un puissant régulateur de l'action pro-inflammatoire de l'IL-1. En effet, les enfants présentant une déficience en cette protéine présentent des tableaux inflammatoires avec notamment des vascularites et des ostéomyélites (lésion inflammatoire osseuse) (Aksentijevich et al., 2009; Reddy et al., 2009). Chez certaines lignées de souris (BALB/c), cette déficience se traduit par l'apparition d'arthrite destructive et de lésions psoriasiques (lésion cutanée inflammatoire) (Horai et al., 2000; Nicklin et al., 2000) . Cette molécule permet donc, conjointement à l'IL-1R2, d'inhiber l'action de l'IL-1 (Giri et al., 1990; Symons et al., 1995).

f. Cibler l'IL-1 : une voie thérapeutique intéressante

Différentes molécules ciblant l'IL-1 ont été développées. Les principales utilisées actuellement sont :

- l'Anakinra (Kineret®), antagoniste de l'IL-1 (Thaler et al., 2009)
- le Canakinumab (Ilaris®) (Lachmann et al., 2009), anticorps humanisé inhibiteur de l'IL-1 β
- le Rilonacept (Arcalyst®) (Hoffman et al., 2008), dimère protéique associant une portion Fc d'IgG1 humaine à une partie similaire au récepteur de l'IL-1.

L'Anakinra est la première biothérapie (ie thérapeutique ciblée qui a comme principale caractéristique d'être fabriquée par un organisme vivant) ciblant l'IL-1 mise sur le marché (Thaler et al., 2009). De ce fait, elle possède le plus d'indication AMM. Sa première indication fut la polyarthrite rhumatoïde, pathologie rhumatismale auto-immune avec une efficacité, certes présente, mais moindre que celle des anti-TNF (Fleischmann et al., 2004).

Depuis, les indications d'utilisation se sont diversifiées et cette thérapie est maintenant prescrite dans les inflammations (Sibley et al., 2012), certaines pathologies auto-inflammatoires telles la maladie de Still (Vastert et al., 2019), la maladie de Behçet (Gül et al., 2012) ou encore les maladies inflammatoires telles la péricardite constrictive ou la goutte (Sutton et al., 2006). L'utilisation de cette thérapeutique dans les maladies auto-immunes reste à ce jour anecdotique. Elle n'est pas utilisée dans les cancers.

Objectifs poursuivis

Nous avons pu voir pendant cette introduction que les Tfh et Tfr ont un rôle important dans la réponse humorale tant physiologique que pathologique. De ce fait, leur ciblage dans les pathologies dysimmunes aussi bien qu'allergiques semble un piste intéressante (Laguna-Goya et al., 2019). Comme nous l'avons vu précédemment, l'ancien thésard du laboratoire, Paul Gédéon Ritvo (Ritvo et al., 2017b) a décrit la voie IL-1 comme potentiel axe régulateur de l'interaction Tfh/Tfr de par l'expression de l'IL-1R1 par les Tfr et les Tfh mais aussi de l'IL-1R2 et l'IL-1Ra par les Tfr. Le projet de ma thèse a eu pour objectifs :

1. de confirmer le rôle activateur de l'IL-1 sur les Tfh.
2. d'étudier le rôle de l'IL-1 sur les Tfr, ces cellules exprimant les trois récepteurs de l'IL-1.
3. d'étudier le rôle de l'expression de ces récepteurs par les Tfh et Tfr dans des modèles auto-immuns et allergiques.

Afin de répondre à ces différents objectifs, nous avons construits des modèles de souris présentant une déficience spécifique de ces récepteurs sur les Tfh et Tfr.

Pour ce faire, nous avons rassemblé des souris IL-1R1 floxée (IL-1R1^{lox}), IL-1R2 floxée (IL-1R2^{lox}), IL-1Ra Knock-out (KO) (IL-1Ra^{-/-}), CD4-cre (CD4^{cre}) and Foxp3-cre (Foxp3^{creYFP}) que nous avons croisées pour obtenir :

- Des souris CD4^{cre}IL-1R1^{lox}Foxp3^{GFP} avec un KO de l'IL-1R1 dans les Tfh et Tfr
- Des souris Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox} avec un KO de l'IL-1R1 dans les Tfr
- Des souris Foxp3^{creYFP}IL-1R2^{lox} avec un KO de l'IL-1R2 dans les Tfr
- Des souris Foxp3^{GFP} IL-1Ra^{-/-} avec un KO de l'IL-1Ra dans les Tfr

Afin d'étudier la réponse vaccinale, nous avons immunisé les différentes lignées de souris avec une solution d'OVA-Alum en intra-péritonéal. Nous avons ensuite suivi la production d'anticorps par mesure du taux d'anticorps anti-OVA sérique.

Afin d'étudier le rôle de nos récepteurs dans l'immunité humorale auto-réactive nous avons étudié l'impact de nos différents KO dans un modèle lupus par immunisation par solution de Pristane en intra-péritonéal : le taux d'auto-anticorps produits et de dépôts glomérulaires de complexes-immuns était ensuite mesuré.

Enfin, afin d'étudier la réponse allergique, nous avons immunisé les souris en sous-cutané avec une solution d'OVA-Alum et étudié la réponse anaphylactique par mesure de la température et

mesure des différentes molécules impliquées dans la réponse allergique après nouvelle exposition à l'allergène (l'OVA).

Résultats

Article 1 – Rôle de l'expression des récepteurs IL-1R1, IL-1R2 et IL-1Ra sur la population T folliculaire

Interleukin 1: a major player in Tfr regulation during the germinal center reaction

En cours de publication

La production d'anticorps (Ac) par les plasmocytes et la génération de cellules B mémoire à long terme sont régulées positivement par les cellules T folliculaires helper (Tfh) et négativement par les cellules T folliculaires régulatrices (Tfr) dans les centres germinaux (CG). Cependant, le rôle précis des cellules Tfr dans le contrôle de la production d'anticorps n'est toujours pas clair. Nous avons précédemment montré que les Tfh expriment le récepteur agoniste IL-1R1 alors que les Tfr expriment l'IL-1R1 à un moindre degré mais aussi l'IL-1Ra, récepteur antagoniste et l'IL-1R2, récepteur leurre de l'IL-1. Afin d'étudier le rôle de l'expression de ces récepteurs par les cellules Tfh et/ou Tfr, nous avons développé des modèles de délétion spécifique des récepteurs IL-1 dans les cellules Tfh et/ou Tfr. Ainsi, nous avons rassemblé des souris existantes IL-1R1 floxées (IL-1R1^{lox}), IL-1R2 floxées (IL-1R2^{lox}), IL-1Ra KO (IL-1Ra^{-/-}), CD4-cre (CD4^{cre}) et Foxp3-cre (Foxp3^{creYFP}) (toutes dans le fond B6). Nous les avons croisées pour obtenir :

- des souris CD4^{cre}IL-1R1^{lox} avec un IL-1R1 KO dans Tfh
- des souris Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox} avec un IL-1R1 KO en Tfr
- Foxp3^{creYFP}IL-1R2^{lox} avec un IL-1R2 KO en Tfr.

En utilisant le modèle d'immunisation à l'OVA, nous montrons que IL-1R1 est important pour l'activation des cellules Tfh mais aussi pour celle des cellules Tfr alors qu'au contraire IL-1R2 et IL-1Ra empêchent l'activation des cellules Tfr avec une modification de la production d'anticorps spécifiques. Le fait de lever l'inhibition des Tfr entraîne une modification de l'activation des cellules Tfh, Tfr, dès un stade précoce et une modification de la maturation des LB.

En utilisant le modèle de lupus induit par le pristane, nous montrons que ces récepteurs sont également impliqués à des temps plus tardifs dans l'auto-immunité. Au total, ces résultats révèlent un axe IL-1 important dans le contrôle de la balance Tfh/Tfr où les récepteurs inhibiteurs exprimés par les Tfr empêchent leur propre activation, permettant ainsi l'expansion des Tfh après immunisation.

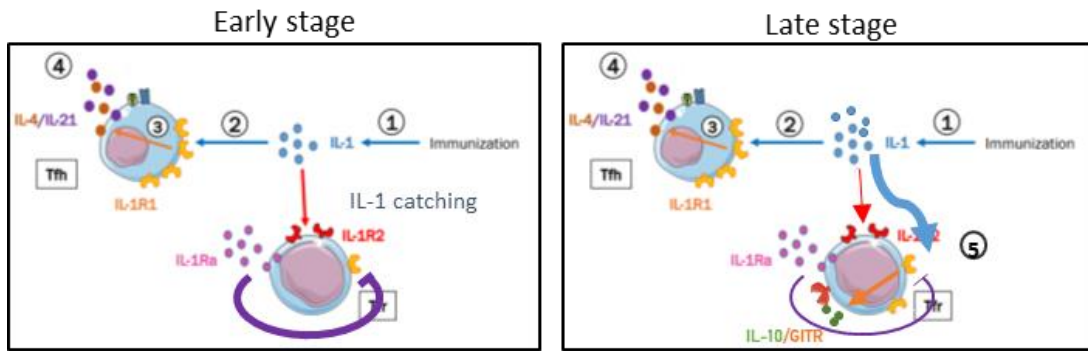


Figure 133 : Effet de l'IL-1 sur la réaction du centre germinatif à des temps précoces et tardifs A un stade précoce : 1. Après immunisation, il existe une production d'IL-1 (1). Celle-ci active les Tfh (2) qui se mettent ensuite à sécréter de l'IL-21 et IL-4 (3). Ces cytokines sont ensuite libérées dans le milieu (4). Durant ce temps, le Tfr de part sa sécrétion d'IL-1Ra qui bloque la disponibilité des récepteurs IL-1R1 et par sa production d'IL-1R2 qui capture l'IL-1 est peu activé. A un stade tardif, du fait d'une production accrue d'IL-1 l'IL-1 peut se lier au récepteur IL-1R1 sur les Tfr et ainsi induit la production de GITR et d'IL-10 par ce dernier (5).

Title: Interleukin 1: a major player in Tfr cell regulation during the germinal center reaction

One Sentence Summary: IL-1 regulates GC reaction by expression of IL-1 receptors on T follicular cells: (i) IL-1R1 is functional and important for the activation of both Tfh and Tfr cells; (ii) IL-1R2 and IL-1Ra expressions on Tfr cells serve the purpose of preventing their own activation, thus allowing the early expansion of Tfh cells after immunization.

Authors: Aude Belbezier¹, Paul Engeroff¹, Helene Vantome¹, Romain Vaineau¹, Gwladys Fourcade¹, Bruno Gouritin¹, Nicolas Tchitchek¹, Bertrand Bellier^{1,2}, Isabelle Borcheriou³, Stephanie Graff-Dubois¹, David Klatzmann^{1,2*}

Affiliations:

¹Sorbonne Université, INSERM, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (i3), F-75005, Paris, France

²AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Biotherapy (CIC-BTi) and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (i2B), F-75651, Paris, France

³AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Department of Pathology, F-75651, Paris, France

*Correspondance: david.klatzmann@sorbonne-universite.fr, +33 1 42 17 74 61

Abstract:

Antibody production by plasma cells and generation of long-term memory B-cells are positively regulated by Tfh cells and, negatively regulated by Tfr cells in germinal centers. However, the precise role of Tfr cells in controlling antibody production is still unclear. We have previously shown that Tfh cells express IL-1R1 while Tfr cells express low levels of IL-1R1 and also both the IL-1R2 decoy and the IL-1Ra antagonist. To study the role of the expression of these receptors by Tfh and/or Tfr cells, we developed models of specific deletion of IL-1 receptors in Tfh and/or Tfr cells. Using OVA immunization model, we show that IL-1R1 is important for Tfh but also for Tfr cell activation while IL-1R2 and IL-1Ra prevent the Tfr cell activation. Moreover, we show that IL-1 β expression on draining lymph node after immunization is increased. Using pristane induced lupus model, we showed that these receptors are also implicated on autoimmunity. Altogether, these results reveal an IL-1 axis in Tfh/Tfr control where inhibitory receptors expressed by Tfr cells prevent their own activation, thus allowing expansion of Tfh cells after immunization.

Graphical Abstract



Main Text:

Introduction

Activated B cells undergo mutation, selection and affinity maturation in germinal centers (GCs) which leads to antibody (Ab) production by plasma cells and the generation of long-term memory B-cells. GC formation can occur independently of T cells or in T-cell dependent fashion (1). The GC consist of the dark zone (DZ), where B cells proliferate and undergo somatic hypermutation (SHM), and the light zone (LZ) where follicular dendritic cells (FDCs) present antigen to B cells and where they can receive T-help after antigen exposure (1). GCs are positively regulated by T follicular helper cells (Tfh) and, negatively regulated by T follicular regulatory cells (Tfr) (2–3). Tfh cell derived CD40L expression, IL-4 and IL-21 play essential roles in GC B cell proliferation, survival and affinity maturation (2).

The origin and mode of action of Tfr cells are more controversial. They are thought to derive from regulatory T cells (Tregs) and to act by regulating the help Tfh cell give to B-cells (4–7). Our recent discovery that, in contrast to Tregs, all GC Tfr cells do not express IL-2Ra (CD25) led us to reanalyze the transcriptome of stringently characterized GC Tfr (8). The transcriptome studies showed that Tfh cells express the IL-1R1 agonist receptor while Tfr cells express IL-1R1 but also high levels of the IL-1R2 decoy receptor and IL-1Ra, the IL-1 receptor antagonist (8). Before our recent findings, IL-1 α and β , the two first discovered members of IL-1 family were mainly known as potent proinflammatory cytokines in innate immunity (9–11). IL-1 α is predominantly produced by pyroptotic cells and cells undergoing specific inflammasome-independent forms of cell death (12) while IL-1 β is produced by hematopoietic cells such as blood monocytes and tissue macrophages in inflammatory conditions (11). These two forms have common pleiotropic function such as trigger fever, hematopoiesis or leukocyte attraction (9, 13). All functions triggered by IL-1 α and β are

mediated through the agonist IL-1 receptor IL-1R1 (14). This interaction is tightly regulated by two different IL-1 receptors : (i) IL-1Ra, an IL-1 receptor antagonist that binds specifically to IL-1R1 and prevent its binding to IL-1 α/β binding, and (ii) IL-1R2, an IL-1 receptor decoy that binds IL-1 and prevents its binding to IL-1R1 (11). Our recent results showing the importance of IL-1 receptor expression in follicular T cells suggest the existence of an IL-1 axis regulating the GC responses. We proposed a model in which IL-1 activates Tfh cells, a process that could be competed for by Tfr through their antagonist receptors. The downstream mechanisms by which IL-1 controls the GC remain to be studied in further detail.

To determine the contribution of the IL-1 axis in the Tfh and Tfr cell regulation of the GC responses, Tfh and Tfr cell-deleter mouse models were developed to delete IL-1 receptors in Tfh and/or Tfr cells.

In this work, we identified that IL-1R1 is important for Tfh cell but also for Tfr cell activation, whereas IL-1Ra and IL-1R2 on Tfr cell inhibit their own activation. We were also able to show that IL-1 levels peak at day 9 post immunization in the GC. All these data suggest a major role for IL-1 β in activating either Tfh or Tfr cells to regulate the germinal center response

Result

IL-1 seems to be important for Tfh cell but also for Tfr cell activation

In order to study the role of IL-1R1 expression by Tfh cells, we have created a mouse model of IL-1R1 deletion in Tfh cells. To achieve this, we have crossed CD4^{cre} mice with IL-1R1^{lox} mice (see materials and methods), Tfh cells being known as the main CD4 cells expressing this receptor (8, 13, 15).

After verification of the viability of the model (Fig. S1A), we first studied the impact of the Knock-out (KO) on the humoral immune phenotype of these mice before any immunization by measuring the serum IgG Ab level and analyzing the distribution of immune cells within the secondary lymphoid organs (SLO). IL-1R1 deficiency among CD4 cells induced a drastic decrease in serum IgG Ab levels (Fig. 1A). However, there was no change in the distribution of T and B cells within the SLOs.

We then investigated the humoral response after immunization with a non-self antigen, OVA. Twenty-eight days after injection of OVA-Alum, mice were sacrificed and spleens analyzed. As described previously (8), CD19⁺CD4⁻ B cells, being known to be CXCR5⁺PD1⁻, were used to select the appropriate gate to define CD4⁺CXCR5^{hi}PD-1^{hi} follicular T (Tfol) cells. Foxp3

staining was then used to identify the subsets of Foxp3⁺ Tfr cells and Foxp3⁻ Tfh cells within Tfol cells.

After immunization, a markedly decreased production of Germinal Center B (GCB) (gated as CD19⁺GL7⁺Bcl6⁺IgD⁻) cells (Fig. 1B) accompanied by a corresponding significant decrease of anti-OVA Ab production was found (Fig. 1C). The ratio of OVA- specific Ab to total Ab (Fig. 1D) was not affected, indicating a concomitant decrease of the specific and global humoral response. IL-1R1 deletion on CD4 cells also induced a significant decrease of the proportion of Tfh cells. The proportion of Tfr cells was slightly but non-significantly decreased with a greatly increased Tfr/Tfh ratio suggesting of a greater impact of IL-1R1 on Tfh cells than on Tfr cells (Fig. 1B).

To explore more precisely the role of IL-1R1 on Tfh cell activation and the impact of this deletion on Tfr cells, we then performed quantitative and qualitative analysis by spectral cytometry of Tfh and Tfr cell populations from draining LN of CD4^{cre}IL-1R1^{lox} and control (Foxp3^{GFP}) mice previously subcutaneously immunized with OVA-Alum. In order to differentiate Tfr from Tfh cells we crossed CD4^{cre}IL-1R1^{lox} mice with mice expressing the green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene for the expression of Foxp3 (Foxp3^{GFP}CD4^{cre}IL-1R1^{lox}). According to the literature reporting that Tfh cell expansion begins 3 days after immunization and reaches a peak after 6-7 days (16, 17), we focused our analysis on day-3 (D3), -6 (D6) post-immunization. After immunization, Tfh cells from Foxp3^{GFP}CD4^{cre}IL-1R1^{lox} mice showed a less active profile with a marked decrease in CD69 and CD44 expression at D3 and ICOS, OX40, PD1, CD44 and CD40L at D6. Simultaneously, we found a decreased activation profile of Tfr at these same time points with a decrease in expression at D3 of ICOS, Foxp3, GITR, CD25 as well as CD103, CTLA4 at D6 (Fig. 1E). All these results plead in favor of a role of IL-1 in the activation of both Tfh and Tfr cells. To confirm this hypothesis, we studied the activation profile of Tfr cells from these mice by in vitro assay measuring the level of GITR expression, a cell surface marker of T cell activation (18, 19), and the level of IL-10 produced by Tfr cells cultured or not with IL-1 β .

Tfr cells were sorted 8 days after immunization and cultured with CD3/CD28 beads and with or without IL-1 β (1 μ g/10⁴ cells) (Fig. 1F). The presence of IL-1 β induced a significant increase of Tfr cell-derived IL-10 production and GITR transmembrane expression (Fig. 1F). Conversely, there was no change in the rate of IL-10 production or transmembrane expression of GITR when IL-1 β was added to the culture of Tfr cells from Foxp3^{GFP}CD4^{cre}IL-1R1^{lox} mice. All these results are in favor of a functional role of the IL-1R1 on Tfr cells. In order to confirm this hypothesis but also to evaluate its impact on the global humoral response, we then constructed a mouse model of IL-1R1 specific deletion on Tfr cells.

To obtain a specific IL-1 deletion model on Tfr cells without affecting Tfh cells, we crossed $Foxp3^{creYFP}$ mice with $IL-1R1^{lox}$ mice. $Foxp3^{creYFP}$ mice express yellow fluorescent protein (YFP) as a reporter gene for $Foxp3$. We thus obtained $Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox}$ mice, showing a deficit of IL-1R1 expression on Tfr cells and not on Tfh cells (Fig. S1B). First, similarly to the $CD4^{cre}IL-1R1^{lox}$ mouse model, we wanted to measure the impact of the deletion on the pre- and post-immunization humoral response. Unexpectedly, $Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox}$ mice had a significantly lower level of circulating IgG Ab than control mice. However, the cellular distribution within the SLOs was similar to that of control mice (Fig. 2A). After immunization, Tfh, Tfr and GCB cell proportions were comparable to that of control mice (Fig. 2B). However, the Tfr/Tfh ratio was decreased, suggesting a quantitative defect in Tfr cell subset after a specific deletion of the IL-1 signaling on these cells. The production of specific anti-OVA Ab was significantly affected by the KO (Fig. 2C) with a strongly reduced ratio of specific to total Ab in $Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox}$ mice compared to controls (Fig. 2D).

Together, these results indicate an IL-1 β -dependent activation of Tfr cells.

IL-1R2 expression by Tfr cells and IL-1Ra are important to control humoral immunity

Having previously observed a functional role for the IL-1R1 receptor on Tfr cells, we decided to next investigate the role of IL-1R2, a decoy receptor as well as IL-1Ra, an antagonist receptor of IL-1 by Tfr cells. For this purpose, we developed a mouse model of specific IL-1R2 deletion on Tfr cells by crossing $Foxp3^{creYFP}$ mice with $IL-1R2^{lox}$ mice. $IL-1Ra^{-/-}$ mice were used to study the role of IL-1Ra expression by Tfr cells. As shown in Fig. 3A and Fig. 3C, there was no major impact of Tfr cell-restricted IL-1R2 deletion as well as IL-1Ra deletion on the basal production of Ab. $Foxp3^{creYFP}IL-1R2^{lox}$ mice, on the other hand, showed a significant decrease in the proportion of transitional B cells among B cells at the steady state with a small (<1%) but significant increase in the proportion of GCBs and plasmablasts.

28 days post immunization, we observed a significant decrease in anti-OVA Ab production in both KO models whereas the proportion of GCBs was not significantly altered by either KO (Fig. 3B and 3D). Regarding the distribution of CD4 T cells after immunization, there was a significant increase in the Tfr/Tfh ratio in $Foxp3^{creYFP}IL-1R2^{lox}$ mice, suggesting a role for IL-1R2 in controlling Tfr cell expansion. However, the Tfr/Tfh ratio was not affected by the IL-1Ra defect.

Since we evidenced differences regarding the level of anti-OVA Ab production while the number of GCBs remains equivalent, we wanted to investigate the impact of these two KOs on the early humoral response. We also investigate the differentiation of B cells as early as D3 and as late as D9 post-immunization using spectral cytometry. Thus, $Foxp3^{creYFP}IL-1R2^{lox}$,

Foxp3^{GFP}IL-1Ra^{-/-} and control mice (Foxp3^{creYFP} and Foxp3^{GFP} respectively) were immunized subcutaneously with an OVA-Alum solution and then sacrificed at D3, D6 or D9 post-immunization and the draining lymph nodes (LN) were analyzed. We observed a modification of the distribution of B cells according to the time post immunization in both mouse models. IL-1R2-depleted Tfr cell mice (Fig. 3E) and IL-1Ra depleted mice (Fig. 3F) showed a less clear cluster distribution than their respective control suggesting a probable alteration of the B cell maturation possibly affecting the humoral response induction between D0 and D9. Our data show that IL-1R2 and IL-1Ra expressed by Tfr cells affect the humoral response at a very early post-immunization stage.

IL-1 receptors expressed by Tfr cells affect their own activation

According to previous observations, we hypothesized that IL-1R1 expressed by Tfr cells is present to enable Tfr cell activation (Fig.2), whereas inhibitory receptors prevent Tfr activation at early stages post immunization (Fig.3). To investigate this hypothesis, we performed a quantitative and qualitative spectral cytometry analysis of Tfr cell populations from LN of OVA-immunized mice including Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox}, Foxp3^{creYFP}IL-1R2^{lox} or Foxp3^{GFP}IL-1Ra^{-/-} and compared Tfr cell phenotype with their corresponding controls: Foxp3^{creYFP} for Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox} and for Foxp3^{creYFP}IL-1R2^{lox}; Foxp3^{GFP} for Foxp3^{GFP}IL-1Ra^{-/-}. To define the best time point at which to perform this analysis, we previously studied IL-1 β production within germinal centers. Thus, we immunized Foxp3^{GFP} mice subcutaneously with OVA-Alum, and the draining LN was analyzed at D0, D3, D6, D9, D12 or D15 post-immunization. Surprisingly, there was a basal expression of IL-1 β in the LN. This expression increased significantly after immunization to peak at D9 (Fig. S2). Based on these findings and on the fact that Tfr cell activation and proliferation is known to occur around D7 post-immunization (4, 6), we decided to analyze the activation status of Tfr cells at D9. In parallel, we studied the activation status of Tfh cells as previously described. Upon deletion of IL-1R1 on Tfr cells, the latter appeared less activated at the steady state (D0) with a lower expression of Foxp3, ICOS and CTLA4 (Fig. 4A). This difference tended to disappear at D9. Conversely, in both Foxp3^{creYFP}IL-1R2^{lox} and Foxp3^{GFP}IL-1Ra^{-/-} mice, Tfr cells were more activated at the steady state showing a higher expression of Foxp3, ICOS (Fig. 4B, C). This difference tended to disappear at D9 post-immunization. The expression of IL-1 receptors also influenced the proliferation of Tfr cells, with an increase of the Tfr/Tfh ratio at the steady state when IL-1 inhibitory receptors were depleted (Fig. 4B, C) and, conversely, a decrease of the latter when IL-1R1 was depleted within Tfr cells (Fig. 4A). These results support the idea that IL-1R1 expressed by Tfr cells is present to enable Tfr cell activation, whereas the expression of inhibitory receptor by Tfr cells prevents its own activation.

When the impact of these deficits on the activation status of Tfh cells was studied, a less activated profile was found in Tfh cells from mice with a deletion of IL-1 inhibitory receptors at D9 (Fig.4B and 4C). A comparable activation profile of Tfh cells was found when IL-1R1 was deleted within Tfr cells (Fig. 4A). Surprisingly, Tfh cells from $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}\text{IL-1R1}^{\text{lox}}$ mice showed a less activated status in the steady state than Tfh cells from control mice.

Because IL-1Ra and IL-1R2 are not exclusively produced by Tfr cell, we wanted to confirm our hypothesis by measuring the impact of these two molecules on Tfr cells by in vitro assays. To do so, we recovered Tfr cells from $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}\text{IL-1R2}^{\text{lox}}$, from $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}\text{IL-1Ra}^{-/-}$ and from their relative control mice ($\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}$ and $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}$ respectively). Isolated Tfr cells were cultured in presence or not of IL-1 β as previously described (see above). Compared with control Tfr cells, Tfr cells derived from $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}\text{IL-1R2}^{\text{lox}}$ mice or $\text{IL-1Ra}^{-/-}$ mice showed increased expression of GITR (Fig. 5A, B). Upon addition of IL-1 β , this difference was amplified. IL-1Ra-deleted Tfr cells produced more IL-10 than control Tfr cells (Fig. 5B). Taken together, these results support a role for IL-1 inhibitor receptors expressed by Tfr cells to prevent their own activation. When IL-1R1 expression was quantified by real time (RT) PCR, IL-1R1 expression was found to be increased when IL-1R2 was deleted (Fig. 5A). No difference was found with IL-1Ra deletion (Fig. 5B). Taken together, these results support an IL-1-dependent activation of Tfr cells that can be suppressed by IL-1Ra and IL-1R2.

Influence of IL-1 on antibody-mediated diseases

We next wanted to investigate the role of IL-1 receptor expression by Tfr cells in the development of autoimmunity. To do so, we tested different KO mice in pristane-induced lupus, a B-cell mediated disease. Mice were injected at D0 with pristane and anti-RNP antibody levels were measured monthly. The mice were sacrificed 6 months after disease induction and their kidneys were recovered and immunostained with FITC-conjugated anti-C3 and AF647-conjugated anti-mouse IgG for immune complex deposits. Mice with a relative anti-RNP autoAb level >500 were considered to have positive anti-RNP titer. $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}\text{IL-1R1}^{\text{lox}}$ mice (blue) had a similar level of anti-RNP antibodies as the control mice (grey) (Fig. 6A) and the deposition of immune complex appeared similar between the 2 groups (Fig 6A).

Conversely, $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}\text{IL-1R2}^{\text{lox}}$ (red) and $\text{IL-1Ra}^{-/-}$ (purple) mice had a strongly decreased level of autoAb compared with control mice ($\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}$ and $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}$, respectively). The number of mice with a positive titer was also significantly greater (Fig. 6B, C). The same trend was found in the analysis of renal immune complex deposition with a decrease in the number of affected glomeruli in $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}\text{IL-1R2}^{\text{lox}}$ (red) and $\text{IL-1Ra}^{-/-}$ (purple) mice (Fig. 6B, C).

Taken together, these results support a role for the IL-1 axis in the activation of Tfr cells under physiological but also pathological conditions.

Discussion

Here, we show that IL-1 activates both Tfh and Tfr cells and is thus a major regulator of the germinal center B cell and antibody responses.

We have previously shown that Tfh cells express the IL-1R1 while Tfr cells express low levels of IL-1R1 and also both the IL-1R2 and the IL-1Ra (8). Other teams have found similar results (8, 19–21). Indeed, Rasheed et al. (15) found a high expression of IL-1R1 in Tfh cells, Hippen et al. (21) in Tfr cells. The presence of IL-1R2 was also found to be increased in Tfr cells compared to other T cells (20, 22). To our knowledge, the expression of IL-1Ra in Tfr cells has so far only been described by our team.

Additionally, we have shown that IL-1 β activates Tfh cells in vitro and promotes their clonal expansion in vivo (8). We demonstrate here that mice with CD4 T cells specifically depleted in IL-1R1 (CD4^{cre}IL-1R1^{lox}) present: (i) a lower Ab level than WT mice at baseline; (ii) a lower specific Ab response after immunization; (iii) a lower proportion of Tfh cells among CD4 after prime boost immunization; and (iv) a lower Tfh cell activation profile. Those results were in line with our previous studies in that IL-1 signaling in Tfh cells is a key regulator of the B cell response.

We have previously speculated that Tfr cell expression of IL-1R2 and IL-1Ra could inhibit the IL-1 dependent activation of Tfh cells. Surprisingly this study show that IL-1 activates Tfr cells themselves, via their own expression of IL-1R1. Indeed, we demonstrate: (i) a lower basal activation profile of IL-1R1-deleted Tfr cell in the Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox} model as well as in the CD4^{cre}IL-1R1^{lox} model ex vivo; (ii) in vitro IL-1 addition induces a transient activation of Tfr cells which disappear when Tfr cells are depleted in IL-1R1. The fact that deletion of IL-1R1 in Tfr cells does not lead to enhanced antibody responses in our OVA immunization model suggests that IL-1R2 likely blocks the activation of the IL-1R1 pathway in Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox}.

Additionally, IL-1Ra and IL-1R2 receptors could act differently depending on the location of the Tfr: Tfr cells outside GC could regulate total IgG levels while inside GC, IL-1R2 and IL-1Ra prevent this effect. Several articles describe that indeed the activation of Tfr cells and their regulatory properties vary according to their spatial position within the SLO (23).

To further investigate the role of IL-1R2 and IL-1Ra in Tfr cells, we generated a new mouse strain Foxp3^{creYFP}IL-1R2^{lox} to study the role of IL-1R2 in the suppressive function of Tfr. The

IL-1R2 receptor is mainly expressed by B cells (24), neutrophils and macrophages (25). It was also described in some Treg cells (20, 26), however, in small amounts and in a lower proportion than in Tfr cells (8, 20). After verification of a specific decrease of IL-1R2 in the Tfr but not Treg or Breg cell compartment from Foxp3^{creYFP}IL-1R2^{lox} mice (Fig. S1C, D), we studied the impact of this deficiency on the humoral response.

We found that after immunization, there was a maturation defect of the humoral response showed by altered repartition of B cell subsets after immunization compared to control mice. Similar results were obtained in immunized IL-1Ra^{-/-} mice suggesting a role for IL-1Ra in the germinal center. Tfr cells are thought to regulate the B humoral response mainly through the regulation of Tfh cells (6, 27, 28). A defect or, conversely, an overactivation of Tfr cells can thus affect the maturation of B cells. The presence of more activated Tfr cells in SLOs at the steady state but also after immunization reinforces the hypothesis that IL-1R2 and IL-1Ra are expressed by Tfr cells to limit their own activation and their ability to suppress B cell responses. Nakae et al. (29) had previously described that IL-1Ra^{-/-} mice immunized subcutaneously with T dependent antigen associated with LPS showed a greater Ab response than control mice. The difference observed between their results and ours attests to the difficulty of exploring the role of such a versatile molecule in the humoral response. The effect of IL-1Ra observed can be explained by the effect on T cells but also on B cells or dendritic cells. The difference in the immunization protocol between the two experiments could explain the observed differences. This could be dependent on the type of cell that is activated by an excess of IL-1. We used Alum as adjuvant, the latter being known to induce IL-1 β production by the NALP3 inflammasome but also to induce a pro-Tfh cell immune response, and pro-Th2 (30–32). The team of Nakae et al. used LPS, a TLR2- and TLR4-specific adjuvant that is known to (i) induce IL-1 α release from macrophages (33), (ii) stimulate B cells (34) and dendritic cell activation (35), (iii) induce a Th1 (30) immune response. Similarly, we chose to perform an intraperitoneal immunization, while Nakae's team chose the subcutaneous route, a route known to induce a strong post-vaccination response via activation of dendritic cells (36, 37). These differences lead us to think that their results could be explained by the role of IL-1Ra on innate immunity. The comparison between different adjuvants could be studied and compared to confirm this hypothesis. We have already made the observation that subcutaneous and intraperitoneal injections have very different effects in these mice. The better way to understand IL-1Ra implication on Tfh and Tfr cell activation will be to transfer Tfr cells from IL-1Ra^{-/-} mice to nude mice and compare their response to vaccine with that of nude mice that received a transfer of Tfr cells from wild type mice. However, as the number of Tfr cells produced after immunization is limited, this would imply

the sacrifice of a large number of mice, which is not in line with current ethical approaches. Another approach would be to generate $\text{Foxp3}^{\text{cre}}\text{IL-1Ra}^{\text{lox}}$ mice to specifically delete IL-1Ra on Tfr cells.

Since it was difficult to perform this type of experiment, we decided to study the impact of IL-1Ra- and IL-1R2- deleted mice by in vitro assay. In these assays, Tfr cells from immunized mice lacking IL-1R2 or IL-1Ra on Tfr cells have an increased activation status expression in the absence of any in vitro stimulation. Furthermore, in vitro stimulation of IL-1R2 or IL-1Ra deficient Tfr cells with IL-1 led to an increase of this difference. This indicates that the IL-1R1 is functional on Tfr cells and confirmed the inhibitory action of IL-1Ra and IL-1R2 on Tfr cells.

We investigated how deletion of IL-1R2/IL-1Ra regulates IL-1R1 expression on Tfr cells and found a higher expression of IL-1R1 on IL-1R2 deleted Tfr cell but not on IL-1Ra deleted Tfr cells (Fig. 5). The difference in IL-1R1 expression between the two strains could be explained by the different inhibition mechanisms exerted by the two receptors: IL-1Ra is known to inhibit IL-1/IL-1R1 interaction by binding to the IL-1R1 receptor (38), whereas IL-1R2 acts by capturing the IL-1 available in the environment (39, 40). Based on this difference, we could hypothesize that IL-1Ra deletion does not modify IL-1R1 expression but free IL-1R1 receptor availability. Conversely, increased availability of IL-1 (due to the absence of IL-1R2) could enhance the production of IL-1R1 by the cell through ligand-induced positive feedback regulation, a common mechanism (41). Altogether, these results support the hypothesis that IL-1 inhibitor receptors expressed by Tfr cells prevent their own activation by IL-1.

To understand how IL-1 influences antibody-mediated diseases, we have finally studied the role of different KO in a pristane induced lupus model. We found a decrease of the autoantibody response in $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}\text{IL-1R2}^{\text{lox}}$ and $\text{IL-1Ra}^{-/-}$ mice, comparable to that observed during immunization with OVA. The autoantibody response was not modified by the deletion of IL-1R1 on Tfr cells. This may be due to a lack of power in this experiment because of the small number of mice included. Another explanation would be that in the absence of IL-1, Tfr cells could be compensated by another signaling pathway.

Our results support that the level of IL-1 β increases progressively after immunization to first activate Tfh cells which express high levels of IL-1R1. In a second step only, Tfr cells expressing lower levels of IL-1R1 are activated. The expression of the inhibitory receptors IL-1R2 and IL-1Ra by Tfr cells prevents their early activation by IL-1. In the pathological context, like lupus, IL-1R2 and IL-1Ra still seem to be deleterious to the development of dysimmune disease and thus inhibit Tfr cell activation. The study of the deletion of IL-1 receptors in other pathological models such as allergy would be interesting.

Even though the different contexts in which IL-1 is more or less important for B cell responses need to be studied in further detail, the findings by us and other groups could have a significant impact on the design of novel immunotherapeutic strategies. Interestingly, it was recently shown that COVID-19 mRNA vaccines trigger an IL-1 response (42). Historically, many immunotherapeutic approaches tried to block the IL-1 pathway to suppress inflammation. However, there might be a paradigm shift towards discovering the use of IL-1 as an adjuvant for vaccination strategies to regulate B cell responses. For example, IL-1 targeted to Tfh cells could be used to boost B cell and antibody responses, whereas IL-1 targeting to Tfr cells could be used to suppress B cell responses.

This could be useful in autoimmune pathologies, where it is necessary to inhibit the auto-reactive humoral response.

However, even if one could target IL-1 pathway to Tfr cells, it might be necessary to specifically inhibit or down-regulate the IL-1R2 receptor on the surface of Tfr. Hence, a lot more research is required before this becomes a viable strategy.

The mechanisms at work for its regulation remain to be refined in physiological and pathological conditions. These questions should be addressed by analyzing cell activation/function at high resolution through transcriptomic analysis in our different IL-1 receptor-deficient mouse lines in physiological or pathological models. Together, our results indicate a fine regulation of IL-1 β within the germinal center: IL-1 would activate Tfh cells even at lower concentrations. It would only activate Tfr cells at higher concentrations, i.e. at later times after immunization, as Tfr cell expressing IL-1R2 and IL-1Ra would prevent its own activation.

Material and methods

Study design

For flow cytometry assays, the sample sizes were of at least three individuals per experiment. For enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), sample sizes were of at least three per condition. Sample size was determined on the basis of experimental feasibility and for statistical significance. The experiments were not randomized. The investigators were not blinded to the allocation during experiments and analyses.

Mice

B6.129S-IL1rntm1Dih/J (JAX stock #004754), B6.Cg-Tg(Cd4-cre)1Cwi/Bflu/J (JAX stock #022071), B6.129(Cg)-Il1r1tm1.1Rbl/J (JAX stock #028398), B6.129(Cg)-Foxp3tm4(YFP/cre)Ayr/J (JAX stock #016959) mice were provided by the Jackson

Laboratory. C57BL/6N-Atm1Brd11r2tm1a(EUCOMM)Wtsi/WtsiPh (MGI:4842437) were provided by Sanger Institute. Confirmed genotyping was performed in accordance with the supplier recommendations. All transgenic mice were in a C57BL/6J background.

C57BL/6 Foxp3-GFP mice expressing GFP under the control of the promoter of Foxp3 gene were provided by B. Malissen of the Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (France).

To generate CD4^{cre}IL-1R1^{lox} mice, Il1r1tm1.1Rbl/J mice were mated with B6.Cg-Tg(Cd4-cre)1Cwi/Bflu/J mice. To generate FoxP3^{creYFP}IL-1R1^{lox} mice Il1r1tm1.1Rbl/J mice were mated with B6.129(Cg)-Foxp3^{tm4(YFP/cre)Ayr}/J mice. To generate Foxp3^{GFP}CD4^{cre}IL-1R1^{lox} mice, allowing to distinguish Tfh and Tfr cells, CD4^{cre}IL-1R1^{lox} mice were crossed with Foxp3^{GFP} mice.

To generate Foxp3^{GFP}IL-1Ra^{-/-} mice, B6.129S-IL1rntm1Dih/J mice were crossed with Foxp3^{GFP} mice.

To generate FoxP3^{creYFP}IL-1R2^{lox} mice, C57BL/6N-A^{tm1Brd1}11r2^{tm1a(EUCOMM)Wtsi/Wtsi} mice were mated with B6.129(Cg)-Foxp3^{tm4(YFP/cre)Ayr}/J mice.

Male and female C57BL/6 were provided by the Jackson Laboratory. All animals were maintained at the University Pierre and Marie Curie (UPMC) Centre d'Expérimentation Fonctionnelle animal facility (Paris, France) under specific pathogen-free conditions in agreement with current European legislation on animal care, housing, and scientific experimentation (agreement number A751315). All procedures were approved by the local animal ethics committee. Probes and primer sequences are available as supplemental data.

Immunization models

OVA Immunization models

Mice were either immunized with intraperitoneal injection three times (D0, D2, D4) and sacrificed at D8 for Tfr /Tfh cell transcriptomic and in vitro studies or immunized twice (D0 and D14). Intraperitoneal injection was performed with 100 ug of OVA (OVA A5503, Sigma-Aldrich) mixed with 500 µg of aluminum hydroxide (Alum) gel (AlH303, Sigma).

Mice were also immunized with OVA-Alum subcutaneously (s.c), in the flank one time and sacrificed at D0, D3, D6, D9 for deep immunophenotyping of follicular cells from inguinal draining lymph.

Pristane Immunization model

Lupus was induced by intraperitoneal injection with 100 µg of Pristane at D0. Mice were euthanized at M6 for the quantification of ICD in the kidney.

Cell sorting

Splenocytes from immunized mice were stained with Ter-119–biotin, CD8–biotin, CC11c–biotin and B220–biotin antibodies for 20 min at 4°C and labeled with anti-biotin magnetic beads (Miltenyi Biotec) for 15 min at 4°C. B cells and erythrocytes were depleted on an autoMACS separator (Miltenyi Biotec), following the manufacturer’s procedure. Enriched T cells were stained as described in the “Flow cytometry analysis of human cells” section, and the following subsets were sorted on BD FACSAria II (BD Biosciences), with a purity of >98%: CD4⁺CD8⁻CXCR5^{hi}PD1^{hi}Foxp3⁻ Tfh cells, CD4⁺CD8⁻CXCR5^{hi}PD1^{hi}Foxp3⁺ Tfr cells.

Inguinal lymph node were comminuted mechanically and filtered through a cell strainer (35 µm, StemCell). The diluent was stored at -80°C to perform IL-1β ELISA. The cell suspension was transferred into a 5 mL tube (Falcon) containing PBS, washed twice with PBS medium and stained.

Analysis of lupus kidney involvement and research of immune complex deposition

One kidney/mouse was embedded in OCT Tissue-Tek compound (CellPath), snap-frozen, and stored at -80°C until use. Kidney were frozen with optimal cutting temperature (OCT) compound, cut into 7 µm sections and fixed with acetone. Sections will then be stained with FITC-conjugated anti-C3 and Alexa Fluor 647-conjugated anti-mouse IgG (Abcam, Cambridge, UK) antibodies. DNA was visualized using DAPI (Sigma-Aldrich). Quantification of fluorescence will be performed at ×20 magnification in one random microscopic field of each kidney, followed by binary analysis using Image J 1.49v software.

Flow cytometry analysis

Fresh total cells from spleens were isolated in PBS1×–3% fetal bovine serum (FBS) and stained for 20 min at 4°C with the following monoclonal antibodies at predetermined optimal dilutions: CD121b-BV421, CD19-PeCF594, CD4-V500, CD8a-AF700, Bcl6-APC, CXCR5-Biotin, GL7- e450, CD95 PE, Foxp3-AF488, PD-1–PE (PD-1–phycoerythrin) (BD Biosciences) or PE-Texas Red (PETR), streptavidin-APC or streptavidin–APC-Cy7 (BD Biosciences), GITR PETR (Miltenyi). CXCR5 staining was performed using biotinylated anti-CXCR5 for 30 min at 20°C followed by APC- or APC-Cy7–labeled streptavidin at 4°C. Intracellular detection of Foxp3 was performed on fixed and permeabilized cells using appropriate buffer (eBioscience), following the manufacturer’s recommendations. Cells were acquired on an LSR II flow

cytometer (Becton Dickinson) and analyzed using FlowJo software (TreeStar Inc.). Dead cells were excluded by forward/side scatter gating.

Spectral flow cytometry profiling

Fluorophores-conjugated antibodies are listed in [Table 1](#). Two million cells per sample were stained. Cell viability was assessed by Viability UV T (ThermoFisher). Cells were washed with PBS. After washing, anti-chemokine antibody (CXCR5) and brilliant stain buffer (used in complement of Brilliant fluorescent polymer dyes) were added in PBS 1 × at room temperature for 20 minutes. Other membrane markers were added next (CD44, CD62L, CD69, CD28, ICOS, CD40L, OX40, CD62L, Fas, GL7, IL-6R, CTLA4, GITR, CD127, CD137, CD103, IgD, IgG, IgM, CD38, B220, CD19) and lymph node cells were incubated for 30 additional minutes at room temperature. After washing, the cells were washed and then resuspended in a residual volume of 100 μL and acquired on an AURORA.

Supervised analyses, conducted using FlowJo software, were used to study the phenotype and function of some specific cell populations.

For unsupervised analysis, batch corrected expression values for all markers and cell clusters analyses were performed using Imubac R package (43, 44). We generated 40 clusters. We manually determined the identity of these clusters from their locations in the UMAP plot and the heatmap summarizing the median expression levels of all markers for each cluster.

Gene expression analysis based on RT-PCR

Sorted cells were washed in PBS 1 × and stored in RNAqueous kit lysis buffer (Ambion Inc./Life Technologies) at -80°C. Total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions, and quality was assessed on a bioanalyzer using the Pico RNA Reagent Kit (Agilent Technologies).

For quantitative PCR, we analysed 25 ng of cDNA for expression of a range of genes using the GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Analysis of cDNA samples from splenocyte was normalized to expression of the housekeeping gene, GAPDH.

In vitro assay

Tfr cells were sorted from D-8 OVA-immunized mice, following a previously described "Immunization" protocol. For all the conditions, 1×10^4 Tfr cells were cultured for 12 hours in 96-well plates (Nunc) in complete RPMI 1640 (Thermo Scientific) and three CD3/CD28 beads for one T cell (Dynabeads Mouse T- Activator, Thermo Scientific). We then added or not

recombinant mouse 1 µg of IL-1β (Milteniy Biotec) to Tfr cell cultures. IL-10 production by Tfr cells was measured by ELISA (eBioscience) in supernatants of cultured Tfr cells. Expression of activation marker (GITR) was analyzed by flow cytometry.

ELISA

The concentrations of mouse IL-10 (eBiosciences), IL-1Ra (eBiosciences), IL-1β (eBiosciences) in the culture supernatant, lymph node lavage fluid and serum were detected using ELISA kits. The serum levels of anti-OVA and anti-RNP antibodies were detected with in-house ELISA.

Briefly, 5 ng/ml OVA proteins were coated on 96-well high-binding EIA/RIA plates overnight. After blocking, mouse serum that had been diluted at different concentration (1 : 4000, 1:12000, 1: 36000, 1:108000, 1:324000, 1:972000) was added to the plates and incubated for 2 h; then HRP- conjugated anti-mouse IgG (Southern Biotech) was added at a 1 : 2500 dilution followed by Streptavidin revelation.

The anti-RNP antibodies were revealed with similar method: 1,33 µg/ml RNP proteins were coated on 96-well high-binding EIA/RIA plates overnight. After blocking, mouse serum that had been diluted at different concentration (1:100, 1:300, 1:900, 1:2700) was added to the plates and incubated for 2 h; then HRP- conjugated anti-mouse IgG (Southern Biotech) was added at a 1: 2500 dilution followed by Streptavidin revelation.

For total IgG levels in serum, Maxisorp (Nunc) plates were coated with anti-mouse Ig (ref : 0107-01, SouthernBiotech) on 96-well high-binding EIA/RIA plates overnight. After blocking, mouse serum that had been diluted at different concentration was added to the plates and incubated for 2 h; then HRP- conjugated anti-mouse IgG (ref : 1030-01, Southern Biotech) was added at a 1: 2500 dilution followed by Streptavidin revelation.

Statistical analysis

Flow cytometry, cytokine production, and gene expression data were analyzed by nonparametric Mann-Whitney U test for unpaired data and paired Wilcoxon for paired data on GraphPad Prism v5 [P values, such as $P > 0.05$ (not significant), $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, and $****P < 0.0001$, are indicated in the figures]. Spectral cytometry data were analysed after batch correction with Imubac package. Clustering analysis and multiscale bootstrap resampling were performed using “ggpubr” R packages on R version 4.1 (cluster method, average).

List of Supplementary Materials

Fig. S1. Phenotype of KO mice

Fig. S2. IL-1 β production on GC

References and Notes

1. N. S. De Silva, U. Klein, Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 137–148 (2015).
2. C. G. Vinuesa, M. A. Linterman, D. Yu, I. C. M. MacLennan, Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 335–368 (2016).
3. P. T. Sage, N. Ron-Harel, V. R. Juneja, D. R. Sen, S. Maleri, W. Sungnak, V. K. Kuchroo, W. N. Haining, N. Chevrier, M. Haigis, A. H. Sharpe, Suppression by TFR cells leads to durable and selective inhibition of B cell effector function. *Nat. Immunol.* **17**, 1436–1446 (2016).
4. P. T. Sage, A. H. Sharpe, T follicular regulatory cells. *Immunol. Rev.* **271**, 246–259 (2016).
5. A. R. Maceiras, V. R. Fonseca, A. Agua-Doce, L. Graca, T follicular regulatory cells in mice and men. *Immunology.* **152**, 25–35 (2017).
6. I. Wollenberg, A. Agua-Doce, A. Hernández, C. Almeida, V. G. Oliveira, J. Faro, L. Graca, Regulation of the germinal center reaction by Foxp3⁺ follicular regulatory T cells. *J. Immunol.* **187**, 4553–4560 (2011).
7. M. A. Linterman, W. Pierson, S. K. Lee, A. Kallies, S. Kawamoto, T. F. Rayner, M. Srivastava, D. P. Divekar, L. Beaton, J. J. Hogan, S. Fagarasan, A. Liston, K. G. C. Smith, C. G. Vinuesa, Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* **17**, 975–982 (2011).
8. P.-G. G. Ritvo, G. Churlaud, V. Quiniou, L. Florez, F. Brimaud, G. Fourcade, E. Mariotti-Ferrandiz, D. Klatzmann, Tfr cells lack IL-2R α but express decoy IL-1R2 and IL-1RA and suppress the IL-1-dependent activation of Tfh cells. *Sci Immunol.* **2** (2017), doi:10.1126/sciimmunol.aan0368.
9. A. H. Chan, K. Schroder, Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. *J. Exp. Med.* (2019), doi:10.1084/jem.20190314.
10. C. A. Dinarello, A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1203–1217 (2011).
11. C. Garlanda, C. A. Dinarello, A. Mantovani, The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* **39**, 1003–1018 (2013).
12. I. Cohen, P. Rider, Y. Carmi, A. Braiman, S. Dotan, M. R. White, E. Voronov, M. U. Martin, C. A. Dinarello, R. N. Apte, Differential release of chromatin-bound IL-1 α discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *PNAS.* **107**, 2574–2579 (2010).
13. P.-G. Ritvo, D. Klatzmann, Interleukin-1 in the Response of Follicular Helper and Follicular Regulatory T Cells. *Front. Immunol.* **10** (2019), doi:10.3389/fimmu.2019.00250.
14. S. K. Dower, S. R. Kronheim, C. J. March, P. J. Conlon, T. P. Hopp, S. Gillis, D. L. Urdal, Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *J. Exp. Med.* **162**, 501–515 (1985).
15. A.-U. Rasheed, H.-P. Rahn, F. Sallusto, M. Lipp, G. Müller, Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1892–1903 (2006).
16. J. S. Weinstein, E. I. Herman, B. Lainez, P. Licona-Limón, E. Esplugues, R. Flavell, J. Craft, TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat. Immunol.* **17**, 1197–1205 (2016).
17. J. Merckenschlager, S. Finkin, V. Ramos, J. Kraft, M. Cipolla, C. R. Nowosad, H. Hartweger, W. Zhang, P. D. B. Olinares, A. Gazumyan, T. Y. Oliveira, B. T. Chait, M. C. Nussenzweig, Dynamic regulation of T FH selection during the germinal centre reaction. *Nature*, 1–6 (2021).
18. S. Ronchetti, O. Zollo, S. Bruscoli, M. Agostini, R. Bianchini, G. Nocentini, E. Ayroldi, C. Riccardi, Frontline: GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur. J. Immunol.* **34**, 613–622 (2004).

19. M. M. Xie, A. L. Dent, Unexpected Help: Follicular Regulatory T Cells in the Germinal Center. *Front Immunol.* **9**, 1536 (2018).
20. E. Nikolouli, Y. Elfaki, S. Herppich, C. Schelmbauer, M. Delacher, C. Falk, I. A. Mufazalov, A. Waisman, M. Feuerer, J. Huehn, Recirculating IL-1R2+ Tregs fine-tune intrathymic Treg development under inflammatory conditions. *Cell Mol Immunol* (2020), doi:10.1038/s41423-019-0352-8.
21. K. L. Hippen, S. N. Furlan, R. Roychoudhuri, E. Wang, Y. Zhang, M. J. Osborn, S. C. Merkel, S. Hani, M. L. MacMillan, F. Cichocki, J. S. Miller, J. E. Wagner, N. P. Restifo, L. S. Kean, B. R. Blazar, Multiply restimulated human thymic regulatory T cells express distinct signature regulatory T-cell transcription factors without evidence of exhaustion. *Cytotherapy* (2021), doi:10.1016/j.jcyt.2021.02.118.
22. H. Georgiev, I. Ravens, G. Papadogianni, S. Halle, B. Malissen, G. G. Loots, R. Förster, G. Bernhardt, Shared and Unique Features Distinguishing Follicular T Helper and Regulatory Cells of Peripheral Lymph Node and Peyer's Patches. *Front Immunol.* **9** (2018), doi:10.3389/fimmu.2018.00714.
23. I. Sayin, A. J. Radtke, L. A. Vella, W. Jin, E. J. Wherry, M. Buggert, M. R. Betts, R. S. Herati, R. N. Germain, D. H. Canaday, Spatial distribution and function of T follicular regulatory cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* **215**, 1531–1542 (2018).
24. E. Stylianou, L. A. O'Neill, L. Rawlinson, M. R. Edbrooke, P. Woo, J. Saklatvala, Interleukin 1 induces NF-kappa B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **267**, 15836–15841 (1992).
25. R. Chizzonite, T. Truitt, P. L. Kilian, A. S. Stern, P. Nunes, K. P. Parker, K. L. Kaffka, A. O. Chua, D. K. Lugg, U. Gubler, Two high-affinity interleukin 1 receptors represent separate gene products. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **86**, 8029–8033 (1989).
26. D. Q. Tran, J. Andersson, D. Hardwick, L. Bebris, G. G. Illei, E. M. Shevach, Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3+ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood.* **113**, 5125–5133 (2009).
27. R. L. Clement, J. Daccache, M. T. Mohammed, A. Diallo, B. R. Blazar, V. K. Kuchroo, S. B. Lovitch, A. H. Sharpe, P. T. Sage, Follicular regulatory T cells control humoral and allergic immunity by restraining early B cell responses. *Nat. Immunol.* **20**, 1360–1371 (2019).
28. H. W. Lim, P. Hillsamer, C. H. Kim, 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.* **114**, 1640–1649 (2004).
29. S. Nakae, M. Asano, R. Horai, Y. Iwakura, Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell-dependent antibody production. *Immunology.* **104**, 402–409 (2001).
30. A. S. McKee, P. Murrack, Old and new adjuvants. *Current Opinion in Immunology.* **47**, 44–51 (2017).
31. M. F. Bachmann, G. T. Jennings, Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology.* **10**, 787–796 (2010).
32. J. C. Cox, A. R. Coulter, Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine.* **15**, 248–256 (1997).
33. M. J. Staruch, D. D. Wood, The adjuvanticity of interleukin 1 in vivo. *J. Immunol.* **130**, 2191–2194 (1983).
34. A. M. Mowat, M. J. Thomas, S. MacKenzie, D. M. Parrott, Divergent effects of bacterial lipopolysaccharide on immunity to orally administered protein and particulate antigens in mice. *Immunology.* **58**, 677–683 (1986).
35. M. Przetak, J. Chow, H. Cheng, J. Rose, L. D. Hawkins, S. T. Ishizaka, Novel synthetic LPS receptor agonists boost systemic and mucosal antibody responses in mice. *Vaccine.* **21**, 961–970 (2003).

36. C. Levin, O. Bonduelle, C. Nuttens, C. Primard, B. Verrier, A. Boissonnas, B. Combadière, Critical Role for Skin-Derived Migratory DCs and Langerhans Cells in TFH and GC Responses after Intradermal Immunization. *Journal of Investigative Dermatology*. **137**, 1905–1913 (2017).
37. W. R. Heath, Y. Kato, T. M. Steiner, I. Caminschi, Antigen presentation by dendritic cells for B cell activation. *Current Opinion in Immunology*. **58**, 44–52 (2019).
38. C. Garlanda, C. A. Dinarello, A. Mantovani, The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. **39**, 1003–1018 (2013).
39. G. Scapigliati, P. Ghiara, M. Bartalini, A. Tagliabue, D. Boraschi, Differential binding of IL- 1 α and IL- 1 β to receptors on B and T cells. *FEBS Letters*. **243**, 394–398 (1989).
40. F. Re, M. Muzio, M. De Rossi, N. Polentarutti, J. G. Giri, A. Mantovani, F. Colotta, The type II “receptor” as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor. *The Journal of Experimental Medicine*. **179**, 739–743 (1994).
41. M. A. Lemmon, D. M. Freed, J. Schlessinger, A. Kiyatkin, The Dark Side of Cell Signaling: Positive Roles for Negative Regulators. *Cell*. **164**, 1172–1184 (2016).
42. M.-G. Alameh, I. Tombácz, E. Bettini, K. Lederer, S. Ndeupen, C. Sittplangkoon, J. R. Wilmore, B. T. Gaudette, O. Y. Soliman, M. Pine, P. Hicks, T. B. Manzoni, J. J. Knox, J. L. Johnson, D. Laczkó, H. Muramatsu, B. Davis, W. Meng, A. M. Rosenfeld, S. Strohmeier, P. J. C. Lin, B. L. Mui, Y. K. Tam, K. Karikó, A. Jacquet, F. Krammer, P. Bates, M. P. Cancro, D. Weissman, E. T. Luning Prak, D. Allman, B. Z. Igyártó, M. Locci, N. Pardi, Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses. *Immunity*. **54**, 2877-2892.e7 (2021).
43. M. Ogishi, R. Yang, C. Aytakin, D. Langlais, M. Bourgey, T. Khan, F. A. Ali, M. Rahman, O. M. Delmonte, M. Chrabieh, P. Zhang, C. Gruber, S. J. Pelham, A. N. Spaan, J. Rosain, W.-T. Lei, S. Drutman, M. D. Hellmann, M. K. Callahan, M. Adamow, P. Wong, J. D. Wolchok, G. Rao, C. S. Ma, Y. Nakajima, T. Yaguchi, K. Chamoto, S. C. Williams, J.-F. Emile, F. Rozenberg, M. S. Glickman, F. Rapaport, G. Kerner, G. Allington, I. Tezcan, D. Cagdas, F. O. Hosnut, F. Dogu, A. Ikinciogullari, V. K. Rao, L. Kainulainen, V. Béziat, J. Bustamante, S. Vilarinho, R. P. Lifton, B. Boisson, L. Abel, D. Bogunovic, N. Marr, L. D. Notarangelo, S. G. Tangye, T. Honjo, P. Gros, S. Boisson-Dupuis, J.-L. Casanova, Inherited PD-1 deficiency underlies tuberculosis and autoimmunity in a child. *Nat Med* (2021), doi:10.1038/s41591-021-01388-5.
44. C. Krieg, M. Nowicka, S. Guglietta, S. Schindler, F. J. Hartmann, L. M. Weber, R. Dummer, M. D. Robinson, M. P. Levesque, B. Becher, Author Correction: High-dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. *Nat Med*. **24**, 1773–1775 (2018).

Acknowledgements

We thanks Olivier Jaen, Bénédicte Hoareau, Gwendolyn Marguerit, Encarnita Mariotti-Ferrandiz, Gabriel Pires, Thomas Vasquez, Flora ISSERT, Doriane Foret, Kim Nguyen, Olivier Bregerie.

Funding : Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, **Fondation de la recherche médicale**

Table 1. Spectral cytometry antibody panel

Label	Target	Clone	Providers
BUV 737	CXCR5	2G8 (RUO)	Becton Dickinson
AF647	CD19	6D5	Biolegend
APC-Fire810	CD45R	RA3-6B2	Biolegend
APC-R700	CD4	RM4-4	Biolegend
SparkBlue 550	CD8	53-6.7	Biolegend
BB700	CD11b	M1/70 (RUO)	Becton Dickinson
APC-Cy7	CD127	A7R34	Becton Dickinson
BV480	CD28	37.51 (RUO)	Becton Dickinson
BUV615	CD40L	MR1 (RUO)	Becton Dickinson
BUV496	CD69	H1.2F3 (RUO)	Becton Dickinson
BUV661	OX40	ACT35 (RUO)	Becton Dickinson
BV510	CD62L	MEL-14 (RUO)	Becton Dickinson
APC	CD152/CTLA4	UC10-4F10-11 (RUO)	Becton Dickinson
PerCP-Cy5.5	GL7	GL7	Biolegend
BUV615	IgD	751474 (RUO)	Becton Dickinson
BV650	CD25	PC61 (RUO)	Becton Dickinson
PerCP	CD3	145-2C11	Biolegend
BUV395	CD38	90/CD38	Becton Dickinson
BV570	CD44	IM7	Biolegend
PE-CF594	CD95	Jo2 (RUO)	Becton Dickinson
PE-Cy7	CD126	D7715A7	Biolegend
BV605	CD137	1AH2	Becton Dickinson
BV711	GITR	DTA-1	Becton Dickinson
PC5	ICOS	15F9	Biolegend
APC	IgM	RMM-1	Biolegend
BV786	PD1	RMP1-30 (RUO)	Becton Dickinson
BUV805	IA-IE	M5/114.15.2	Becton Dickinson
BUV563	IgG1	A85-1 (RUO)	Becton Dickinson
UBUV420	Viability UV T		Thermofisher
BV750	CD103	M290 (RUO)	Becton Dickinson
PE	CD121a	35F5 (RUO)	Becton Dickinson
BV421	CD121b	4E2 (RUO)	Becton Dickinson

Figure Legend

Fig. 1. IL-1 seems to be important for Tfh cell but also for Tfr cell activation.

(A) Description of CD4 T and B cell populations within SLOs and circulating IgG antibody levels before any immunization in CD4^{cre}IL-1R1^{lox} (green triangle) and control, CD4^{cre} (grey circle) mice. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, Mann-Whitney U test. (B) Proportion of Tfh, Tfr, GCB cells and Tfr/Tfh ratio at the indicated time and circulating anti-OVA IgG antibody level after intraperitoneal immunization with OVA-Alum in CD4^{cre}IL-1R1^{lox} mice (green triangle) and controls, CD4^{cre} (grey circle) mice. *P < 0.05, Mann-Whitney U test. Data are representative of three independent experiments. (C) Ratio of specific anti-OVA IgG Ab/total IgG Ab after OVA immunization in CD4^{cre}IL-1R1^{lox} mice (green triangle) and control mice, CD4^{cre} (grey circle). *P < 0.05, Mann-Whitney U test. (D) Radar comparing the expression profiles of Tfh and Tfr cell markers of Foxp3^{GFP}CD4^{cre}IL-1R1^{lox} (green) and control, Foxp3^{GFP} (grey) mice after immunization at the indicated time point. (E) Protocol of the Tfr cell activation assay and histograms comparing the MFI of GITR and the level of IL-10 production under the indicated conditions of Tfr cell from Foxp3^{GFP}CD4^{cre}IL-1R1^{lox} mice (green triangle) and control, Foxp3^{GFP} (grey circle). Data centered with respect to control and reduced Tfr cells. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, Mann-Whitney U test for unpaired data and Wilcoxon paired test for paired data. Data are representative of three independent experiments.

Fig.2. IL-1R1 receptor expressed by Tfr cells is functional and important for the regulation of the humoral immune response

(A) Description of CD4 T and B cell populations within SLOs and circulating IgG antibody levels before any immunization in Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox} (blue triangle) and control (Foxp3^{creYFP} = grey circle) mice. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, Mann-Whitney U test. (B) Proportion of Tfh, Tfr, GCB cells and Tfr/Tfh ratio at the indicated time and circulating anti-OVA IgG antibody level after intraperitoneal immunization with OVA-Alum in Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox} mice (blue triangle) and controls, Foxp3^{creYFP} (grey circle) mice. *P < 0.05, Mann-Whitney U test. Data are representative of three independent experiments. (C) Ratio of specific anti-OVA IgG Ab/total IgG Ab after OVA immunization in Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox} mice (blue triangle) and control mice, Foxp3^{creYFP} (grey circle). *P < 0.05, Mann-Whitney U test.

Fig.3. IL-1R1 receptor expressed by Tfr cells is functional and important for the regulation of the humoral immune response

(A) Description of CD4 T and B cell populations within SLOs and circulating IgG antibody levels before any immunization in $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}\text{IL-1R2}^{\text{lox}}$ (red square) and control ($\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}$ = grey circle) mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, Mann-Whitney U test. (B) Proportion of Tfh, Tfr, GCB cells and Tfr/Tfh ratio at the indicated time and circulating anti-OVA IgG antibody level after intraperitoneal immunization with OVA-Alum in $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}\text{IL-1R2}^{\text{lox}}$ mice (red square) and controls, $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}$ (grey circle) mice. * $P < 0.05$, Mann-Whitney U test. Data are representative of three independent experiments. (C) Description of CD4 T and B cell populations within SLOs and circulating IgG antibody levels before any immunization in $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}\text{IL-1Ra}^{-/-}$ (purple diamond) and control ($\text{Foxp3}^{\text{GFP}}$ = grey circle) mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, Mann-Whitney U test. (D) Proportion of Tfh, Tfr, GCB cells and Tfr/Tfh ratio at the indicated time and circulating anti-OVA IgG antibody level after intraperitoneal immunization with OVA-Alum in $\text{IL-1Ra}^{-/-}$ mice (purple diamond) and controls, $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}$ (grey circle) mice. * $P < 0.05$, Mann-Whitney U test. Data are representative of three independent experiments. (E) MDS of B cell population frequencies on $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}\text{IL-1R2}^{\text{lox}}$ (red) and $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}$ (grey) mice at indicated time point after immunization. (F) MDS of B cell population frequencies on $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}\text{IL-1Ra}^{-/-}$ (purple) and $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}$ (grey) mice at indicated time point after immunization.

Fig. 4. IL-1 receptors expressed by Tfr cells affect their own activation.

(A) Tfr/Tfh ratio and radar comparing the expression profiles of Tfr and Tfh cell markers of $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}\text{IL-1R1}^{\text{lox}}$ (blue) and control, $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}$ (grey) mice after immunization at the indicated time point. (B) Tfr/Tfh ratio and radar comparing the expression profiles of Tfr and Tfh cell markers of $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}\text{IL-1R2}^{\text{lox}}$ (red) and control, $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}$ (grey) mice after immunization at the indicated time point. (C) Tfr/Tfh ratio and radar comparing the expression profiles of Tfr and Tfh cell markers of $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}\text{IL-1Ra}^{-/-}$ (purple) and control, $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}$ (grey) mice after immunization at the indicated time point.

Fig.5. The expression of IL-1R2 and IL-1Ra by Tfr is present to inhibit their own activation through inhibition of IL-1R1/IL-1 binding

(A) Histograms comparing the MFI of GITR, level of IL-10 production and IL-1R1 expression under the indicated conditions of Tfr cells from $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}\text{IL-1R2}^{\text{lox}}$ mice (red square) and control, $\text{Foxp3}^{\text{creYFP}}$ (grey circle) mice. Data centered with respect to control and reduced Tfr cells. (B) Histograms comparing the MFI of GITR, level of IL-10 production and IL-1R1 expression under the indicated conditions of Tfr cells from $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}\text{IL-1Ra}^{-/-}$ mice (purple diamond) and control, $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}$ (grey circle) mice. Data centered with respect to control and

reduced Tfr. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, Mann-Whitney U test for unpaired data and Wilcoxon paired test for paired data. Data are representative of three independent experiments.

Fig. 6. Deletion of IL-1R1 on Tfr cells does not alter the risk of autoimmunity, but deletion of IL-1R2 and IL-1Ra on Tfr cells prevents autoimmune disease.

(A) Serum anti-RNP IgG production, proportion of mice with positive anti-RNP Ab and deposition of C3 (green) and IgG (red) in kidney tissues 6 months after Pristane immunization on Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox} (blue) and control, Foxp3^{creYFP} (grey) mice. (B) Anti-RNP IgG production, proportion of mice with positive anti-RNP Ab and deposition of C3 (green) and IgG (red) in kidney tissues 6 months after Pristane immunization on Foxp3^{creYFP}IL-1R2^{lox} (red) and control, Foxp3^{creYFP} (grey) mice. (C) Anti-RNP IgG production, proportion of mice with positive anti-RNP Ab and deposition of C3 (green) and IgG (red) in kidney tissues 6 months after Pristane immunization on Foxp3^{GFP}IL-1Ra^{-/-} (purple) and control, Foxp3^{GFP} (grey) mice. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, Mann-Whitney U test. Data are representative of three independent experiments.

Supplementary Materials:

Fig. S1. Phenotype of KO mice

(A) IL-1R1 relative fold change versus GAPDH on Tfol, Tfh and Tfr cells on CD4^{cre}IL-1R1^{lox} (green) and control (grey), Foxp3^{GFP} mice. (B) IL-1R1 relative fold change versus GAPDH on Tfr and Tfh cells on Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox} (blue) and control (grey), Foxp3^{creYFP} mice. (C) Quantification of IL-1R2 expression on Tfr cells (gated as CD4⁺Foxp3⁺CD19⁻PD1⁺CXCR5⁺), Tfh cells (gated as CD4⁺Foxp3⁻CD19⁻PD1⁺CXCR5⁺), Treg (gated as CD4⁺Foxp3⁺CD19⁻PD1⁻CXCR5⁻) and Teff (gated as CD4⁺Foxp3⁻CD19⁻PD1⁻CXCR5⁻) on Foxp3^{GFP} mice. (D) Quantification of IL-1R2 expression on Tfr, Treg and Breg on Foxp3^{creYFP}IL-1R2^{lox} and control, Foxp3^{creYFP}, mice. (E) Blood IL-1Ra expression in IL-1Ra^{-/-} (purple) and control (grey) Foxp3^{GFP} mice after PBS or OVA-Alum immunization. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, Mann-Whitney U test.

Fig. S2. IL-1 β production on GC

Kinetics of Tfh cells (green), Tfr cells (orange), Plasmablast (CD19⁺CD38⁺B220^{low}IgG⁺IgD⁻) (pink) cell development and IL-1 β production in LN C57BL/6 mice after subcutaneous Alum-OVA immunization

Fig.1. IL-1 seems to be important for Tfh cell but also for Tfr cell activation

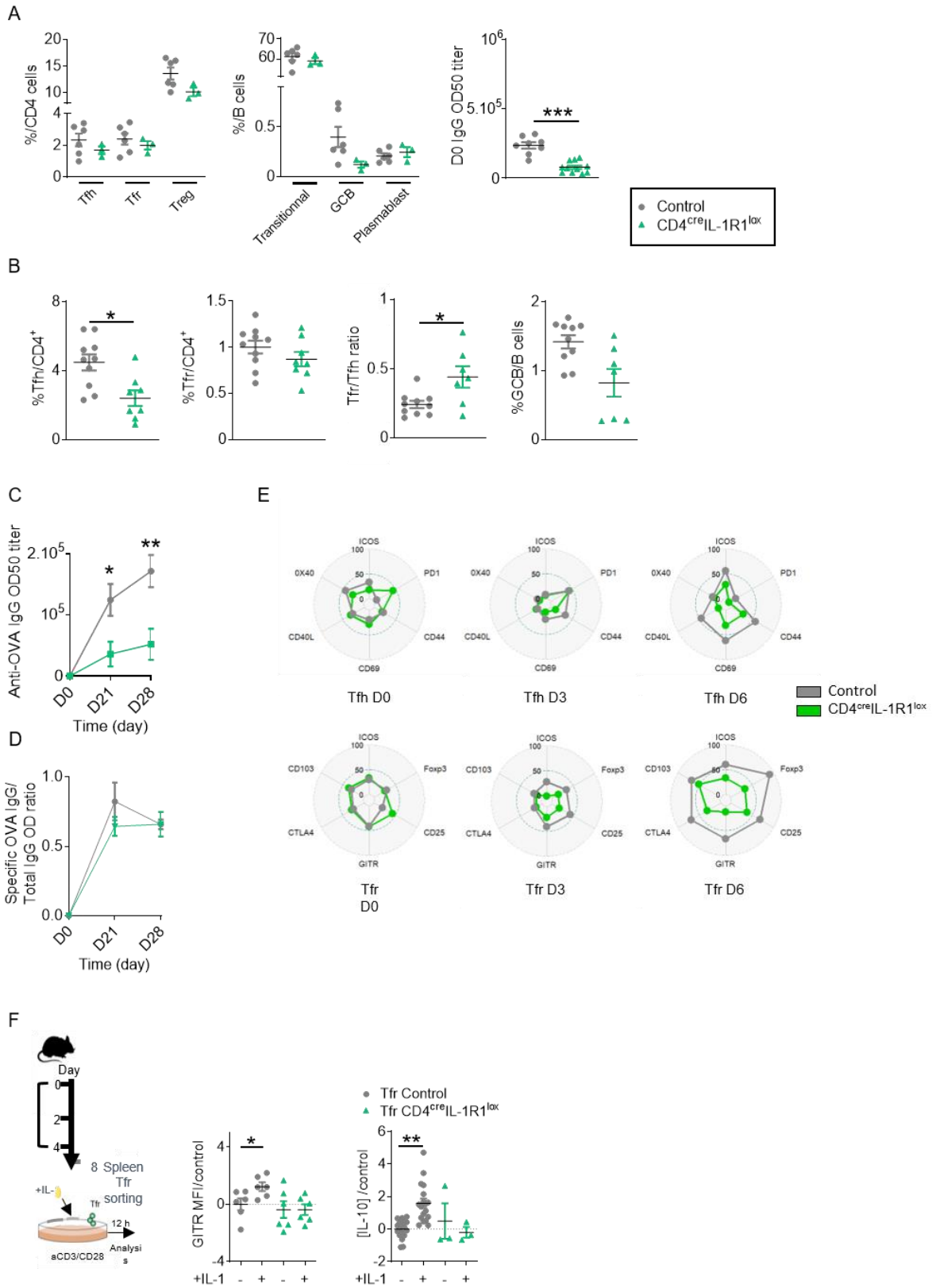


Fig.2. IL-1R1 is important for early Tfr cell activation

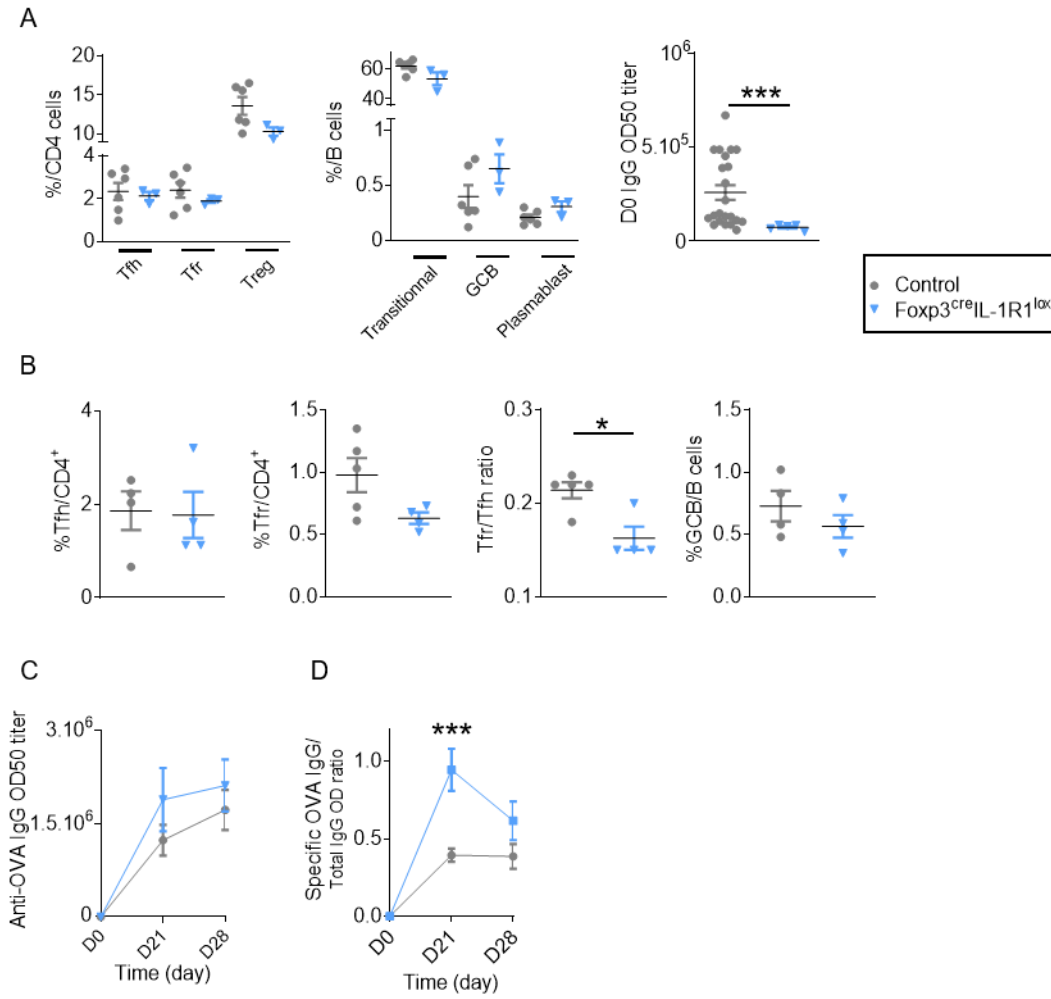


Fig. 3. IL-1R2 Tfr expression and IL-1Ra are present to inhibit the humoral immune response.

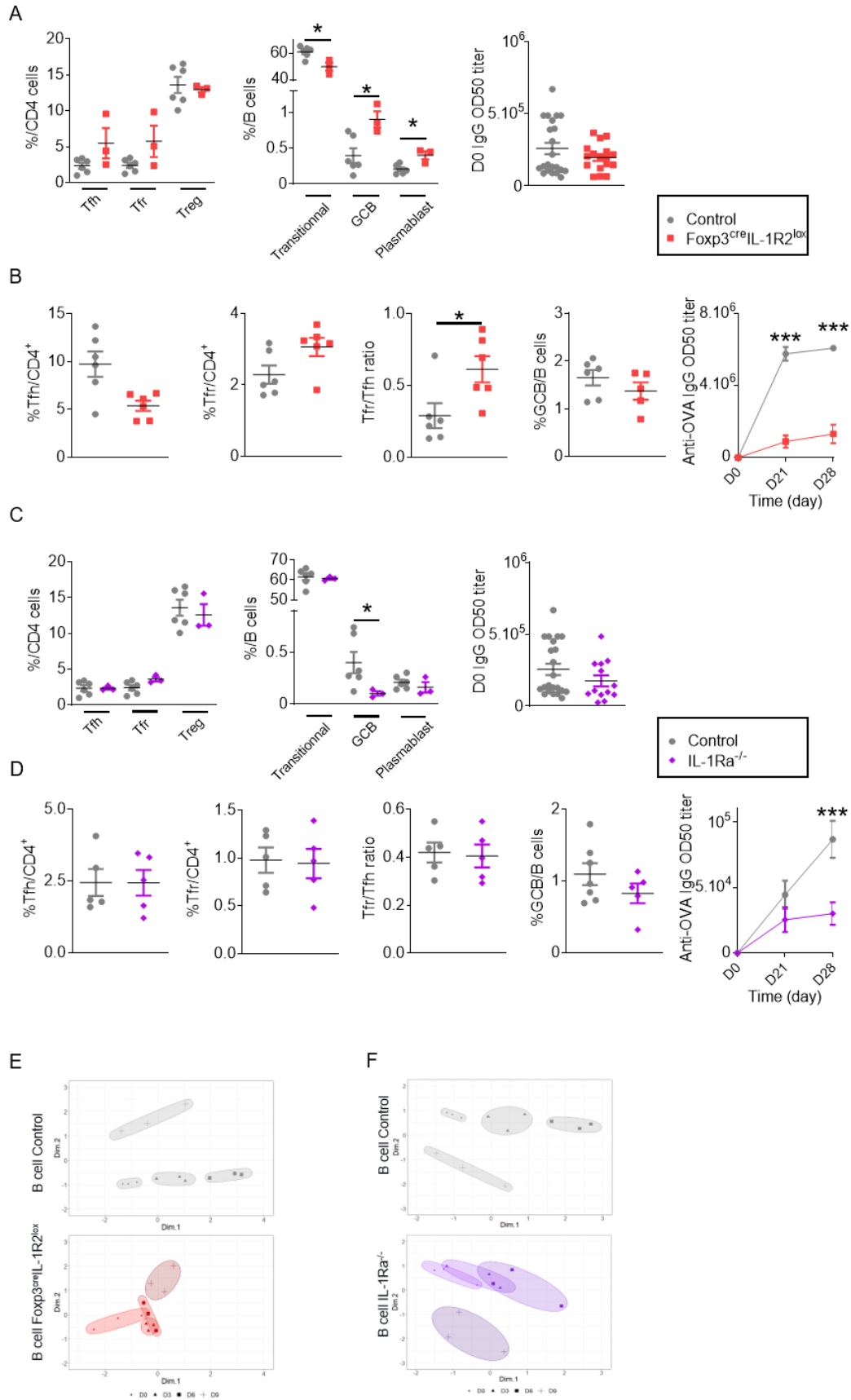


Fig. 4. IL-1 receptors expressed by Tfr cells affect their own activation

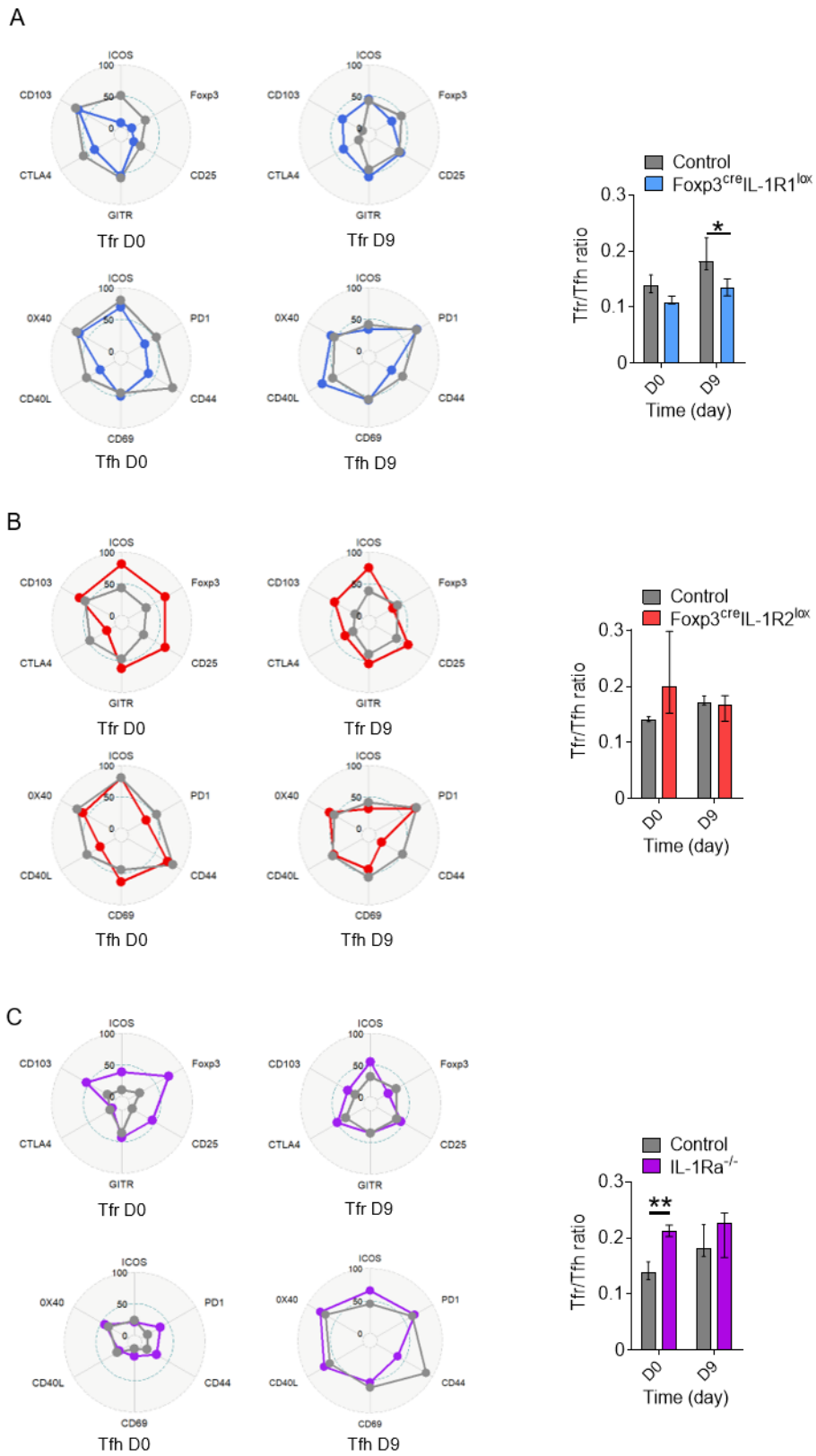


Fig.5. The expression of IL-1R2 and IL-1Ra by Tfr is present to inhibit their own activation through inhibition of IL-1R1/IL-1 binding

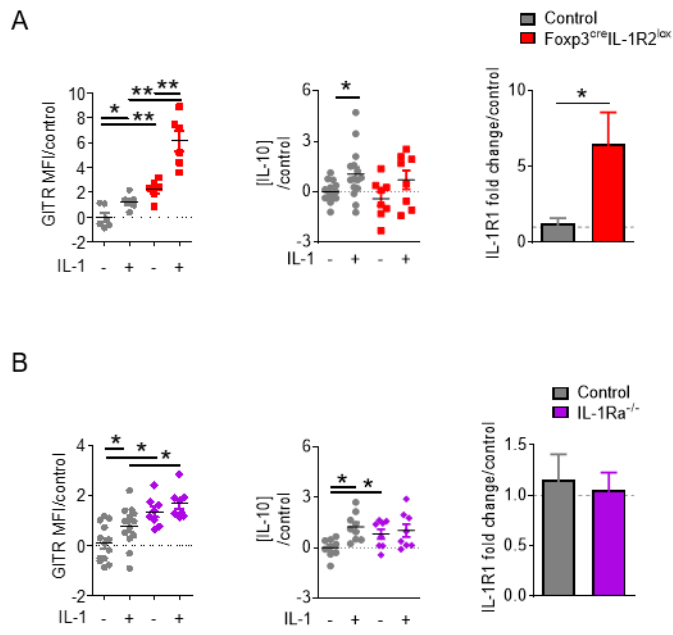


Fig. 6. Deletion of IL-1R1 on Tfr cells does not alter the risk of autoimmunity, but deletion of IL-1R2 and IL-1Ra on Tfr cells prevents autoimmune disease.

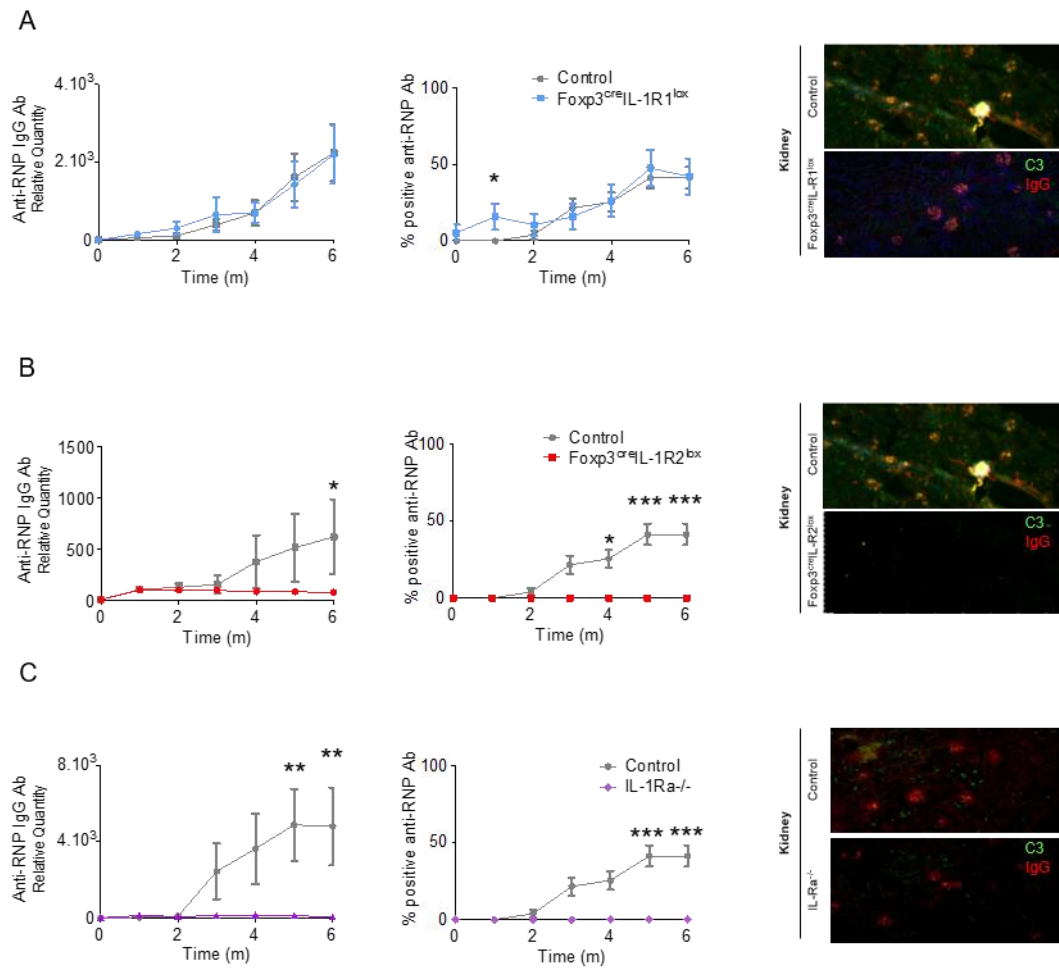
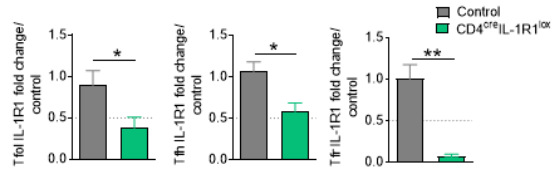
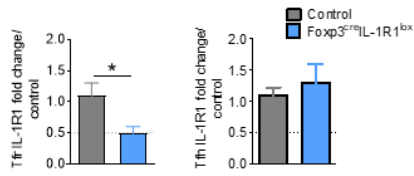


Fig. S1. Phenotype of KO mice

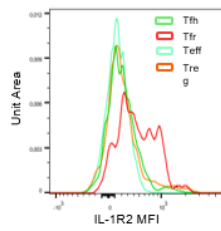
A



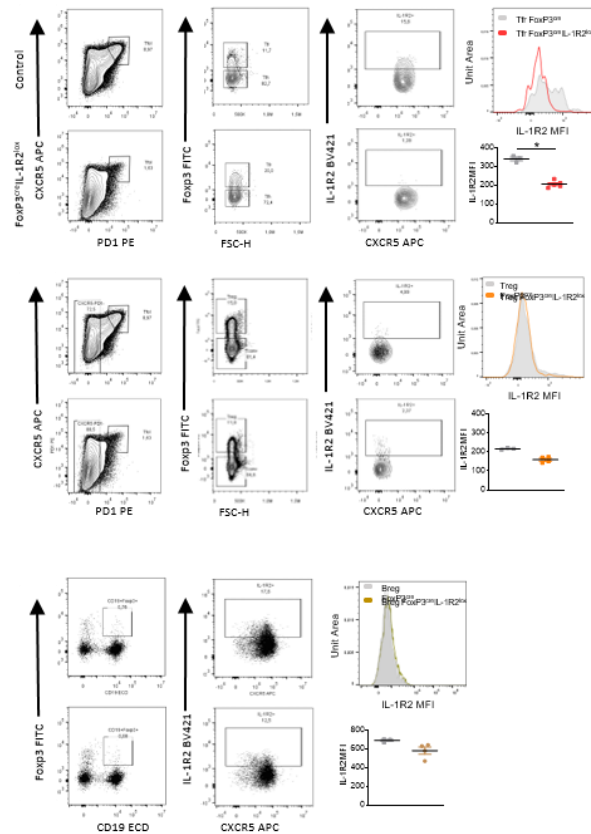
B



C



D



E

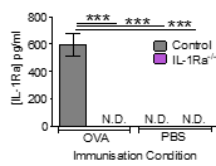
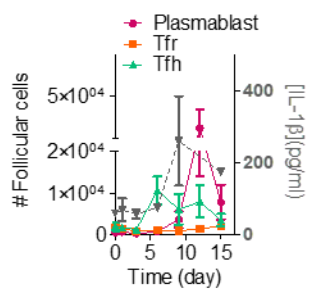


Fig. S2. IL-1 production on GC



Article 2 – Rôle de l'IL-1 β dans l'allergie
IL-1 β orchestrates the IgG/Fc γ RIIb mediated inhibition of allergy

En cours de publication

L'anaphylaxie est un type de réaction allergique provoquée par la dégranulation des mastocytes suite à la réticulation de leurs IgE de surface, ce qui entraîne la libération de molécules biologiquement actives à l'origine d'une maladie allergique. Il est intrigant de constater que c'est la production d'IgE de haute affinité, et non d'IgE totales, qui est nécessaire à la dégranulation des mastocytes et à l'anaphylaxie, ce qui implique que cette maladie est dérivée du CG car elle nécessite le processus d'hypermutation somatique et de sélection par affinité. Nous avons précédemment vu qu'il existait une régulation fine de la réaction du centre germinatif par l'IL-1 β dans des conditions physiologiques : du fait d'une augmentation de sa présence au sein du centre germinatif post immunisation, elle activerait au départ les Tfh, ceux-ci exprimant l'IL-1R1, récepteur agoniste de l'IL-1, puis les Tfr, ces derniers exprimant l'IL-1R1 à un moindre degré mais aussi l'IL-1Ra, récepteur antagoniste et IL-1R2, récepteur leurre de l'IL-1. Aussi, suite à cette découverte, nous avons entrepris d'étudier la cinétique de cette réponse dans des conditions allergiques.

Nous montrons dans un premier temps que l'immunisation en présence d'IL-1 β augmente le rapport IgG:IgE et réduit l'anaphylaxie allergique. A l'inverse, l'anaphylaxie allergique est majorée en présence d'IL-1Ra. Nous avons pu montrer que l'effet de l'IL-1 passait par une majoration de l'expression de Fc γ RIIb par les cellules effectrices (basophiles et mastocytes), qui inhibait secondairement l'expression cellulaire du récepteur Fc ϵ R.

Nous avons ensuite voulu étudier le rôle de l'expression des récepteurs inhibiteurs de l'IL-1 sur les Tfr dans l'allergie. A l'inverse de ce que nous avons pensé, les souris Foxp3^{creYFP}IL-1R2^{lox} présentaient une réaction anaphylactique accrue. Lorsque nous étudions la présence de Fc γ RIIb sur les cellules effectrices, celle-ci était abaissée. Ces analyses permettent de conclure au rôle protecteur de l'IL-1 dans l'allergie mais aussi au rôle délétère des Tfr dans l'allergie. De plus, elles confirment à nouveau le rôle de l'expression de l'IL-1R2 dans l'inhibition du Tfr.

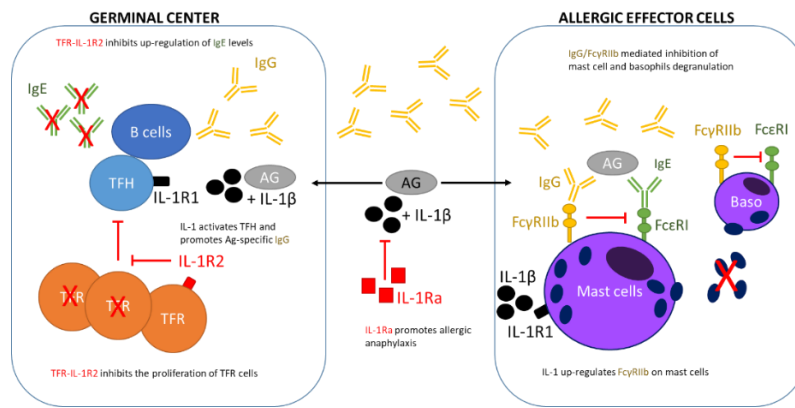


Figure 144 : Rôle de l'IL-1 β dans la réponse allergique. Les Tfh sont activés par IL-1. Cette activation permet l'induction de lymphocytes B producteurs d'IgG. Ces IgG sont protectrices vis-à-vis des réactions allergiques car elles se lient au récepteur Fc γ RIIb présents sur les cellules mastocytaires ou les basophiles et inhibent l'expression de Fc ϵ RI à leur surface. L'IL-1 active aussi directement les cellules mastocytaires via l'expression d'IL-1R1. Les Tfr inhibent la production d'IgG via une inhibition des Tfh. Néanmoins, lorsqu'ils expriment l'IL-1R2, ils prolifèrent moins. Ainsi il semble que les Tfr jouent un rôle délétère dans l'allergie.

IL-1 regulates follicular T cells and mast cells to suppress allergic responses

Paul Engeroff¹, Aude Belbezier¹, Romain Vaineau¹, Gwladys Fourcade¹, James Vigneron¹, Stephanie Graff-Dubois¹, Bertrand Bellier¹, David Klatzmann^{1,2*}

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

²AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Biotherapy (CIC-BTi) and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (i2B), F-75651, Paris, France

*Correspondance: david.klatzmann@sorbonne-universite.fr, +33 1 42 17 74 61

KEYWORDS: Allergy, allergen, immunotherapy, FoxP3, hypersensitivity, IgE, FcεRI, basophils, mast cells, food allergy, sensitization

CONFLICT OF INTEREST: All authors declare no conflict of interest.

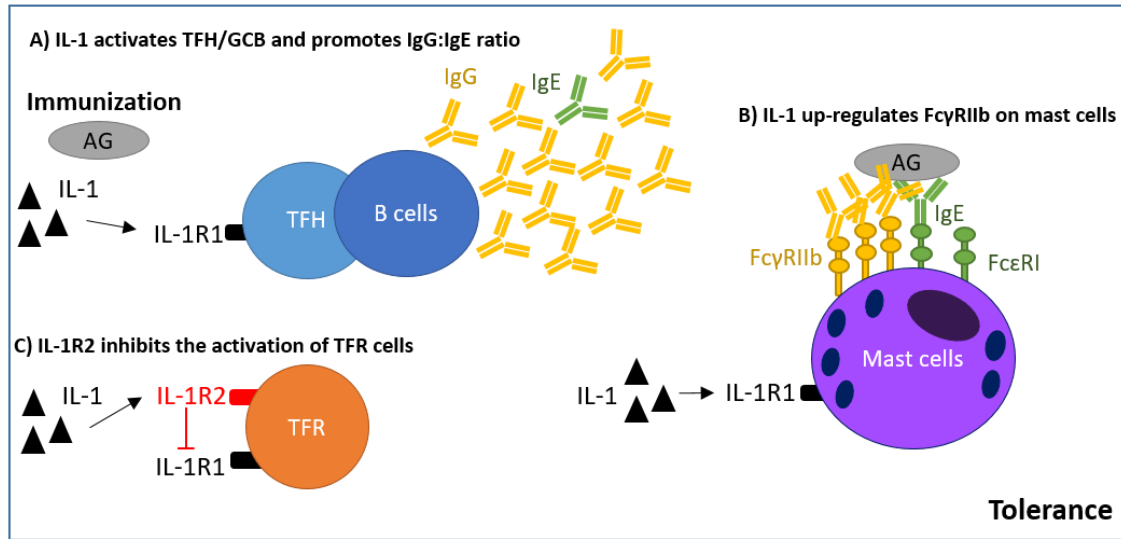
ABBREVIATIONS: IL-1-Interleukin-1, OVA-Ovalbumin, BMMC-bone marrow derived mast cells, TFH-T follicular helper cells, TFR T follicular regulatory cells, GCB-germinal centre B cells, PMC-peritoneal mast cells, IC-immune complex, AIT/SIT-specific allergy immunotherapy, Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3).

AUTHOR CONTRIBUTIONS: P.E. and D.K. designed experiments. P.E., A.B., R.V., G.F., J.V., performed experiments. P.E., S.G., B.B., D.K. interpreted results. P.E. wrote the manuscript, D.K. supervised the project.

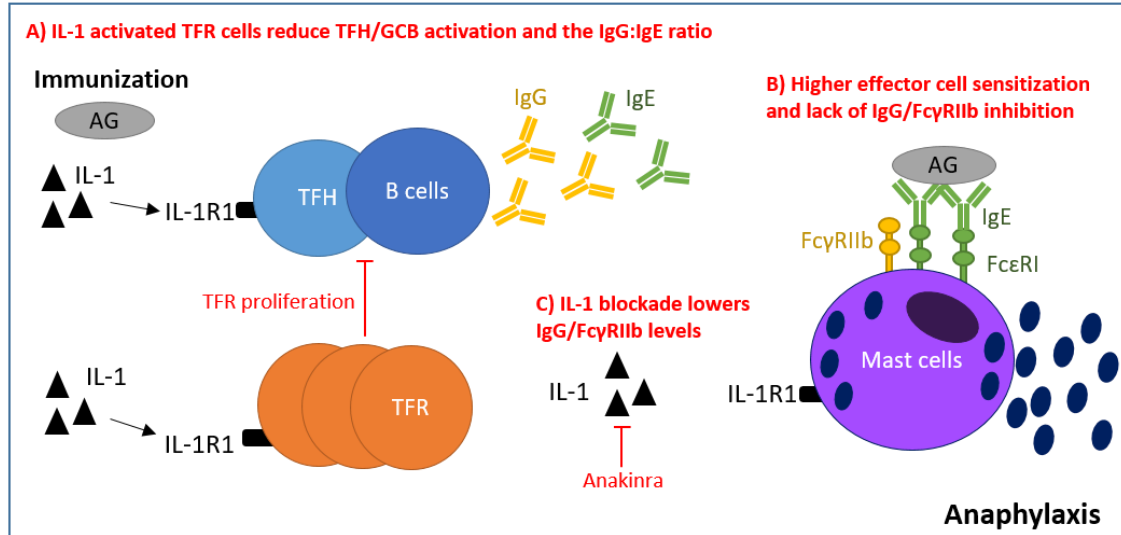
FUNDING: Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Investissements d'Avenir programme (ANR-11-IDEX-0004-02, LabEx Transimmunom) and Swiss National Science Foundation (SNF grant P2BEP3_188262 to Paul Engeroff) and Novartis Research Foundation (grant 20A002 to Paul Engeroff).

Graphical Abstract

REGULATED RESPONSE



DYSREGULATED RESPONSE



ABSTRACT

Allergic anaphylaxis is driven by IgE antibodies that activate mast cells and basophils via the high affinity IgE receptor FcεRI. The reactivity of IgE is controlled by IgG antibodies that inhibit activation of mast cells and basophils via the inhibitory IgG receptor FcγRIIb. Both, IgG and IgE responses are regulated by follicular T helper (TFH) and regulatory cells (TFR) controlling the germinal center B cell (GCB) reaction. We have previously shown that Interleukin-1 (IL-1) regulates the activity of TFH/TFR/GCB and thus the generation of antibodies. Here, we studied the role of IL-1β in the allergic antibody and cellular response. We performed IL-1β injection or blockade and we investigated transgenic IL-1RaKO mice, CD4^{cre}IL-1R1^{lox} and FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice. Excess IL-1 during sensitization promoted antigen-specific IgG responses that protect from allergic anaphylaxis in an FcγRIIb-dependent manner. Furthermore, IL-1β directly up-regulated FcγRIIb expression in mast cells thus reducing their activation potential in presence of IgG. FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice displayed a lower IgG:IgE ratio, and higher levels of anaphylaxis than CD4^{cre}IL-1R1^{lox}. Additionally, TFR cells from FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} proliferated upon IL-1 or OVA re-stimulation whereas B cells only proliferated in wild type mice. Finally, three IL-1+OVA injections shifted the allergic response towards a tolerant outcome in a model of allergen-specific immunotherapy. Thus, IL-1 regulates T follicular cells, B cells and mast cells to suppress allergic responses by promoting the IgG/FcγRIIb tolerance pathway. Our findings could pave the way for the development of novel IL-1-based therapeutic approaches in allergy immunotherapy.

INTRODUCTION

Type I hypersensitivities including allergic airway diseases, food allergy and severe cases of allergic anaphylaxis are on the rise worldwide^{1,2}. Type I hypersensitivity is characterized by a misguided immune response to a non-pathogenic antigen resulting in elevated levels of Immunoglobulin E (IgE). IgE sensitizes mast cells and basophils via the high-affinity IgE receptor FcεRI, gearing the cells up to de-granulate upon antigen encounter resulting in the release of highly inflammatory mediators^{3,4}. Under normal non-allergic conditions, IgE is thought to have a protective role against parasites, toxins and it acts as a physiological adjuvant regulating secondary antibody responses^{5,6}. The inflammatory potential of IgE requires for a multitude of control mechanisms including its general low serum prevalence, fast serum clearance, and inhibitory mechanisms on mast cells and basophils themselves. IgG antibodies play a key role in regulating IgE activity in that they can either neutralize the allergen (anti-allergen IgG), neutralize IgE (anti-IgE IgG), or inhibit FcεRI signaling directly on mast cells and basophils by cross-linking FcεRI with the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) containing IgG receptor FcγRIIb⁷⁻¹¹.

The only disease-modifying treatment for allergic patients is specific allergen immunotherapy (SIT or AIT), which is based on a repeated administration of the allergen at increasing doses, results in an increase of regulatory T and B cells as well as an elevated IgG4:IgE ratio¹²⁻¹⁴. Those hallmarks of specific allergen immunotherapy are at the basis of novel therapeutic approaches to improve allergy immunotherapy which has a very low patient compliance due to a number of factors including the long treatment duration, mixed efficacy, and a risk of side effects¹⁵. Novel approaches that make use of the protective role of IgG in allergies include the development of monoclonal allergen-specific antibodies as well as vaccination strategies to enhance IgG responses, such as displaying allergens on virus-like particles, while at the same time, approaches aim to reduce the side effects of allergen preparations by reducing their allergic reactivity¹⁶⁻¹⁸.

Antigen-specific antibody responses including IgE and IgG are controlled by T follicular cells during the germinal centre reaction, the process by which B cells undergo affinity maturation to generate high-affinity antibody responses¹⁹. Even though the specific TFH and TFR mediated mechanisms that shape the allergic response are not yet fully resolved, it is becoming clear that TFH are important

mediators of allergic sensitization²⁰⁻²⁵. Specifically, a key study showed that a subset of IL-13+ TFH cells drives the generation of high-affinity anaphylactic IgE antibodies specifically in response to allergens but not to parasites²⁶. The role of TFR in allergy is still more nebulous as they were both shown to suppress and promote allergy in different contexts^{27,28}.

Furthermore, the specific molecules and pathways that activate TFH/TFR in allergy are not well understood. Our group has recently shown that IL-1 plays an important role in promoting TFH and the GCB cell response as we uncovered an IL-1 axis that controls the activation of TFH and TFR cells²⁹. IL-1 includes IL-1 α and IL-1 β which are essential pro-inflammatory cytokines involved in a variety of innate and adaptive immune responses³⁰. IL-1 activates the IL-1R1 receptor via recruitment of the accessory protein (IL-1RAP or IL-1R3) which triggers a signalling cascade. This process is controlled by the IL-1 receptor antagonist IL-1Ra, and the IL-1 decoy receptor IL-1R2 which does not recruit IL-1R3. TFH express high levels of IL-1R1 and can be activated by IL-1 to produce IL-4 and IL-21, which then promote B cell activation. In contrast, TFR express lower IL-1R1 levels but high levels of IL-1R2, allowing them to consume IL-1 and counteract the process of TFH and B cell activation³¹.

Here, we aimed to delineate the role of IL-1 and TFH/TFR-expressed IL-1 receptors in shaping the allergic response. In a mouse model based on Alum/Ovalbumin sensitization, we found that addition of IL-1 β during immunization confers protection from anaphylaxis by promoting the IgG/IgE ratio. Furthermore, IL-1 β directly up-regulated Fc γ RIIb on mast cells, reducing their reactivity upon antigen challenge. The absence of IL-1R2 in TFR cells resulted in a significantly decreased IgG/IgE ratio and enhanced IL-1 dependent proliferation of TFR cells. Finally, we demonstrate the therapeutic potential of low-dose IL-1 β in models of systemic anaphylaxis and food allergy. In conclusion, IL-1 orchestrates the suppression of allergic responses by regulating follicular T cells and mast cells and thus bears potential as an adjuvant for the improvement of safety as well as efficacy in allergy immunotherapy.

MATERIAL AND METHODS

Mice

All animals were kept at the Centre d'Expérimentation Fonctionnelle animal facility (Paris, France). The local animal ethics committee approved all procedures (agreement number A751315). Transgenic mouse strains were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) including B6.129S-IL1rntm1Dih/J (JAX stock #004754), B6.Cg-Tg(Cd4-cre)1Cwi/Bflu/J (JAX stock #022071), B6.129(Cg)-Il1r1tm1.1Rbl/J (JAX stock #028398), B6.129(Cg)-Foxp3tm4(YFP/cre)Ayr/J (JAX stock #016959) except for the strain C57BL/6N-A^{tm1Brd1}11r2^{tm1a(EUCOMM)Wtsi/Wtsi} (MGI:4842437) was provided by the Sanger Institute. Seven-week-old BALB/C (AnNR/J) female mice were purchased at Elevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). B6.Cg-Tg(Cd4-cre) and B6.129(Cg)-Foxp3tm4(YFP/cre)Ayr/J mice were used as wild type mice. There was no difference of the here-observed IL-1 mediated effects between both strains (not shown). Wild type and transgenic male and female mice were used for experiments between 6 and 15 weeks old. Different groups within individual experiments were performed with mice in the same age ranges of ± 10 days and the same sex.

Injections

All injections except OVA challenges were done in a volume of 100 μ l. Mice were immunized day 0 and day 14 by subcutaneous injection with 100 μ g OVA (OVA A5503, Sigma-Aldrich) in Imject® Alum (Thermo Fisher) 1:1 diluted in PBS. Anakinra (Kineret®, Swedish Orphan Biovitrum) was given day 0-5 and day 14-16, twice per day at 50 mg/kg subcutaneously as we have previously established in a model of acute lung injury³². Mice treated with IL-1 β received recombinant mouse IL-1 β mixed with OVA/Alum (0.5 μ g per mouse; Miltenyi Biotec). For induction of anaphylaxis, mice were injected intravenously with 2 μ g OVA in 200 μ l PBS. Rectal temperature was measured at 10-minute intervals for 1 hour using a rectal thermometer (Biosep Lab Instruments, Vitrolles, France). For blocking of Fc γ RIIb, 100 μ g anti-CD32b antibody (Thermo Fisher, clone AT130-2) were injected intraperitoneally 1 hour before OVA challenge. Alternatively, Mouse IgG2a, kappa Isotype control (Miltenyi Biotec) was injected. For short-term therapeutic injections, 0.5 μ g IL-1 β in PBS or PBS only was injected subcutaneously. For long-term therapeutic injections 10 μ g OVA in PBS or 0.5 μ g IL-1 β

+10 µg OVA in PBS were injected subcutaneously three times in 2 day intervals. For food allergy sensitization, 10 µg OVA in Alum/PBS 1:1 was injected intraperitoneally at day 0 and day 10. Oral challenge was performed by gavage of 20mg OVA every 2 days for up to 5 challenges, whereas body temperature was assessed at 30-45 minutes. The clinical score was based on the severity of diarrhoea graded from 0 to 3 points and appearance of hirsute pelage marked out 0–2 points.

Sampling

To assess basophils, blood from tail veins was collected in EDTA tubes (final concentration 1mM EDTA). Red blood cells were lysed using BD Pharm Lyse™ (BD Bioscience) according to the manufacturers protocol and were washed three times with PBS. Peritoneal lavage was performed in sacrificed mice by flushing peritoneal cavities with 5ml ice cold PBS under constant massaging. The peritoneum was thereafter cut, and the fluid was collected with a Pasteur Pipet. Red blood cells were lysed followed by three washes with PBS. Whole spleens were collected from sacrificed mice and transferred into 48-well plates containing RPMI 1640 medium (Sigma). The spleens were then mashed and filtered through a cell strainer (70µm, Sigma Aldrich) and washed three times with PBS. To generate murine bone marrow-derived mast cells (BMMCs), femur and tibia of the hind limbs were isolated from sacrificed mice and cut from both sides. The bone marrow was flushed out with a syringe with RPMI 1640 medium. All isolated cells were centrifuged at 300g for 5 min at 4°C and finally suspended in RPMI 1640, 20% FCS medium (Sigma).

Flow cytometry

All primary antibody stainings were carried out in 96 round well plates (Thermo Fisher) for 20 minutes at 4°C in PBS. Between all steps, the cells were washed two times with 200µl PBS. Fixation and permeabilization was performed with eBioscience™ Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (Thermo Fisher) according to the manufacturers protocol. Basophils were defined as anti-mouse CD49b+ (Thermo Fisher, clone DX5), anti-mouse IgE+ (Thermo Fisher, clone 23G3), anti-mouse CD45lo (Thermo Fisher, clone 30-F11) and negative for anti-CD117 (Thermo Fisher, clone 2B8) and anti-CD19 (BD Bioscience, clone 1D3). Peritoneal mast cells (PMC) and bone-marrow derived mast cells (BMMC) were defined as anti-mouse FcεRI+ (Thermo Fisher, clone MAR-1), anti-mouse IgE+, anti-mouse CD117+, anti-mouse F4/80- (Thermo Fisher, clone BM8) and anti-mouse CD49b-. Basophil and mast cell activation was investigated with anti-CD63 (Thermo Fisher, clone

NVG-2) staining. Germinal center B cells were defined as CD45+, anti-mouse CD19+ or anti-mouse B220+ (Thermo Fisher, clone RA3-6B2), anti-mouse GL-7+ (Thermo Fisher, clone GL-7) anti-mouse IgD- (Thermo Fisher, clone 11-26c) and anti-mouse CD3- (Thermo Fisher, clone 145-2C11). OVA-specific GCB cells were investigated by staining with 1µg/ml Invitrogen™ Ovalbumin, Alexa Fluor™ 488 Conjugate (Thermo Fisher Scientific). Proliferating cells were investigated by staining with anti-mouse Ki-67 (Thermo Fisher, clone SolA15). Plasmablast were defined as CD19+/B220+, GL-7-, IgD-, CD138+ (Thermo Fisher, clone 281-2). Follicular T cells were gated by anti-mouse CD3+, anti-mouse CD4+ (Thermo Fisher, clone RM4-5) anti-mouse CXCR5+ (Thermo Fisher, clone 2G8) and anti-mouse PD-1+ (Thermo Fisher, clone RPM1-30) dumping CD19+ or B220+ cells. In Follicular T cells, TFH cells were defined as anti-mouse FoxP3-(Thermo Fisher, clone FJK-16s) whereas TFR were defined as FoxP3+. All flow cytometry was performed with CytoFLEX (Beckman Coulter, Brea, USA) and analyzed by using FLOWJO software (TreeStar Inc, Ashland, Ore) or CytEXPERT (Beckman Coulter).

ELISA

For ELISA, 96-well Nunc Maxisorp ELISA plates (Thermo Fisher Scientific) were coated with reagents in PBS at 4°C overnight. For anti-OVA IgG, 500ng/ml OVA was coated. For total and specific IgE, rat anti-mouse anti-IgE (BD Biosciences, clone R35-72) was coated at 2µg/ml. Blocking was performed with Blocker™ Casein solution (Thermo Fisher) for 2 hours. Dilutions of sera were added to the plates and incubated for 2 hours at room temperature. For specific IgG ELISA, serum was initially diluted 1:100, followed by 10x dilution steps. For total IgE, initial dilution was 1:50 followed by 3x dilution steps. To generate a standard curve, we used purified mouse IgE (Biolegend, clone MEA-36). For specific IgE, serum dilution was 1:10. The plates were then washed 5 times with PBS/0.05% Tween. Specific IgG was detected for 1 hour at room temperature with biotin rat anti-mouse IgG (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) or biotin rat anti-mouse IgG1 (Southern Biotech), biotin rat anti-mouse IgG2a (Southern Biotech). Total IgE was detected with biotin rat anti mouse IgE (Southern Biotech). After washing 3 times in PBS/0.05% Tween, specific IgG and total IgE ELISAs were further incubated with Streptavidin-HRP (Thermo Fisher) for 1 hour at room temperature. Specific IgE was detected with 500ng/ml OVA added for 1 hour at room temperature in a first step. Plates were washed 5 times with PBS-Tween and thereafter incubated with polyclonal

anti-OVA-HRP (Thermo Fisher). Finally all plates were washed 5 times with PBS/0.05% Tween and the ELISAs were developed with 1x TMB substrate solution (Thermo Fisher) and stopped with 1M HCL. All ODs were measured at 450 nm, the half-maximal antibody titer (OD_{50}) was defined as the reciprocal of the dilution leading to half of the OD measured at saturation.

Effector cell binding and activation assays

For basophil assays, about 200ul blood from three mice was pooled and lysed and cells were resuspended in RPMI1640 medium with 10% FBS (Sigma). For basophil activation tests, cells were initially incubated with titrated doses of OVA for 1 hour at 37°C in (data from Figure 5). 5nM OVA was established as a good dose for comparing basophil activation and used for all proceeding experiments. However, the basophil assays were later optimized by shortening the incubation time to 20 minutes at 37°C (data from Figure 2). For BMDCs, activation was performed for 20 minutes at 37°C using 1nM OVA, based on titrations in suppl. Figure 3. Since IgE-antigen complexes do not trigger anaphylaxis we did not further purify the sera to minimize the loss of material³³. The presence of mouse BD Fc-Block™ (BD Biosciences) further allowed us to determine the IgG-dependent binding effect from our sera. For basophil activation tests, serum from D21 immunized mice was pre-mixed for 20 minutes at room temperature with 5nM OVA prior to addition to basophils or 1nM OVA for BMDCs. Binding assays in basophils and BMDCs were performed by premixing 25nM OVA-A488 with 1:10 diluted serum in medium for 20 minutes at 4°C. Activation/Inhibition assays were performed with 1:1000 diluted serum after initial titration experiments displayed in suppl. Figure 2. In principle, the same protocol was used for BMDC binding and activation assays except for additional binding experiments using 1:100 serum dilution. For all activation assays, instead of Fcγ-block, the more specific blocking antibody anti-FcγRIIb was added at 1:200 dilution to the cells prior to the addition of OVA-IgG complexes.

TFH/TFR re-stimulation assay

TFH/TFR cells, re-stimulation experiments were performed with whole splenocytes derived from mice immunized at day 21. Isolated splenocytes were cultured at 2 million cells per well in 96 well round (U) bottom plates (Thermo Fisher Scientific). Culture medium was RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% FBS, 20mM L-Glutamine (Thermo Fisher Scientific) and

Penicillin-streptomycin (100 U/mL, Thermo Fisher Scientific) in a final volume of 200 μ l per well. We aimed to add IL-1 β , OVA and Anakinra at 0.5ug/ml IL-1 β , 1.2 ug/ml OVA and 0.5ug/ml Anakinra. The splenocytes were cultured for 48h at 37°C, 5% CO₂. The cells were then washed 3 times in PBS prior to staining.

Statistics

All results shown are representative of at least 3 independent experiments except for Figure 2E (2 independent experiments), Figure 3A-E (2 independent experiments), Kinetics suppl. Figure 1 (1 experiment), Suppl. Figure 2F and G (1 experiment), Suppl. Figure 5A-D (1 experiment). Suppl. Figure 6 (2 experiments). All data is presented as mean plus/minus the standard error of the mean. All the statistical tests and evaluations were performed by using GraphPad PRISM 6.0 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, Calif). For all experiments, we used an α value of 0.05 and statistical significance for p-values is displayed as follows: * is less than or equal to .05; ** is less than or equal to .01; *** is less than or equal to .001. Non-parametric, 2-tailed Student t tests were used for the comparison of two groups (e.g. antibody titers, cell frequencies, activation assays, proliferation assays). Dose- and time-dependent comparisons were performed by 2-way ANOVA followed by Bonferroni correction to obtain individual p-values (e.g IL-1 titration to BMDC and anaphylaxis experiments).

RESULTS

Presence of IL-1 β during immunization boosts antibody responses and reduces systemic anaphylaxis

We have previously shown that IL-1 promotes TFH and GCB cell activation resulting in a boost of IgG responses. Here, we aimed to investigate the impact of IL-1 on the allergic immune response. In a first step, we investigated IgG and IgE responses in mice immunized with OVA, OVA+IL-1 or when IL-1 is blocked with a daily Anakinra treatment (OVA+Anakinra). Initial antibody serum kinetics led us to compare day 0 (naïve) and day 21 sera for all conditions (suppl. Figure 1A-C). Figure 1A shows that IL-1 β significantly enhanced specific IgG titres whereas IL-1 blockade slightly reduced specific IgG. Similarly, IL-1 β led to an increase of total IgE levels (Figure 1B). Specific IgE levels were very low in general, but we observed an increase in immunized mice compared to naïve groups and an enhancement in the OVA+IL-1 groups (Figure 1C). We also investigated basophil-displayed antibodies and serum IgG subclasses, all of which were up-regulated in presence of IL-1 (Suppl. Figure 1D-N). Since the IgG/IgE balance is an important characteristic in allergy, we formulate an IgG:IgE ratio where we observe a strong increase in OVA+IL-1 immunized mice (Figure 1D). In a next step, we investigated antibody responses upon OVA sensitization in IL-1RaKO mice. Similar to OVA+IL-1 immunized mice, IL-1RaKO mice displayed higher IgG and IgE responses and a higher IgG/IgE ratio compared to wild type mice (Figure E-H). Finally, we compared OVA, OVA+IL-1, OVA+Anakinra immunized mice in terms of their anaphylactic response to OVA challenge at day 28. IL-1 β protected mice significantly from systemic anaphylaxis while IL-1 blockade had a strong worsening effect (Figure 1I). Along the same line, IL-1RaKO mice were protected from systemic anaphylaxis compared to wild type mice (Figure 1J). In conclusion, despite an increase in IgE levels, excess IL-1 during sensitization promotes the IgG:IgE ratio and suppresses the anaphylactic response.

IL-1 β - promoted IgG facilitates the Fc γ RIIb-dependent protection from allergic anaphylaxis

Having shown that IL-1 β confers protection against anaphylaxis, we next aimed to verify the IgG-dependency of this process. We first evaluated the effect of serum induced by OVA, OVA+IL-1, OVA+Anakinra on the binding of OVA-IgG immune complexes (IC) to whole blood basophils (For all titrations and IL-1RaKO serum, see suppl. Figure 2). Alternatively, we used *in vitro* matured bone-marrow derived mast cells (BMMC) allowing us to work with higher cell numbers and purity (phenotypic and functional characterization, suppl. Figure 3). We pre-mixed 1:10 diluted sera (naïve, OVA, OVA+IL-1, OVA+Anakinra) with fluorescent OVA-A488 to form IC prior to addition to the cells for 30 minutes at 4°C. Since OVA can bind to basophils via IgE in absence of serum, we used naïve serum as an OVA binding baseline. Figure 2A shows that OVA+IL-1 serum promotes IC binding to basophils compared to naïve serum. The additional presence of Fc γ -Block completely blocked this enhancement of IC binding. In BMMCs, the effect of OVA+IL-1 serum was even more striking as shown in Figure 2B. In a next step, we aimed to test the effect of the different sera on the degranulation of basophils and mast cells. Titration experiments led us to dilute serum 1:1000 for activation assays. Furthermore, we used a specific anti-Fc γ RIIb blocking antibody instead of pan Fc γ -Block. OVA+IL-1 serum inhibited basophil and BMMC degranulation more than OVA serum compared to naïve serum in Fc γ RIIb-dependent fashion (Figure 2C and 2D). Finally, we injected mice immunized with OVA, OVA+IL-1, OVA+Anakinra with 100 μ g anti-Fc γ RIIb antibody or isotype control i.p. 1 hour prior to OVA challenge. OVA or OVA+IL-1 immunized mice injected with the Fc γ RIIb antibody displayed similar levels of enhanced anaphylaxis compared to isotope control antibody injected mice. Hence, the antibodies induced by OVA+IL-1 immunization enhance the Fc γ -dependent binding to allergic effector cells and reduces their degranulation in Fc γ RIIb-dependent fashion.

IL-1 β up-regulates Fc γ RIIb expression in mast cells and reduces their activity

IL-1R1 expression has been previously described on mast cells³⁴. Having demonstrated that IL-1 β controls allergic anaphylaxis via IgG/Fc γ RIIb, we thus evaluated whether IL-1 β has a direct effect on the expression of IgE/IgG surface receptors in mast cells. To this end, we isolated peritoneal mast cells (PMC) at day 28 after immunization with OVA, OVA+IL-1 and OVA+Anakinra. Interestingly, we found higher frequencies of peritoneal mast cells in OVA+IL-1 immunized mice compared to naïve, OVA, and OVA+Anakinra groups (Figure 3A). However, we observed decreased Fc ϵ RI in OVA+IL-1 immunized mice compared to OVA-immunized mice only (Figure 3B). Interestingly, the expression of Fc γ RIIb was lower in OVA+Anakinra treated mice compared to OVA and OVA+IL-1 mice (Figure 3C). Overall the MFI ratios of Fc γ RIIb:Fc ϵ RI, significantly increased in PMCs from OVA+IL-1 immunized mice (Figure 3D). In a next step, we to OVA sensitized mice and injected IL-1 β for 1 day before isolating PMC and challenging with OVA. Fc γ RIIb but not Fc ϵ RI was up-regulated in PMCs 1 day after IL-1 injection (Figure 3E, F). Mice pre-treated with IL-1 displayed significantly reduced anaphylaxis (Figure G). Mixing IL-1 with Anakinra or the addition of anti-Fc γ RIIb inhibited the protection from anaphylaxis (suppl. Figure 2H). We next titrated IL-1 β to BMMC in vitro for 48 hours and evaluated the relative expression of Fc ϵ RI and Fc γ RIIb by flow cytometry. We detected a significant up-regulation of Fc γ RIIb in IL-1 β treated BMBCs whereas Fc ϵ RI expression remained more stable (summary, Figure 3H, histograms, Figure 3I.). We next performed a serum inhibition assay adding serum from OVA immunize mice (day 21) to BMBCs primed with IL-1 β for 48h. As shown in Figure 3J, IL-1 β priming reduced the activity of BMBC in presence of OVA serum compared to naïve serum. Hence, in addition to increasing the IgG:IgE antibody ratio, IL-1 β promotes the Fc γ RIIb:Fc ϵ RI receptor ratio and thus reduces the activity of mast cells. In conclusion, the presence of IL-1 β during immunization has a dual effect on serum IgG and mast cell Fc γ RIIb that contributes to protection from allergic anaphylaxis.

FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice display elevated IgE levels, reduced IgG levels, and increased anaphylaxis

Having previously shown that IL-1 activates TFH/GCB cells, we were interested in evaluating the role of IL-1 receptors expressed in follicular T cells in the allergic response. To evaluate the role of IL-1R1-expressing follicular T cells in the IgG response mediated by IL-1 β , we immunized WT (CD4^{cre}) mice or CD4^{cre}IL-1R1^{lox} with OVA or OVA+IL-1 and we investigated IgG/IgE responses and the anaphylactic response to OVA challenge. As shown in Figure 4A-D, CD4^{cre}IL-1R1^{lox} displayed lower IgG responses, slightly enhanced total IgE responses, a trend towards lower specific IgE, and a non-significant tendency towards lowering of the specific IgG to specific IgE ratio. In a next step we evaluated the role of TFR-expressed IL-1R2 by studying FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice. FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice displayed lower IgG responses but significantly higher naïve total IgE levels that were further increased upon immunization (Figure 4E,F). Whereas specific IgE levels did not change in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice, the specific IgG: specific IgE ratio was drastically lowered (Figure 4H). When investigating anaphylaxis in CD4^{cre}IL-1R1^{lox}, we did not observe a significant difference compared to WT mice (Figure 4I). In contrast, FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} were significantly more susceptible to systemic anaphylaxis upon intravenous OVA challenge (Figure 4J). In both strains, CD4^{cre}IL-1R1^{lox} and FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox}, the additional presence of IL-1 during OVA immunization promoted IgG levels, though to a lower level than in WT mice. Nevertheless, OVA+IL-1 immunization had a protective effect on anaphylaxis in both strains compared to OVA only immunization (suppl. Figure 4). Hence, the absence of IL-1R1 in T follicular cells decreases IgG levels but does not shift the IgG/IgE ratio enough to promote anaphylaxis. In contrast, the absence of IL-1R2 in TFR promotes a prone allergic phenotype characterized by a dysregulated, lower IgG/IgE balance and higher susceptibility to allergic anaphylaxis in response to allergen challenge.

Elevated IgE levels and reduced FcγRIIb engagement promote anaphylaxis in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice

Having observed a dysregulated immune response in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox}, we next aimed evaluate the mechanism of anaphylaxis in further detail. The higher serum total IgE levels in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice come in association with higher blood basophil frequencies compared to WT mice (Figure 5A) as well as increased surface IgE levels (Figure 5B) In contrast, serum IgG subclasses, and basophil-IgG were lower (suppl. Figure 5). We next investigated the reactivity of basophil to OVA challenge in absence of serum. Basophils from FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} showed higher degranulation in response to OVA than WT basophils thus suggesting a pure IgE effect (Figure 5C). To evaluate the impact of serum IgG, we next investigated the effect of D21 serum from WT or FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice on effector cell binding as well as activation. In line with our previous results with IL-1 or Anakinra, IgG binding and inhibition of activation correlated with specific IgG levels. We observed a reduction of IgG-OVA binding to basophils in serum derived from OVA-immunized FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice compared to WT mice (Figure 5D). In turn, WT OVA serum inhibited basophil degranulation more than FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} OVA serum (Figure 5E). The same effects were observed in BMMCs (Figure 5F, G). In a next step, we aimed to test the effect of FcγRIIb blockade prior to OVA challenge in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice compared to WT mice. As shown in Figure 5H, FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} did not benefit from FcγRIIb-mediated protection to the same extent as WT mice. In conclusion, the higher IgE levels in addition to a lower IgG:IgE ratio in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice leads to higher IgE+ basophil frequencies as well as a lack of FcγRIIb engagement on basophils and mast cells resulting in increased allergic anaphylaxis.

FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice display TFR proliferation in response to IL-1 or antigen re-stimulation

Having shown the mechanism of anaphylaxis in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice, we next aimed to study how a lack of IL-1R2 on TFR results in a shift of the IgG/IgE balance. When comparing splenic frequencies of TFH/TFR/GCB in WT and FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice, we observed a striking reduction of GCB cells, higher levels of proliferating TFR and increased B cell apoptosis in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice (suppl. Figure 6). We thus performed an *in vitro* re-stimulation experiment to evaluate the effect of IL-1, OVA, or IL-1+OVA re-stimulation on the proliferation of TFR, TFH and B cells. The cells were cultured *ex vivo* for 48 hours in presence of OVA and/or IL-1 β . We characterized proliferating cells as Ki-67+FSC^{hi} by flow cytometry (gating shown in 6A). Compared to splenocytes derived from WT mice, follicular T cells in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} displayed a significant proliferative response to IL-1, OVA and IL-1+OVA re-stimulation (6B). The proliferating cells were mainly FoxP3⁺ whereas no proliferation was observed in the FoxP3⁻ cell population (6C, D). The enhanced TFR proliferation led to an increase in TFR CD69 and ICOS expression, and an increase in the TFR:TFH ratio (suppl. Figure 6). In contrast, proliferation of B cells was only observed in splenocytes derived from WT mice whereas B cell proliferation was completely suppressed in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} (5E). To confirm the IL-1-dependency of TFR proliferation, we additionally performed an assay with FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} splenocytes in absence or presence of Anakinra. As shown in Figure 5H, TFR proliferation was blocked by the addition of Anakinra, most notably also in OVA only re-stimulated splenocytes suggesting that endogenous IL-1 is in the system. Together our results show that mice lacking IL-1R2 in FoxP3⁺ cells present higher levels of TFR proliferation and reduced B cell proliferation in response to IL-1 β and/or antigen re-stimulation. This dysregulated response may disrupt the TFH/GCB response, lower the IgG:IgE balance and lead to increased allergic responses.

Having observed that IL-1 regulates both mast cells and follicular T cells to suppress allergic responses, we aimed to evaluate whether three subcutaneous IL-1+OVA injections diluted in PBS have a desensitization effect in OVA sensitized mice. We investigated serum antibody levels before the treatment at day 14, and after the treatment at days 40, 60, and 80. In line with our previous results, IL-1+OVA immunotherapy boosted specific IgG and total IgE levels significantly whereas no changes in specific IgE levels were observed (Figure 7A-C). At day 80, we additionally performed a basophil activation test in presence of serum. We compared basophils from OVA or OVA+IL-1 groups in presence of 1:1000 naïve, OVA or OVA+IL-1 serum (from day 80). There was no difference in basophil activation between OVA or OVA+IL-1 groups, but OVA+IL-1 serum significantly reduced basophil activation (Figure 7D). We performed a first challenge at Day 41, where IL-1+OVA treated mice were protected from systemic anaphylaxis compared to OVA mice (Figure 7E). One day before the second challenge at day 65, one group received an extra injection of IL-1 in PBS. Figure 7F shows, that IL-1+OVA mice at day 65 were still significantly protected compared to OVA mice, and the extra addition of IL-1 had an additive effect leading to complete absence of anaphylaxis. At the end of the experiment at day 80, PMC were isolated. Figure 7G shows that Fc ϵ RI expression was reduced whereas Fc γ RIIb expression increased by IL-1+OVA therapy. Finally, we aimed to confirm the therapeutic potential of IL-1 in a second model of allergy. For this model, BALB/C mice were used, and we challenged orally by OVA gavage. In accordance with our model in C57BL/6 mice, the presence of IL-1 during sensitization had a preventive anti-allergic effect, reducing the loss of body temperature and the allergy score (Figure 7I and 7J). Along the same lines, IL-1 treatment of sensitized mice between OVA challenges reduced anaphylaxis and allergy scores in response (Figure 7K and 7L). Hence, we demonstrate the short-term and long-term therapeutic potential of IL-1 in a variety of applications, different mouse strains and different types of allergen challenge.

DISCUSSION

We observed several novel mechanisms by which IL-1 orchestrates the IgG/IgE balance and thus regulates the development of allergy: i) Addition of IL-1 β during immunization boosts the IgG:IgE ratio resulting in a higher Fc γ RIIb-mediated inhibition of allergic effector cells, ii) IL-1 β promotes the expression of Fc γ RIIb directly on mast cells reducing their activity. iii) Deletion of IL-1R2 expression in TFR lowers the IgG:IgE ratio and promotes an allergic phenotype.

Type I hypersensitivities are becoming a larger public health and economic burden specifically in industrialized communities. A prominent potential explanation, also known as the “hygiene hypothesis”, is a lack of immune system activation by pathogens leading to a shift towards IgE driven responses³⁵. For example, studies have shown that a traditional rural farming lifestyle and associated immune stimuli are protective against the development of allergies³⁶⁻³⁸. The gut microbiome specifically may play an important role in preventing allergies³⁸⁻⁴⁰. Likewise, it is established that pathogens including parasites, bacteria and viruses antigens do not promote allergic responses⁴¹⁻⁴³.

From that standpoint, our results about IL-1, a classical pro-inflammatory cytokine, being able to suppress an allergic response are in line with the literature. IL-1 has been previously reported to promote the IgG response and have adjuvant potential⁴⁴⁻⁴⁶. The fact that IL-1 β also up-regulates IgE levels is not surprising as IgE is induced in response to a variety of antigens most prominently from parasites but also viruses and bacteria⁴⁷⁻⁴⁹. IgE may thus play a role in anti-pathogen immune responses whereas Fc γ RIIb is an important co-regulator in this process to prevent allergy and anaphylaxis.

The direct effects of IL-1 on allergic effector cells needs to be evaluated in detailed follow-up studies. Previous studies have demonstrated various effects of IL-1 β on mast cells including cytokine production and an involvement in skin inflammation^{50,51}. Mast cells have also been shown to shape inflammation by producing IL-1 as well as IL-1Ra^{52,53}. Mast cells undergo various maturation steps and exist in a variety of tissues⁵⁴. We do not exclude that depending on the maturation state and environment such as for example chronic ongoing inflammation, the effect of IL-1 on mast cells could change. Still, in our hands, looking at *in vitro* differentiated BMMCs and PMC after immunization, we observed a role for IL-1 in regulating Fc γ RIIb expression in two distinct types of mast cells. Hence,

our results suggest that in the presence of IL-1, elevated IgG levels in accordance with an increase of available Fc γ RIIb receptor on mast cells could work together for the dual suppression of anaphylactic reactivity. This could also explain the here-observed strong pro-anaphylactic effect of Anakinra treatment since the effect of Anakinra on serum IgG is significant but only slight in magnitude. Our findings are in line with previous reports that have linked Anakinra to reduced vaccination responses whereas allergies and anaphylaxis as a potential side effect for anakinra treatment has been reported but needs to be investigated in closer detail in future studies^{55,56}.

We have shown that TFH cells express high levels of IL-1R1, and that IL-1 thus may promote B cell and antibody responses in germinal centres. Furthermore, this process is negatively regulated by TFR cells expressing lower levels of IL-1R1 but higher levels of IL-1R2²⁹. Even though IL-1 has a wide-ranging impact on a plethora of immune cells including antigen-presenting cells, we formulated the hypothesis the IL-1 axis may be specifically important for TFH/TFR cells.

We found that CD4^{cre}IL-1R1^{lox} mice displayed lower levels of OVA-specific IgG upon OVA+IL-1 immunization than wild type controls confirming that follicular T cells are involved in the response. However, in CD4^{cre}IL-1R1^{lox}, we are not able to discriminate between TFH-expressed or TFR-expressed IL-1. Due to the high expression of IL-1R2 in TFR, it could be speculated that we are mainly looking at a TFH effect. Nevertheless, the fact that IL-1 β still significantly enhanced IgG levels in CD4^{cre}IL-1R1^{lox} mice suggests that IL-1 β activates other cells which is not surprising as many cell types respond to IL-1, including antigen-presenting cells⁵⁸. Regarding the allergic response, though the IgG/IgE balance was shifted in CD4^{cre}IL-1R1^{lox} mice, in our model we did not observe striking changes in anaphylaxis.

In contrast, the effects in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice were much more striking and had a significant impact on the anaphylactic response. Since conventional regulatory T cells do not express IL-1R2, the knockout is likely to be quite specific to TFR cells. It was recently shown that CXCR5⁺ TFH can up-regulate FoxP3⁺ during end-stage germinal centres thus essentially turning into TFR cells to suppress the germinal centre reaction⁶⁰. Nevertheless, all FoxP3⁺ cells share a common functionality in shutting down immune responses and according to our results, IL-1 may drive this process once IL-1R2 expression is down-regulated or IL-1R2 is occupied on FoxP3⁺ cells.

Even though a role for TFH/TFR in shaping allergic responses has been demonstrated by other groups, the detailed mechanisms by which TFH/TFR cells are differentially activated to enhance or reduce the IgG:IgE balance are not fully understood^{23,26,57}. Here, we confirm our previous study showing a key role for an IL-1 axis in the regulation of follicular T cells and extends those findings to the allergic immune response. Our results suggest that the absence of IL-1R2 on TFR promotes their own activation leading to a shutdown of GCB cell responses and IgG antibodies. While shutting down IgG responses can be useful in a different context such as for preventing autoimmunity, this is not the case in the context of allergy. The fact that TFR proliferate suggests that the mechanism of GC suppression is in part a change of the TFR:TFH:GCB cell ratio. This is supported by the fact that we observed an inhibition of B cell and TFH proliferation upon re-stimulation in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} compared to WT mice and an up-regulation.

In our immunization models, we have mainly observed differences in total IgE levels across immunization schemes and different mouse strains. Specific IgE is difficult to assess, due the low serum prevalence, specifically in C57BL/6 mice. The interference of antigen-specific and IgE-specific IgG blocking antibodies and the fact that most IgE is present in cell-bound fashion further clouds the analysis. Nevertheless, it was shown that even low-affinity, germline IgE can trigger anaphylaxis due to avidity effects of allergen binding which is likely also the reason for high cross-reactivity in allergic patients⁵⁹. This even strengthens the need for constant specific IgG-mediated control of anaphylaxis via FcγRIIb.

Our findings are in line with previous reports that have proposed a role for TFR in the promotion of allergy²⁷. Future studies will need investigate the exact kinetics and location of the IgE and IgG antibody responses. IgE responses are characterized by an early plasmablast increase, short-lived IgE+ germinal center cells quickly undergoing apoptosis and a non-classical memory that is kept in the IgG1 compartment⁶¹. We speculate, that the suppression of specific IgG responses via TFR cells may either occur late enough, or spatially separated enough, to still allow low-affinity IgE responses to occur thus shifting the immune response towards a lower IgG:IgE ratio.

It needs to be discussed, that IgG is not always anti-inflammatory but can also promote anaphylaxis^{62,63}. While IgG plays a beneficial role in the anaphylactic IgE via basophils and mast cells,

IgG can trigger anaphylaxis via neutrophils and macrophages but usually this only occurs at very high antigen concentrations. Thus, the complexity of anaphylaxis is enhanced by the fact that different FcγRs have different roles depending on the context and it is possible that Fcγ and FcεRI are part of a reaction chain. Nevertheless, in our classical model of allergic anaphylaxis, the induction of IgG corresponds with a reduced anaphylactic reactivity suggesting that the composition of IgG antibodies and the availability of FcγRIIb is optimal for the inhibition of anaphylaxis. Furthermore, FcγRIIb may not only inhibit IgE-dependent anaphylaxis, but also IgG-dependent anaphylaxis.

The therapeutic value of IL-1β needs to be determined in further detail. It is established that high doses of IL-1β are highly inflammatory and toxic. However, the high potency of IL-1β could be benefited from as an adjuvant in allergy AIT, even at very low and well tolerated doses. A difficult problem that AIT faces is the risk of side effects due to administration of the allergens themselves that cause degranulation of effector cells. Enhancing the immunogenicity of allergens while lowering the risk of side effects is thus an important optimization approach in AIT⁶⁴. We show that very low doses of IL-1β can boost IgG responses significantly. Thus, small allergen doses in AIT mixed with low dose IL-1β could lead to quicker and more efficient responses in AIT. Furthermore, we show that low doses of IL-1β reduce anaphylaxis immediately the next day, which could allow a safer application of allergen extracts in AIT. Most importantly, we could demonstrate that the use of IL-1β has therapeutic potential in a variety of settings, different mouse strains and models, including a model of AIT.

In addition to higher IgG and FcγRIIb levels, a striking hallmark that we observe is an increase in total IgE levels. This is very interesting as in AIT, a spike of IgE followed by an increase in the IgG4:IgE balance are hallmarks of successful allergy immunotherapy and reduced responsiveness of effector cells. The importance of FcγRIIb is quite established in allergy research. In humans, the importance of IgG4 has been linked to FcγRIIb, as it displays a higher affinity towards IgG4 than all other subclasses⁶⁵. Hence, the fact that IL-1β promotes IgE levels as well as the IgG:IgE ratio is an interesting parallel to those hallmarks in human patients. Regarding the role of TFR cells, it is too early to assume that hyperactivated TFR are a common phenomenon across human allergic patients, but a very interesting study has shown that allergy immunotherapy modulates the TFR:TFH balance²⁵. Future research may delineate in further detail under which circumstances TFR may promote and

suppress the allergic response. Our results suggest that IL-1-dependent activation of TFR can drive allergic sensitization.

In conclusion, we show that IL-1 inhibits the development of allergic responses by promoting the non-allergic, IgG/Fc γ RIIb pathway for the antigen in TFH/TFR/GCB as well as in mast cells. In contrast, a lack of IL-1 or a lack of IL-1R2 in TFR may promote allergic responses and anaphylaxis.

REFERENCES

1. Devereux G. The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(11):869-874. doi:10.1038/nri1958
2. Genuneit J, Seibold AM, Apfelbacher CJ, et al. Overview of systematic reviews in allergy epidemiology. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2017;72(6):849-856. doi:10.1111/all.13123
3. Wu LC, Zarrin AA. The production and regulation of IgE by the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(4):247-259. doi:10.1038/nri3632
4. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med.* 2012;18(5):693-704. doi:10.1038/nm.2755
5. Pritchard DI, Falcone FH, Mitchell PD. The evolution of IgE-mediated type I hypersensitivity and its immunological value. *Allergy.* 2021;76(4):1024-1040. doi:10.1111/all.14570
6. Heyman B. Antibodies as Natural Adjuvants BT - Fc Receptors. In: Daeron M, Nimmerjahn F, eds. Cham: Springer International Publishing; 2014:201-219. doi:10.1007/978-3-319-07911-0_9
7. Bachmann MF, Mohsen MO, Kramer MF, Heath MD. Vaccination against Allergy: A Paradigm Shift? *Trends Mol Med.* 2020. doi:https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.01.007
8. van de Veen W, Akdis M. Role of IgG 4 in IgE-mediated allergic responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(5):1434-1435. doi:10.1016/j.jaci.2016.07.022
9. Engeroff P, Plattner K, Storni F, et al. Glycan-specific IgG anti-IgE autoantibodies are protective against allergic anaphylaxis in a murine model. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147(4):1430-1441. doi:10.1016/j.jaci.2020.11.031
10. Uermösi C, Zabel F, Manolova V, et al. IgG-mediated down-regulation of IgE bound to mast cells: a potential novel mechanism of allergen-specific desensitization. *Allergy.* 2014;69(3):338-347. doi:10.1111/all.12327
11. Kanagaratham C, El Ansari YS, Lewis OL, Oettgen HC. IgE and IgG Antibodies as Regulators of Mast Cell and Basophil Functions in Food Allergy. *Front Immunol.* 2020;11:603050. doi:10.3389/fimmu.2020.603050
12. Jutel M, Akdis CA. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2011;66(6):725-732. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02589.x
13. Jutel M, Agache I, Bonini S, et al. International consensus on allergy immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(3):556-568. doi:10.1016/j.jaci.2015.04.047
14. Jutel M, Agache I, Bonini S, et al. International Consensus on Allergen Immunotherapy II: Mechanisms, standardization, and pharmacoeconomics. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(2):358-368. doi:10.1016/j.jaci.2015.12.1300
15. Musa F, Al-Ahmad M, Arifhodzic N, Al-Herz W. Compliance with allergen immunotherapy and factors affecting compliance among patients with respiratory allergies. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(3):514-517. doi:10.1080/21645515.2016.1243632
16. Orenco JM, Radin AR, Kamat V, et al. Treating cat allergy with monoclonal IgG antibodies that bind allergen and prevent IgE engagement. *Nat Commun.* 2018;9(1):1421. doi:10.1038/s41467-018-03636-8
17. Storni F, Cabral-Miranda G, Roesti E, et al. A Single Monoclonal Antibody against the Peanut Allergen Ara h 2 Protects against Systemic and Local Peanut Allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2020;181(5):334-341. doi:10.1159/000505917
18. Kündig TM, Klimek L, Schendzielorz P, Renner WA, Senti G, Bachmann MF. Is The Allergen Really Needed in Allergy Immunotherapy? *Curr Treat Options Allergy.* 2015;2(1):72-82. doi:10.1007/s40521-014-0038-5

19. Qi H. T follicular helper cells in space-time. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(10):612-625. doi:10.1038/nri.2016.94
20. Yao Y, Chen C-L, Yu D, Liu Z. Roles of follicular helper and regulatory T cells in allergic diseases and allergen immunotherapy. *Allergy.* 2021;76(2):456-470. doi:10.1111/all.14639
21. Clement RL, Daccache J, Mohammed MT, et al. Follicular regulatory T cells control humoral and allergic immunity by restraining early B cell responses. *Nat Immunol.* 2019;20(10):1360-1371. doi:10.1038/s41590-019-0472-4
22. Dolence JJ, Kobayashi T, Iijima K, et al. Airway exposure initiates peanut allergy by involving the IL-1 pathway and T follicular helper cells in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142(4):1144-1158.e8. doi:10.1016/j.jaci.2017.11.020
23. Kobayashi T, Iijima K, Dent AL, Kita H. Follicular helper T cells mediate IgE antibody response to airborne allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(1):300-313.e7. doi:10.1016/j.jaci.2016.04.021
24. Gowthaman U, Chen JS, Eisenbarth SC. Regulation of IgE by T follicular helper cells. *J Leukoc Biol.* 2020;107(3):409-418. doi:10.1002/JLB.3RI1219-425R
25. Schulten V, Tripple V, Seumois G, et al. Allergen-specific immunotherapy modulates the balance of circulating Tfh and Tfr cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(2):775-777.e6. doi:10.1016/j.jaci.2017.04.032
26. Gowthaman U, Chen JS, Zhang B, et al. Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE. *Science (80-).* 2019;365(6456):eaaw6433. doi:10.1126/science.aaw6433
27. Xie MM, Chen Q, Liu H, et al. T follicular regulatory cells and IL-10 promote food antigen-specific IgE. *J Clin Invest.* 2020;130(7):3820-3832. doi:10.1172/JCI132249
28. Clement RL, Daccache J, Mohammed MT, et al. Follicular regulatory T cells control humoral and allergic immunity by restraining early B cell responses. *Nat Immunol.* 2019;20(10):1360-1371. doi:10.1038/s41590-019-0472-4
29. Ritvo P-G, Klatzmann D. Interleukin-1 in the Response of Follicular Helper and Follicular Regulatory T Cells. *Front Immunol.* 2019;10(February):1-7. doi:10.3389/fimmu.2019.00250
30. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27(1):519-550. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612
31. Ritvo P-GG, Churlaud G, Quiniou V, et al. T_{fr} 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
32. Engeroff P, Belbézier A, Monsel A, Klatzmann D. Anakinra reduces lung inflammation in experimental acute lung injury. *Immunity, Inflamm Dis.* December 2021. doi:10.1002/iid3.548
33. Engeroff P, Caviezel F, Mueller D, Thoms F, Bachmann MF, Vogel M. CD23 provides a noninflammatory pathway for IgE-allergen complexes. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145(1):301-311.e4. doi:10.1016/j.jaci.2019.07.045
34. Moritz DR, Rodewald HR, Gheyselinck J, Klemenz R. The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. *J Immunol.* 1998;161(9):4866-4874.
35. Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol.* 2001;1:69. <https://doi.org/10.1038/35095579>.
36. von Mutius E, Vercelli D. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(12):861-868. doi:10.1038/nri2871
37. Stein MM, Hrusch CL, Gozdz J, et al. Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. *N Engl J Med.* 2016;375(5):411-421. doi:10.1056/NEJMoa1508749

38. Depner M, Taft DH, Kirjavainen P V, et al. Maturation of the gut microbiome during the first year of life contributes to the protective farm effect on childhood asthma. *Nat Med*. 2020;26(11):1766-1775. doi:10.1038/s41591-020-1095-x
39. Feehley T, Plunkett CH, Bao R, et al. Healthy infants harbor intestinal bacteria that protect against food allergy. *Nat Med*. 2019;25(3):448-453. doi:10.1038/s41591-018-0324-z
40. Stefka AT, Feehley T, Tripathi P, et al. Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(36):13145-13150. doi:10.1073/pnas.1412008111
41. Engeroff P, Caviezel F, Storni F, Thoms F, Vogel M, Bachmann MF. Allergens displayed on virus-like particles are highly immunogenic but fail to activate human mast cells. *Allergy*. 2018;73(2):341-349. doi:10.1111/all.13268
42. Storni F, Zeltins A, Balke I, et al. Vaccine against peanut allergy based on engineered virus-like particles displaying single major peanut allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(4):1240-1253.e3. doi:https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.12.007
43. Schmitz N, Dietmeier K, Bauer M, et al. Displaying Fel d1 on virus-like particles prevents reactogenicity despite greatly enhanced immunogenicity: a novel therapy for cat allergy. *J Exp Med*. 2009;206(9):1941-1955. doi:10.1084/jem.20090199
44. Nakae S, Asano M, Horai R, Sakaguchi N, Iwakura Y. IL-1 Enhances T Cell-Dependent Antibody Production Through Induction of CD40 Ligand and OX40 on T Cells. *J Immunol*. 2001;167(1):90 LP - 97. doi:10.4049/jimmunol.167.1.90
45. Tahtinen S, Tong A-J, Himmels P, et al. IL-1 and IL-1ra are key regulators of the inflammatory response to RNA vaccines. *Nat Immunol*. 2022;23(April). doi:10.1038/s41590-022-01160-y
46. Muñoz-Wolf N, Lavelle EC. A Guide to IL-1 family cytokines in adjuvanticity. *FEBS J*. 2018;285(13):2377-2401. doi:10.1111/febs.14467
47. Tam JS, Jackson WT, Hunter D, Proud D, Grayson MH. Rhinovirus specific IgE can be detected in human sera. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(5):1241-1243. doi:10.1016/j.jaci.2013.07.011
48. Ownby DR, Peterson EL, Joseph CLM, et al. The Development of Anti-Tetanus IgE Antibodies in the First 2 Years of Life. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(2):S89. doi:10.1016/j.jaci.2007.12.357
49. Cruz AA, Cooper PJ, Figueiredo CA, Alcantara-Neves NM, Rodrigues LC, Barreto ML. Global issues in allergy and immunology: Parasitic infections and allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(5):1217-1228. doi:https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.005
50. Hültner L, Kölsch S, Stassen M, et al. In Activated Mast Cells, IL-1 Up-Regulates the Production of Several Th2-Related Cytokines Including IL-9. *J Immunol*. 2000;164(11):5556 LP - 5563. doi:10.4049/jimmunol.164.11.5556
51. Nakamura Y, Franchi L, Kambe N, Meng G, Strober W, Núñez G. Critical role for mast cells in interleukin-1 β -driven skin inflammation associated with an activating mutation in the nlrp3 protein. *Immunity*. 2012;37(1):85-95. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.013
52. A. NP, A. BB, A. MP, et al. Mast cells contribute to initiation of autoantibody-mediated arthritis via IL-1. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(7):2325-2330. doi:10.1073/pnas.0610852103
53. Hagaman DD, Okayama Y, D'Ambrosio C, Prussin C, Gilfillan AM, Metcalfe DD. Secretion of Interleukin-1 Receptor Antagonist from Human Mast Cells after Immunoglobulin E-Mediated Activation and after Segmental Antigen Challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;25(6):685-691. doi:10.1165/ajrcmb.25.6.4541
54. Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol*. 2010;3(2):111-128. doi:10.1038/mi.2009.136

55. Aguiar CL, Pan N, Adams A, Barinstein L, Lehman TJ. Anaphylaxis to anakinra in a pediatric patient with systemic juvenile idiopathic arthritis successfully treated with canakinumab: a case-based review. *Clin Rheumatol*. 2015;34(10):1821-1824. doi:10.1007/s10067-015-2889-y
56. Atagündüz P, Keser G, Soy M. Interleukin-1 Inhibitors and Vaccination Including COVID-19 in Inflammatory Rheumatic Diseases: A Nonsystematic Review. *Front Immunol*. 2021;12:734279. doi:10.3389/fimmu.2021.734279
57. Lama JK, Iijima K, Kobayashi T, Kita H. Blocking the inhibitory receptor programmed cell death 1 prevents allergic immune response and anaphylaxis in mice. *J Allergy Clin Immunol*. January 2022. doi:10.1016/j.jaci.2022.01.014
58. Van Den Eeckhout B, Tavernier J, Gerlo S. Interleukin-1 as Innate Mediator of T Cell Immunity . *Front Immunol* . 2021;11.
59. Chang X, Zha L, Wallimann A, et al. Low-affinity but high-avidity interactions may offer an explanation for IgE-mediated allergen cross-reactivity. *Allergy*. 2021;76(8):2565-2574. doi:10.1111/all.14864
60. Jacobsen JT, Hu W, R Castro TB, et al. Expression of Foxp3 by T follicular helper cells in end-stage germinal centers. *Science*. 2021;373(6552). doi:10.1126/science.abe5146
61. Saunders SP, Ma EGM, Aranda CJ, Curotto de Lafaille MA. Non-classical B Cell Memory of Allergic IgE Responses. *Front Immunol*. 2019;10(April):715. doi:10.3389/fimmu.2019.00715
62. Beutier H, Gillis CM, Iannascoli B, et al. IgG subclasses determine pathways of anaphylaxis in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(1):269-280.e7. doi:10.1016/j.jaci.2016.03.028
63. Gillis CM, Jönsson F, Mancardi DA, et al. Mechanisms of anaphylaxis in human low-affinity IgG receptor locus knock-in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(4):1253-1265.e14. doi:10.1016/j.jaci.2016.06.058
64. Jensen-Jarolim E, Bachmann MF, Bonini S, et al. State-of-the-art in marketed adjuvants and formulations in Allergen Immunotherapy: A position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). *Allergy*. 2020;75(4):746-760. doi:10.1111/all.14134
65. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*. 2012;119(24):5640-5649. doi:https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-380121

FIGURE LEGEND:

Figure 1: IL-1 enhances the IgG:IgE ratio and reduces allergic anaphylaxis.

Mice were immunized with OVA, OVA+IL-1 or treated with Anakinra (OVA+Anakina), serum was collected at day 0 and day 21. A) Shown are mean \pm SEM OD50 titers of OVA-specific IgG. B) Mean \pm SEM total IgE levels ($\mu\text{g/ml}$). C) Mean \pm SEM OD450 values of OVA-specific IgE. D) Specific IgG to specific IgE ratio. E) Wild type or IL-1RaKO mice were immunized with OVA. Shown are mean \pm SEM OD50 titers of OVA-specific IgG. F) Mean \pm SEM total IgE levels ($\mu\text{g/ml}$). G) Mean \pm SEM OD450 values of OVA-specific IgE. H) Specific IgG to specific IgE ratio. At day 28, mice were challenged i.v. with OVA and body temperature was followed at 10 minute intervals. Shown are mean \pm SEM degrees lost compared to baseline temperature in OVA, OVA+IL-1, or OVA+Anakinra mice. I) Shown are mean \pm SEM degrees lost compared to baseline temperature in Wild type or IL-1RaKO mice.

Figure 2: IL-1 β promotes the IgG/Fc γ RIIb-mediated inhibition of effector cell degranulation

The impact of D21 immunized serum on OVA binding to effector cells is shown as the mean \pm SEM relative OVA-A488 MFI fold change compared to naive serum. A) OVA-A488 binding to basophils in presence of 1:10 serum. B) OVA-A488 binding to BMDCs in presence of 1:10 serum. C) The impact of D21 immunized serum on effector cell degranulation is shown as the mean \pm SEM anti-CD63 MFI fold change relative to non-challenged cells (baseline). D) Serum inhibition assay with basophils in presence of 1:1000 serum. E) Serum inhibition assay with sensitized BMDCs in presence of 1:1000 serum. F) OVA challenge at day 28 in presence of anti-Fc γ RIIb blocking antibody or isotype control antibody. Shown are mean \pm SEM degrees lost compared to baseline temperature.

Figure 3: IL-1 β promotes Fc γ RIIb expression and reduces the reactivity of mast cells

Mice were immunized with OVA, OVA+IL-1, or OVA+Anakinra and PMCs were investigated at day 28. A) Shown are mean \pm SEM PMC frequencies. B) Mean \pm SEM anti-Fc ϵ RI MFI in PMC. C) Mean \pm SEM Fc γ RIIb MFI in PMC. D) Fc γ RIIb:Fc ϵ RI MFI ratio. E) OVA-immunized mice were injected with s.c. PBS or IL-1 at day 21. At day 22, PMC were investigated by flow cytometry. Shown is the mean \pm SEM anti-Fc ϵ RI MFI in PMC. F) Shown is the mean \pm SEM Fc γ RIIb MFI in PMC. G)

Alternatively, mice were challenged with OVA at day 22. Shown are mean \pm SEM degrees lost compared to baseline temperature. H) BMMCs were treated with various concentrations of IL-1 β for 48h. Shown are mean \pm SEM anti-Fc γ RIIb and anti-Fc ϵ RI MFI fold changes compared to unstimulated control cells. I) Representative BMMC raw histograms of anti-Fc ϵ RI and anti-Fc γ RIIb expression in absence or presence of 0.2ug/ml IL-1 β for 48h. J) Sensitized BMMCs were primed for 48h with 0.2ug/ml IL-1 β . OVA was mixed with serum from D21 OVA immunized WT mice and added to IL-1 β primed or non-primed BMMCs in additional presence or absence of anti-Fc γ RIIb. Shown is the mean \pm SEM relative anti-CD63 expression compared to untreated control cells.

Figure 4: FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice display a reduced IgG:IgE ratio and enhanced anaphylaxis

A) CD4^{cre} (WT), or CD4^{cre}IL-1R1^{lox} were immunized s.c. with OVA/Alum at day 0 and day 14 and serum was collected at day 0 and day 21. Shown are mean \pm SEM OD50 titers of OVA-specific IgG . B) Mean \pm SEM \pm SEM total IgE levels (ug/ml). C) Mean \pm SEM OD450 values of OVA-specific IgE. D) Mean \pm SEM specific IgG to specific IgE ratio. E) FoxP3^{cre}(WT) or FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice were immunized s.c. with OVA/Alum at day 0 and day 14 and serum was collected at day 0 and day 21. Shown are mean \pm SEM OD50 titers of OVA-specific IgG . F) Mean \pm SEM \pm SEM total IgE levels (ug/ml). G) Mean \pm SEM OD450 values of OVA-specific IgE. H) Mean \pm SEM specific IgG to specific IgE ratio. I) CD4^{cre}IL-1R1^{lox} were challenged i.v with OVA at day 28. Shown are Mean \pm SEM degrees lost compared to baseline temperature. J) FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} were challenged i.v with OVA at day 28. Shown are Mean \pm SEM degrees lost compared to baseline temperature.

Figure 5: Dysregulated IgG/IgE balance drives anaphylaxis in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice

FoxP3^{cre}(WT) or FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice were immunized s.c. with OVA/Alum at day 0 and day 14. A) Mean \pm SEM Basophil frequency at day 21. B) Mean \pm SEM basophil anti-IgE MFI at day 21. C) Mean \pm SEM Basophil anti-CD63 MFI upon OVA challenge. D) OVA-A488 binding to basophils in presence of 1:10 serum. E) Serum inhibition assay with basophils in presence of 1:1000 serum. F) OVA-A488 binding to BMMCs in presence of 1:100 serum. G) Serum inhibition assay with BMMCs in presence of 1:1000 serum. H) 1 hour before OVA challenge at day 28, anti-Fc γ RIIb blocking antibody or isotype

control antibody was i.v. injected. Body temperature was followed at 10 minute intervals. Mean \pm SEM degrees lost compared to baseline temperature..

Figure 6: TFR from FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice proliferate upon IL-1 β and/or OVA re-stimulation

WT or foxp3^{cre}IL-1R2^{lox} mice were immunized s.c. with OVA/Alum at day 0 and day 14. At day 23, spleens were isolated and re-stimulated ex vivo with IL-1, OVA or OVA+IL-1 β for 48 hours. A) Shown is the gating strategy of proliferating CD4⁺ cells defined as FSH^{hi}KI-67⁺ in unstimulated cells (left panel) versus IL-1+OVA stimulated cells (right panel) and the expression of PD-1/Foxp3 (lower panels). B) Mean \pm SEM frequency of total proliferating follicular T cells in CD4⁺. C) Mean \pm SEM frequency of proliferating TFR cells in CD45⁺. D) Mean \pm SEM frequency of proliferating TFH cells in CD45⁺. E) Mean \pm SEM frequency of proliferating CD19⁺ cells in CD45⁺. F) Anakinra was added to the 48 hour re-stimulation with IL-1, OVA or OVA+IL-1. Shown is the mean \pm SEM frequency of proliferating TFR cells in CD4⁺.

Figure 7: IL-1 β protects sensitized mice from systemic and oral allergen challenge

OVA-sensitized mice were treated three times with OVA or OVA+IL-1 β in PBS at day 16, 18, 20. Serum was collected before treatment and at day 40. A) Shown are mean \pm SEM OD50 titers of OVA-specific IgG over time. B) Mean \pm SEM total IgE levels (μ g/ml) over time. C) Mean \pm SEM OD450 values of OVA-specific IgE over time. D) At day 60, Basophils from OVA or OVA+IL-1 β treated mice were challenged with OVA in presence of 1:1000 naive, OVA or OVA+IL-1 β serum from day 60. Shown is the inhibition of anti- CD63 MFI compared to naive serum. E) At day 41, mice were challenged i.v. with OVA. Shown are mean \pm SEM degrees lost compared to baseline temperature. F) A second challenge was done at day 65 whereas one group had an extra injection of IL-1 β in PBS at day 64. Shown are mean \pm SEM degrees lost compared to baseline temperature. G) At the end of the experiment, PMC were isolated. Shown is the mean \pm SEM anti-Fc ϵ RI MFI. H) Mean \pm SEM anti-Fc γ RIIb MFI in PMC. I) BALB/c mice were sensitized i.p. at day 0 and day 10 with OVA or OVA+IL-1 β before an cycle of p.o. OVA challenges starting at day 20. Shown is the mean \pm SEM of maximal temperature drops measured for individual mice. J) Shown are mean \pm SEM food allergy scores. K) At day 40, a second cycle of p.o challenges was performed with addition of s.c. PBS or IL-1 β before each challenge.

Shown is the mean \pm SEM of maximal temperature drops measured for individual mice. L) Shown are mean \pm SEM food allergy scores.

SUPPLEMENTARY MATERIALS :

Suppl.Figure 1: IgG and basophil kinetics

Mice were immunized s.c. with OVA/Alum at day 0 and day 14. A) Mean \pm SEM OD50 titers of OVA-specific IgG at day 0, 7, 14 and 21. B) Mean \pm SEM OD50 titers of OVA-specific IgG1 at day 7, 14 and 21. C) Mean \pm SEM OD50 titers of OVA-specific IgG2b at day 7, 14 and 21. D) Mean \pm SEM Basophil frequencies at day 7, 14, 21. E) Gating strategy for whole blood basophils investigated at day 21 by flow cytometry gated as CD117-, CD19-, CD45^{lo}, CD49b+, IgE+. F) Mean \pm SEM anti-IgE MFI in basophils at day 7, 14, 21. G) Mean \pm SEM anti-IgG MFI in basophils at day 7, 14, 21. H) Mice were immunized with OVA, OVA+Anakinra, or OVA+IL-1. Shown are mean \pm SEM Basophil frequencies I) Mean \pm SEM anti-IgE MFI in basophils J) Mean \pm SEM anti-IgG MFI in basophils. K) Mean \pm OD50 titers of OVA-specific IgG1. L) Mean \pm OD50 titers of OVA-specific IgG2a M) Mean \pm OD50 titers of OVA-specific IgG2b. N) Specific IgG to total IgE ratio

Suppl.Figure 2: Basophils and anaphylaxis

Mice were immunized with OVA, OVA+IL-1 or OVA+Anakinra. A) Mean \pm SEM anti-CD63 MFI upon 5nM OVA with titrated serum from D21 OVA immunized mice. B) OVA-A488 titration to 1:10 serum from D21 OVA immunized mice. Shown is the mean \pm SEM OVA-A488 fold change relative to naive serum. C) Serum from D21 OVA immunized mice titrated to 25nM OVA. Shown is the mean \pm SEM anti-IgG MFI fold change relative to naive serum. D) OVA-A488 binding to naive basophils and D21 immunized basophils in additional presence of D21 OVA serum, and Fc γ Block. Shown is the mean \pm SEM OVA-A488 MFI. E) IgG binding to naive basophils and D21 immunized basophils in additional presence of D21 OVA serum, and Fc γ Block. Shown is the mean \pm SEM anti-IgG MFI. F) OVA-A488 binding in presence of titrated WT or IL-1RaKO serum. G) anti-CD63 MFI in presence of titrated WT or IL-1RaKO serum. H) OVA sensitized mice were treated with IL-1, IL-1 + Anakinra or IL-1 + anti-Fc γ RIIb for 24 hours and challenged the next day. I) Anaphylaxis in OVA+Anakinra immunized mice in presence of isotype antibody or anti-Fc γ RIIb antibody.

Suppl. Figure 3: Mast cells characterization and supplements

A) Shown is the gating strategy of BMMCs based on SSC/FSC (left panel) and CD117 and anti-FcεRI (right panel). C) Shown is the mean ± SEM anti-IgE MFI demonstrating IgE binding to BMMCs after incubation for 24 hours with naïve or OVA serum. D) The impact of D21 immunized serum (1:100 diluted) on OVA binding to BMMCs shown as mean ± SEM OVA-488 MFI. E) Serum titration with 25nM OVA-488. F) The impact of 48h IL-1β priming on OVA-488 binding in presence or absence of Fcγ-Block. G) The impact of IL-1 priming on IgG binding to BMMCs shown as mean ± SEM anti-IgG MFI. H) Serum inhibition titration of BMMC activation compared to OVA only stimulated BMMCs. I) Gating strategy for peritoneal mast cells (PMC), defined as CD45+, F4/80-, CD117+, FcεRI+, IgE+.

Suppl. Figure 4: IL-1 promotes IgG and protection from anaphylaxis in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} and CD4^{cre}IL-1R1^{lox}

A) WT or CD4^{cre}IL-1R1^{lox} mice were immunized with OVA or OVA+IL-1 at day 0 and day 14, serum was collected at day 0 and day 21. Shown are mean ± SEM OD50 titers of OVA-specific IgG. B) Mean ± SEM total IgE levels (μg/ml). C) Mean ± SEM OD450 values of OVA-specific IgE. D) FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice were immunized with OVA, OVA+Anakinra or OVA+IL-1 at day 0 and day 14, serum was collected at day 0 and day 21. Shown are mean ± SEM OD50 titers of OVA-specific IgG. E) Mean ± SEM total IgE levels (μg/ml). F) Mean ± SEM OD450 values of OVA-specific IgE. G) Mean ± SEM degrees lost in WT or CD4^{cre}IL-1R1^{lox} upon OVA challenge. H) Mean ± SEM degrees lost in WT or FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} upon OVA challenge.

Suppl. Figure 5 : Antibodies and Basophils in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox}

WT or foxp3^{cre}IL-1R2^{lox} mice were immunized s.c. with OVA/Alum at day 0 and day 14. A) Mean ± SEM Total IgE at day 0, 7, 14 and 21. B) Mean ± SEM OD50 titers of OVA-specific IgG1 at day 21. C) Mean ± SEM OD50 titers of OVA-specific IgG2a D) Mean ± SEM OD50 titers of OVA-specific IgG2b. E) Mean ± SEM specific IgG to total IgE ratio F) Mean ± SEM anti-IgE MFI in basophils at day 0, 14, 21. G) Mean ± SEM anti-IgG MFI in basophils at day 21. H) Foxp3^{cre}IL-1R2^{lox} mice were immunized with OVA,

OVA+Anakinra, OVA+IL-1 β and basophils were assessed at day 21. Shown is the mean \pm SEM basophil frequency. I) Mean \pm SEM anti-IgE MFI in basophils. J) Mean \pm SEM basophil anti-IgG MFI.

Suppl. Figure 6: FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice display reduced splenic B cell responses

WT or foxp3^{cre}IL-1R2^{lox} mice were immunized s.c. with OVA/Alum at day 0 and day 14. A) Gating strategy of T cells and B cells (upper left panel), GC B cells (lower left panel), follicular T cells (upper right panel), and TFH/TFR (lower right panel). B) Mean \pm SEM follicular T cells in CD4+. C) Mean \pm SEM TFH frequency in CD4+. D) Mean \pm SEM TFR frequency in CD4+. E) Mean \pm SEM CD19+ in lymphocytes. F) Mean \pm SEM GC B cell frequency in lymphocytes. G) Mean \pm SEM OVA+ frequency in GCB. H) Mean \pm SEM proliferating Ki-67+ frequency in GCB. I) Mean \pm SEM Ki-67+ in plasmablasts. Mean \pm SEM frequency of proliferating Ki-67+ proliferating cells in TFR. J) Mean \pm SEM frequency of Ki-67+ proliferating cells in TFH. K) Mean \pm SEM frequency of Ki-67+ proliferating cells in TFR. L) Mean \pm SEM apoptotic cells in CD19+.

Suppl. Figure 7: TFR proliferation in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox}

WT or foxp3^{cre}IL-1R2^{lox} mice were immunized s.c. with OVA/Alum at day 0 and day 14. At day 23, spleens were isolated and re-stimulated ex vivo with IL-1, OVA or OVA+IL-1 β for 48 hours. A) Shown are mean \pm SEM ki-67+ TFH in CD4+ cells B) Shown are mean \pm SEM Ki-67+ TFH in Tfol. C) Shown are mean \pm SEM ki-67+ TFR in Tfol. D) Shown are mean \pm SEM ki-67+ in CD19+ E) Mean \pm SEM anti-ICOS MFI of TFR. F) Mean \pm SEM anti-CD69 MFI of TFR. G) Mean \pm SEM TFR:TFH ratio. H) Mean \pm SEM frequency of CD4+ or CD19+ cells in lymphocytes displayed as fold change relative to unstimulated cells.

Figure 1: IL-1 enhances the IgG:IgE ratio and reduces allergic anaphylaxis

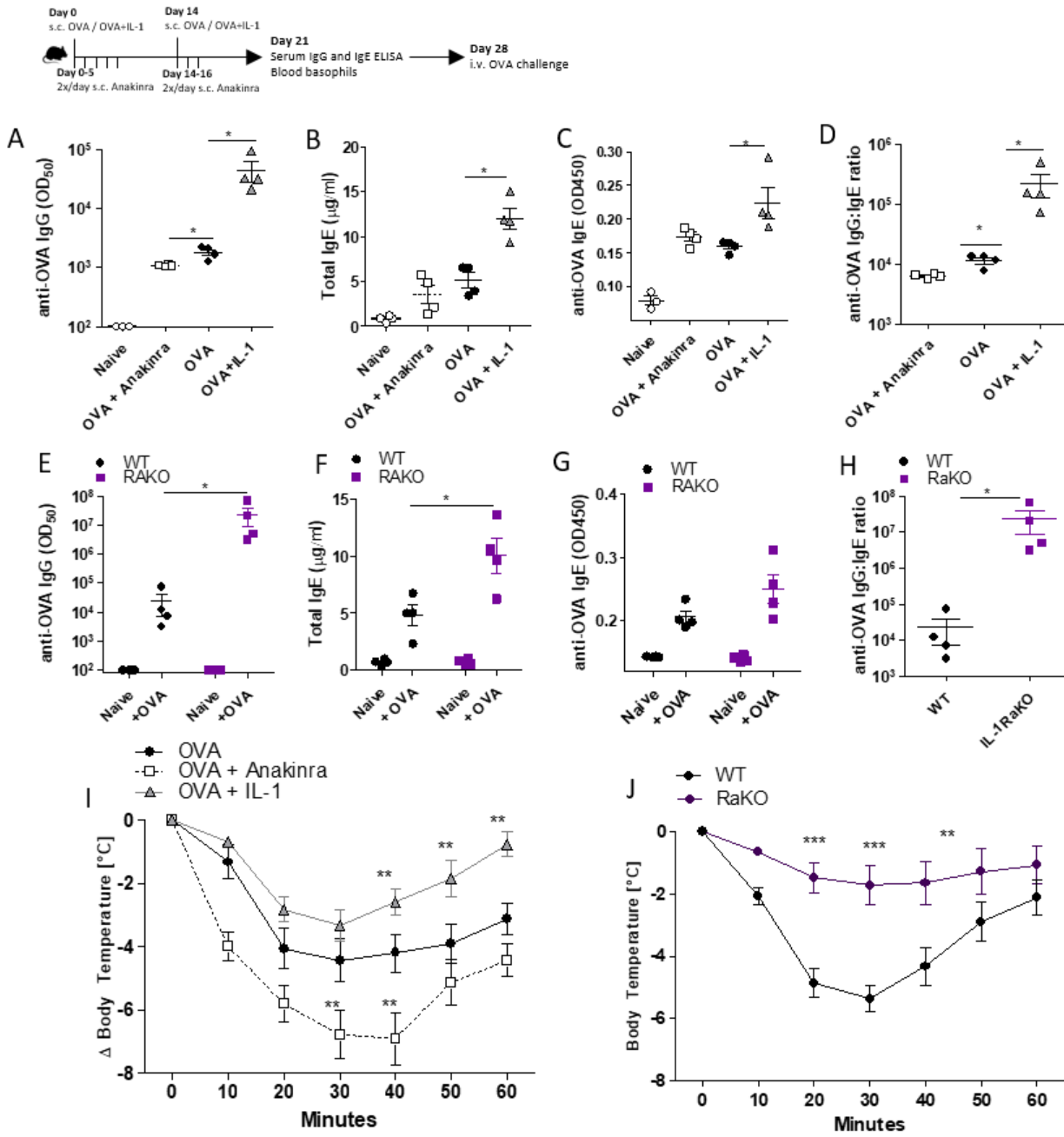


Figure 2: IL-1 β promotes the IgG/Fc γ R1Ib-mediated inhibition of effector cell degranulation

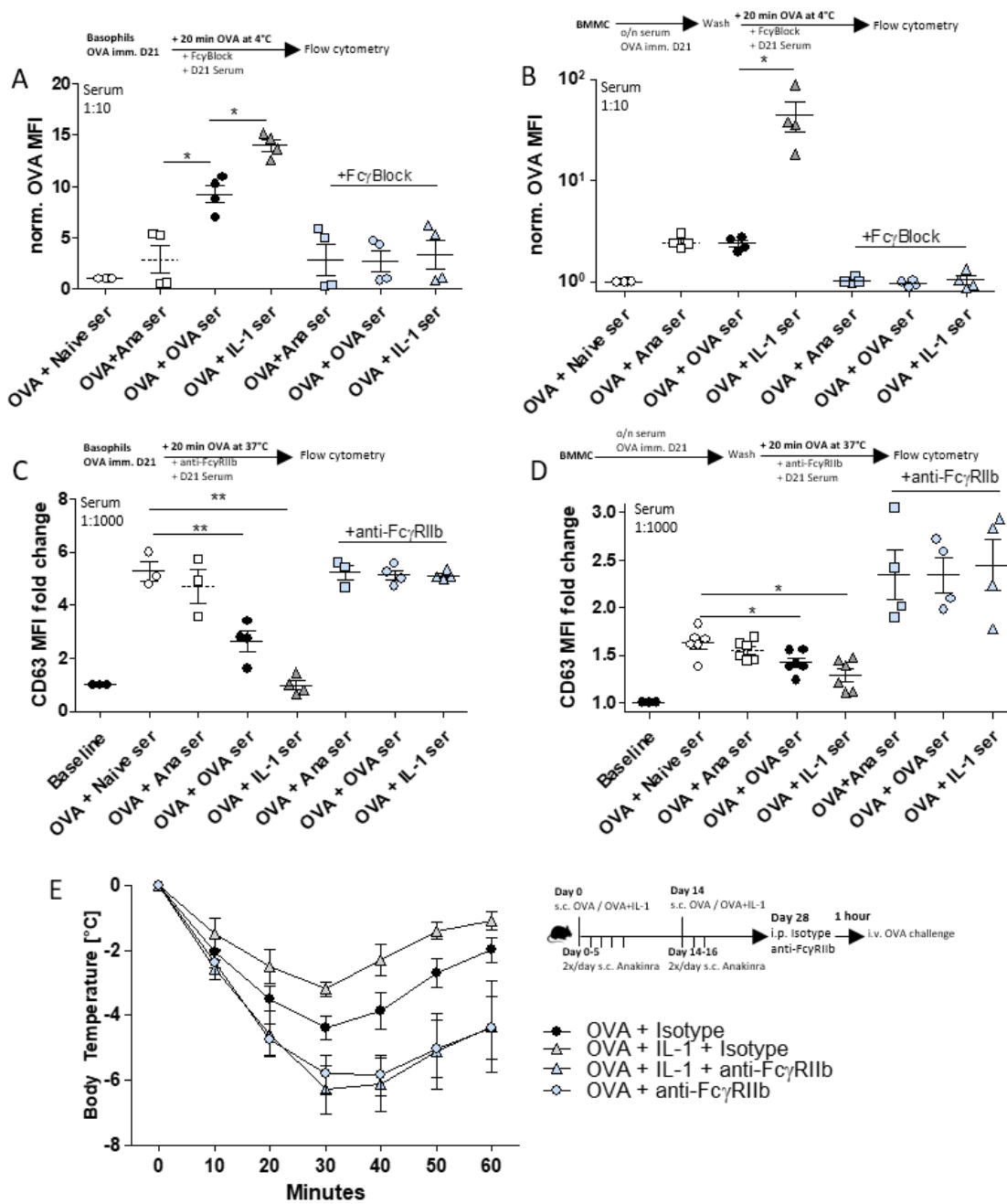


Figure 3: IL-1 β promotes Fc γ RIIb expression and reduces the reactivity of mast cells

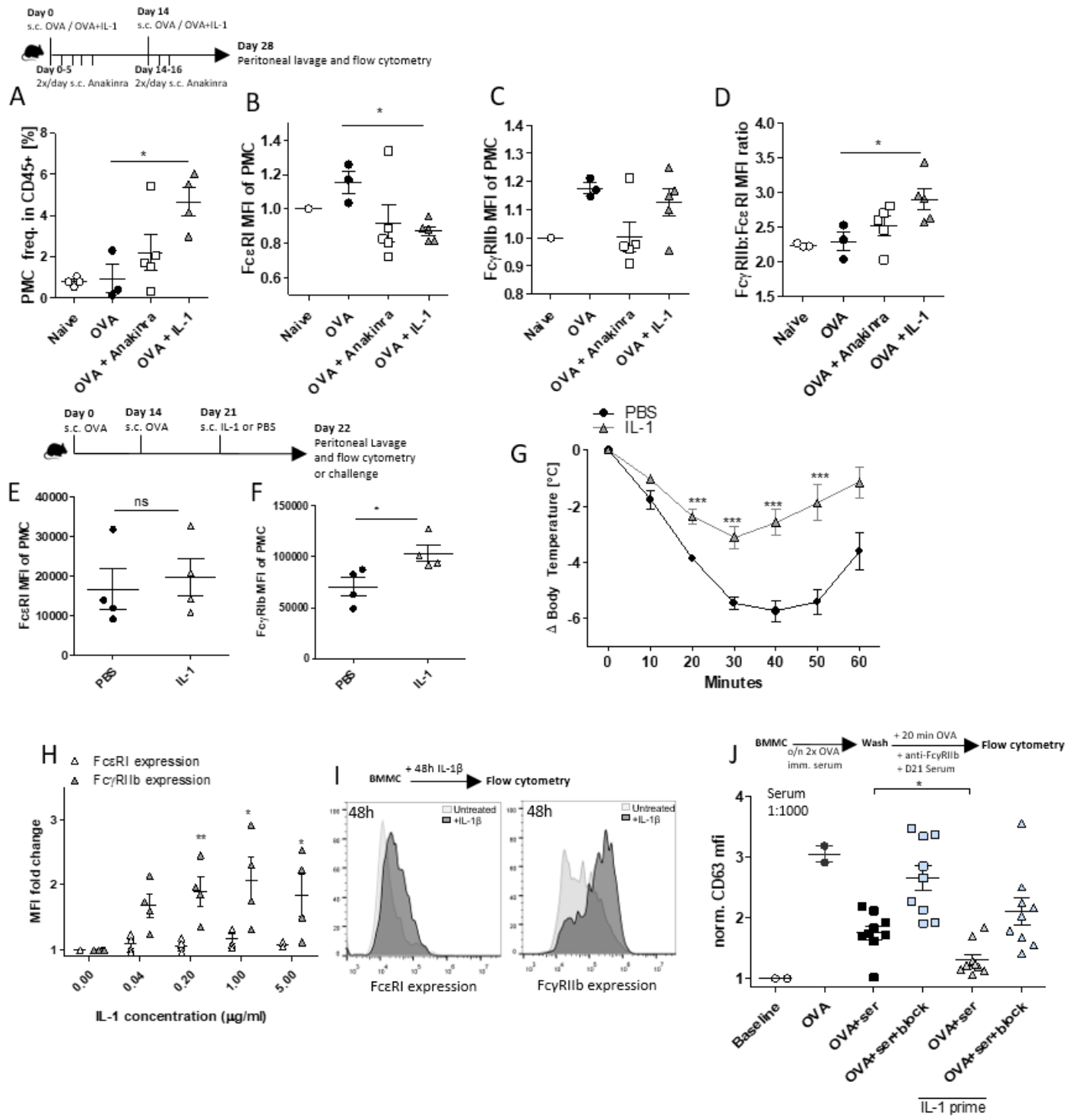


Figure 4: FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice display a reduced IgG:IgE ratio and enhanced anaphylaxis

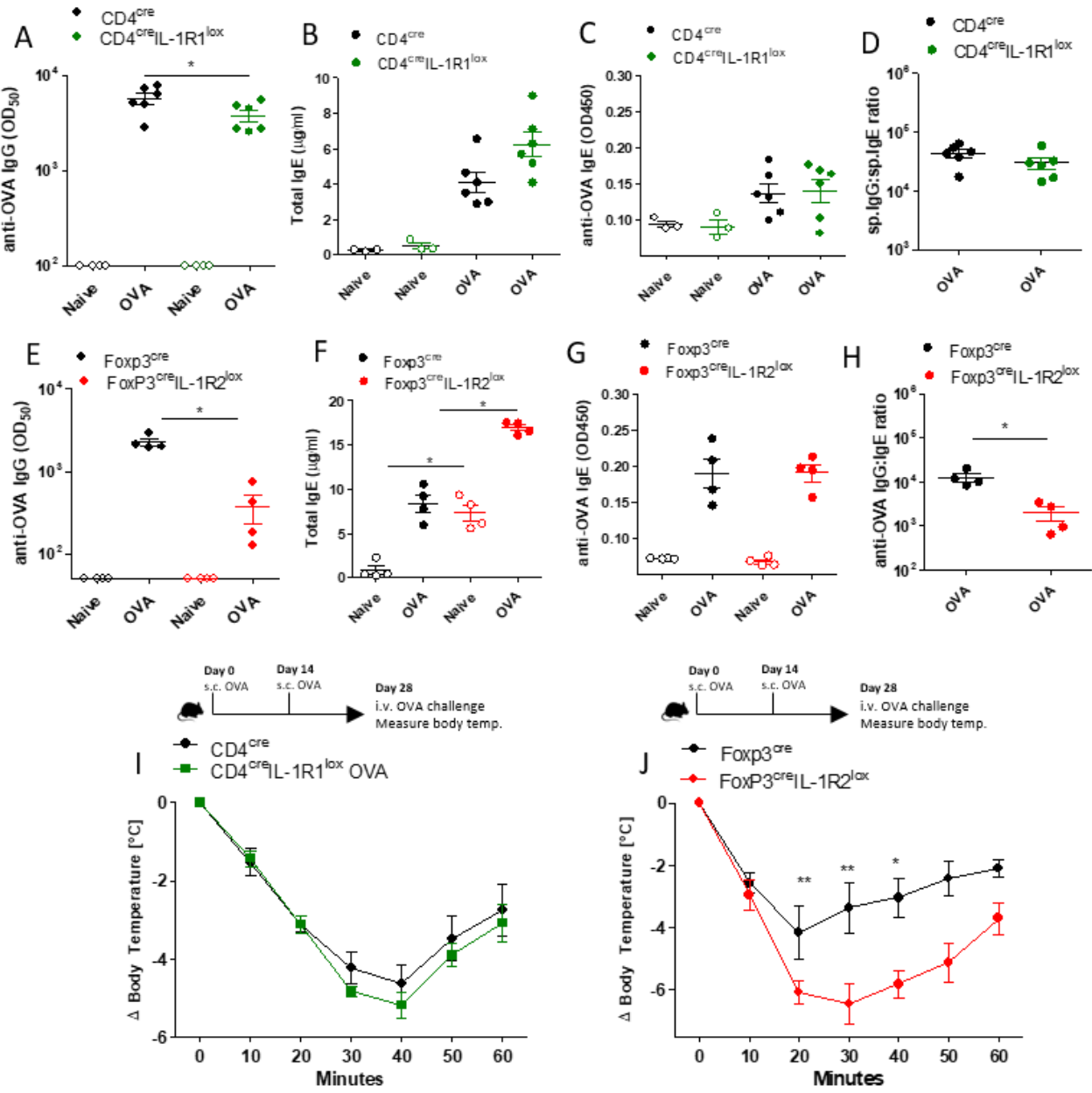


Figure 5: Dysregulated IgG/IgE balance drives anaphylaxis in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice

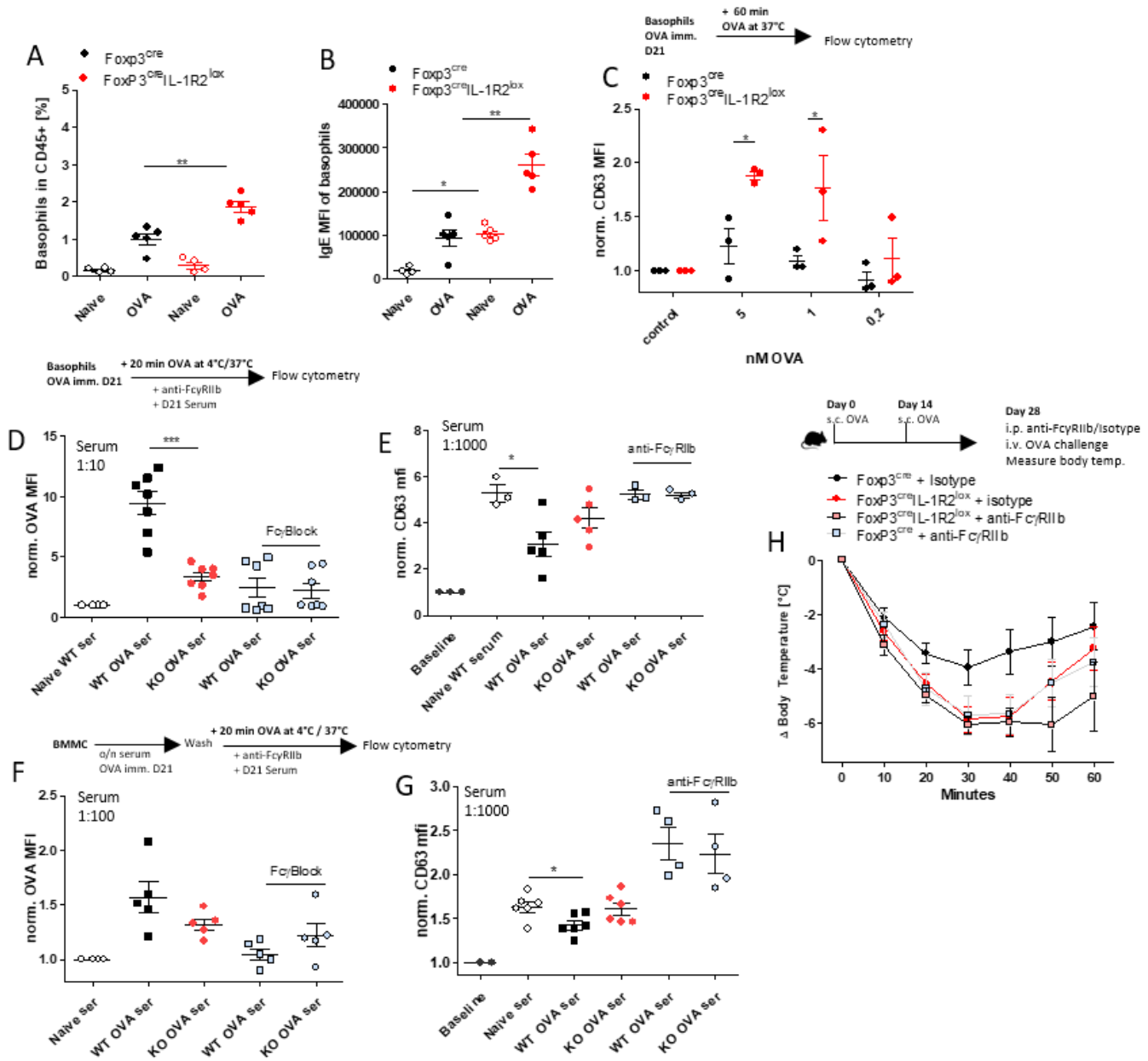


Figure 6: TFR from FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice proliferate upon IL-1 β and/or OVA re-stimulation

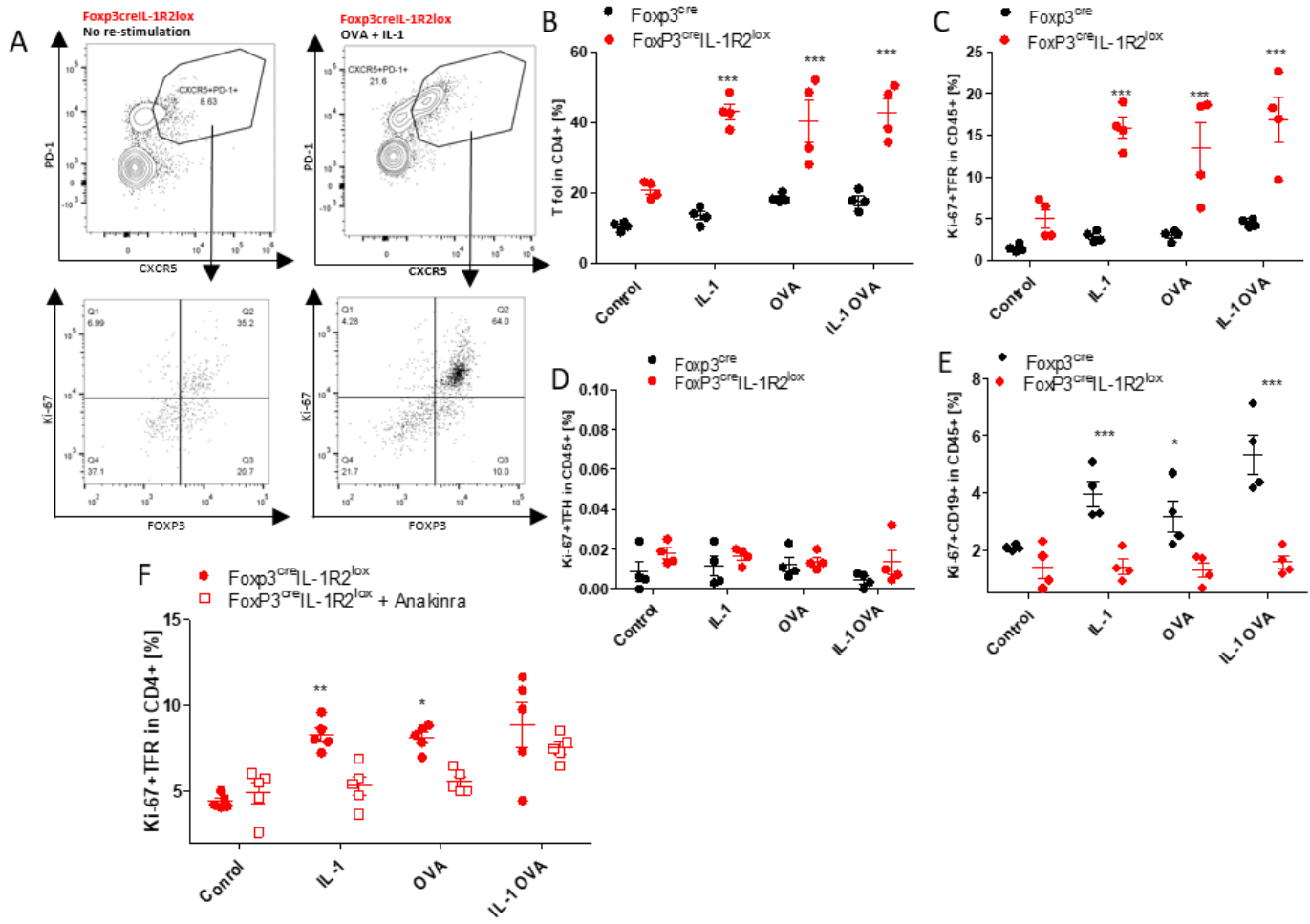
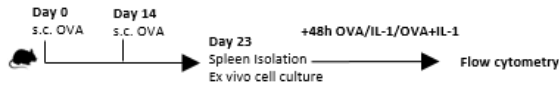
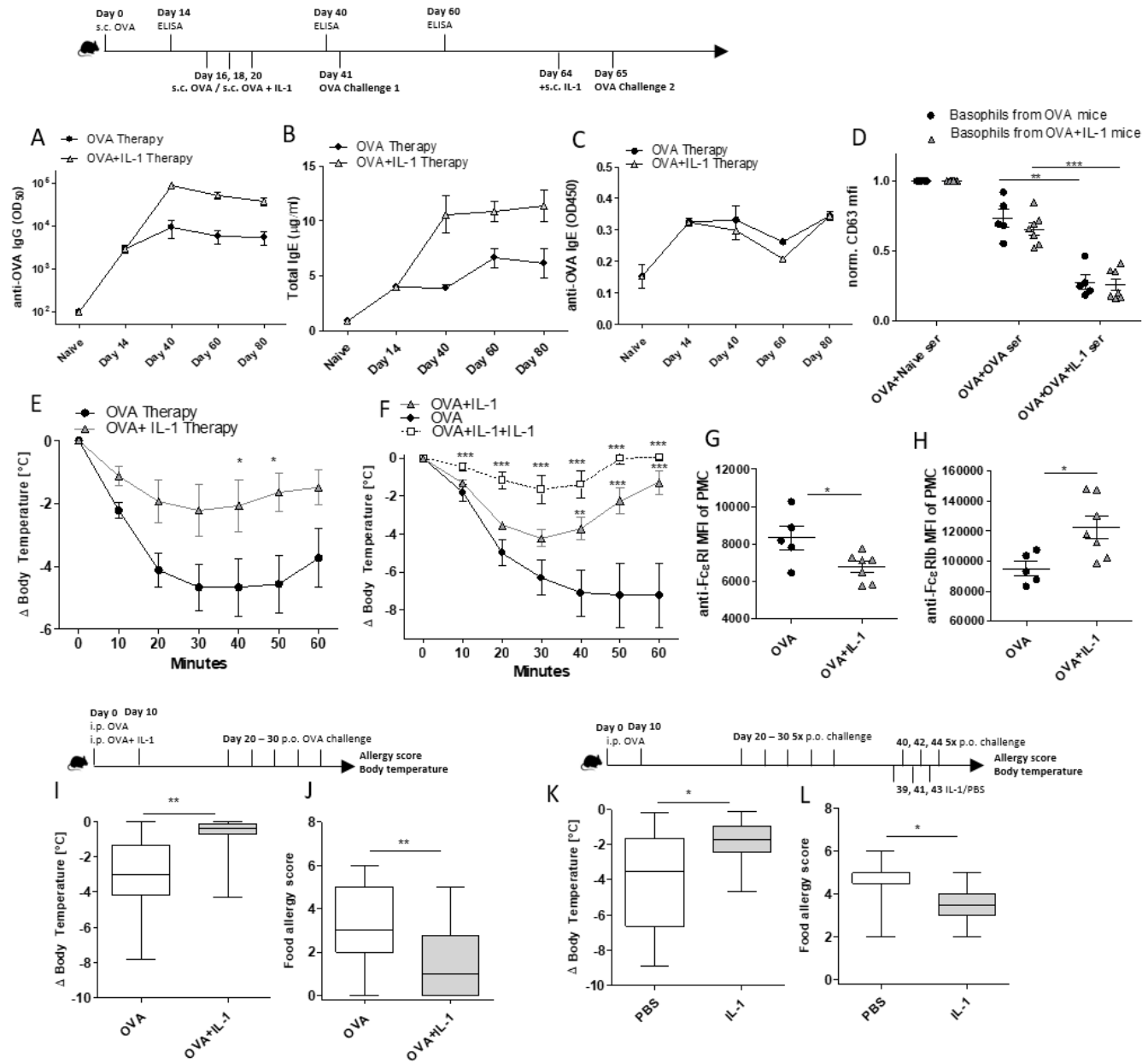
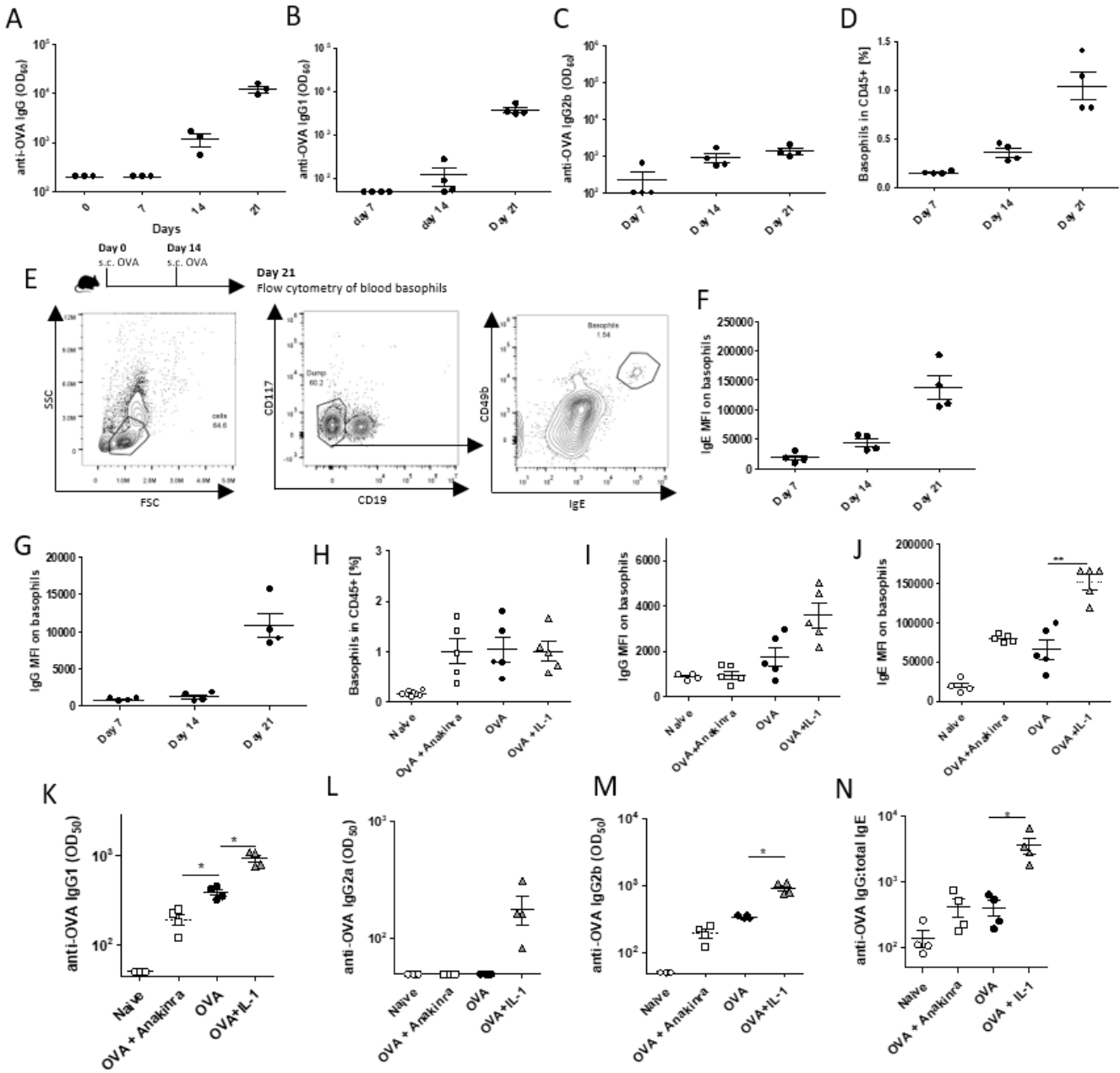


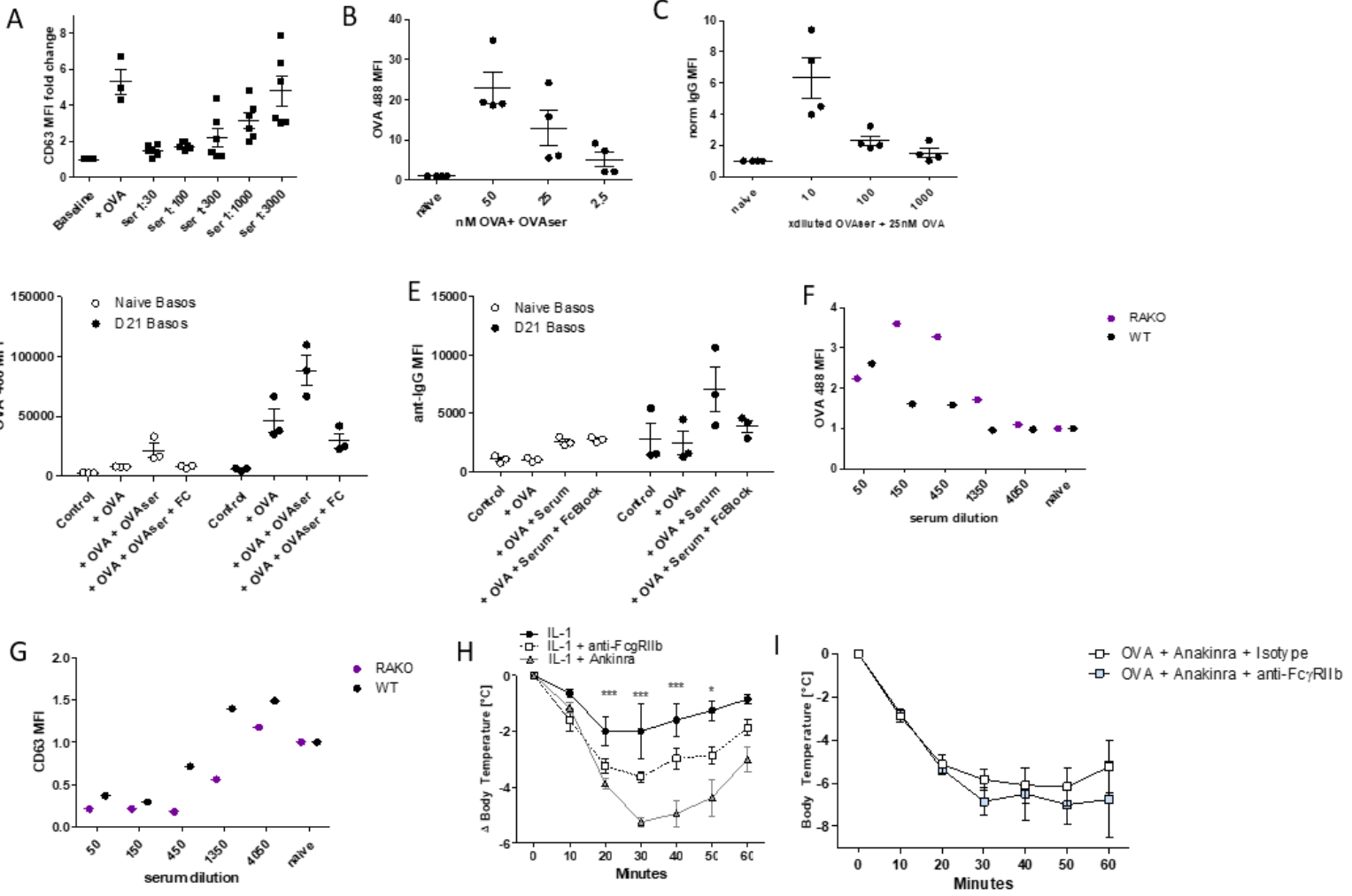
Figure 7: IL-1 β protects sensitized mice from systemic and oral allergen challenge



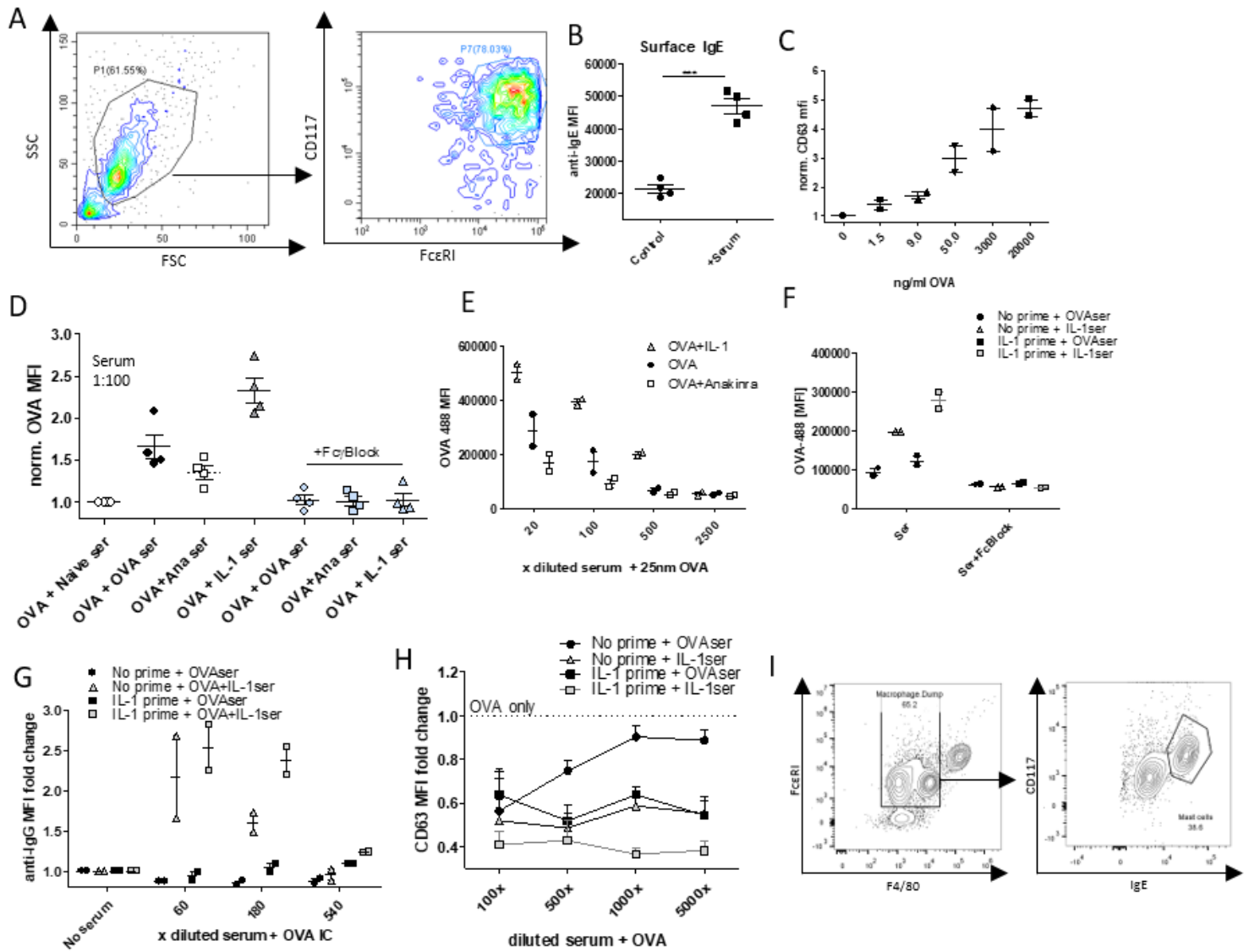
Suppl. Figure 1: IgG and basophil kinetics



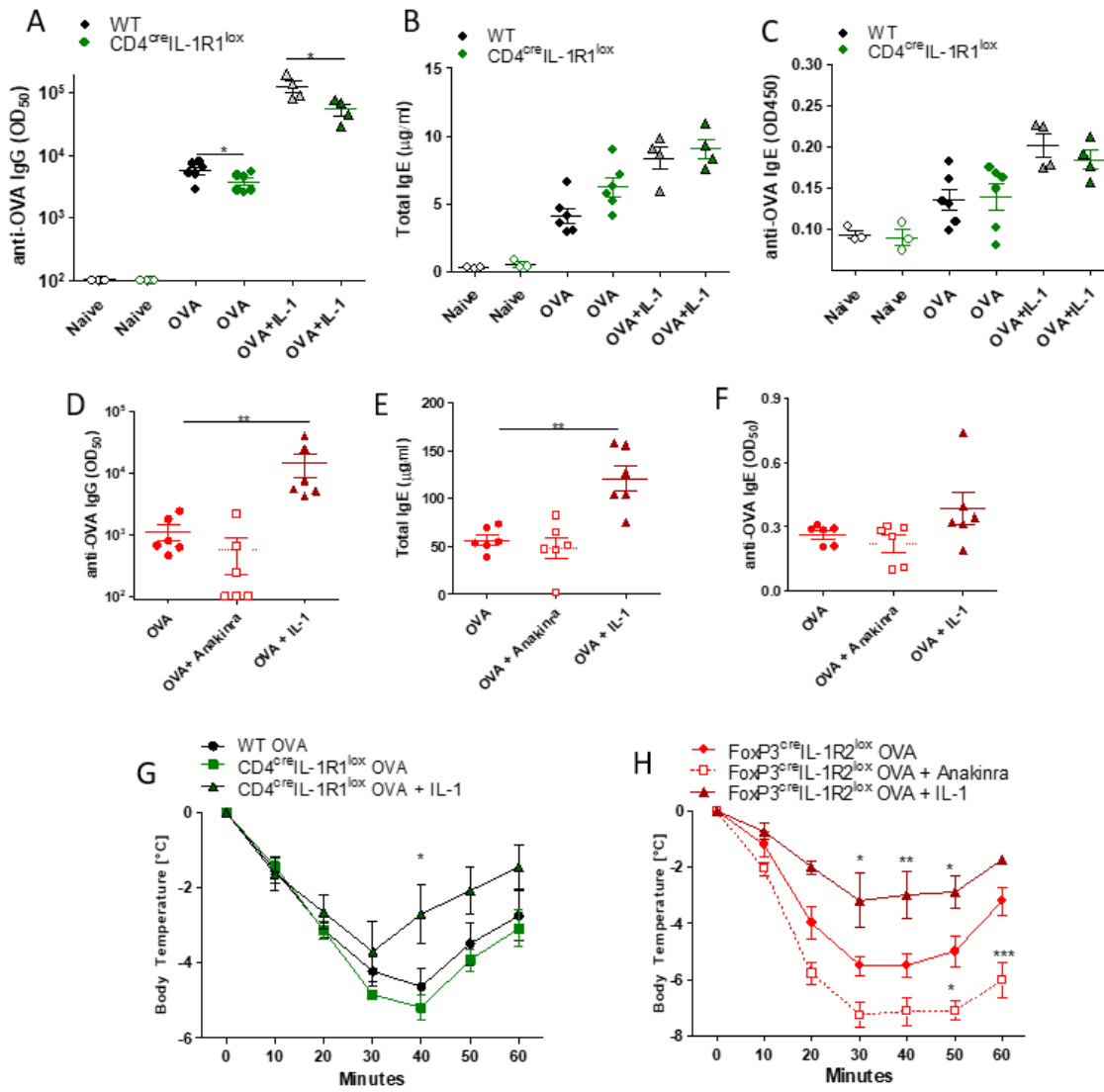
Suppl. Figure 2: Basophils and anaphylaxis



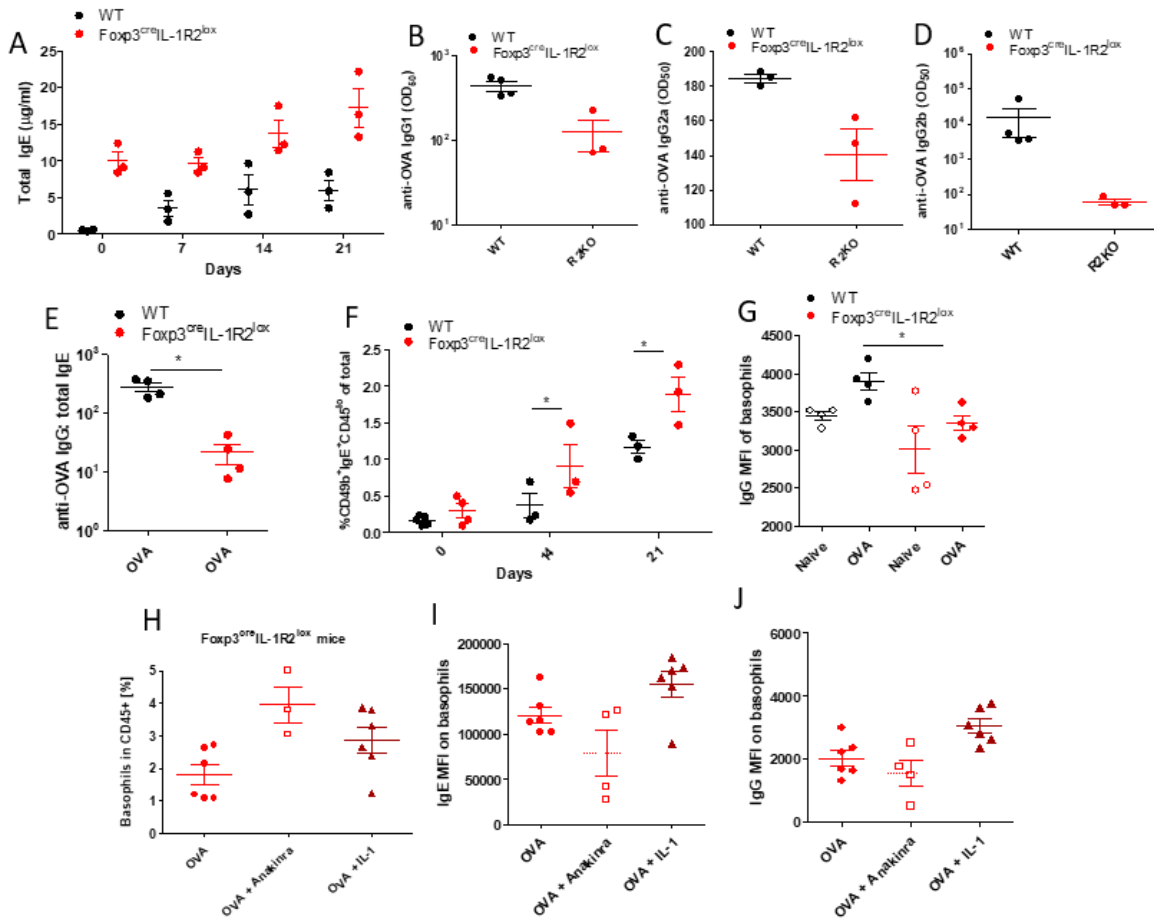
Suppl. Figure 3: Mast cells characterization and supplements



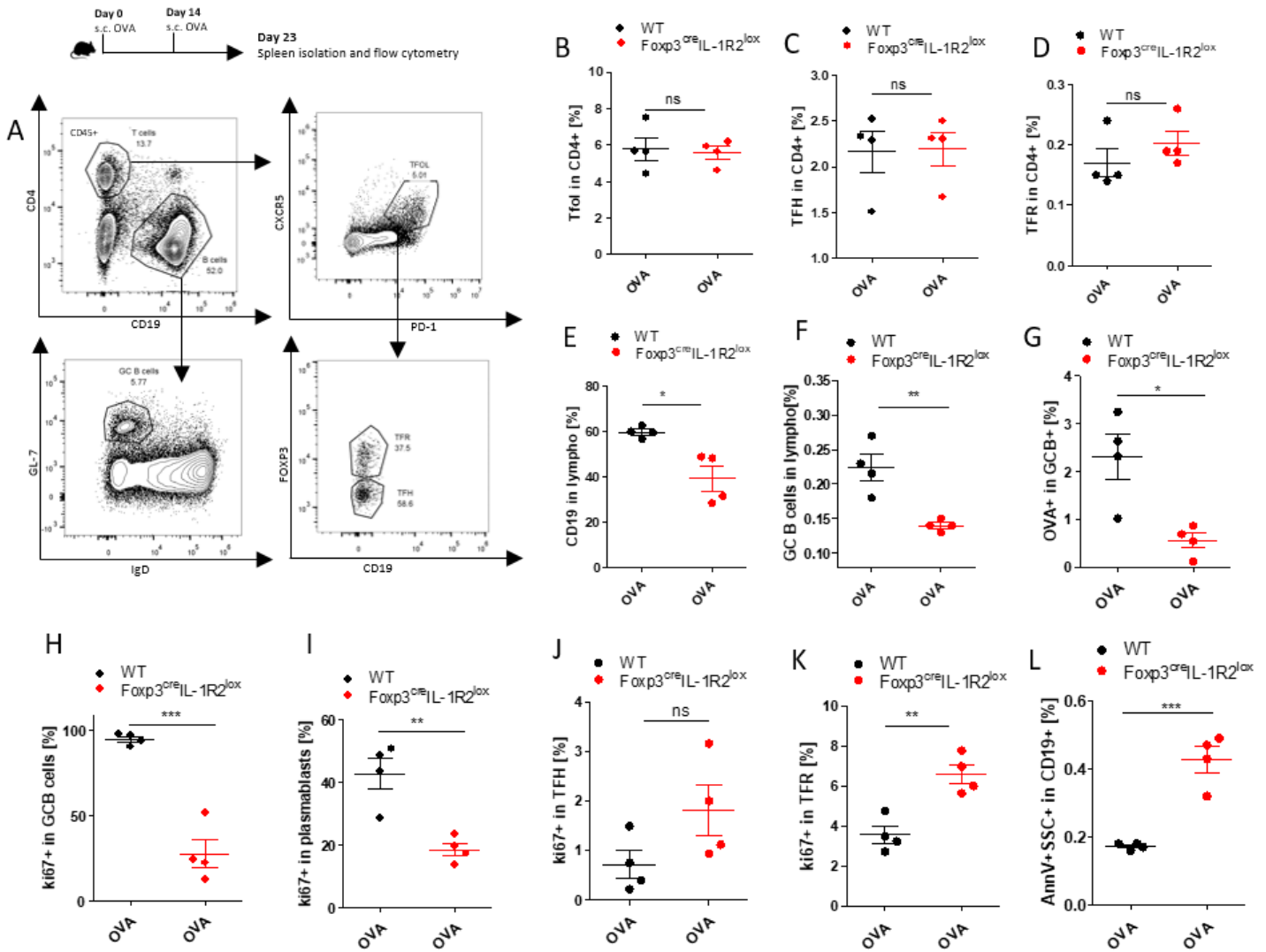
Suppl. Figure 4: IL-1 promotes IgG and protection from anaphylaxis in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} and CD4^{cre}IL-1R1^{lox}



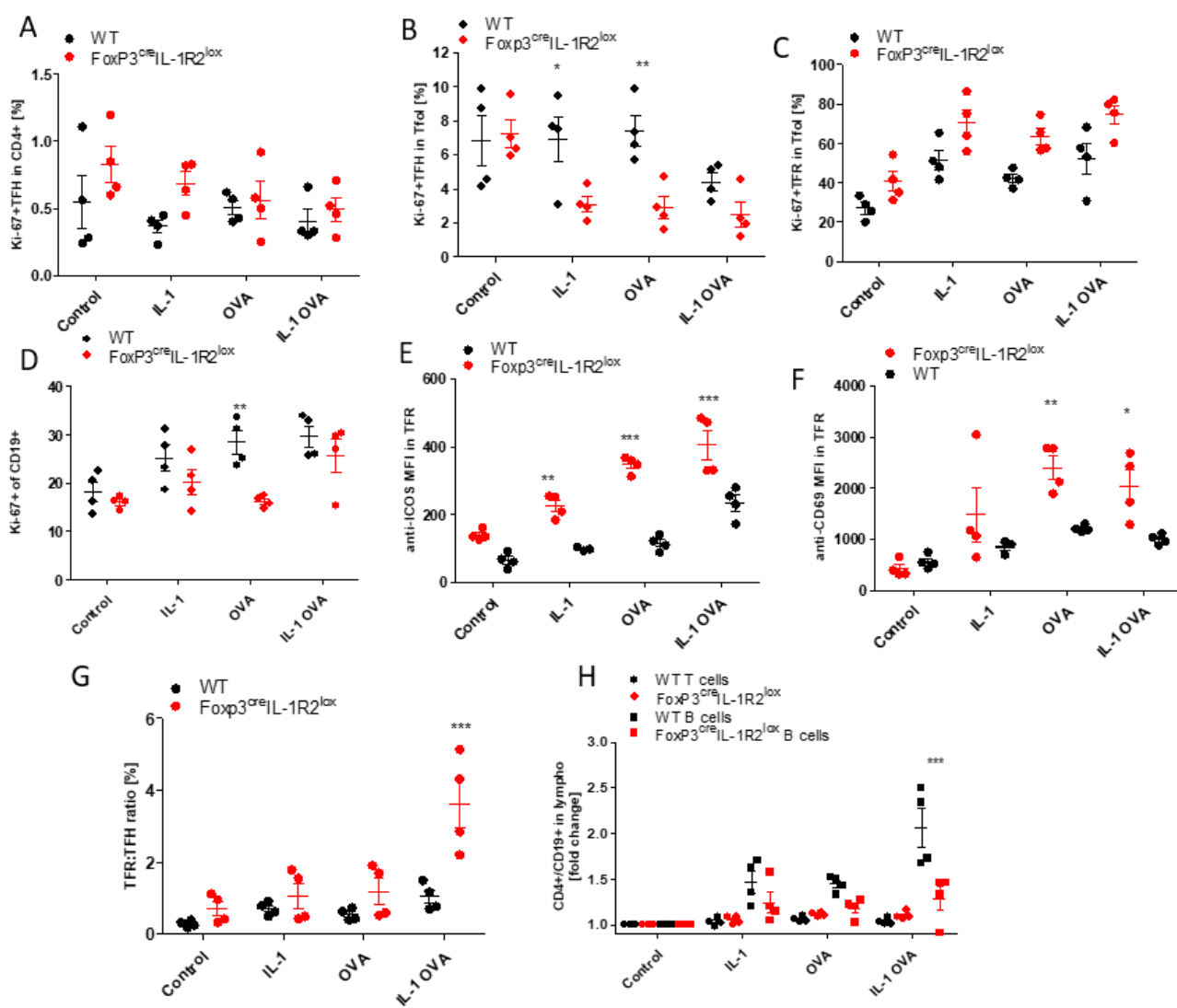
Suppl. Figure 5 : Antibodies and Basophils in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox}



Suppl. Figure 6: FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox} mice display reduced splenic B cell responses



Suppl. Figure 7: TFR proliferation in FoxP3^{cre}IL-1R2^{lox}



Discussion

Nous avons pu montrer ici que l'IL-1 jouait un rôle dans l'immunité humorale aussi bien physiologique que pathologique. Néanmoins son rôle semble varier en fonction du contexte ce qui m'amène à discuter ce rôle en trois points distincts :

1. rôle de l'IL-1 dans la réponse physiologique humorale,
2. rôle de l'IL-1 dans la réponse humorale auto-immune,
3. rôle de l'IL-1 dans la réponse allergique.

1. Rôle de l'IL-1 dans la réponse physiologique humorale

Nous avons pu voir que les Tfh ainsi que les Tfr expriment les récepteurs de l'IL-1 - les Tfh, l'IL-1R1 alors que les Tfr, l'IL-1R1, mais aussi l'IL-1R2 et l'IL-1Ra. Nous avons aussi pu voir que l'expression de ces récepteurs module la réponse anticorps. Paul Gédéon Ritvo avait supposé que les Tfr exprimaient les 2 récepteurs inhibiteurs de l'IL-1 afin d'inhiber l'activation des Tfh (Ritvo et al., 2017b). A l'inverse de ce qui était pressenti, nous retrouvons ici un rôle activateur de l'IL-1 tant sur les Tfh (a) que sur les Tfr (b), l'expression de l'IL-1Ra et l'IL-1R2 étant présente sur les Tfr afin de limiter leur propre activation.

a. Rôle de l'IL-1 sur le Tfh

L'IL-1 semble donc avoir un rôle activateur du Tfh. Nous avons pu montrer précédemment que les Tfh mis en culture avec de l'IL-1 β sécrétaient plus d'IL-4 et d'IL-21 (Ritvo et al., 2017a). Nous montrons ici, que les souris CD4^{cre}IL-1R1^{lox} -soit les souris délétées en IL-1R1 dans les CD4- présentent une réponse anticorps diminuée. Certes, l'IL-1R1 n'est pas exprimé exclusivement par les Tfh parmi les CD4, les Th17 étant en effet décrits comme pouvant l'exprimer (tout comme les Tfr) (Ben-Sasson et al., 2009; Rasheed et al., 2006; Ritvo and Klatzmann, 2019; Ritvo et al., 2017a; Schenten et al., 2014; Taylor-Robinson and Phillips, 1994). Néanmoins, du fait d'une faible implication des Th17 dans la réponse humorale, ainsi qu'une différence franche objectivée dans la réponse humorale obtenue entre les souris CD4^{cre}IL-1R1^{lox} et Foxp3^{cre}YFPIL-1R1^{lox}, nous pouvons supposer que la différence observée dans la réponse anticorps entre les souris CD4^{cre}IL-1R1^{lox} et les souris Foxp3^{cre}IL-1R1^{lox} est secondaire à la différence d'expression de l'IL-1R1 par les Tfh. De plus, lors de l'analyse par phénotypage approfondi des Tfh issus de souris CD4^{cre}IL-1R1^{lox} par cytométrie spectrale, nous confirmons le rôle de l'IL-1R1 dans l'activation des Tfh avec un profil d'activation plus faible des Tfh issus des souris CD4^{cre}IL-1R1^{lox} par rapport aux Tfh issus de souris contrôles. Le mécanisme sous tendant l'activation reste encore à élucider. Nous avons fait l'hypothèse que cette activation pouvait faire intervenir une uprégulation de l'IL-6R par les Tfh, cette molécule étant décrite comme une molécule clé à la prolifération et à la survie des Tfh (Papillion et al., 2019). Cependant, nous n'avons pas trouvé de modification d'expression du récepteur à L'IL-

6 à la membrane des Tfh issus de souris CD4^{cre}IL-1R1^{lox} par rapport aux souris contrôles. Une analyse transcriptomique des Tfh issus de souris CD4^{cre}IL-1R1^{lox} permettrait d'explorer cette hypothèse. Une autre approche serait d'étudier le niveau de différenciation de cellules T en Tfh chez les souris CD4^{cre}IL-1R1^{lox} et contrôles préalablement exposées ou non à de l'anti-IL-6R in vivo et in vitro.

L'IL-1 pourrait aussi jouer sur les Tfh par activation de leur TCR. Les études sur les TCR ont en effet montré que, de manière inattendue, les répertoires Tfh et Tfr contiennent des milliers de séquences différentes, même après une immunisation avec un seul peptide (Ritvo et al., 2018). Cette constatation est surprenante car la réponse du CG se traduit en fin de compte par une réponse très spécifique des lymphocytes B, dont on aurait pu prévoir qu'elle serait pilotée par des spécificités TCR restreintes. L'analyse approfondie du partage des séquences TCR de Tfh et Tfr a révélé que les réponses spécifiques à l'antigène sont obscurcies par une stimulation globale secondaire de Tfh et Tfr qui semble être indépendante de l'antigène et pourrait être médiée par les cytokines. Ce mécanisme d'activation pourrait donc être mis en jeu par l'IL-1. L'analyse du TCR des Tfh issus de souris CD4^{cre}IL-1R1^{lox} pourrait aider à répondre à cette question.

b. Rôle de l'IL-1 sur le Tfr

Le rôle de l'IL-1 dans l'activation du Tfr semble plus complexe. En effet, cette cellule exprimant les trois récepteurs de l'IL-1, il fut nécessaire de créer trois modèles de KO afin d'explorer le rôle de chacun :

- un présentant une délétion de l'IL-1R1 sur les Tfr
- un présentant une délétion de l'IL-1R2 sur les Tfr
- un présentant une délétion de l'IL-1Ra sur les Tfr.

L'IL-1R1 étant, comme vu précédemment, exprimé principalement par les Tfh, Th17 et Tfr, et non par les Treg, nous avons construit notre modèle de KO en déplaçant spécifiquement l'IL-1R1 parmi les cellules exprimant la Foxp3 (Rasheed et al., 2006; Ritvo and Klatzmann, 2019; Ritvo et al., 2017a). De même, afin de construire un modèle de délétion de l'IL-1R2 parmi les Tfr (l'IL-1R2 étant décrite comme exprimée principalement par les Tfr parmi les cellules Foxp3⁺ (Nikolouli et al., 2020; Ritvo and Klatzmann, 2019)), nous avons croisé des souris Foxp3^{cre}YFP avec des souris IL-1R2^{lox}. Enfin, afin d'étudier le rôle de l'expression de l'IL-1Ra par les Tfr, nous avons utilisé des souris IL-1Ra^{-/-}. Ce dernier modèle pose le problème de ne pas étudier spécifiquement le KO de l'IL-1Ra parmi les Tfr. L'IL-1Ra étant connue pour être fortement impliquée dans l'immunité innée, ceci soulève le biais de ne pas mesurer l'effet du KO sur les Tfr seuls mais sur les cellules de l'immunité innée, notamment les cellules

dendritiques. Néanmoins, faute de meilleur modèle, nous avons choisi d'étudier la réponse humorale chez ces souris, en limitant la part d'innée en injectant les souris en intra-péritonéale, cette localisation étant connue pour présenter une moins grande diversité de cellules présentatrices de l'antigène (Heath et al., 2019; Levin et al., 2017). De même, afin de confirmer le réel impact de la délétion de l'IL-1Ra sur les Tfr, nous avons isolé les Tfr des souris IL-1Ra^{-/-} et effectué des analyses *in vitro* d'activation de ces cellules.

Grâce à ces différents modèles, nous avons pu montrer que l'IL-1R1 était présent à la surface du Tfr afin de permettre son activation alors que l'IL-1R2 et l'IL-1Ra étaient présents, quant à eux afin d'inhiber l'activation précoce de ce dernier. Le rôle du récepteur agoniste de l'IL-1 nous apparaît ici moins franc que celui des récepteurs inhibiteurs avec une absence d'impact de la délétion sur la réponse anticorps. Néanmoins, l'allèle Foxp3^{cre} étant connu pour être leaky (Franckaert et al., 2015), cette absence de différence pourrait être liée à une diminution d'expression de l'IL-1R1 sur les Tfh. La présence d'un niveau diminué d'anticorps IgG totaux à J0 et J21 (résultats non montrés) soutient cette hypothèse. Une manière de confirmer cette hypothèse serait de construire un double KO : IL-1R1 et IL-1R2 au sein des Tfr. Ainsi, nous pourrions vérifier qu'en l'absence d'IL-1R1, les souris délétées en IL-1R2 ne présentent pas de diminution du taux de production d'anticorps par rapport aux souris non délétées en récepteurs en IL-1. Une autre manière de faire serait aussi d'essayer d'amplifier la différence en immunisant les souris Foxp3^{creYFP}IL-1R1^{lox} avec de l'IL-1.

Lors de la délétion de l'IL-1Ra ou de l'IL-1R2, les Tfr apparaissent plus suppressifs aussi bien lors des analyses (i) *in vivo*, (ii) *in vitro* par culture cellulaire, (iii) qu'*ex-vivo* par analyse en cytométrie spectrale. Du fait d'une augmentation progressive du taux d'IL-1 β dans le surnageant de ganglion post immunisation, nous pouvons penser que les récepteurs inhibiteurs de l'IL-1 seraient exprimés par les Tfr afin d'empêcher leur propre activation par l'IL-1.

Du fait d'une réponse similaire en analyse *in vivo*, nous pourrions supposer que le mécanisme de régulation de l'IL-1R2 et IL-1Ra agit de façon similaire, ie par inhibition de la transduction intracellulaire du signal IL-1R1 après liaison de ce dernier à l'IL-1. Néanmoins, la différence du profil d'activation et du taux d'expression d'IL-1R1 des Tfr *ex-vivo* issus de rate de souris des deux lignées préalablement immunisées fait discuter un mécanisme d'action distinct. L'IL-1R2 est, comme nous l'avons vu, connu pour avoir une action transmembranaire mais aussi probablement intracellulaire. En effet, comme vu plus tôt, elle pourrait se lier à la pro-IL-1 α et empêcher ainsi son clivage par la calpaïne en IL-1 α mature. Ainsi, elle permettrait d'inhiber la libération d'IL-1 α par les cellules immunitaires. Ceci fut décrit pour les macrophages et non les LT. Cependant une telle action exercée sur les Tfr pourrait expliquer que le KO de l'IL-1R2 contribue à l'activation du Tfr par augmentation de la disponibilité d'IL-1 pour le récepteur IL-

IL-1 mais aussi par production accrue d'IL-1 par le Tfr, pouvant agir de façon autocrine et induire une boucle d'auto-amplification avec production secondaire d'IL-1R1. Afin d'étudier cette hypothèse, il conviendrait de réaliser une analyse transcriptomique de Tfr issus de $Foxp3^{creYFP}IL-1R2^{lox}$ et de souris Wild Type (WT) et ainsi comparer leur niveau d'expression d'IL-1 α . Il est aussi à noter que dans notre modèle murin $IL-1Ra^{-/-}$, le taux d'IL-1Ra intracellulaire est augmenté du fait d'une mutation jouant seulement sur la sécrétion d'IL-1Ra dans le milieu extracellulaire et non sur la production d'IL-1Ra (résultats non montrés). La différence retrouvée entre les deux modèles de KO pourrait ainsi s'expliquer par une action intracellulaire de l'IL-1Ra non étudiée dans le modèle $IL-1Ra^{-/-}$. Tahtinen et al. (Tahtinen et al., 2022) retrouvent aussi une expression diminuée de l'IL-1R1 membranaire des cellules spléniques issues de souris $IL-1Ra^{-/-}$. Cette diminution d'expression est associée à une augmentation concomitante de l'IL-1R1 soluble dans le sérum. Ces résultats suggèrent que l'excrétion d'IL-1R1 serait un mécanisme de résistance par lequel les souris $IL-1Ra^{-/-}$ s'adaptent à une signalisation excessive de l'IL-1. Les auteurs n'ont par contre pas étudié le niveau d'expression intra-cellulaire d'IL-1Ra de leur souris KO. Il se peut que l'excès d'IL-1R1 « sécrété » soit secondaire à un excès d'IL-1Ra intracellulaire produit.

Le mécanisme par lequel l'IL-1R1 permet l'activation du Tfr reste encore à explorer. L'IL-1 pourrait agir, comme pour les Tfh, sur la prolifération des Tfr spécifiques de l'antigène mais aussi sur une stimulation globale, non spécifique (Ritvo et al., 2018). Il conviendrait donc de réaliser une analyse transcriptomique des différents KO mais aussi une analyse du répertoire TCR afin de mieux comprendre son rôle.

2. Rôle de l'IL-1 dans la réponse pathologique auto-immune

Après étude du rôle de l'IL-1 dans l'activation des Tfh et Tfr dans un modèle physiologique, nous avons décidé d'étudier le rôle de ces cellules dans un modèle auto-immun : le lupus induit par Pristane.

Les Tfr peuvent être vus comme des cellules « garde-fous », luttant contre une réponse humorale excessive, empêchant ainsi les phénomènes dysimmunitaires. L'IL-1 ayant démontré un rôle dans l'immunité humorale physiologique, cela nous a semblé nécessaire d'étudier ensuite son rôle dans la dysimmunité, ce d'autant que l'IL-1 est connue pour être impliquée dans plusieurs pathologies dysimmunes.

En effet, son rôle a, par exemple, clairement été établi dans les inflammasomopathies.

Les inflammasomopathies sont des maladies génétiques caractérisées par un excès de production d'IL-1 du fait d'une atteinte de l'inflammasome. Ces maladies se manifestent

principalement par des épisodes de fièvre, d'arthrites ou arthralgies et de douleurs abdominales (secondaire à une inflammation digestive) apparaissant dès l'enfance et évoluant par poussées (Sönmez and Özen, 2017).

D'autres maladies semblent médiées, ou du moins, aggravées par la présence d'un excès d'IL-1. En effet, il a été montré que les souris délétées en IL-1 β ne développaient pas, à l'inverse de souris WT, d'arthrite microcristalline goutteuse (cristaux d'urate de sodium). Cette observation est en faveur d'un rôle pathogène de l'IL-1 dans cette maladie (Martinon et al., 2006). D'autres travaux tendent à montrer le rôle de l'IL-1 dans d'autres pathologies inflammatoires telles que le diabète de type 2 ou la périodontite (Dinarello, 2011b).

Son rôle dans les pathologies auto-immunes, pathologies qui nous intéressent particulièrement ici du fait de l'implication démontrée des cellules T folliculaires dans ces maladies, est plus débattu. Certains auteurs décrivent une action de l'IL-1 dans l'apparition de maladies auto-immunes. Ainsi, Sutton et al. (Sutton et al., 2006) rapportent que les souris délétées en IL-1 β ou IL-1 α ne développent pas d'Encéphalomyélite Allergique Expérimentale (EAE), modèle murin de sclérose en plaque. Néanmoins, ces résultats n'ont pas été reproduits, et le rôle de l'IL-1 n'a pas été retrouvé dans d'autres modèles d'auto-immunité.

Aussi, il nous a semblé important d'étudier le rôle de l'IL-1 dans un modèle de pathologie auto-immune à médiation humorale : le lupus. Nous avons dans ce but induit un lupus par immunisation intra-péritonéale de Pristane dans nos différentes lignées comme décrit par Satoh et al. (Satoh et al., 1995). Le lupus est une maladie auto-immune systémique touchant principalement la peau et les articulations. Dans les formes sévères, elle peut atteindre le rein par dépôt de complexes immuns. La physiopathologie de la maladie n'est à ce jour qu'incomplètement élucidée, néanmoins elle semble faire intervenir l'immunité humorale avec une majoration du taux de Tfh circulants décrite chez les patients lupiques ainsi que la présence d'auto-Ac sériques type anti-nucléaires tels les anticorps anti-DNA ou encore les anti-RNP (Simpson et al., 2010b). Un modèle lupus du fait de cette médiation humorale prédominante nous a semblé tout indiqué ici, ce d'autant que ce modèle pathologique à l'avantage d'être simple de réalisation avec la nécessité d'une seule injection de pristane et d'un suivi mensuel de la production d'auto-anticorps dans le sérum. Il présente par contre comme désavantages majeurs d'induire (i) une mortalité élevée chez les souris C57/BL6 du fait d'induction d'hémorragie intra-alvéolaire le mois suivant l'injection de pristane, ainsi que (ii) d'induire une forme clinique pauci-immune avec une production d'auto-anticorps moindre chez les souris C57/BL6 que chez des souris BALB/c (Barker et al., 2011; Chowdhary et al., 2007; Reeves et al., 2009; Satoh et al., 2000; Zhuang et al., 2017). Afin de parer à ces problèmes, nous avons décidé d'inclure plus de souris au départ ainsi que d'étudier non pas la protéinurie ou encore le

nombre d'articulations gonflées mais le nombre de glomérules rénaux touchés par des dépôts de complexes immuns. Ainsi, nous avons pu retrouver un rôle de l'IL-1 dans l'induction d'une auto-immunité. Fait intéressant, nous avons retrouvé un niveau de sévérité similaire de la maladie lorsqu'il existait une délétion spécifique de l'IL-1R1 dans les Tfr (Foxp3^{cre}YFP^{IL-1R1^{lox}}). Par contre, lors de la délétion des 2 récepteurs inhibiteurs de l'IL-1 sur les Tfr, il existait un phénotype lupique moins sévère chez les souris. Ces résultats sont encourageants. En effet, il existe actuellement peu de thérapeutique ayant démontré une efficacité dans le lupus (Fanouriakis et al., 2021). Un traitement majorant l'expression d'IL-1R1 ou inhibant l'IL-1R2 sur les Tfr serait une piste intéressante.

En oncologie, plusieurs médicaments sont développés ciblant deux molécules concomitamment, le plus souvent une dirigée contre une molécule néoplasique et une ciblant l'immunité anti-néoplasique (Chames and Wurch, 2019; Del Bano et al., 2015). Une idée serait donc de développer un anticorps bispécifique dirigé contre l'IL-1R1 ou l'IL-1R2 et le Tfr. Cependant, il n'existe pas de molécule de surface spécifique du Tfr. Une manière de cibler cette cellule serait de cibler des molécules connues pour être fortement exprimées par cette dernière telle la molécule GITR. En effet, nous avons pu montrer précédemment que l'IL-1 activait les Tfr mais aussi les Tfh. Or une suractivation des Tfh semble favoriser une rupture de la tolérance immunitaire (soit une dysimmunité). Il pourrait ainsi être envisagé de créer une protéine de fusion bi-spécifique constituée d'un agoniste de l'IL-1 et du ligand de GITR, ce dernier étant peu exprimé par les Tfh: l'IL-1 serait alors spécifiquement délivrée aux cellules exprimant GITR, soit principalement les Tfr. Une autre méthode serait d'utiliser une technologie type siRNA. Plusieurs vaccins utilisant cette technologie ont été développés, notamment un vaccin contre Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2 (SARS-CoV-2) (Polack et al., 2020). Il pourrait ainsi être envisagé d'inhiber la transcription d'IL-1R2 des Tfr. Afin de viser spécifiquement les Tfr, ces derniers exprimant la molécule PD1, il conviendrait de créer un siRNA dirigé contre l'IL-1R2 couplé à un anticorps dirigé spécifiquement contre la molécule PD1. Une telle technique a fait ses preuves tant dans le domaines de la cancérologie (Mathupala, 2009; Satake et al., 2016) que dans celui de l'infectiologie (Song et al., 2005). Cependant, la conception de telles molécules reste un processus fastidieux et onéreux. La confirmation du rôle de l'axe IL-1 dans l'activation des Tfr dans d'autres pathologies auto-immunes à médiation humorale telles la myasthénie, la sclérose en plaque ou encore le syndrome de Gougerot-Sjögren paraît une bonne option avant d'envisager de telles options thérapeutiques.

3. *Rôle de l'IL-1 dans la réponse allergique*

Nous avons pu voir lors de l'introduction que les Tfh et Tfr semblent être des régulateurs clés de l'immunité allergique en contrôlant les réponses du CG (Yao et al., 2021). Ainsi, il nous a

semblé naturel d'étudier le rôle de l'expression des récepteurs de l'IL-1 par les Tfr dans la réponse allergique.

Lorsque l'on s'intéresse au rôle des Tfr dans l'allergie, nous observons une aggravation de la réaction allergique lors du déficit en Tfr. Cette aggravation est associée à une majoration d'IgE totales produites et non spécifiques. Ces résultats sont surprenants, les Tfr étant décrits comme une population régulatrice du CG. Cependant, plusieurs auteurs retrouvent des résultats similaires (Lama et al., 2022; Wang and Tan, 2019). Notamment, Xie et al. (Xie et al., 2020) ont récemment rapporté l'observation que la perte de Tfr réduit les titres d'IgE spécifiques à l'arachide mais augmente le taux d'IgE non spécifiques dans un modèle d'allergie alimentaire induite par l'arachide. L'équipe avait alors proposé que cet effet était lié à une production d'IL-10 par les Tfr contribuant au développement de plasmocytes sécrétant d'Ac de type IgE. De par notre découverte que la délétion d'IL-1R2 par les Tfr induit un profil plus activé des Tfr mais aussi une diminution du ratio IgG:IgE sérique, nous pouvons aussi supposer que cet effet serait lié à une inhibition de la réponse humorale IgG. Une autre hypothèse pouvant expliquer que les Tfr puissent avoir une action parfois protectrice, parfois délétère dans l'allergie, serait qu'il existe une variation de leur profil d'activation selon leur localisation ou selon l'environnement cytokinique. Il est actuellement admis que le profil des Tfr peut varier en fonction de l'environnement (Gowthaman et al., 2019; Hong et al., 2019). De même, le profil des Tfr pourrait être impacté par l'environnement cytokinique. Les travaux de Clement et al. (Clement et al., 2019) vont dans ce sens. En effet, ils retrouvent des expressions géniques différentes des Tfr issus de souris immunisées avec de l'HDM (allergène associé à allergie aux acariens) et ceux issus de souris immunisées avec de l'OVA. La voie d'immunisation pourrait aussi jouer. Comparer le profil transcriptomique des Tfr issus de souris immunisées par différentes techniques d'immunisation serait, à mon sens, aussi intéressant à étudier.

Nous avons pu montrer ici que l'IL-1 β joue un rôle dans la réponse allergique. Ainsi, nous avons pu montrer que l'IL-1 augmentait le rapport IgG:IgE via une induction de l'expression de Fc γ RIIb par les cellules effectrices (basophiles et mastocytes), inhibant ainsi secondairement l'expression cellulaire de Fc ϵ R. En augmentant ce rapport, l'IL-1 participe à un contrôle de la réponse allergique.

L'IL-1 β pourrait ainsi permettre de limiter la réaction allergique chez les patients souffrant d'atopie.

L'introduction d'IL-1 chez les patients atopiques pourrait ainsi induire une amélioration de la réponse allergique. Néanmoins, du fait d'une activation des Tfr par l'IL-1, comme nous l'avons démontré auparavant, la dose d'IL-1 prescrite ou encore le timing de délivrance de l'IL-1

paraissent des éléments cruciaux à prendre en compte afin de ne pas aggraver les manifestations allergiques au lieu de les améliorer. Les effets majeurs observés chez les souris motivent à étudier plus en détail cette option thérapeutique chez l'homme. En effet, comme vu précédemment, l'allergie est un mal qui ne cesse de sévir dans le monde. Or peu de thérapies s'avèrent efficaces dans cette pathologie. On pourrait ainsi imaginer proposer une immunothérapie sub-linguale de désensibilisation associée à de faible dose d'IL-1.

4. *Perspectives*

Comme nous l'avons vu l'IL-1 semble jouer un rôle dans la réponse humorale via l'expression de ces récepteurs sur les Tfh et les Tfr. Il reste maintenant à mieux comprendre les mécanismes sous-tendant ce rôle.

Les études par cytométrie spectrales ont permis d'étudier quelques pistes de réflexion. Il serait maintenant intéressant de poursuivre les investigations en étudiant concomitamment le TCR et le transcriptome par single cell des Tfr et Tfh des différents KO en conditions physiologiques et pathologiques (auto-immunes et allergiques) afin de comprendre plus précisément l'impact des récepteurs sur l'état d'activation, de prolifération et d'expansion clonale de ces cellules.

Je ne pourrais malheureusement pas participer activement à ces nouvelles avancées. Néanmoins, je les suivrai avec fort intérêt, tant du point de vue du clinicien que du point de vue du chercheur !

Références Bibliographiques

- Afonina, I.S., Tynan, G.A., Logue, S.E., Cullen, S.P., Bots, M., Lüthi, A.U., Reeves, E.P., McElvaney, N.G., Medema, J.P., Lavelle, E.C., et al. (2011). Granzyme B-Dependent Proteolysis Acts as a Switch to Enhance the Proinflammatory Activity of IL-1 α . *Molecular Cell* 44, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.037>.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.
- Akkaya, M., Traba, J., Roesler, A.S., Miozzo, P., Akkaya, B., Theall, B.P., Sohn, H., Pena, M., Smelkinson, M., Kabat, J., et al. (2018). Second signals rescue B cells from activation-induced mitochondrial dysfunction and death. *Nature Immunology* 19, 871–884. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0156-5>.
- Aksentijevich, I., Masters, S.L., Ferguson, P.J., Dancey, P., Frenkel, J., van Royen-Kerkhoff, A., Laxer, R., Tedgård, U., Cowen, E.W., Pham, T.-H., et al. (2009). An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N. Engl. J. Med.* 360, 2426–2437. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0807865>.
- Alexander, C.-M., Tygrett, L.T., Boyden, A.W., Wolniak, K.L., Legge, K.L., and Waldschmidt, T.J. (2011). T regulatory cells participate in the control of germinal centre reactions. *Immunology* 133, 452–468. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03456.x>.
- Aloulou, M., Carr, E.J., Gador, M., Bignon, A., Liblau, R.S., Fazilleau, N., and Linterman, M.A. (2016). Follicular regulatory T cells can be specific for the immunizing antigen and derive from naive T cells. *Nat Commun* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10579>.
- Amiezer, M., and Phan, T.G. (2016). Disentangling Tfr cells from Treg cells and Tfh cells: How to untie the Gordian knot. *Eur. J. Immunol.* 46, 1101–1104. <https://doi.org/10.1002/eji.201646389>.
- Arend, W.P. (1991). Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J. Clin. Invest.* 88, 1445–1451. <https://doi.org/10.1172/JCI115453>.
- Arend, W.P., Joslin, F.G., and Massoni, R.J. (1985). Effects of immune complexes on production by human monocytes of interleukin 1 or an interleukin 1 inhibitor. *J. Immunol.* 134, 3868–3875. .
- Arroyo, E.N., and Pepper, M. (2020). B cells are sufficient to prime the dominant CD4+ Tfh response to Plasmodium infection. *J. Exp. Med.* 217. <https://doi.org/10.1084/jem.20190849>.
- Asrir, A., Aloulou, M., Gador, M., Pérals, C., and Fazilleau, N. (2017). Interconnected subsets of memory follicular helper T cells have different effector functions. *Nat Commun* 8, 847. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00843-7>.
- Auron, P.E., Webb, A.C., Rosenwasser, L.J., Mucci, S.F., Rich, A., Wolff, S.M., and Dinarello, C.A. (1984). Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 7907–7911. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.7907>.

- Bankoti, R., Ogawa, C., Nguyen, T., Emadi, L., Couse, M., Salehi, S., Fan, X., Dhall, D., Wang, Y., Brown, J., et al. (2017). Differential regulation of Effector and Regulatory T cell function by Blimp1. *Sci Rep* 7, 12078. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12171-3>.
- Barker, T.T., Lee, P.Y., Kelly-Scumpia, K.M., Weinstein, J.S., Nacionales, D.C., Kumagai, Y., Akira, S., Croker, B.P., Sobel, E.S., Reeves, W.H., et al. (2011). Pathogenic role of B cells in the development of diffuse alveolar hemorrhage induced by pristane. *Lab. Invest.* 91, 1540–1550. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.108>.
- Baumjohann, D., Preite, S., Reboldi, A., Ronchi, F., Ansel, K.M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2013). Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity* 38, 596–605. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.020>.
- Beeson, P.B. (1948). Temperature-elevating effect of a substance obtained from polymorphonuclear leucocytes. *J. Clin. Invest.* 27, 524. .
- Bell, L., Lenhart, A., Rosenwald, A., Monoranu, C.M., and Berberich-Siebelt, F. (2020). Lymphoid Aggregates in the CNS of Progressive Multiple Sclerosis Patients Lack Regulatory T Cells. *Front. Immunol.* 10, 3090. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03090>.
- Ben-Chetrit, E., Gattorno, M., Gul, A., Kastner, D.L., Lachmann, H.J., Touitou, I., and Ruperto, N. (2018). Consensus proposal for taxonomy and definition of the autoinflammatory diseases (AIDs): a Delphi study. *Ann Rheum Dis* 77, 1558–1565. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-212515>.
- Ben-Sasson, S.Z., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M., Shapira, I., Dinarello, C.A., and Paul, W.E. (2009). IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 7119–7124. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902745106>.
- Bentebibel, S.-E., Lopez, S., Obermoser, G., Schmitt, N., Mueller, C., Harrod, C., Flano, E., Mejias, A., Albrecht, R.A., Blankenship, D., et al. (2013). Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci Transl Med* 5, 176ra32. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005191>.
- van Besouw, N.M., Mendoza Rojas, A., and Baan, C.C. (2019). The role of follicular T helper cells in the humoral alloimmune response after clinical organ transplantation. *HLA* <https://doi.org/10.1111/tan.13671>.
- Bird, T.A., Gearing, A.J., and Saklatvala, J. (1988). Murine interleukin 1 receptor. Direct identification by ligand blotting and purification to homogeneity of an interleukin 1-binding glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 263, 12063–12069. .
- Burzynski, L.C., Humphry, M., Pyrillou, K., Wiggins, K.A., Chan, J.N.E., Figg, N., Kitt, L.L., Summers, C., Tatham, K.C., Martin, P.B., et al. (2019). The Coagulation and Immune Systems Are Directly Linked through the Activation of Interleukin-1 α by Thrombin. *Immunity* 50, 1033–1042.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.003>.
- Cha, Z., Qian, G., Zang, Y., Gu, H., Huang, Y., Zhu, L., Li, J., Liu, Y., Tu, X., Song, H., et al. (2017). Circulating CXCR5+CD4+ T cells assist in the survival and growth of primary diffuse large B cell lymphoma cells through interleukin 10 pathway. *Exp. Cell Res.* 350, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.11.017>.

- Chames, P., and Wurch, T. (2019). Les anticorps et scaffold bispécifiques, des médicaments innovants en oncologie impliquant le ciblage des cellules immunitaires. *Med Sci (Paris)* 35, 1072–1082. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019242>.
- Chan, A.H., and Schroder, K. (2019). Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. *J. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1084/jem.20190314>.
- Chavele, K.-M., Merry, E., and Ehrenstein, M.R. (2015). Cutting edge: circulating plasmablasts induce the differentiation of human T follicular helper cells via IL-6 production. *J. Immunol.* 194, 2482–2485. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401190>.
- Chen, C.-J., Kono, H., Golenbock, D., Reed, G., Akira, S., and Rock, K.L. (2007). Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat. Med.* 13, 851–856. <https://doi.org/10.1038/nm1603>.
- Chen, X., Cao, G., Wu, J., Wang, X., Pan, Z., Gao, J., Tian, Q., Xu, L., Li, Z., Hao, Y., et al. (2019). The histone methyltransferase EZH2 primes the early differentiation of follicular helper T cells during acute viral infection. *Cell. Mol. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0219-z>.
- Chizzonite, R., Truitt, T., Kilian, P.L., Stern, A.S., Nunes, P., Parker, K.P., Kaffka, K.L., Chua, A.O., Lugg, D.K., and Gubler, U. (1989). Two high-affinity interleukin 1 receptors represent separate gene products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 8029–8033. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.20.8029>.
- Choi, Y.S., Eto, D., Yang, J.A., Lao, C., and Crotty, S. (2013). Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. *J. Immunol.* 190, 3049–3053. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203032>.
- Choi, Y.S., Gullicksrud, J.A., Xing, S., Zeng, Z., Shan, Q., Li, F., Love, P.E., Peng, W., Xue, H.-H., and Crotty, S. (2015). LEF-1 and TCF-1 orchestrate T(FH) differentiation by regulating differentiation circuits upstream of the transcriptional repressor Bcl6. *Nat. Immunol.* 16, 980–990. <https://doi.org/10.1038/ni.3226>.
- Chowdhary, V.R., Grande, J.P., Luthra, H.S., and David, C.S. (2007). Characterization of haemorrhagic pulmonary capillaritis: another manifestation of Pristane-induced lupus. *Rheumatology (Oxford)* 46, 1405–1410. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kem117>.
- Clement, R.L., Daccache, J., Mohammed, M.T., Diallo, A., Blazar, B.R., Kuchroo, V.K., Lovitch, S.B., Sharpe, A.H., and Sage, P.T. (2019). Follicular regulatory T cells control humoral and allergic immunity by restraining early B cell responses. *Nat. Immunol.* 20, 1360–1371. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0472-4>.
- Codarri, L., Vallotton, L., Ciuffreda, D., Venetz, J.-P., Garcia, M., Hadaya, K., Buhler, L., Rotman, S., Pascual, M., and Pantaleo, G. (2007). Expansion and tissue infiltration of an allospecific CD4+CD25+CD45RO+IL-7Ralphahigh cell population in solid organ transplant recipients. *J. Exp. Med.* 204, 1533–1541. <https://doi.org/10.1084/jem.20062120>.
- Cohen, I., Rider, P., Carmi, Y., Braiman, A., Dotan, S., White, M.R., Voronov, E., Martin, M.U., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2010). Differential release of chromatin-bound IL-1 α discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *PNAS* 107, 2574–2579. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915018107>.
- Colineau, L., Rouers, A., Yamamoto, T., Xu, Y., Urrutia, A., Pham, H.-P., Cardinaud, S., Samri, A., Dorgham, K., Coulon, P.-G., et al. (2015). HIV-Infected Spleens Present Altered Follicular

Helper T Cell (Tfh) Subsets and Skewed B Cell Maturation. *PLoS ONE* 10, e0140978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140978>.

Colotta, F., Borré, A., Wang, J.M., Tattaneli, M., Maddalena, F., Polentarutti, N., Peri, G., and Mantovani, A. (1992). Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* 148, 760–765. .

Cretney, E., Xin, A., Shi, W., Minnich, M., Masson, F., Miasari, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Busslinger, M., Nutt, S.L., et al. (2011). The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 12, 304–311. <https://doi.org/10.1038/ni.2006>.

Crotty, S. (2019). T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* 50, 1132–1148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.011>.

Cui, Y.-Z., Qu, S.-Y., Chang, L.-L., Zhao, J.-R., Mu, L., Sun, B., Li, H.-L., Zhang, T.-S., Wang, G.-Y., and Kong, Q.-F. (2019). Enhancement of T Follicular Helper Cell-Mediated Humoral Immunity Reponses During Development of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis. *Neurosci Bull* 35, 507–518. <https://doi.org/10.1007/s12264-019-00344-1>.

Danger, R., Chesneau, M., Delbos, F., Le Bot, S., Kerleau, C., Chenouard, A., Ville, S., Degauque, N., Conchon, S., Cesbron, A., et al. (2019). CXCR5+PD1+ICOS+ Circulating T Follicular Helpers Are Associated With de novo Donor-Specific Antibodies After Renal Transplantation. *Front Immunol* 10, 2071. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02071>.

De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 137–148. <https://doi.org/10.1038/nri3804>.

Del Bano, J., Chames, P., Baty, D., and Kerfelec, B. (2015). Taking up Cancer Immunotherapy Challenges: Bispecific Antibodies, the Path Forward? *Antibodies* 5, 1. <https://doi.org/10.3390/antib5010001>.

De Simone, M., Arrigoni, A., Rossetti, G., Gruarin, P., Ranzani, V., Politano, C., Bonnal, R.J.P., Provasi, E., Sarnicola, M.L., Panzeri, I., et al. (2016). Transcriptional Landscape of Human Tissue Lymphocytes Unveils Uniqueness of Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells. *Immunity* 45, 1135–1147. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.021>.

Dinarello, C.A. (1998). Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 856, 1–11. .

Dinarello, C.A. (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.

Dinarello, C.A. (2011a). A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur. J. Immunol.* 41, 1203–1217. <https://doi.org/10.1002/eji.201141550>.

Dinarello, C.A. (2011b). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117, 3720–3732. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-273417>.

Ding, Y., Li, J., Wu, Q., Yang, P., Luo, B., Xie, S., Druey, K.M., Zajac, A.J., Hsu, H.-C., and Mountz, J.D. (2013). IL-17RA is essential for optimal localization of follicular Th cells in the germinal center light zone to promote autoantibody-producing B cells. *J. Immunol.* 191, 1614–1624. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300479>.

- Dower, S.K., Kronheim, S.R., March, C.J., Conlon, P.J., Hopp, T.P., Gillis, S., and Urdal, D.L. (1985). Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *J. Exp. Med.* *162*, 501–515. <https://doi.org/10.1084/jem.162.2.501>.
- Edholm, E.-S., Bengten, E., and Wilson, M. (2011). Insights into the function of IgD. *Dev. Comp. Immunol.* *35*, 1309–1316. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.002>.
- Ehrenstein, M.R., and Notley, C.A. (2010). The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 778–786. <https://doi.org/10.1038/nri2849>.
- Eisenberg, R. (2003). Mechanisms of Autoimmunity. *IR* *27*, 203–218. <https://doi.org/10.1385/IR:27:2-3:203>.
- Faliti, C.E., Gualtierotti, R., Rottoli, E., Gerosa, M., Perruzza, L., Romagnani, A., Pellegrini, G., Conti, B.D.P., Rossi, R.L., Idzko, M., et al. (2019). P2X7 receptor restrains pathogenic Tfh cell generation in systemic lupus erythematosus. *Journal of Experimental Medicine* *216*, 317–336. <https://doi.org/10.1084/jem.20171976>.
- Fanouriakis, A., Tziolos, N., Bertias, G., and Boumpas, D.T. (2021). Update on the diagnosis and management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* *80*, 14–25. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-218272>.
- Fazilleau, N., and Aloulou, M. (2018). Several Follicular Regulatory T Cell Subsets With Distinct Phenotype and Function Emerge During Germinal Center Reactions. *Front Immunol* *9*, 1792. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01792>.
- Fenton, M.J. (1992). Review: transcriptional and post-transcriptional regulation of interleukin 1 gene expression. *Int. J. Immunopharmacol.* *14*, 401–411. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(92\)90170-p](https://doi.org/10.1016/0192-0561(92)90170-p).
- Fleischmann, R., Stern, R., and Iqbal, I. (2004). Anakinra: an inhibitor of IL-1 for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opinion on Biological Therapy* *4*, 1333–1344. <https://doi.org/10.1517/14712598.4.8.1333>.
- Foerster, J., and Molęda, A. (2020). Virus-Like Particle-Mediated Vaccination against Interleukin-13 May Harbour General Anti-Allergic Potential beyond Atopic Dermatitis. *Viruses* *12*. <https://doi.org/10.3390/v12040438>.
- Fonseca, V.R., Romão, V.C., Agua-Doce, A., Santos, M., López-Presa, D., Ferreira, A.C., Fonseca, J.E., and Graca, L. (2018). Blood T Follicular Regulatory Cells / T Follicular Helper Cells ratio Marks Ectopic Lymphoid Structure Formation and PD-1+ICOS+T Follicular Helper Cells Indicate Disease Activity in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* <https://doi.org/10.1002/art.40424>.
- Fortea-Gordo, P., Nuño, L., Villalba, A., Peiteado, D., Monjo, I., Sánchez-Mateos, P., Puig-Kröger, A., Balsa, A., and Miranda-Carús, M.-E. (2019). Two populations of circulating PD-1hiCD4 T cells with distinct B cell helping capacity are elevated in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology* *58*, 1662–1673. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez169>.
- Franckaert, D., Dooley, J., Roos, E., Floess, S., Huehn, J., Luche, H., Fehling, H.J., Liston, A., Linterman, M.A., and Schlenner, S.M. (2015). Promiscuous Foxp3-cre activity reveals a differential requirement for CD28 in Foxp3⁺ and Foxp3⁻ T cells. *Immunol Cell Biol* *93*, 417–423. <https://doi.org/10.1038/icb.2014.108>.

- Fu, W., Liu, X., Lin, X., Feng, H., Sun, L., Li, S., Chen, H., Tang, H., Lu, L., Jin, W., et al. (2018). Deficiency in T follicular regulatory cells promotes autoimmunity. *J. Exp. Med.* *215*, 815–825. <https://doi.org/10.1084/jem.20170901>.
- Galli, S.J., and Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nat. Med.* *18*, 693–704. <https://doi.org/10.1038/nm.2755>.
- Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013a). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* *39*, 1003–1018. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010>.
- Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013b). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* *39*, 1003–1018. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010>.
- Gatto, D., and Brink, R. (2013). B cell localization: regulation by EBI2 and its oxysterol ligand. *Trends Immunol.* *34*, 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.01.007>.
- Giri, J.G., Newton, R.C., and Horuk, R. (1990). Identification of soluble interleukin-1 binding protein in cell-free supernatants. Evidence for soluble interleukin-1 receptor. *J. Biol. Chem.* *265*, 17416–17419. .
- Gowthaman, U., Chen, J.S., Zhang, B., Flynn, W.F., Lu, Y., Song, W., Joseph, J., Gertie, J.A., Xu, L., Collet, M.A., et al. (2019). Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE. *Science* *365*. <https://doi.org/10.1126/science.aaw6433>.
- de Graav, G.N., Dieterich, M., Hesselink, D.A., Boer, K., Clahsen-van Groningen, M.C., Kraaijeveld, R., Litjens, N.H.R., Bouamar, R., Vanderlocht, J., Tilanus, M., et al. (2015). Follicular T helper cells and humoral reactivity in kidney transplant patients. *Clin. Exp. Immunol.* *180*, 329–340. <https://doi.org/10.1111/cei.12576>.
- Greenfeder, S.A., Nunes, P., Kwee, L., Labow, M., Chizzonite, R.A., and Ju, G. (1995). Molecular Cloning and Characterization of a Second Subunit of the Interleukin 1 Receptor Complex. *J. Biol. Chem.* *270*, 13757–13765. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.23.13757>.
- Gül, A., Tugal-Tutkun, I., Dinarello, C.A., Reznikov, L., Esen, B.A., Mirza, A., Scannon, P., and Solinger, A. (2012). Interleukin-1 β -regulating antibody XOMA 052 (gevokizumab) in the treatment of acute exacerbations of resistant uveitis of Behçet’s disease: an open-label pilot study. *Ann Rheum Dis* *71*, 563–566. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-155143>.
- Guo, Z., Liang, H., Xu, Y., Liu, L., Ren, X., Zhang, S., Wei, S., and Xu, P. (2017). The Role of Circulating T Follicular Helper Cells and Regulatory Cells in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Scand. J. Immunol.* *86*, 107–112. <https://doi.org/10.1111/sji.12566>.
- Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., et al. (2013). CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* *123*, 2873–2892. <https://doi.org/10.1172/JCI67428>.
- Han, L., Yang, X., Yu, Y., Wan, W., Lv, L., and Zou, H. (2019). Associations of circulating CXCR3-PD-1+CD4⁺T cells with disease activity of systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* *29*, 461–469. <https://doi.org/10.1080/14397595.2018.1469581>.
- Harker, J.A., Lewis, G.M., Mack, L., and Zuniga, E.I. (2011). Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. *Science* *334*, 825–829. <https://doi.org/10.1126/science.1208421>.

- Haynes, N.M., Allen, C.D.C., Lesley, R., Ansel, K.M., Killeen, N., and Cyster, J.G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J. Immunol.* *179*, 5099–5108.
- Heath, W.R., Kato, Y., Steiner, T.M., and Caminschi, I. (2019). Antigen presentation by dendritic cells for B cell activation. *Current Opinion in Immunology* *58*, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.04.003>.
- Hoffman, H.M., Throne, M.L., Amar, N.J., Sebai, M., Kivitz, A.J., Kavanaugh, A., Weinstein, S.P., Belomestnov, P., Yancopoulos, G.D., Stahl, N., et al. (2008). Efficacy and safety of riloncept (interleukin-1 trap) in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes: Results from two sequential placebo-controlled studies. *Arthritis Rheum* *58*, 2443–2452. <https://doi.org/10.1002/art.23687>.
- Holm Hansen, R., Højsgaard Chow, H., Sellebjerg, F., and Rode von Essen, M. (2019). Dimethyl fumarate therapy suppresses B cell responses and follicular helper T cells in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult. Scler.* *25*, 1289–1297. <https://doi.org/10.1177/1352458518790417>.
- Hong, S.-W., O, E., Lee, J.Y., Lee, M., Han, D., Ko, H.-J., Sprent, J., Surh, C.D., and Kim, K.S. (2019). Food antigens drive spontaneous IgE elevation in the absence of commensal microbiota. *Sci. Adv.* *5*, eaaw1507. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw1507>.
- Horai, R., Saijo, S., Tanioka, H., Nakae, S., Sudo, K., Okahara, A., Ikuse, T., Asano, M., and Iwakura, Y. (2000). Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Exp. Med.* *191*, 313–320.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* *299*, 1057–1061. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>.
- Hou, S., Clement, R.L., Diallo, A., Blazar, B.R., Rudensky, A.Y., Sharpe, A.H., and Sage, P.T. (2019). FoxP3 and Ezh2 regulate Tfr cell suppressive function and transcriptional program. *J. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1084/jem.20181134>.
- Ivanchenko, M., Aqrabi, L.A., Björk, A., Wahren-Herlenius, M., and Chemin, K. (2019). FoxP3+ CXCR5+ CD4+ T cell frequencies are increased in peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* <https://doi.org/10.1111/cei.13244>.
- Iwai, H., and Inaba, M. (2012). Fetal thymus graft prevents age-related hearing loss and up regulation of the IL-1 receptor type II gene in CD4(+) T cells. *J. Neuroimmunol.* *250*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.05.007>.
- Jacquemin, C., Taieb, A., Boniface, K., Seneschal, J., and FHU ACRONIM (2019). Imbalance of peripheral follicular helper T lymphocyte subsets in active vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res* *32*, 588–592. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12763>.
- Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* *325*, 1006–1010. <https://doi.org/10.1126/science.1175870>.

- Kawamoto, S., Tran, T.H., Maruya, M., Suzuki, K., Doi, Y., Tsutsui, Y., Kato, L.M., and Fagarasan, S. (2012). The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science* 336, 485–489. <https://doi.org/10.1126/science.1217718>.
- Kim, A.R., Han, D., Choi, J.Y., Seok, J., Kim, S.-E., Seo, S.-H., Takahashi, H., Amagai, M., Park, S.-H., Kim, S.-C., et al. (2020). Targeting ICOS expressed on CXCR5+PD-1+ T helper cells suppresses the progression of pemphigus vulgaris. *J. Allergy Clin. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.03.036>.
- Kim, J.-W., Lee, J., Hong, S.-M., Lee, J., Cho, M.-L., and Park, S.-H. (2019). Circulating CCR7^{lo} PD-1^{hi} Follicular Helper T Cells Indicate Disease Activity and Glandular Inflammation in Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *Immune Netw* 19, e26. <https://doi.org/10.4110/in.2019.19.e26>.
- Kobayashi, Y., Harada, A., Furuta, B., Asou, H., Kato, U., and Umeda, M. (2013). The role of NADRIN, a Rho GTPase-activating protein, in the morphological differentiation of astrocytes. *J. Biochem.* 153, 389–398. <https://doi.org/10.1093/jb/mvt005>.
- Kroenke, M.A., Eto, D., Locci, M., Cho, M., Davidson, T., Haddad, E.K., and Crotty, S. (2012). Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. *J. Immunol.* 188, 3734–3744. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103246>.
- La Muraglia, G.M., Wagener, M.E., Ford, M.L., and Badell, I.R. (2020). Circulating T follicular helper cells are a biomarker of humoral alloreactivity and predict donor-specific antibody formation after transplantation. *C* 20, 75–87. <https://doi.org/10.1111/ajt.15517>.
- Lachmann, H.J., Kone-Paut, I., Kuemmerle-Deschner, J.B., Leslie, K.S., Hachulla, E., Quartier, P., Gitton, X., Widmer, A., Patel, N., and Hawkins, P.N. (2009). Use of Canakinumab in the Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome. *N Engl J Med* 360, 2416–2425. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810787>.
- Laguna-Goya, R., Suárez-Fernández, P., and Paz-Artal, E. (2019). Follicular helper T cells and humoral response in organ transplantation. *Transplant Rev (Orlando)* 33, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.ttre.2019.06.003>.
- Laidlaw, B.J., Lu, Y., Amezcua, R.A., Weinstein, J.S., Vander Heiden, J.A., Gupta, N.T., Kleinstein, S.H., Kaech, S.M., and Craft, J. (2017). Interleukin-10 from CD4+ follicular regulatory T cells promotes the germinal center response. *Sci Immunol* 2. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan4767>.
- Lama, J.K., Iijima, K., Kobayashi, T., and Kita, H. (2022). Blocking the inhibitory receptor programmed cell death 1 prevents allergic immune response and anaphylaxis in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* S0091674922000847. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.01.014>.
- Lang, D., Knop, J., Wesche, H., Raffetseder, U., Kurrle, R., Boraschi, D., and Martin, M.U. (1998). The Type II IL-1 Receptor Interacts with the IL-1 Receptor Accessory Protein: A Novel Mechanism of Regulation of IL-1 Responsiveness. *The Journal of Immunology* 161, 6871–6877. .
- Lechner, A., Schlößer, H.A., Thelen, M., Wennhold, K., Rothschild, S.I., Gilles, R., Quaas, A., Siefer, O.G., Huebbers, C.U., Cukuroglu, E., et al. (2019). Tumor-associated B cells and humoral immune response in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 8. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1535293>.

- Lederer, K., Bettini, E., Parvathaneni, K., Painter, M.M., Agarwal, D., Lundgreen, K.A., Weirick, M., Muralidharan, K., Castaño, D., Goel, R.R., et al. (2022). Germinal center responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccines in healthy and immunocompromised individuals. *Cell* S0092867422001386. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.027>.
- Lee, J., Park, H., Eom, J., and Kang, S.G. (2018). MicroRNA-mediated Regulation of the Development and Functions of Follicular Helper T cells. *Immune Netw* 18, e7. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e7>.
- León, B., Bradley, J.E., Lund, F.E., Randall, T.D., and Ballesteros-Tato, A. (2014). FoxP3+ regulatory T cells promote influenza-specific Tfh responses by controlling IL-2 availability. *Nat Commun* 5, 3495. <https://doi.org/10.1038/ncomms4495>.
- Levin, C., Bonduelle, O., Nuttens, C., Primard, C., Verrier, B., Boissonnas, A., and Combadière, B. (2017). Critical Role for Skin-Derived Migratory DCs and Langerhans Cells in TFH and GC Responses after Intradermal Immunization. *Journal of Investigative Dermatology* 137, 1905–1913. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.04.016>.
- Lim, H.W., Hillsamer, P., and Kim, C.H. (2004a). 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.* 114, 1640–1649. <https://doi.org/10.1172/JCI22325>.
- Lim, H.W., Hillsamer, P., and Kim, C.H. (2004b). 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.* 114, 1640–1649. <https://doi.org/10.1172/JCI22325>.
- Linterman, M.A., and Hill, D.L. (2016). Can follicular helper T cells be targeted to improve vaccine efficacy? *F1000Res* 5. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7388.1>.
- Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* 17, 975–982. <https://doi.org/10.1038/nm.2425>.
- Liu, C., Wang, D., Lu, S., Xu, Q., Zhao, L., Zhao, J., Song, Y., and Wang, H. (2018). Increased Circulating Follicular Treg Cells Are Associated With Lower Levels of Autoantibodies in Patients With Rheumatoid Arthritis in Stable Remission. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 70, 711–721. <https://doi.org/10.1002/art.40430>.
- Liu, G.Y., Fairchild, P.J., Smith, R.M., Prowle, J.R., Kioussis, D., and Wraith, D.C. (1995). Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity* 3, 407–415. .
- Locci, M., Havenar-Daughton, C., Landais, E., Wu, J., Kroenke, M.A., Arlehamn, C.L., Su, L.F., Cubas, R., Davis, M.M., Sette, A., et al. (2013). Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* 39, 758–769. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.031>.
- Ma, C.S., and Deenick, E.K. (2014). Human T follicular helper (Tfh) cells and disease. *Immunol. Cell Biol.* 92, 64–71. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.55>.
- Ma, C.S., Nichols, K.E., and Tangye, S.G. (2007). Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 337–379. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141651>.

- Ma, C.S., Wong, N., Rao, G., Avery, D.T., Torpy, J., Hambridge, T., Bustamante, J., Okada, S., Stoddard, J.L., Deenick, E.K., et al. (2015). Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.* *136*, 993-1006.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.05.036>.
- Ma, J., Zhu, C., Ma, B., Tian, J., Baidoo, S.E., Mao, C., Wu, W., Chen, J., Tong, J., Yang, M., et al. (2012). Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Dev. Immunol.* *2012*, 827480. <https://doi.org/10.1155/2012/827480>.
- Maceiras, A.R., and Graca, L. (2015). Identification of Foxp3⁺ T follicular regulatory (Tfr) cells by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* *1291*, 143–150. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2498-1_12.
- Maceiras, A.R., Almeida, S.C.P., Mariotti-Ferrandiz, E., Chaara, W., Jebbawi, F., Six, A., Hori, S., Klatzmann, D., Faro, J., and Graca, L. (2017a). T follicular helper and T follicular regulatory cells have different TCR specificity. *Nat Commun* *8*, 15067. <https://doi.org/10.1038/ncomms15067>.
- Maceiras, A.R., Almeida, S.C.P., Mariotti-Ferrandiz, E., Chaara, W., Jebbawi, F., Six, A., Hori, S., Klatzmann, D., Faro, J., and Graca, L. (2017b). T follicular helper and T follicular regulatory cells have different TCR specificity. *Nat Commun* *8*, 15067. <https://doi.org/10.1038/ncomms15067>.
- MacLennan, I.C. (1994). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 117–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.001001>.
- Malhotra, D., Burrack, K.S., Jenkins, M.K., and Frosch, A.E. (2020). Antigen-Specific CD4⁺ T Cells Exhibit Distinct Kinetic and Phenotypic Patterns During Primary and Secondary Responses to Infection. *Frontiers in Immunology* *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02125>.
- Mantovani, A., Dinarello, C.A., Molgora, M., and Garlanda, C. (2019). IL-1 and related cytokines in innate and adaptive immunity in health and disease. *Immunity* *50*, 778–795. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.012>.
- March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., and Grabstein, K. (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* *315*, 641–647. <https://doi.org/10.1038/315641a0>.
- Martin, M.U. (2013). Special aspects of interleukin-33 and the IL-33 receptor complex. *Seminars in Immunology* *25*, 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.006>.
- Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* *440*, 237–241. <https://doi.org/10.1038/nature04516>.
- Mathupala, S.P. (2009). Delivery of small-interfering RNA (siRNA) to the brain. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* *19*, 137–140. <https://doi.org/10.1517/13543770802680195>.
- McCausland, M.M., Yusuf, I., Tran, H., Ono, N., Yanagi, Y., and Crotty, S. (2007). SAP regulation of follicular helper CD4 T cell development and humoral immunity is independent of SLAM and Fyn kinase. *J. Immunol.* *178*, 817–828. .

- Merkenschlager, J., Finkin, S., Ramos, V., Kraft, J., Cipolla, M., Nowosad, C.R., Hartweger, H., Zhang, W., Olinares, P.D.B., Gazumyan, A., et al. (2021). Dynamic regulation of T FH selection during the germinal centre reaction. *Nature* 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03187-x>.
- Miyajima, S., Shigehara, K., Kamekura, R., Takaki, H., Yabe, H., Ikegami, I., Asai, Y., Nishikiori, H., Chiba, H., Uno, E., et al. (2020). Activated circulating T follicular helper cells and skewing of T follicular helper 2 cells are down-regulated by treatment including an inhaled corticosteroid in patients with allergic asthma. *Allergy International* 69, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2019.08.008>.
- Molgora, M., Supino, D., Mantovani, A., and Garlanda, C. (2018). Tuning inflammation and immunity by the negative regulators IL-1R2 and IL-1R8. *Immunol. Rev.* 281, 233–247. <https://doi.org/10.1111/imr.12609>.
- Moody, M.A., Pedroza-Pacheco, I., Vandergrift, N.A., Chui, C., Lloyd, K.E., Parks, R., Soderberg, K.A., Ogbe, A.T., Cohen, M.S., Liao, H.-X., et al. (2016). Immune perturbations in HIV-1-infected individuals who make broadly neutralizing antibodies. *Sci Immunol* 1, aag0851. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aag0851>.
- Moon, J.J., Suh, H., Li, A.V., Ockenhouse, C.F., Yadava, A., and Irvine, D.J. (2012). Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines that expand Tfh cells and promote germinal center induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1080–1085. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112648109>.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18470–18476. .
- Murphy, P.A., Cebula, T.A., Levin, J., and Windle, B.E. (1981). Rabbit macrophages secrete two biochemically and immunologically distinct endogenous pyrogens. *Infect. Immun.* 34, 177–183. .
- Nicklin, M.J., Hughes, D.E., Barton, J.L., Ure, J.M., and Duff, G.W. (2000). Arterial inflammation in mice lacking the interleukin 1 receptor antagonist gene. *J. Exp. Med.* 191, 303–312. <https://doi.org/10.1084/jem.191.2.303>.
- Nikolouli, E., Elfaki, Y., Herppich, S., Schelmbauer, C., Delacher, M., Falk, C., Mufazalov, I.A., Waisman, A., Feuerer, M., and Huehn, J. (2020). Recirculating IL-1R2+ Tregs fine-tune intrathymic Treg development under inflammatory conditions. *Cell Mol Immunol* <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0352-8>.
- Niogret, J., Berger, H., Rebe, C., Mary, R., Ballot, E., Truntzer, C., Thibaudin, M., Derangère, V., Hibos, C., Hampe, L., et al. (2021). Follicular helper-T cells restore CD8⁺-dependent antitumor immunity and anti-PD-L1/PD-1 efficacy. *J Immunother Cancer* 9, e002157. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-002157>.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.-H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325, 1001–1005. <https://doi.org/10.1126/science.1176676>.
- Otsuka, K., Yamada, A., Saito, M., Ushio, A., Sato, M., Kisoda, S., Shao, W., Tsunematsu, T., Kudo, Y., Arakaki, R., et al. (2019). Ascl2-Regulated Follicular Helper T Cells Promote

Autoimmunity in a Murine Model for Sjögren's Syndrome. *Am. J. Pathol.* <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.08.008>.

Pallikkuth, S., de Armas, L.R., Rinaldi, S., George, V.K., Pan, L., Arheart, K.L., Pahwa, R., and Pahwa, S. (2019). Dysfunctional peripheral T follicular helper cells dominate in people with impaired influenza vaccine responses: Results from the FLORAH study. *PLoS Biol.* *17*, e3000257. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000257>.

Papillion, A., Powell, M.D., Chisolm, D.A., Bachus, H., Fuller, M.J., Weinmann, A.S., Villarino, A., O'Shea, J.J., León, B., Oestreich, K.J., et al. (2019). Inhibition of IL-2 responsiveness by IL-6 is required for the generation of GC-TFH cells. *Sci Immunol* *4*. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaw7636>.

Perreau, M., Savoye, A.-L., De Cignis, E., Corpataux, J.-M., Cubas, R., Haddad, E.K., De Leval, L., Graziosi, C., and Pantaleo, G. (2013). Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J. Exp. Med.* *210*, 143–156. <https://doi.org/10.1084/jem.20121932>.

Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* *131*, 959–971. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>.

Polack, F.P., Thomas, S.J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J.L., Pérez Marc, G., Moreira, E.D., Zerbini, C., et al. (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine* *383*, 2603–2615. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>.

Ponce, L.F., García-Martínez, K., and León, K. (2019). Quantitative assessment of extracellular IL-1 regulation. *J. Theor. Biol.* *487*, 110113. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.110113>.

Puthenparampil, M., Zito, A., Pantano, G., Federle, L., Stropparo, E., Miante, S., Silvestro, G.D., Plebani, M., and Gallo, P. Peripheral imbalanced TFH/TFR ratio correlates with intrathecal IgG synthesis in multiple sclerosis at clinical onset. *Multiple Sclerosis Journal* *9*. .

Quebrada Palacio, L.P., Fernández, E.R., Hernández-Vásquez, Y., Petray, P.B., and Postan, M. (2020). Circulating T Follicular Helper Cell Abnormalities Associated to Different Clinical Forms of Chronic Chagas Disease. *Front Cell Infect Microbiol* *10*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00126>.

Rajewsky, K., Förster, I., and Cumano, A. (1987). Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science* *238*, 1088–1094. .

Rasheed, A.-U., Rahn, H.-P., Sallusto, F., Lipp, M., and Müller, G. (2006). Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1892–1903. <https://doi.org/10.1002/eji.200636136>.

Ray, J.P., Marshall, H.D., Laidlaw, B.J., Staron, M.M., Kaech, S.M., and Craft, J. (2014). Transcription factor STAT3 and type I interferons are corepressive insulators for differentiation of follicular helper and T helper 1 cells. *Immunity* *40*, 367–377. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.005>.

Re, F., Muzio, M., De Rossi, M., Polentarutti, N., Giri, J.G., Mantovani, A., and Colotta, F. (1994). The type II “receptor” as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor. *The Journal of Experimental Medicine* *179*, 739–743. <https://doi.org/10.1084/jem.179.2.739>.

- Reddy, S., Jia, S., Geoffrey, R., Lorier, R., Suchi, M., Broeckel, U., Hessner, M.J., and Verbsky, J. (2009). An autoinflammatory disease due to homozygous deletion of the IL1RN locus. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2438–2444. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0809568>.
- Reeves, W.H., Lee, P.Y., Weinstein, J.S., Satoh, M., and Lu, L. (2009). Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends Immunol.* *30*, 455–464. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.06.003>.
- Reif, K., Ekland, E.H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Förster, R., and Cyster, J.G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* *416*, 94–99. <https://doi.org/10.1038/416094a>.
- Reinhardt, R.L., Liang, H.-E., and Locksley, R.M. (2009). Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat. Immunol.* *10*, 385–393. <https://doi.org/10.1038/ni.1715>.
- Ritvo, P.-G., and Klatzmann, D. (2019). Interleukin-1 in the Response of Follicular Helper and Follicular Regulatory T Cells. *Front. Immunol.* *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00250>.
- Ritvo, P.-G., Saadawi, A., Barennes, P., Quiniou, V., Chaara, W., El Soufi, K., Bonnet, B., Six, A., Shugay, M., Mariotti-Ferrandiz, E., et al. (2018). High-resolution repertoire analysis reveals a major bystander activation of Tfh and Tfr cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *115*, 9604–9609. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808594115>.
- Ritvo, P.-G.G., Churlaud, G., Quiniou, V., Florez, L., Brimaud, F., Fourcade, G., Mariotti-Ferrandiz, E., and Klatzmann, D. (2017a). Tfr cells lack IL-2R α but express decoy IL-1R2 and IL-1Ra and suppress the IL-1-dependent activation of Tfh cells. *Sci Immunol* *2*. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan0368>.
- Ritvo, P.-G.G., Churlaud, G., Quiniou, V., Florez, L., Brimaud, F., Fourcade, G., Mariotti-Ferrandiz, E., and Klatzmann, D. (2017b). Tfr cells lack IL-2R α but express decoy IL-1R2 and IL-1Ra and suppress the IL-1-dependent activation of Tfh cells. *Sci Immunol* *2*. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan0368>.
- Rivers-Auty, J., Daniels, M.J.D., Colliver, I., Robertson, D.L., and Brough, D. (2018). Redefining the ancestral origins of the interleukin-1 superfamily. *Nat Commun* *9*, 1156. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03362-1>.
- Roncador, G., García Verdes-Montenegro, J.-F., Tedoldi, S., Paterson, J.C., Klapper, W., Ballabio, E., Maestre, L., Pileri, S., Hansmann, M.-L., Piris, M.A., et al. (2007). Expression of two markers of germinal center T cells (SAP and PD-1) in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica* *92*, 1059–1066. .
- Ruffin, N., Hani, L., and Seddiki, N. (2017). From dendritic cells to B cells dysfunctions during HIV-1 infection: T follicular helper cells at the crossroads. *Immunology* *151*, 137–145. <https://doi.org/10.1111/imm.12730>.
- Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2016). T follicular regulatory cells. *Immunol. Rev.* *271*, 246–259. <https://doi.org/10.1111/imr.12411>.
- Sage, P.T., Francisco, L.M., Carman, C.V., and Sharpe, A.H. (2013). The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat. Immunol.* *14*, 152–161. <https://doi.org/10.1038/ni.2496>.
- Sage, P.T., Paterson, A.M., Lovitch, S.B., and Sharpe, A.H. (2014). The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory,

and T regulatory cells. *Immunity* 41, 1026–1039. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.005>.

Sage, P.T., Ron-Harel, N., Juneja, V.R., Sen, D.R., Maleri, S., Sungnak, W., Kuchroo, V.K., Haining, W.N., Chevrier, N., Haigis, M., et al. (2016). Suppression by TFR cells leads to durable and selective inhibition of B cell effector function. *Nat. Immunol.* 17, 1436–1446. <https://doi.org/10.1038/ni.3578>.

Saito, R., Onodera, H., Tago, H., Suzuki, Y., Shimizu, M., Matsumura, Y., Kondo, T., and Itoyama, Y. (2005). Altered expression of chemokine receptor CXCR5 on T cells of myasthenia gravis patients. *J. Neuroimmunol.* 170, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.09.001>.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155, 1151–1164. .

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775–787. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>.

Santana, M.A., and Esquivel-Guadarrama, F. (2006). Cell biology of T cell activation and differentiation. *Int. Rev. Cytol.* 250, 217–274. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)50006-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)50006-3).

Satake, N., Duong, C., Yoshida, S., Oestergaard, M., Chen, C., Peralta, R., Guo, S., Seth, P.P., Li, Y., Beckett, L., et al. (2016). Novel Targeted Therapy for Precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Anti-CD22 Antibody-MXD3 Antisense Oligonucleotide Conjugate. *Mol Med* 22, 632–642. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00210>.

Satoh, M., Treadwell, E.L., and Reeves, W.H. (1995). Pristane induces high titers of anti-Su and anti-nRNP/Sm autoantibodies in BALB/c mice. Quantitation by antigen capture ELISAs based on monospecific human autoimmune sera. *J. Immunol. Methods* 182, 51–62. .

Satoh, M., Richards, H.B., Shaheen, V.M., Yoshida, H., Shaw, M., Naim, J.O., Wooley, P.H., and Reeves, W.H. (2000). Widespread susceptibility among inbred mouse strains to the induction of lupus autoantibodies by pristane. *Clin Exp Immunol* 121, 399–405. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01276.x>.

Sayin, I., Radtke, A.J., Vella, L.A., Jin, W., Wherry, E.J., Buggert, M., Betts, M.R., Herati, R.S., Germain, R.N., and Canaday, D.H. (2018). Spatial distribution and function of T follicular regulatory cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* 215, 1531–1542. <https://doi.org/10.1084/jem.20171940>.

Scapigliati, G., Ghiara, P., Bartalini, M., Tagliabue, A., and Boraschi, D. (1989). Differential binding of IL-1 α and IL-1 β to receptors on B and T cells. *FEBS Letters* 243, 394–398. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80169-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80169-3).

Schenten, D., Nish, S.A., Yu, S., Yan, X., Lee, H.K., Brodsky, I., Pasman, L., Yordy, B., Wunderlich, F.T., Brüning, J.C., et al. (2014). Signaling through the Adaptor Molecule MyD88 in CD4⁺ T Cells Is Required to Overcome Suppression by Regulatory T Cells. *Immunity* 40, 78–90. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.023>.

Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41-52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>.

- Seth, A., and Craft, J. (2019). Spatial and functional heterogeneity of follicular helper T cells in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* *61*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.06.005>.
- Shan, Y., Qi, C., Zhao, J., Liu, Y., Gao, H., Zhao, D., Ding, F., Wang, J., and Jiang, Y. (2015a). Higher frequency of peripheral blood follicular regulatory T cells in patients with new onset ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *42*, 154–161. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12330>.
- Shan, Y., Qi, C., Zhao, J., Liu, Y., Gao, H., Zhao, D., Ding, F., Wang, J., and Jiang, Y. (2015b). Higher frequency of peripheral blood follicular regulatory T cells in patients with new onset ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *42*, 154–161. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12330>.
- Shao, P., Li, F., Wang, J., Chen, X., Liu, C., and Xue, H.-H. (2019). Cutting Edge: Tcf1 Instructs T Follicular Helper Cell Differentiation by Repressing Blimp1 in Response to Acute Viral Infection. *J. Immunol.* *203*, 801–806. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900581>.
- Sharabi, A., Tsokos, M.G., Ding, Y., Malek, T.R., Klatzmann, D., and Tsokos, G.C. (2018). Regulatory T cells in the treatment of disease. *Nat Rev Drug Discov* <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.148>.
- Shi, W., Li, X., Cha, Z., Sun, S., Wang, L., Jiao, S., Yang, B., Shi, Y., Wang, Z., Wu, Z., et al. (2014). Dysregulation of circulating follicular helper T cells in nonsmall cell lung cancer. *DNA Cell Biol.* *33*, 355–360. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2332>.
- Shulman, Z., Gitlin, A.D., Weinstein, J.S., Lainez, B., Esplugues, E., Flavell, R.A., Craft, J.E., and Nussenzweig, M.C. (2014). Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science* *345*, 1058–1062. <https://doi.org/10.1126/science.1257861>.
- Sibley, C.H., Plass, N., Snow, J., Wiggs, E.A., Brewer, C.C., King, K.A., Zalewski, C., Kim, H.J., Bishop, R., Hill, S., et al. (2012). Sustained response and prevention of damage progression in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease treated with anakinra: A cohort study to determine three- and five-year outcomes. *Arthritis & Rheumatism* *64*, 2375–2386. <https://doi.org/10.1002/art.34409>.
- Simpson, N., Gatenby, P.A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., Manku, H., Vyse, T.J., Roncador, G., Huttley, G.A., et al. (2010a). Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *62*, 234–244. <https://doi.org/10.1002/art.25032>.
- Simpson, N., Gatenby, P.A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., Manku, H., Vyse, T.J., Roncador, G., Huttley, G.A., et al. (2010b). Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *62*, 234–244. <https://doi.org/10.1002/art.25032>.
- Sims, J., March, C., Cosman, D., Widmer, M., MacDonald, H., McMahan, C., Grubin, C., Wignall, J., Jackson, J., Call, S., et al. (1988). cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* *241*, 585–589. <https://doi.org/10.1126/science.2969618>.
- Sitia, R., and Rubartelli, A. (2020). Evolution, role in inflammation, and redox control of leaderless secretory proteins. *J. Biol. Chem.* *jbc.REV119.008907*. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.008907>.

- Song, E., Zhu, P., Lee, S.-K., Chowdhury, D., Kussman, S., Dykxhoorn, D., Feng, Y., Palliser, D., Weiner, D., Shankar, P., et al. (2005). Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nature Biotechnology* 23, 709–717. <https://doi.org/10.1038/nbt1101>.
- Sönmez, H.E., and Özen, S. (2017). A clinical update on inflammasomopathies. *International Immunology* 29, 393–400. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx020>.
- Stylianou, E., O'Neill, L.A., Rawlinson, L., Edbrooke, M.R., Woo, P., and Saklatvala, J. (1992). Interleukin 1 induces NF-kappa B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 267, 15836–15841. .
- Sutton, B.J., and Gould, H.J. (1993). The human IgE network. *Nature* 366, 421–428. <https://doi.org/10.1038/366421a0>.
- Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K.H.G., and Lavelle, E.C. (2006). A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine* 203, 1685–1691. <https://doi.org/10.1084/jem.20060285>.
- Symons, J.A., Young, P.R., and Duff, G.W. (1995). Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 1714–1718. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1714>.
- Tahtinen, S., Tong, A.-J., Himmels, P., Oh, J., Paler-Martinez, A., Kim, L., Wichner, S., Oei, Y., McCarron, M.J., Freund, E.C., et al. (2022). IL-1 and IL-1ra are key regulators of the inflammatory response to RNA vaccines. *Nat Immunol* 23, 532–542. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01160-y>.
- Taylor-Robinson, A.W., and Phillips, R.S. (1994). Expression of the IL-1 receptor discriminates Th2 from Th1 cloned CD4+ T cells specific for *Plasmodium chabaudi*. *Immunology* 81, 216–221. .
- Thaler, K., Chandiramani, and Hansen, R. (2009). Efficacy and safety of anakinra for the treatment of rheumatoid arthritis: an update of the Oregon Drug Effectiveness Review Project. BTT 485. <https://doi.org/10.2147/BTT.S3579>.
- Townsend, W., Pasikowska, M., Yallop, D., Phillips, E.H., Patten, P.E.M., Salisbury, J.R., Marcus, R., Pepper, A., and Devereux, S. (2019). The architecture of neoplastic follicles in follicular lymphoma; analysis of the relationship between the tumor and follicular helper T-cells. *Haematologica* haematol.2019.220160. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.220160>.
- Tran, D.Q., Andersson, J., Hardwick, D., Bebris, L., Illei, G.G., and Shevach, E.M. (2009). Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3+ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood* 113, 5125–5133. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-199950>.
- Vaeth, M., Müller, G., Stauss, D., Dietz, L., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Lipp, M., Berberich, I., and Berberich-Siebelt, F. (2014). Follicular regulatory T cells control humoral autoimmunity via NFAT2-regulated CXCR5 expression. *J. Exp. Med.* 211, 545–561. <https://doi.org/10.1084/jem.20130604>.

- Vaeth, M., Eckstein, M., Shaw, P.J., Kozhaya, L., Yang, J., Berberich-Siebelt, F., Clancy, R., Unutmaz, D., and Feske, S. (2016). Store-Operated Ca(2+) Entry in Follicular T Cells Controls Humoral Immune Responses and Autoimmunity. *Immunity* 44, 1350–1364. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.013>.
- Vasilyev, F., Silkov, A., and Sennikov, S. (2015). Relationship between interleukin-1 type 1 and 2 receptor gene polymorphisms and the expression level of membrane-bound receptors. *Cell Mol Immunol* 12, 222–230. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.43>.
- Vastert, S.J., Jamilloux, Y., Quartier, P., Ohlman, S., Osterling Koskinen, L., Kullenberg, T., Franck-Larsson, K., Fautrel, B., and de Benedetti, F. (2019). Anakinra in children and adults with Still's disease. *Rheumatology* 58, vi9–vi22. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez350>.
- Victoria, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 429–457. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075032>.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 5, 520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>.
- Walker, L.S.K., and Sansom, D.M. (2011). The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 852–863. <https://doi.org/10.1038/nri3108>.
- Wang, K.K. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 23, 20–26. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(99\)01479-4](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01479-4).
- Wang, Z., and Tan, F. (2019). The Blockade of PD-1/PD-L1 Pathway Promotes the Apoptosis of CD19+ CD25+ Bregs and Suppresses the Secretion of IL-10 in Patients with Allergic Rhinitis. *Scand. J. Immunol.* <https://doi.org/10.1111/sji.12836>.
- Wang, J., Tian, X., Han, R., Zhang, X., Wang, X., Shen, H., Xue, L., Liu, Y., Yan, X., Shen, J., et al. (2014a). Downregulation of miR-486-5p contributes to tumor progression and metastasis by targeting protumorigenic ARHGAP5 in lung cancer. *Oncogene* 33, 1181–1189. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.42>.
- Wang, L., Qiu, J., Yu, L., Hu, X., Zhao, P., and Jiang, Y. (2014b). Increased numbers of CD5+CD19+CD1dhighIL-10+ Bregs, CD4+Foxp3+ Tregs, CD4+CXCR5+Foxp3+ follicular regulatory T (TFR) cells in CHB or CHC patients. *J Transl Med* 12, 251. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0251-9>.
- Wang, Y., Krémer, V., Iannascoli, B., Goff, O.R.-L., Mancardi, D.A., Ramke, L., de Chaisemartin, L., Bruhns, P., and Jönsson, F. (2022). Specificity of mouse and human Fcγ receptors and their polymorphic variants for IgG subclasses of different species. *Eur J Immunol* 52, 753–759. <https://doi.org/10.1002/eji.202149766>.
- Weber, J.P., Fuhrmann, F., Feist, R.K., Lahmann, A., Al Baz, M.S., Gentz, L.-J., Vu Van, D., Mages, H.W., Haftmann, C., Riedel, R., et al. (2015). ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2. *J. Exp. Med.* 212, 217–233. <https://doi.org/10.1084/jem.20141432>.
- Weinstein, J.S., Herman, E.I., Lainez, B., Licona-Limón, P., Esplugues, E., Flavell, R., and Craft, J. (2016). TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat. Immunol.* 17, 1197–1205. <https://doi.org/10.1038/ni.3554>.

- Wen, Y., Yang, B., Lu, J., Zhang, J., Yang, H., and Li, J. (2016). Imbalance of circulating CD4(+)CXCR5(+)FOXP3(+) Tfr-like cells and CD4(+)CXCR5(+)FOXP3(-) Tfh-like cells in myasthenia gravis. *Neurosci. Lett.* *630*, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.07.049>.
- Wing, J.B., Ise, W., Kurosaki, T., and Sakaguchi, S. (2014). Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4. *Immunity* *41*, 1013–1025. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.006>.
- Wing, J.B., Kitagawa, Y., Locci, M., Hume, H., Tay, C., Morita, T., Kidani, Y., Matsuda, K., Inoue, T., Kurosaki, T., et al. (2017). A distinct subpopulation of CD25- T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *114*, E6400–E6409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705551114>.
- Wollenberg, I., Agua-Doce, A., Hernández, A., Almeida, C., Oliveira, V.G., Faro, J., and Graca, L. (2011). Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. *J. Immunol.* *187*, 4553–4560. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101328>.
- Wu, H., Chen, Y., Liu, H., Xu, L.-L., Teuscher, P., Wang, S., Lu, S., and Dent, A.L. (2016a). Follicular regulatory T cells repress cytokine production by follicular helper T cells and optimize IgG responses in mice. *Eur. J. Immunol.* *46*, 1152–1161. <https://doi.org/10.1002/eji.201546094>.
- Wu, H., Xie, M.M., Liu, H., and Dent, A.L. (2016b). Stat3 Is Important for Follicular Regulatory T Cell Differentiation. *PLoS ONE* *11*, e0155040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155040>.
- Wu, X., Su, Z., Cai, B., Yan, L., Li, Y., Feng, W., and Wang, L. (2018). Increased Circulating Follicular Regulatory T-Like Cells May Play a Critical Role in Chronic Hepatitis B Virus Infection and Disease Progression. *Viral Immunol.* *31*, 379–388. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0171>.
- Xie, M.M., Chen, Q., Liu, H., Yang, K., Koh, B., Wu, H., Maleki, S.J., Hurlburt, B.K., Cook-Mills, J., Kaplan, M.H., et al. (2020). T follicular regulatory cells and IL-10 promote food antigen-specific IgE. *Journal of Clinical Investigation* *130*, 3820–3832. <https://doi.org/10.1172/JCI132249>.
- Xu, B., Wang, S., Zhou, M., Huang, Y., Fu, R., Guo, C., Chen, J., Zhao, J., Gaskin, F., Fu, S.M., et al. (2017a). The ratio of circulating follicular T helper cell to follicular T regulatory cell is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* *183*, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.07.004>.
- Xu, L., Huang, Q., Wang, H., Hao, Y., Bai, Q., Hu, J., Li, Y., Wang, P., Chen, X., He, R., et al. (2017b). The Kinase mTORC1 Promotes the Generation and Suppressive Function of Follicular Regulatory T Cells. *Immunity* *47*, 538–551.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.011>.
- Yang, G., Yang, X., Zhang, J., Li, G., Zheng, D., Peng, A., Hu, J., Xu, L., Yang, B., Yang, H., et al. (2018). Transcriptional repressor Blimp1 regulates follicular regulatory T-cell homeostasis and function. *Immunology* *153*, 105–117. <https://doi.org/10.1111/imm.12815>.
- Yao, Y., Wang, Z.-C., Wang, N., Zhou, P.-C., Chen, C.-L., Song, J., Pan, L., Liao, B., Zhang, X.-H., Yang, Y.-S., et al. (2019). Allergen immunotherapy improves defective follicular regulatory T cells in patients with allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *144*, 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.02.008>.

Yao, Y., Chen, C., Yu, D., and Liu, Z. (2021). Roles of follicular helper and regulatory T cells in allergic diseases and allergen immunotherapy. *Allergy* 76, 456–470. <https://doi.org/10.1111/all.14639>.

Yazdi, A.S., and Ghoreschi, K. (2016). The Interleukin-1 Family. *Adv. Exp. Med. Biol.* 941, 21–29. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_2.

Yusuf, I., Kageyama, R., Monticelli, L., Johnston, R.J., Ditoro, D., Hansen, K., Barnett, B., and Crotty, S. (2010). Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J. Immunol.* 185, 190–202. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903505>.

Zhang, K., Sun, Y.-L., Zhou, S.-N., Xu, R.-N., Liu, Z.-W., Wang, F.-S., and Shi, M. (2019a). Circulating CXCR3-CCR6-CXCR5+CD4+ T cells are associated with acute allograft rejection in liver transplantation. *Immunol. Lett.* 213, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.03.003>.

Zhang, K., Sun, Y.-L., Zhou, S.-N., Xu, R.-N., Liu, Z.-W., Wang, F.-S., and Shi, M. (2019b). Circulating CXCR3-CCR6-CXCR5+CD4+ T cells are associated with acute allograft rejection in liver transplantation. *Immunol. Lett.* 213, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.03.003>.

Zhang, Y., Garcia-Ibanez, L., and Toellner, K.-M. (2016). Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunol. Rev.* 270, 8–19. <https://doi.org/10.1111/imr.12396>.

Zheng, Y., Josefowicz, S.Z., Kas, A., Chu, T.-T., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2007). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445, 936–940. <https://doi.org/10.1038/nature05563>.

Zheng, Y., Humphry, M., Maguire, J.J., Bennett, M.R., and Clarke, M.C.H. (2013). Intracellular Interleukin-1 Receptor 2 Binding Prevents Cleavage and Activity of Interleukin-1 α , Controlling Necrosis-Induced Sterile Inflammation. *Immunity* 38, 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.01.008>.

Zhuang, H., Han, S., Lee, P.Y., Khaybullin, R., Shumyak, S., Lu, L., Chatha, A., Afaneh, A., Zhang, Y., Xie, C., et al. (2017). Pathogenesis of diffuse alveolar hemorrhage in murine lupus. *Arthritis Rheumatol* 69, 1280–1293. <https://doi.org/10.1002/art.40077>.