



**HAL**  
open science

# Les lymphocytes T folliculaires auxiliaires et les lymphocytes T régulateurs, un partenariat surprenant dans la réponse humorale

Julien Novarino

► **To cite this version:**

Julien Novarino. Les lymphocytes T folliculaires auxiliaires et les lymphocytes T régulateurs, un partenariat surprenant dans la réponse humorale. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30092 . tel-04259463

**HAL Id: tel-04259463**

**<https://theses.hal.science/tel-04259463v1>**

Submitted on 26 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

**En vue de l'obtention du  
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE  
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier**

---

**Présentée et soutenue par  
Julien NOVARINO**

Le 27 avril 2023

**Les lymphocytes T folliculaires auxiliaires et les lymphocytes T  
régulateurs, un partenariat surprenant dans la réponse  
humorale.**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **IMMUNOLOGIE**

Unité de recherche :

**INFINITY - Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires**

Thèse dirigée par

**Nicolas FAZILLEAU et Meryem ALOULOU**

Jury

**Mme Stéphanie GRAFF-DUBOIS, Rapporteur**

**Mme Hélène PAÏDASSI, Rapporteur**

**Mme Marion ESPÉLI, Rapporteur**

**Mme Encarnita MARIOTTI-FERRANDIZ, Examinatrice**

**M. Joost VAN-MEERWIJK, Examineur**

**M. Nicolas FAZILLEAU, Directeur de thèse**

**Mme Meryem ALOULOU, Co-directrice de thèse**



« La science ne doit pas être un plaisir égoïste : ceux qui ont la chance de pouvoir se consacrer aux études scientifiques doivent-êre aussi les premiers à mettre leurs connaissances au service de l'humanité. »

Paul Lafargue



# REMERCIEMENTS

*Je tiens d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et pour les échanges passionnants et bienveillants que nous avons eu.*

*J'aimerais également remercier toutes les personnes qui ont participé à ces travaux. Merci à l'ensemble de nos collaborateurs, en particulier Raïssa qui a passé beaucoup de temps sur nos analyses d'imagerie confocale. Merci aussi à tous les personnels des plateaux et services auxquels j'ai eu accès : la zootechnie, le plateau d'imagerie, de génomique et transcriptomique, avec une mention spéciale pour le plateau de cytométrie en flux que j'ai très souvent sollicité.*

*Merci à mon équipe, l'équipe NF/SG, d'abord de manière collective. C'est un luxe de travailler dans une équipe où il n'y a jamais de problèmes, une équipe bienveillante, une équipe bien gérée où chacun y trouve sa place.*

*Bien-sûr, je voudrais dire un immense merci au chef. Merci **Nicolas** de m'avoir fait confiance dès le début en M2 et d'avoir continué à me faire confiance même dans les moments où je perdais un peu espoir. Vous êtes toujours disponible malgré vos responsabilités, toujours de bonne humeur, toujours à se soucier si tout le monde va bien. Ce n'est peut-être pas grand-chose mais cela fait plaisir un chef qui passe nous voir avec le sourire tous les jours dès qu'il a cinq minutes pour dire bonjour.*

*En plus de cet aspect humain, vous m'avez aussi énormément appris, intellectuellement et scientifiquement. Tout en me laissant une immense liberté dans ma façon d'aborder les questions ou de les présenter, vous m'avez appris à organiser mes pensées et donc à organiser mon travail, ce dont j'avais bien besoin, moi qui ne suis pas vraiment un as de l'organisation.*

*En ce point justement vous avez formé un duo génial avec Meryem. Quand vous me permettiez de m'organiser, elle remettait un peu de bazar dans ma tête pour me stimuler et me pousser à aller encore plus loin. Grâce à vous deux, j'ai eu accès à deux visions de la recherche et pu apprendre de ces deux visions pour commencer à construire la mienne. Merci à tous les deux pour cette complémentarité et ce partenariat, pas surprenant mais stimulant.*

***Meryem**, tu m'as vraiment pris sous ton aile dès mon arrivée au labo. Tu as partagé avec moi ton enthousiasme, ta curiosité et ton amour de la recherche. Tu as toujours une nouvelle idée, toujours un nouveau truc à tester. C'est tellement stimulant. Merci pour ça mais merci aussi pour ta bienveillance, ton soutien, ton écoute. Même quand tu es partie en Angleterre tu étais toujours disponible, au moindre problème ou à la moindre question tu étais là. Merci pour tout, j'ai adoré travailler avec toi.*

***Fanny**, je ne vais pas trop m'étendre mais il y aurait beaucoup à dire. Tu as été bien plus qu'une collègue, plutôt une sœur de thèse. J'ai toujours pu compter sur toi. Même si nous n'avons pas du tout (du tout) les mêmes façons de fonctionner ou de réfléchir, c'était toujours un plaisir de travailler ou juste de passer du temps avec toi. Tu es une personne brillante, je suis heureux et fier d'avoir traversé cette période avec toi. Et merci d'avoir corrigé mes fautes d'orthographe pendant ces années de thèse.*

*Merci **Cyrielle**, tu as toujours été là pour me filer un coup de main entre deux choco-bons ou pour me faire rire avec tes bourdes ou tes expressions un peu inédites. Tu as rempli le bureau de bonne humeur. Je crois que tu as toujours nos fléchettes artisanales dans ton tiroir, fais en bon usage.*

*Merci **Coline**, j'ai adoré t'encadrer pendant ton stage de M2 puis travailler avec toi pendant la fin de cette thèse. J'en profite pour remercier tous les étudiants et étudiantes que j'ai eu la chance d'encadrer (Clara, Alexandre, Audrey, Léa, Alexandre, Guillem) et tous les autres qui sont passés dans l'équipe.*

**Claire**, merci de m'avoir supporté pendant toutes mes pauses cafés depuis le M2. J'espère que je ne t'ai pas trop embêté avec le bruit de la machine à café. Merci aussi particulièrement pour cette fin de thèse. C'était bien pratique d'avoir quelqu'un vers qui se tourner en cas de questions administratives au sujet de la thèse.

Merci **Corine**, comme je l'ai dit plus haut, c'était un plaisir de travailler dans une équipe bien gérée et c'est en grande partie grâce à toi. Tu fais un travail de l'ombre dont on ne se rend pas toujours compte quand on a la tête dans les manip. Merci pour ça mais aussi pour ta gentillesse et ta bienveillance.

Merci **José** pour tous tes conseils (en bio-informatique mais pas seulement), tes anecdotes et tes chocolats parfois nécessaires.

Merci **Vivien**. Tu n'as passé qu'un an avec nous mais j'ai tellement aimé passer cette année avec toi.

Merci **Carole**, nous nous sommes juste croisés dans l'équipe finalement mais c'était vraiment cool de finir cette thèse avec toi. Et merci encore de m'avoir prêté Blue, j'ai hâte de le revoir.

Enfin, merci **Sylvie**. Je tiens à vous remercier pour tous vos conseils et toutes vos remarques (à part celles sur ma tenue vestimentaire).

Du soutien je n'en ai pas eu qu'au sein de mon équipe.

Merci aux hérissons (des amis piquants mais toujours mignons) **Carmen**, **Ikram** et **Karl**. Nos gouters ou nos soirées ont été des bols d'air pour moi. Vous avez joué un rôle essentiel à mon équilibre. J'ai trop hâte d'enfin faire cet escape game du vin avec vous (oui oui, j'écris ça pour vous mettre un peu de pression afin de trouver une date).

*Merci aux autres copains et copines d'Infinity avec qui j'ai passé des supers moments (je ne cite pas de noms mais vous vous reconnaîtrez certainement). Avec un merci tout particulier au peuple des tortuleils.*

***Lidia**, merci pour tous les moments passés à Infinity, les heures de tri, les cafés ou justes les pauses. Mais merci aussi et surtout pour tous les moments en dehors du labo, aussi bien avant qu'après ton passage dans l'institut, comme les petits cafés pendant l'écriture de cette thèse ou les petites bières de décompression.*

*Merci également à mes proches qui ne font pas d'immunologie.*

*Mes amis, les montéchois : **Antoine, Jérémy, Céline, Vincent, Thomas, Océane, Lou** et **Julia**. On n'a jamais eu besoin de beaucoup de mots pour se comprendre alors juste merci.*

*Il y a les non montéchois à qui je dois énormément aussi, **Téo, Robin, Mathilde** pour ne citer qu'eux. Téo, on a un peu commencé cette aventure ensemble dans notre coloc il y a déjà 10 ans. On en a parcouru du chemin depuis les JO d'hiver de Sotchi jusqu'à la thèse.*

*Il y a 10 ans cela correspond aussi à la fin du lycée. J'en profite pour remercier **Nicole Lefèvre**. On n'a pas tous la chance de tomber sur des profs qui ont un impact aussi important. C'est vous (toi, je ne sais jamais) qui m'avez donné envie d'aller à l'université faire de la biologie alors merci pour ça.*

*Merci à toute la famille **Ladouce**.*

*À ma famille, les **papys**, les **mamies**, **papa**, **maman**, **Jessica**, **Lorie**, merci. Vous êtes les meilleurs. Vous m'avez toujours poussé et encouragé, je n'en serai pas là sans vous.*

*Enfin, Léa. Je ne sais pas vraiment si je dois dire merci ou désolé. Je n'ai pas été un cadeau, surtout sur la fin de l'écriture de la thèse. Mais tu as toujours été là pour me motiver, me rassurer, m'aider, m'aimer. Tu m'as permis aussi de m'évader quand j'en avais besoin. M'évader mais jamais fuir, tu sais très bien comment me remettre sur les rails quand il le faut. En tous cas, et j'en suis sûr, je n'y serais pas arrivé sans toi. Merci mon S.*



# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>15</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>23</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>27</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>31</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>35</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>39</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>43</b>
<b>1. Vaccination et système immunitaire .....</b>	<b>45</b>
<b>1.1 Histoire et principe de la vaccination .....</b>	<b>45</b>
<b>1.2 Réponse Immunitaire Innée .....</b>	<b>46</b>
<b>1.3 Réponse Immunitaire Adaptative .....</b>	<b>47</b>
<b>1.3.1 Les organes lymphoïdes secondaires .....</b>	<b>47</b>
<b>1.3.2 La réponse cellulaire .....</b>	<b>49</b>
<b>1.3.3 La réponse humorale : rôle des anticorps .....</b>	<b>50</b>

1.3.3.1	Structure des Ac.....	50
1.3.3.2	Modes d'action des Ac .....	51

## **2. Mise en place de la réponse B-T dépendante ... 55**

### **2.1 Acteurs cellulaires ..... 55**

#### **2.1.1 Les Cellules Dendritiques ..... 55**

2.1.1.1	Classification.....	55
2.1.1.2	Développement des cDC.....	57
2.1.1.3	Fonctions des cDC2 : CPA professionnelle.....	59
2.1.1.4	IL-2 et DC.....	61

#### **2.1.2 Les Lymphocytes T CD4+ ..... 65**

2.1.2.1	Développement .....	65
2.1.2.2	Activation des LT CD4+.....	68
2.1.2.3	Polarisation des LT CD4+.....	70

#### **2.1.3 Les Lymphocytes B.....73**

2.1.3.1	Le développement des LB .....	73
2.1.3.2	Activation des LB naïfs.....	77
2.1.3.3	Réponses B indépendantes des LT ou extra-folliculaires .....	79

### **2.2 Les LT folliculaires auxiliaires ..... 81**

#### **2.2.1 Rencontre avec une DC ..... 81**

#### **2.2.2 Rencontre avec un LB .....83**

#### **2.2.3 Rôle particulier de l'IL-2 pour les Tfh ..... 85**

## **3. Le Centre Germinatif ..... 87**

### **3.1 La zone sombre..... 88**

### **3.2 La zone claire..... 89**

## **4. La mémoire immunitaire ..... 93**

### **4.1 La mémoire des LT CD4+ ..... 93**

<b>4.1.1</b>	<b>Hétérogénéité des LT CD4+ mémoires.....</b>	<b>94</b>
4.1.1.1	Selon la localisation/circulation (Tcm, Tem, Trm).....	94
4.1.1.2	Selon la polarisation.....	96
<b>4.1.2</b>	<b>Génération des LT CD4+ mémoires.....</b>	<b>97</b>
<b>4.2</b>	<b>Les LTm de la MO.....</b>	<b>101</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Hétérogénéité des LTm de la MO.....</b>	<b>101</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Signaux d'adressage à la MO.....</b>	<b>102</b>
<b>4.3</b>	<b>Les Tfh mémoires.....</b>	<b>103</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Plasticité des mTfh.....</b>	<b>104</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Localisations des mTfh.....</b>	<b>105</b>
4.3.2.1	Les mTfh locaux.....	106
4.3.2.2	Les mTfh circulants (cTfh).....	106
4.3.2.3	Les mTfh résidents.....	111
4.3.2.4	Les mTfh de la MO.....	112
<b>4.4</b>	<b>La mémoire humorale.....</b>	<b>112</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Les Plasmocytes à longue durée de vie.....</b>	<b>112</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Les LB mémoires.....</b>	<b>115</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Réponse anticorps secondaire.....</b>	<b>117</b>
<b>4.5</b>	<b>La niche plasmocytaire de la moelle osseuse.....</b>	<b>118</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Migration vers la MO.....</b>	<b>118</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Une niche pour survivre.....</b>	<b>119</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Compétition pour la niche.....</b>	<b>122</b>
<b>5.</b>	<b>Les Treg, gardiens de l'équilibre.....</b>	<b>123</b>
<b>5.1</b>	<b>Ontogénie des Treg.....</b>	<b>123</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Les tTreg.....</b>	<b>124</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Les pTreg.....</b>	<b>125</b>

<b>5.2</b>	<b>Les LT folliculaires régulateurs (Tfr).....</b>	<b>126</b>
<b>5.3</b>	<b>Fonctions des Treg.....</b>	<b>129</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Fonctions « classiques » suppressives .....</b>	<b>129</b>
5.3.1.1	Des Treg .....	129
5.3.1.2	Des Tfr .....	132
<b>5.3.2</b>	<b>Fonctions « moins classiques » .....</b>	<b>134</b>
5.3.2.1	À l'initiation de la réponse .....	134
5.3.2.2	Dans le CG .....	134
5.3.2.3	Pendant la phase mémoire .....	135
	<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>137</b>
	<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>141</b>
	<b>Les Treg promeuvent la capacité des DC à induire la</b>	
	<b>différenciation des Tfh .....</b>	<b>143</b>
	<b>Les mTfh de la MO .....</b>	<b>189</b>
	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>207</b>

<b>Les Treg promeuvent la capacité des DC à induire la différenciation des Tfh .....</b>	<b>209</b>
<b>Les mTfh de la MO .....</b>	<b>217</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>223</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>225</b>
<b>PUBLICATIONS.....</b>	<b>255</b>



# **LISTE DES ABREVIATIONS**



Ac : Anticorps  
ADP : Adénosine diphosphate  
Ag : Antigène  
AID : Activation-induced cytidine deaminase  
AIRE : Autoimmune regulator  
APE1 : Apurinic-apyrimidinic endonuclease 1  
APRIL : a proliferation inducing ligand  
Ascl2 : Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 2  
ATP : Adénosine triphosphate  
BAFF : B-cell activating factor  
Batf3 : Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor 3  
Bcl : B-cell lymphoma  
BCMA : B cell maturation antigène  
BCR : B Cell Receptor  
Blimp1 : B lymphocyte-induced maturation protein 1  
Brm : LB résidents mémoires  
CCL : Chemokine C ligand  
CCR : Chemokine C receptor  
CD : Cluster de Différenciation  
cDC : Cellule dendritique conventionnelle  
CDP : Progéniteur commun des cellules dendritiques  
CG : Centre germinatif  
CLIP : Class II-associated invariant- chain peptide  
CLP : Progéniteur commun des cellules lymphoïdes  
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité  
CMH-1 : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1  
CMH-2 : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2  
CMP : Cellules myéloïdes  
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène  
CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CSR : Class switch recombination  
cTEC : Cellule de l'épithélium thymique cortical  
cTfh : mTfh circulants  
CTL : Cytotoxic T Lymphocyte  
CTLA4 : Cytotoxique-T-Lymphocyte- Antigen 4 protein  
CXCL : Chemokine XC ligand  
CXCR : Chemokine XC receptor  
DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern  
DC : Cellule dendritique  
DII4 : Delta-like protein 4  
DTR : Récepteur à la toxine diphtérique  
DTX : Toxine diphtérique  
EBF1 : early B-cell factor  
EBI2 : Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2  
ETP : Early thymic progenitor  
Fc : Fragment cristallisable  
FDC : Cellule dendritique folliculaire  
Flt3 : fms like tyrosine kinase  
Flt3L : fms like tyrosine kinase ligand  
Foxp3 : Forkhead box P3  
FR4 : Folate receptor 4  
FRC : Cellule fibroblastique réticulaire  
GATA-3 : GATA binding protein 3  
GM-CSF : Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor  
HEV : Veinule endothéliale haute  
HSC : Cellule souche hématopoïétique  
HSC : cellules souches hématopoïétiques  
ICAM-1 : Intracellular adhesion molecule 1  
ICOS : Inductible T cell costimulator  
Id2 : Inhibitor of DNA binding 2  
iDC : Cellule dendritique inflammatoire

IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase (

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IgH : chaîne lourde du BCR

IL-2 : Interleukine 2

IL-2R : Récepteur à l'IL-2

iNOS : inducible nitric oxide synthase

IPA : ingenuity pathway analysis

IRF : Interferon Regulatory Factor

IRF8 : Interferon Regulatory Factor 8

ITAM : Immunoreceptor tyrosine activation motif

iTreg : Treg induits en périphérie

Klf4 : Kruppel-like factor 4

LB : Lymphocyte B

LBm : Lymphocyte B mémoire

LC : Cellule de Langerhans

LT : Lymphocyte T

LTi : LT inducer

LTm : Lymphocyte T mémoire

M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor

Mcl1 : Induced myeloid leukemia cell differentiation protein

MDP : Progéniteurs communs aux monocytes et aux cellules dendritiques

MO : Moelle osseuse

moDC : Cellule dendritique dérivée de monocytes

MPP : Progéniteurs multipotents

mTEC : Cellule de l'épithélium thymique médullaire

mTfh : Tfh mémoires

mTOR : mammalian target of rapamycin

MZB : Zone marginale

NAFT2 : Nuclear factor of activated T cells 2

neoPC : PC nouvellement formés

Nfil3 : Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated  
NK : Cellule Natural Killer  
OLI : Organe lymphoïde primaire  
OLII : Organe lymphoïde secondaire  
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern  
PAX5 : Paired box 5  
PC : Plasmocyte à longue durée de vie  
PCC : Pigeon Cytochrome C  
PD1 : Programmed cell death protein 1  
pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde  
PP : Plaques de Peyer  
Prdm1 : PR domain zinc finger protein 1  
PRR : Récepteur de reconnaissance moléculaire  
pTcm : Précurseur de Tcm  
RAG : Recombination activating gene  
Rorc : RAR Related Orphan Receptor C  
ROR $\gamma$ t : RAR related orphan receptor  $\gamma$   
ROS : Espèces réactives d'oxygène  
S1PR1 : Sphingosin-1-phosphate receptor 1  
SAP : SLAM-associated protein  
SCF : Stem cell factor  
scRNAseq : single cell RNA sequencing  
SHM : Somatic hypermutation  
SLC : Chaîne légère de substitution  
SLC : chaîne légère de substitution  
SOSTDC1 : Sclerotin domain-containing protein 1  
SP : Simple positif  
STAT : Signal transducer and activator of transcription  
T-bet : T-box expressed in T cells  
TACI : Transmembrane activator and CAML interactor  
TBM : macrophages à corps tangible

Tbx21 : T-box transcription factor 21  
Tcm : Lymphocytes T centraux mémoires  
TCR : T Cell Receptor  
Tem : LT effecteurs mémoires  
Tfh : Follicular helper T cells  
Tfr : LT folliculaires régulateurs  
TGF $\beta$  : Tumor growth factor  
Th : LT auxiliaire  
TIP-DC : DC Productrice de TNF et iNOS  
TNF : Tumor necrosis factor  
TNL : Tissus non lymphoïdes  
TRAF3 : TNF receptor associated factor 3  
Treg : Lymphocyte T régulateur  
Trh : mTfh résidents  
Trm : LT résidents mémoires  
TSP : Thymus seeding progenitor  
tTreg : Treg naturel ou thymique  
UNG : Uracil-DNA glycosylase  
UPR : Unfolded protein response  
VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule 1  
Virus LCMV lymphocytic choriomeningitis virus  
VLA-2 : Very late antigen 2  
XBP1 : X-box binding protein 1  
ZC : Zone claire  
ZG : Zone grise  
ZS : Zone sombre



# **LISTE DES FIGURES**



<b>Figure 1 : Structure d'un ganglion lymphatique.....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 2 : Structure classique d'un Ac.....</b>	<b>50</b>
<b>Figure 3 : Modes d'actions des Ac.....</b>	<b>53</b>
<b>Figure 4: Ontogénie et diversité des DC.....</b>	<b>57</b>
<b>Figure 5 : IL-2R .....</b>	<b>63</b>
<b>Figure 6 : Développement des LT dans le thymus .....</b>	<b>68</b>
<b>Figure 7 : Polarisation des LT CD4+.....</b>	<b>71</b>
<b>Figure 8 : Développement des LB .....</b>	<b>76</b>
<b>Figure 9 : Parcours du LB dans le follicule B.....</b>	<b>79</b>
<b>Figure 10 : Différenciation des Tfh .....</b>	<b>84</b>
<b>Figure 11: Dynamique et compartimentation du CG.....</b>	<b>91</b>
<b>Figure 12 : Circulation des différentes sous-populations de LTm et de LT naïfs..</b>	<b>96</b>
<b>Figure 13 : Différenciation des Tem et des Tcm .....</b>	<b>100</b>
<b>Figure 14 : Les différentes sous-populations de cTfh .....</b>	<b>108</b>
<b>Figure 15 : Les cTfh dérivent des Tfh des OLII.....</b>	<b>110</b>
<b>Figure 16 : Soutien apporté au PC par les cellules stromales et les éosinophiles dans le maintien la niche plasmocytaire dans la MO .....</b>	<b>121</b>
<b>Figure 17 : Modèle de développement des LT selon l'affinité du TCR.....</b>	<b>125</b>
<b>Figure 18 : Les Tfh SOSTDC1+ favorisent la différenciation des Tfr.....</b>	<b>128</b>
<b>Figure 19 : Les fonctions suppressives des Treg.....</b>	<b>131</b>
<b>Figure 20 : Fonctions suppressives des Tfr.....</b>	<b>133</b>
<b>Figure 21 : Résumé graphique .....</b>	<b>146</b>
<b>Figure 22 : Identification de mTfh dans les MO humaine et murine.....</b>	<b>191</b>
<b>Figure 23 : Phénotype des mTfh de la MO .....</b>	<b>192</b>
<b>Figure 24 : Les mTfh de la MO ne sont pas impactés après une immunisation secondaire .....</b>	<b>194</b>
<b>Figure 25 : Les mTfh de la MO expriment Sostdc1.....</b>	<b>197</b>
<b>Figure 26 : Les mTfh de la MO participent à la survie des PC en favorisant celle des Treg .....</b>	<b>201</b>
<b>Figure 27 : Les mTfh de la MO pourraient agir directement sur les PC.....</b>	<b>204</b>
<b>Figure 28 : Résumé graphique.....</b>	<b>205</b>



# **LISTE DES TABLEAUX**



<b>Tableau 1 : Tableau 30 ligands des mTfh de la MO (c2) ou des OLId (c1) avec le plus haut « prioritization score », prédits par Nichenet pour interagir avec des récepteurs exprimés par les cellules Foxp3+ de la niche MO ou OLId.</b>	199
<b>Tableau 2 : Gènes cibles des interactions prédites par Nichenet entre les mTfh de la MO et les Treg (et Tfr) de la MO.</b>	200
<b>Tableau 3 : Localisation, phénotype et fonctions des trois sous-population de Tfhm décrites dans la littérature : mTfh locaux, cTfh et Trh.</b>	218



# RÉSUMÉ



Une réponse vaccinale efficace se traduit par la production durable d'anticorps (Ac) de haute affinité pour l'antigène caractéristique d'un pathogène ou d'une toxine contre lesquels nous voulons nous protéger. Les lymphocyte B (LB) produisent ces Ac après avoir subi des événements de maturation qui impliquent l'aide d'une population de lymphocytes T (LT), les LT folliculaires auxiliaires (Tfh). Le soutien fourni par les Tfh permet en effet la mise en place de centres germinatifs, une structure dans laquelle les LB peuvent se différencier en plasmocytes à longue durée de vie (PC) sécrétant d'Ac de haute affinité.

Mes travaux de thèses se sont focalisés sur la coopération de deux populations de LT, les Tfh et les LT régulateurs (Treg), dans la mise en place de la réponse Ac et favorisant sa pérennité.

Nous avons mis en évidence un mécanisme par lequel les Treg, généralement considérés comme des régulateurs négatifs de la réponse immune, favorisent le développement de Tfh. Grâce à un modèle murin de déplétion transitoire des Treg (seulement dans les trois premiers jours après l'immunisation) nous avons observé un impact des Treg sur les capacités intrinsèques des cellules dendritiques (DC) à induire la différenciation des Tfh. En effet, en capturant l'interleukine 2 (IL-2), les Treg en privent les DC et particulièrement les DC conventionnelles de type 2 (cDC2) qui sont les cellules présentatrices de l'antigène responsables de la différenciation des LT naïfs en Tfh. Or, la signalisation de l'IL-2 dans la cDC2 conduit à l'augmentation de l'expression du récepteur à chimiokine CCR7. Les gradients de chimiokines déterminent le positionnement des cellules dans l'organe lymphoïde secondaire (OLII). CXCL13 dont le récepteur est CXCR5, permet la localisation dans les follicules B de l'OLII et CCL21 dont le récepteur est CCR7, la localisation dans la zone T de l'OLII. L'augmentation de l'expression de CCR7 à la surface des cDC2 cantonne ainsi ces cellules dans la zone T alors que la différenciation des Tfh est induite par les cDC2 positionnées à la frontière entre la zone T et les follicules B. L'absence de

cette signalisation grâce aux Treg permet alors aux cDC2 de se localiser de manière optimale et d'induire efficacement la différenciation des Tfh.

Mes travaux se sont aussi intéressés à la durabilité de la réponse Ac, en se focalisant sur les cellules de la moelle osseuse (MO), niche pour les PC qui y sécrètent leurs Ac de manière constitutive sur le long terme. Nous avons mis en évidence la présence de Tfh mémoires (mTfh) dans la MO chez l'humain comme chez la souris. Via des analyses de cytométrie en flux et transcriptomique en single cell RNA sequencing (scRNAseq) de cellules T de la MO, nous montrons que la représentation de ces cellules augmente au moins jusqu'à 200 jours après l'immunisation. Nous avons aussi observé l'expression de *Sostdc1* (*Sclerostin Domain Containing 1*) par les mTfh de la MO. Les populations de Tfh SOSTDC1+ dans les OLI n'aident pas les LB mais favorisent le développement de Treg en bloquant la voie Wnt- $\beta$ -caténine. Les résultats que nous avons obtenus vont également dans ce sens. L'outil Nichenet permet de prédire des interactions ligands/récepteurs à partir de données de scRNAseq. Cet outil prédit de nombreuses interactions entre les Treg et les mTfh dans la MO, elles induisent dans les Treg, l'expression de nombreux gènes participant à leur survie. Nous pouvons alors avancer l'hypothèse selon laquelle les mTfh de la MO assurent l'équilibre de la niche plasmocytaire en y favorisant la survie des Treg qui de leur côté, favorisent la survie des PC. Ils pourraient aussi contrôler directement la survie et l'expansion des PC.

Mes travaux ont donc mis en lumière un partenariat entre les Tfh et les Treg qui assure une réponse humorale efficace et durable.

# **ABSTRACT**



An effective vaccine response results in the long-lasting production of antibodies (Ab) of high affinity for the characteristic antigen of a pathogen or a toxin against those who want to protect us. To produce these Abs, B lymphocytes must undergo maturation events that involve the help of a population of T lymphocytes, the follicular helper T cells (Tfh). The support provided by the Tfh indeed allows the establishment of germinal centers necessary for the differentiation of the B cells into long-lived plasma cells (PC) secreting high affinity Ac.

My thesis work focused on the cooperation of two LT populations, Tfh and regulatory T cells (Treg), in the establishment of the Ab response and promoting its sustainability.

We have demonstrated a mechanism by which Treg, generally considered negative regulators of the immune response, will drive the development of Tfh. Using a mouse model of transient Treg depletion (only in the first three days after immunization), we observed an impact of Treg on the integrated capacities of dendritic cells (DC) to induce Tfh differentiation. Indeed, by capturing interleukin 2 (IL-2), Treg deprive DC of it and particularly conventional type 2 DC (cDC2) which are the antigen-presenting cells responsible for the differentiation of naive LT into Tfh. IL-2 signaling in cDC2 leads to increased expression of the chemokine receptor CCR7. Chemokine gradients determine the positioning of cells in the secondary lymphoid organ (SLO). CXCL13, whose receptor is CXCR5, allows localization in the B follicles of the SLO and CCL21, whose receptor is CCR7, localization in the T zone of the SLO. The increase in the expression of CCR7 on the surface of the cDC2 thus cantons these cells in the T zone whereas to effectively induce the differentiation of Tfh, they must position themselves at the T:B border. the absence of this signaling thanks to the Treg then allows the cDC2 to localize in an optimal manner to induce the differentiation of the Tfh.

My work has also focused on the durability of the Ac response, focusing on the cells of the bone marrow (BM), a niche for PC which secrete their Ab there constitutively over the long term. We have demonstrated the presence of memory Tfh (mTfh) in BM in humans as well as in mice. Through flow cytometry and transcriptomic analyzes in single cell RNA sequencing (scRNAseq) of BM T cells, we show that the representation of these cells increases at least until 200 days after immunization. We also observed the expression of *Sostdc1* (Sclerostin Domain Containing 1) by BM mTfh. Tfh *SOSTDC1+* populations in SLO do not help B cells but promote Treg development by blocking the Wnt- $\beta$ -catenin pathway. Our results also point in this direction. The Nichenet tool makes it possible to predict ligand/receptor interactions from scRNAseq data. This tool predicts many interactions between Tregs and mTfhs in BM, they induce in Tregs the expression of many genes involved in their survival. We can then put forward the hypothesis that the mTfh of the BM ensure the balance of the plasma cell niche by favoring the survival of the Treg which, in turn, favor the survival of the PC. They could also directly control the survival and expansion of PC.

My work has therefore highlighted a partnership between Tfh and Treg to ensure an effective and lasting humoral response.

# AVANT-PROPOS



Cette thèse a été menée en grande partie pendant une période inédite, celle de la pandémie causée par le SARS-CoV-2, communément appelée COVID-19. Ce virus a tué des millions de personnes et a eu des conséquences désastreuses pour d'autres. Il a paralysé des économies, des états et des sociétés entières. En l'absence de solution efficace pour nous protéger, les dirigeants ont assigné à résidence un tiers de la planète. L'utilisation de mesures de privation de libertés pour lutter contre un problème de santé soulève, en dehors des questions philosophiques, une interrogation qui devrait nous obséder : Pourquoi nous ne disposons pas de moyens sanitaires et médicaux nécessaires pour répondre à ce type de crise ?

Les meilleures « armes » face à un virus de manière générale, a fortiori lors d'une pandémie, sont les vaccins. Le développement d'un vaccin est un processus long et laborieux. De ce point de vue, la vitesse à laquelle les vaccins contre le SARS-CoV-2 ont été mis sur le marché est un véritable exploit. Cela est notamment dû à l'utilisation de la technologie du vaccin à ARN messager, qui est particulièrement porteuse d'espoir. Malgré l'accessibilité de plusieurs vaccins et les campagnes de vaccination intenses (mais inégales), celles-ci n'ont pas permis de se substituer totalement aux mesures de confinement. En cause, le manque d'efficacité de ces vaccins. En effet l'immunité engendrée n'est pas optimale. Elle permet de se prémunir contre les formes les plus graves de la maladie, mais ne garantit pas une protection de l'infection de façon satisfaisante. De plus, la protection n'est efficace que pour une durée limitée, ce qui rend nécessaire l'administration de plusieurs rappels. Ces vaccins ne semblent pas suffisants pour éradiquer le virus et mettre un terme à la pandémie. Il s'agit ici d'un virus précis, le SARS-CoV-2, mais les zoonoses risquent de se multiplier du fait du réchauffement climatique, de la déforestation et de l'élevage intensif. Dans ce contexte, être en capacité de produire rapidement des vaccins sûrs et efficaces, immédiatement et sur le long terme, est un enjeu sanitaire majeur. Cela met en lumière l'importance de la recherche en générale et plus particulièrement en immunologie et vaccinologie.



# INTRODUCTION



# 1. Vaccination et système immunitaire

## 1.1 Histoire et principe de la vaccination

La vaccination repose sur ce que l'on appelle la mémoire immunologique. Les premières traces de l'utilisation de ce concept remontent au VII<sup>ème</sup> siècle, quand des bouddhistes indiens buvaient du venin de serpent pour se protéger des effets de sa toxine<sup>1</sup>. Des pratiques similaires sont apparues par la suite, notamment en Chine au X<sup>ème</sup> siècle avec l'injection de pus de pustules de variole pour s'en protéger. On ne parle pas encore de vaccination mais de « variolisation ». La première vaccination est plus récente. À la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle Edward Jenner, un médecin anglais, constate que les personnes ayant été en contact avec les pis de vaches contaminés par la vaccine (variole des vaches) ne contractent pas la variole humaine. En injectant le pus présent sur les pis des vaches à un enfant il pratique pour la première fois le geste de vaccination. La protection apportée par la vaccine est due à la très forte ressemblance entre ce virus (*cowpox*) et le virus de la variole (*smallpox*). À la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, les travaux de Louis Pasteur et de ses étudiants permettent le développement de vaccins et l'établissement de la vaccination moderne, d'abord sur des animaux puis sur des humains. Depuis, les connaissances en microbiologie et immunologie n'ont cessé de s'approfondir permettant ainsi l'élaboration d'une multitude de vaccins et l'éradication de la variole grâce à une campagne de vaccination mondiale en 1980<sup>2</sup>. L'Organisation Mondiale de la Santé estime que les vaccins ont permis de sauver chaque année des millions de vies, et ont protégé des millions de personnes contre les maladies et les handicaps.

Le vaccin induit l'activation de l'immunité innée et adaptative. D'abord de l'immunité innée, qui est précoce mais pas spécifique de l'antigène (Ag) rencontré, puis de l'immunité adaptative, plus tardive mais spécifique de l'Ag. Cette dernière permet une protection sur le long terme en s'appuyant

sur la capacité des lymphocytes T (LT) et des lymphocytes B (LB) à induire une réponse mémoire et la sécrétion d'anticorps (Ac) de haute affinité dirigés contre l'Ag. Ainsi, le vaccin conduit à la mise en place de la mémoire immunologique, ce qui confère une protection contre les futures infections.

## 1.2 Réponse Immunitaire Innée

La réponse immunitaire innée est la première étape de la réponse. Elle a lieu à l'endroit même de l'infection ou de l'injection dans le cadre d'une vaccination. Elle s'active en réponse aux signaux de danger, aussi appelés PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) et DAMP (*Damage-Associated Molecular Pattern*). Dans un vaccin classique, c'est généralement l'adjuvant qui fait office de signal de danger. L'immunité innée implique divers types de cellules et mécanismes. Certaines cellules, comme les Macrophages ou les Neutrophiles par exemple, sont capables de phagocyter l'agent pathogène et le détruire. Les Neutrophiles peuvent aussi éjecter leur ADN, cela conduit à la capture et au blocage des pathogènes, c'est la NETose. Les cellules « *Natural Killer* » (NK) vont directement tuer les cellules cancéreuses ou infectées. Il existe aussi des mécanismes qui passent par la sécrétion ou le relargage de molécules solubles. En effet, les cellules de la réponse innée peuvent sécréter des molécules favorisant l'inflammation et le recrutement d'autres cellules immunitaires, comme les chimiokines, les cytokines ou les médiateurs pro-inflammatoires. Elles peuvent également sécréter des enzymes, comme les lysozymes, qui s'attaquent directement à la paroi des bactéries, ou des peptides antimicrobiens qui comme leur nom l'indique peuvent directement tuer le pathogène microbien. Le dernier mécanisme que j'évoquerai et qui sera celui qui nous intéressera particulièrement dans le cadre de cette thèse fait intervenir principalement les Cellules Dendritiques (DC) et leur rôle de Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA) qui fait le lien entre la réponse innée et la réponse adaptative.

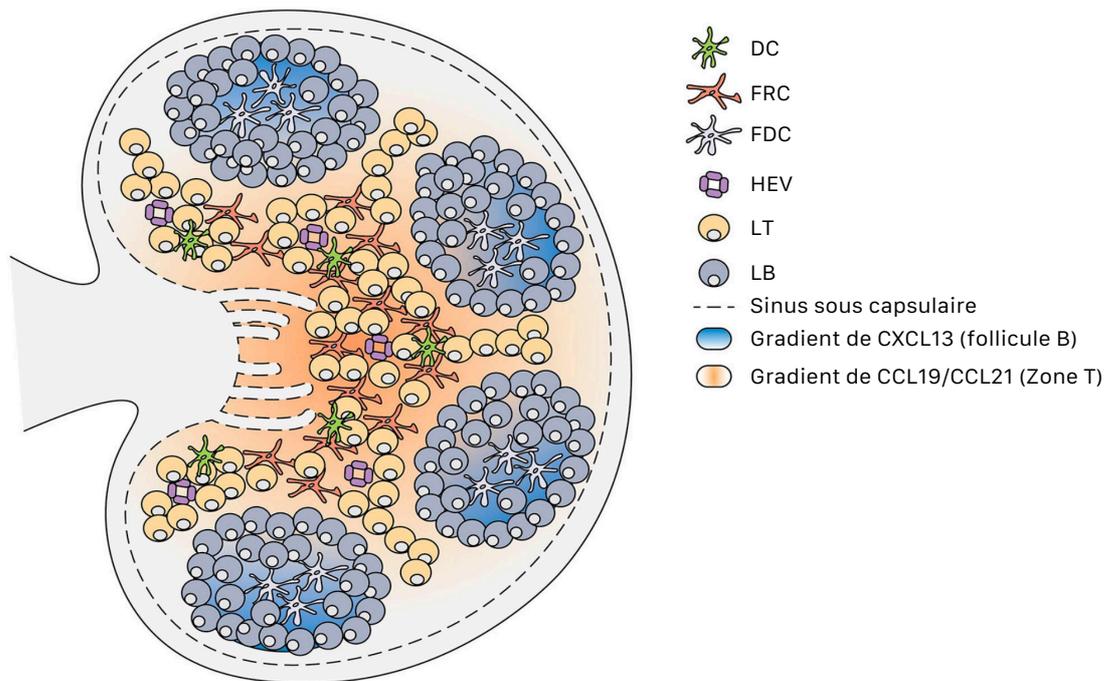
## 1.3 Réponse Immunitaire Adaptative

Après l'immunité innée, qui est rapide mais peu spécifique du pathogène, se met en place l'immunité dite adaptative. Elle est plus lente mais très spécifique du danger rencontré. Elle s'appuie principalement sur les lymphocytes (LT et LB) qui sont capables de reconnaître spécifiquement un Ag donné via leurs récepteurs propres, le TCR (*T cell receptor*) pour les LT et le BCR (*B cell receptor*) pour les LB. Il existe trois grands types d'immunités permettant de répondre de la manière la plus efficace et adaptée au danger rencontré. L'immunité de type I contre les virus et bactéries intracellulaires, l'immunité de type II contre les allergènes et les parasites, et l'immunité de type III contre les bactéries extracellulaires et les infections fongiques. L'activation de cette réponse adaptative se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires (OLII).

### 1.3.1 Les organes lymphoïdes secondaires

Les lymphocytes se développent dans les organes lymphoïdes primaires (OLI), la moelle osseuse (MO) pour les LB et la MO puis le thymus pour les LT, mais c'est dans les OLII que les lymphocytes vont être activés et où la réponse immunitaire adaptative se met en place. Parmi les OLII chez l'humain, nous pouvons citer notamment les ganglions lymphatiques, la rate, les amygdales ou encore les plaques de Peyer (PP). Ces organes ont une structure anatomique bien spécifique qui favorise les interactions entre les différents acteurs de la réponse adaptative, permettant ainsi l'activation du LT ou du LB spécifique de l'Ag cible. Dans cette partie, je vais me focaliser sur les ganglions lymphatiques (GL). Ce sont des organes encapsulés avec une structure organisée en trois régions : le cortex, le paracortex et la médulla. Le cortex, ou follicule B est une zone riche en LB, il est le siège des réponses B-T dépendantes. Le paracortex, qui est souvent désigné sous le nom de zone T

en raison de sa composition principale de LT, est adjacent au follicule B. On y trouve également d'autres types cellulaires comme des DC. Les veinules endothéliales hautes (HEV) qui constituent la porte d'entrée des LT et LB sont aussi localisé dans la zone T. C'est dans cette région que les LT sont activés. Enfin, au centre du GL, se trouve la médulla qui débouche sur le vaisseau lymphatique efférent qui permet aux lymphocytes de quitter le GL pour gagner la circulation sanguine. Les chimiokines contrôlent le positionnement des lymphocytes dans le follicule B ou la zone T. En effet, le follicule B étant riche en CXCL13 (*chemokine XC ligand 13*), chimiokine produite notamment par les cellules dendritiques folliculaires (FDC), les cellules qui pourront s'y localiser sont celles exprimant le récepteur de cette chimiokine, le CXCR5 (*chemokine XC receptor 5*), comme les LB. La zone T est riche en CCL19 (*chemokine C ligand 19*) et CCL21, produites par les cellules fibroblastiques réticulaires (FRC), dont le récepteur est CCR7 (*chemokine C receptor 7*). Les cellules exprimant ce récepteur pourront se positionner dans la zone T. Le positionnement exact d'une cellule dans le GL dépendra alors de la balance CXCR5/CCR7 à sa surface.



**Figure 1 : Structure d'un ganglion lymphatique.** Le ganglion lymphatique peut être divisé en deux compartiments. Le premier, que l'on appelle la zone T, est riche en LT et en DC. L'expression de CCR7 par les cellules leur permet de se localiser dans la zone T selon un gradient de CCL19/CCL21 produit par les FRC. Le second compartiment correspond au follicule B. Il est surtout composé de LB qui s'y dirigent grâce à un gradient de CXCL13 produit par les FDC, reconnu par le CXCR5 à la surface du LB. Les LB comme les LT entrent dans l'organe via les HEV. Figure adaptée de Stebegg et al, 2018<sup>3</sup>.

### 1.3.2 La réponse cellulaire

Il existe deux types de réponses adaptatives qui se déroulent généralement de façon concomitante : la réponse cellulaire et la réponse humorale.

La réponse cellulaire correspond principalement à la capacité des LT CD8<sup>+</sup> ou CTL (*Cytotoxic T Lymphocyte*) de tuer les cellules infectées (ou cancéreuses). Le LT CD8<sup>+</sup> est activé dans les OLI où les DC vont lui présenter des peptides (ou épitopes) issus de l'Ag via leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1 (CMH-1) avec le soutien des LT CD4<sup>+</sup>

que l'on appelle LT auxiliaires. Le LT CD8+ migre alors jusqu'au site de l'inflammation où il reconnaîtra son Ag cible préparé et présenté via des molécules de CMH-1 à la surface de la cellule à éliminer. Les deux cellules s'associent alors étroitement dans ce que l'on appelle une synapse immunologique. Cela induit l'activation des LT CD8+ et la libération de leurs molécules effectrices (perforine et granzyme) qui provoquent la lyse de la cellule cible.

### 1.3.3 La réponse humorale : rôle des anticorps

La réponse dite humorale ou à médiation humorale se base essentiellement sur la production et la sécrétion par des LB d'Ac, aussi appelés immunoglobulines (Ig) dirigés contre un Ag donné. Contrairement aux TCR qui ne reconnaissent que des peptides issus de la dégradation de l'Ag, présenté sur une molécule de CMH, les Ac peuvent reconnaître l'Ag sous sa forme native.

#### 1.3.3.1 Structure des Ac

Un Ac est une protéine monomérique d'environ 150 kDa. Il est composé de deux chaînes légères et deux chaînes lourdes reliées par des ponts disulfures, ce qui lui donne sa forme de Y. La chaîne légère est constituée d'une région variable et d'une région constante alors que la chaîne lourde est constituée d'une région variable et de généralement, trois régions constantes.

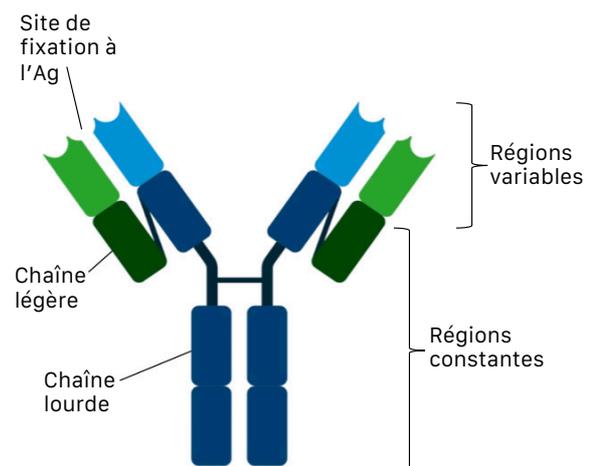


Figure 2 : Structure classique d'un Ac

La partie constante est en parti composé de ce que l'on appelle la partie Fc (Fragment cristallisable). Les régions variables déterminent la spécificité de l'Ac pour son Ag cible, alors que la partie constante lui permet d'interagir avec d'autres composantes du système immunitaire, aussi bien des acteurs cellulaires que des molécules solubles<sup>4,5</sup>. Les Ac produits sont classés en différents isotypes (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) selon la structure de leur chaîne lourde. Des structures différentes entraînent des fonctions différentes adaptées aux contexte inflammatoire. Cela est possible grâce à la commutation isotypique que je présenterai plus loin.

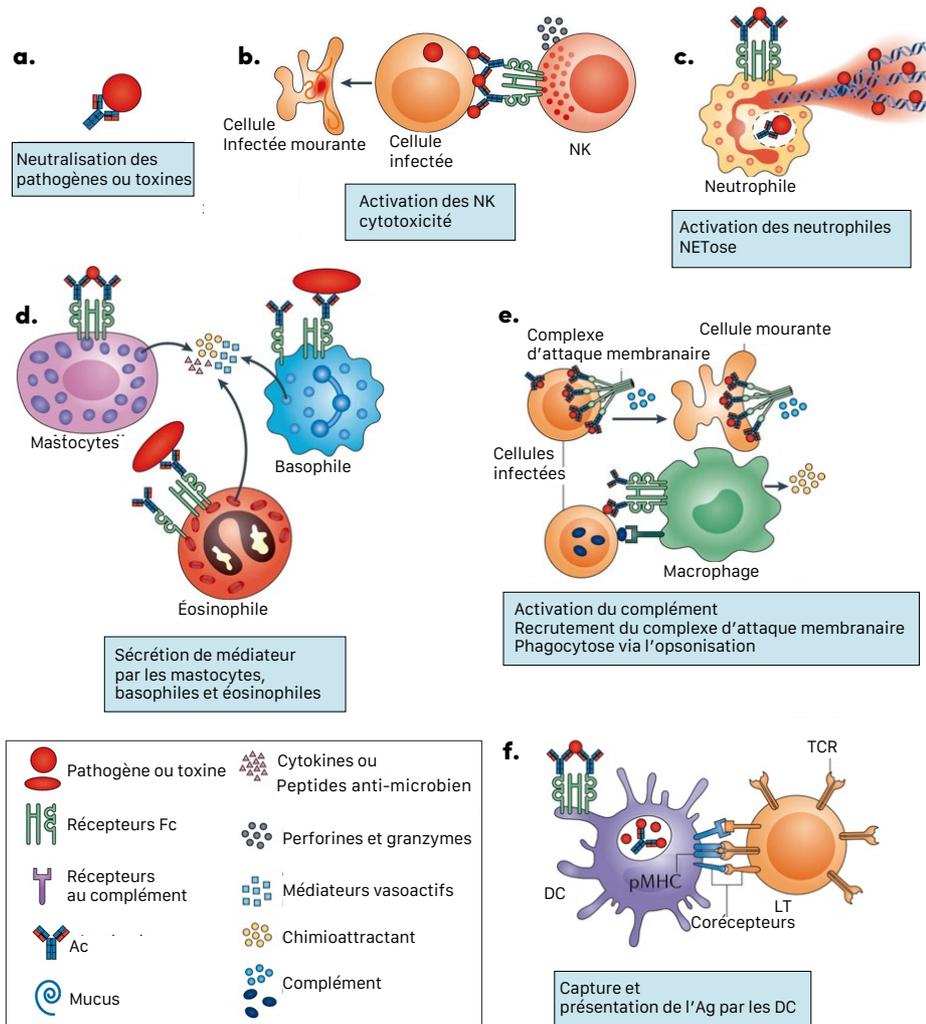
### 1.3.3.2 Modes d'action des Ac

Sans entrer dans les détails de chaque mode d'action j'en évoquerai trois types : la neutralisation, l'opsonisation et l'activation du complément. La neutralisation consiste à recouvrir une toxine, un virus ou une bactérie par des Ac, ce qui l'empêchera de pénétrer dans les cellules et d'exercer son pouvoir pathogène. Avec l'opsonisation, les Ac se fixent sur la bactérie ou la cellule infectée ce qui permet de faciliter leur reconnaissance par d'autres cellules immunitaires portant des récepteurs de la partie Fc des Ac (récepteurs Fc). Cela favorise la phagocytose par les macrophages et les neutrophiles, la NETose par les neutrophiles, la sécrétion de médiateurs par les mastocytes, les éosinophiles et les basophiles, l'activation des cellules NK ou encore la capture et la présentation de l'antigène par les DC. Enfin, l'Ac sur sa cible peut également fixer et activer les différents complexes du complément, cela peut amplifier l'opsonisation et la phagocytose mais aussi induire la lyse de la bactérie ou de la cellule infectée, ciblée par le complexe d'attaque membranaire<sup>5</sup>.

Les isotypes des Ac produits sont sélectionnés en fonction du contexte inflammatoire. Par exemple, chez la souris, les isotypes IgG2a et IgG2b sont produit dans le cadre de l'immunité de type I car ils permettent d'activer

efficacement le complément et donc de lyser les cellules infectées. Dans l'immunité de type II, il s'agit plutôt d'IgG1 et IgE car ils conduisent notamment à l'activation des mastocytes, importants lors de la réponse contre un parasite, un venin ou un allergène. Enfin dans l'immunité de type III, les Ac sont principalement d'isotype IgA. Cet isotype permet de piéger efficacement les bactérie ou champignons dans les muqueuses<sup>5,6</sup>.

La production d'Ac de haute affinité contre l'Ag et dont les isotypes sont adaptés au contexte conduit à une réponse humorale efficace et protectrice. Le LB se différencie en plasmocyte à longue durée de vie (PC) et sécrète ces Ac de haute affinité à la suite de plusieurs étapes de maturations faisant intervenir différents acteurs cellulaires.



**Figure 3 : Modes d'actions des Ac.** Les Ac peuvent agir de plusieurs manières, soit via la liaison directe sur le pathogène ou la toxine pour le ou la neutraliser (a.), soit via la liaison de leur Fc sur les récepteurs Fc de différentes cellules, ce qui peut conduire à l'activation des NK (b.), à l'activation et la NETose des neutrophiles (c.), à la dégranulation et sécrétion de médiateurs par les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles (d.), à l'activation du complément qui recrute le complexe d'attaque membranaire ou les macrophages qui phagocytent les cellules infectées (e.). Enfin cela facilite la capture de l'Ag par les DC favorisant ainsi la présentation de ce dernier à un LT (f.). Figure adaptée Lu et al, 2018<sup>5</sup>.



## 2. Mise en place de la réponse B-T dépendante

### 2.1 Acteurs cellulaires

#### 2.1.1 Les Cellules Dendritiques

##### 2.1.1.1 Classification

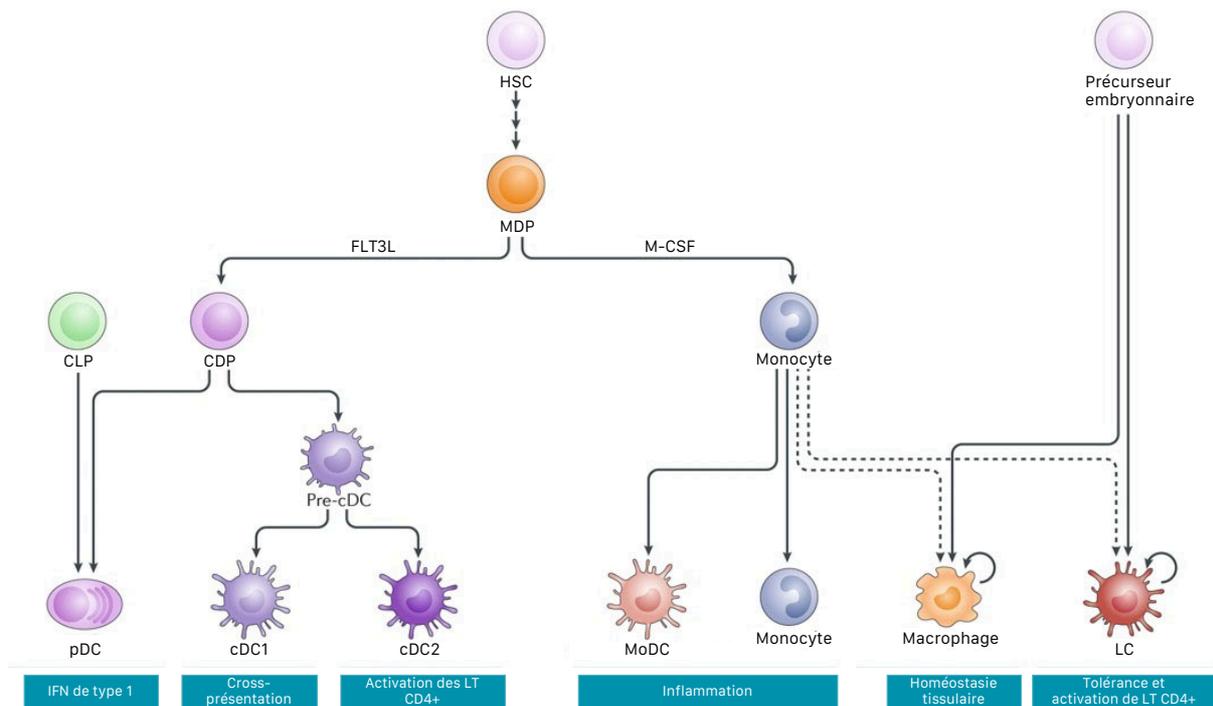
Les cellules dendritiques sont considérées comme la charnière entre l'immunité innée et adaptative. Elles sont essentielles à l'activation des LT via leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) mais leur éventail de fonctions est bien plus diversifié, au même titre que leur ontogénie. Cette diversité conduit à les classer en différentes populations de DC. En plus des DC conventionnelles (cDC), dont je parlerai plus en détail par la suite et qui sont spécialisées dans la présentation antigénique, nous pouvons distinguer les DC plasmacytoïdes (pDC), les cellules de Langerhans (LC) et les DC dérivées de monocytes (moDC).

Les pDC peuvent se différencier à partir de deux progéniteurs différents, le progéniteur commun des DC (CDP), comme les cDC ou le progéniteur commun des cellules lymphoïdes (CLP)<sup>7</sup>. Malgré cette ontogénie commune avec les cDC, leurs fonctions sont distinctes. En dehors de contextes particuliers, elles ne sont pas des CPA efficaces mais sont connues pour être de grosses productrices d'interféron (IFN) de type 1 en réponse à une infection virale<sup>8</sup>.

Les LC proviennent de précurseurs embryonnaires et se renouvellent *in-situ*, mais peuvent également s'y différencier à partir de monocytes dans des conditions inflammatoires<sup>9</sup>. Les LC présentent une proximité ontogénique avec les macrophages mais pas de proximité fonctionnelle. De ce point de vue, les LC sont plus proches des cDC et sont des CPA efficaces

comparé aux macrophages qui promeuvent plutôt l'activation des LB en capturant l'Ag dans le sinus sous capsulaire et le rendant accessible aux LB<sup>10</sup>.

Alors que les populations cDC, pDC and LC sont présentes à la fois dans des conditions homéostatiques et inflammatoires, le développement des moDC partageant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles clés avec des cDC a été décrit exclusivement dans un milieu inflammatoire *in vivo*. Cette population est souvent désignée moDC, DC inflammatoire (iDC) ou cellules spécialisées dans la production de TNF (*tumor necrosis factor*) et iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) (TIP-DC) dans la littérature<sup>9</sup>. Leur recrutement sur le site de l'inflammation dépend de CCR2. Dans le tissu, ces cellules vont favoriser l'élimination des cellules apoptotiques, produire des cytokines pro-inflammatoires et présenter l'Ag aux LT effecteurs sur place. Certaines moDC peuvent migrer dans les OLII via la circulation sanguine par un mécanisme CCR7-indépendant où elles auront des fonctions similaires à celles des cDC<sup>11</sup>.



**Figure 4: Ontogénie et diversité des DC.** Les HSC se différencient en MDP qui à leur tour se différencient en CDP sous l'influence du FLT3L, ou en monocytes sous l'influence du M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor). En fonction des signaux reçus, les monocytes peuvent se différencier en moDC, monocytes, macrophages ou LC. Ces deux derniers types cellulaires proviennent toutefois majoritairement de précurseurs embryonnaires. Les CDP peuvent se différencier soit en pré-cDC qui se différencieront en cDC1 ou cDC2, soit en pDC. Les pDC peuvent également se différencier à partir des CLP. Figure adaptée de Eisenbarth, 2019<sup>9</sup>.

### 2.1.1.2 Développement des cDC

Comme toutes les cellules du système immunitaire (lymphoïdes comme myéloïdes), les cDC sont issues d'un processus de différenciation et de spécialisation dans la MO à partir des cellules souches hématopoïétiques (HSC) qui vont se différencier en progéniteurs multipotents (MPP). Les MPP vont poursuivre leur spécialisation en se différenciant soit en CLP soit en progéniteur commun des cellules myéloïdes (CMP). Bien qu'entre 10 et 15% des cDC proviennent de CLP, la majorité se différencie bien à partir de CMP<sup>12</sup>. L'étape suivante est la perte du potentiel à devenir un granulocyte. Les CMP deviennent alors des progéniteurs communs aux monocytes et DC (MDP)

sous l'action de l'IRF8 (*Interferon Regulatory Factor 8*)<sup>13</sup>. Les MDP vont à leur tour se différencier en CDP, le progéniteur commun aux cDC et certaines pDC. Des études suggèrent un rôle précoce de l'IRF8, au niveau des MPP, dans lesquels son expression induirait un biais de lignage vers les cDC<sup>14,15</sup>. Les CDP peuvent se différencier en pré-pDC ou en pré-cDC qui donneront respectivement les pDC ou les cDC. Au sein des pré-cDC nous pouvons distinguer les pré-cDC1 et les pré-cDC2<sup>16</sup>. À la suite de ces étapes de spécialisation, les pré-cDC vont quitter la MO et gagner la circulation sanguine puis les tissus périphériques. Dans les tissus, sous l'influence du micro-environnement, les pré-cDC engagent leur différenciation terminale en cDC, cDC1 pour les pré-cDC1 et cDC2 pour les pré-cDC2.

Différents facteurs, cytokiniques et transcriptionnels, contrôlent ces étapes de différenciation et de spécialisation.

Un des éléments clés est la signalisation via le récepteur Flt3 (*fms like tyrosine kinase-3*) qui reconnaît le facteur de croissance Flt3 ligand (Flt3L). L'expression de ce récepteur est permise grâce à l'expression de PU.1 dès le stade CMP<sup>17</sup>. L'activation du Flt3 par le Flt3L conduit à la phosphorylation de STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) et l'activation de la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*) dépendante de la PI3-kinase<sup>18,19</sup>. Cette voie de signalisation est essentielle au développement des cDC (et des pDC) puisqu'il est observé une réduction drastique des cDC dans des souris déficientes pour le Flt3 ou le Flt3L<sup>20-22</sup>. De plus, la signalisation forcée de la voie de Flt3 dans des progéniteurs Flt3<sup>négatif</sup> peut conduire à leur différenciation en cDC ou pDC<sup>23</sup>. Cela suggère que l'activation de Flt3 est, non seulement nécessaire à la différenciation des cDC mais aussi suffisante.

La différenciation des pré-cDC1 en cDC1 est contrôlée par différents facteurs de transcription tels que Batf3 (*basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3*), Nfil3 (*nuclear factor interleukin 3 regulated*), Id2 (*inhibitor of DNA binding 2*) et IRF8<sup>24</sup>. IRF8, que j'ai évoqué précédemment, est crucial

au développement des cDC dans leur globalité, mais il est également considéré comme le facteur de transcription terminal des cDC1. En effet, il est indispensable à leur différenciation, à leur survie et à leurs fonctions<sup>25</sup>.

Les mécanismes qui permettent la différenciation des pré-cDC2 en cDC2, sont encore mal connus. En raison de l'hétérogénéité de cette population, aucun facteur n'a été décrit comme étant essentiel à la différenciation des cDC2 dans leur ensemble. Toutefois, il semble que le facteur de transcription IRF4 y joue un rôle central. En effet, les souris déficientes pour l'IRF4 présentent une forte réduction du nombre de cDC2<sup>26</sup>. Les cDC2 sont classiquement divisées en deux sous-populations, une dépendante de Notch2 et une dépendante de Klf4 (*Kruppel-like factor 4*). Les cDC2 dépendantes de Notch2 contrôlent les réponses de type III et la réponse humorale alors que celles dépendantes de Klf4 contrôlent les réponses de type II<sup>27-29</sup>.

### 2.1.1.3 Fonctions des cDC2 : CPA professionnelle

Les cDC sont considérées comme des CPA professionnelles spécialisées dans l'activation de LT naïfs. Les cDC1 sont spécialisées dans la présentation d'Ag exogène sur leur CMH-1 par un mécanisme que l'on appelle cross-présentation, et activent les LT CD8+. Les cDC1 expriment aussi le CMH-2, ce qui leur permet d'activer les LT CD4+ dans le cadre de l'immunité de type 1. Les cDC2, qui vont nous intéresser particulièrement dans le cadre de cette thèse, présentent l'Ag sur leur CMH-2 et activent principalement les LT CD4+<sup>30</sup>.

Dans un premier temps, la cDC2 capture l'Ag en périphérie. Trois mécanismes de capture ont été décrits : la phagocytose, l'endocytose ou la macropinocytose<sup>31</sup>. La phagocytose permet d'internaliser des particules extracellulaires de grande taille comme des cellules apoptotiques ou des micro-organismes opsonisés alors que l'endocytose concerne des Ag

exogènes qui, en se liant à des récepteurs d'endocytose comme la decalectine 205 (DEC-205) ou des  $FC\gamma R$ , à la surface des cDC, induisent leur internalisation. La macropinocytose quant à elle permet l'internalisation de molécules solubles de manière aléatoire. Ces mécanismes ont principalement lieu dans les cDC immatures et pas dans les cDC matures ou les autres CPA. Cela est lié notamment à une diminution de l'expression des récepteurs de phagocytose suite à l'activation et la maturation des cellules.

L'internalisation de l'Ag est suivie par sa dégradation dans les endosomes ou lysosomes, sous l'action de protéases comme les cathepsines et l'asparagine endopeptidase. Une dégradation importante des Ag pourrait conduire à la perte de certains épitopes qui pourraient être reconnus par le LT et donc une perte d'efficacité de la réponse immunitaire. Les cDC ont mis en place des mécanismes qui limitent la protéolyse des Ag. Ces mécanismes ont été sélectionnés car ils conduisent à la préservation des épitopes. En effet, l'extrait lysosomal des cDC présente une activité protéolytique cinquante fois moindre que celle des macrophages, ce qui leur permet de conserver certains épitopes intacts pendant plusieurs heures alors qu'ils sont dégradés très rapidement dans les macrophages<sup>32</sup>.

Le CMH-2 néosynthétisé est adressé aux endosomes. Le CMH-2 est un hétérodimère composé de deux glycoprotéines  $\alpha$  et  $\beta$ . Lorsqu'il arrive dans l'endosome, il est lié à une chaîne invariante Ii qui le stabilise et empêche la fixation de peptides. Les protéases vont dégrader la chaîne Ii et laisser en place seulement le peptide CLIP (*class II-associated invariant-chain peptide*) qui occupe le sillon peptidique du CMH-2. Sous l'action d'autres protéines, le CLIP est finalement remplacé par le peptide antigénique. Le complexe CMH-2/peptide est ensuite adressé à la membrane plasmique de la cDC<sup>31</sup>. Ce complexe CMH-2/peptide sera reconnu par le TCR d'un LT CD4+.

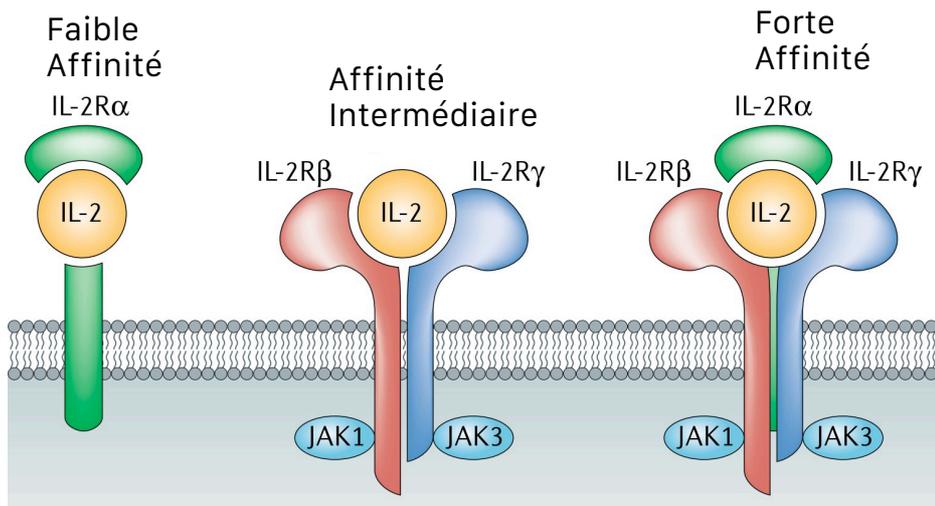
Le CMH-2 situé à la surface des cDC2 pourra aussi être internalisé, se charger avec un autre peptide présent dans le nouvel endosome et être recyclé à la membrane plasmique.

Avant de pouvoir présenter efficacement l'Ag à des LT CD4+ et les activer, la cDC2 doit subir une étape de maturation. En condition inflammatoire, la cDC2 va être activée grâce à la reconnaissance de PAMP ou de DAMP par leurs récepteurs de reconnaissance moléculaire (PRR) comme les TLR (*toll like receptor*) 2,4,5,7,9,11,12 et 13 ou les CLR (*C-type lectin receptor*) DCIR2, Dectin-1 et CLEC12A<sup>33</sup>. Cette maturation modifie le phénotype et les fonctions des cDC2 à plusieurs niveaux. Cela va amplifier la présentation antigénique. En effet, les Ag capturés par les cDC2 immatures vont être moins efficacement dégradés et présentés à la surface des cellules et les molécules de CMH-2 qu'elles synthétisent restent dans les lysosomes<sup>34,35</sup>. La maturation va aussi induire l'expression de CCR7 qui permet la migration des cDC2 vers les OLI, lieux de l'activation des LT CD4+. Les cDC2 matures expriment également des molécules de costimulation, essentielles à l'activation des LT CD4+. Enfin, en fonction des signaux de danger captés par la cDC2, cette étape de maturation permettra la sécrétion de cytokines pro ou anti-inflammatoires qui orienteront le devenir des LT CD4+. Je détaillerai les signaux fournis par la DC aux LT CD4+ dans une partie dédiée à l'activation de ces cellules.

#### 2.1.1.4 IL-2 et DC

L'interleukine 2 (IL-2) est une cytokine connue pour son rôle essentiel dans le développement et l'homéostasie des LT régulateurs (Treg) et dans la prolifération des LT et la génération de LT effecteurs et mémoires<sup>36</sup>. Cette cytokine est produite principalement par les LT CD4+ activés. Cependant, d'autres cellules comme les LT CD8+, les mastocytes ou les DC peuvent également en produire suite à certains stimuli<sup>37-41</sup>.

Le récepteur à l'IL-2 (IL-2R) de forte affinité est composé d'une chaîne  $\alpha$  (CD25 ou IL-2R $\alpha$ ), une chaîne  $\beta$  (CD122 ou IL-2R $\beta$ ) et une chaîne  $\gamma$  (CD132 ou IL-2R $\gamma$ ). L'IL-2R d'affinité intermédiaire est classiquement composé des chaînes  $\beta$  et  $\gamma$ . La chaîne  $\alpha$  permet de stabiliser le récepteur et d'augmenter son affinité<sup>42</sup>. Les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  sont responsables de la transduction du signal via la phosphorylation de STAT5, l'activation de la PI3 Kinase et la MAP Kinase<sup>43</sup>. L'IL-2R $\gamma$  est commune à différents récepteurs (ceux de l'IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21), elle est exprimée dans la plupart des cellules hématopoïétiques. L'IL-2R $\beta$  est également exprimée par plusieurs types cellulaires, notamment les LB, les monocytes, les NK, les DC et les LT. Bien que l'expression de ces deux chaînes soit constitutive dans ces différents types cellulaires, elle peut être amplifiée par plusieurs mécanismes comme une stimulation par l'IL-2 par exemple<sup>44,45</sup>. L'expression de l'IL-2R $\alpha$  est quant à elle plus finement régulée et dépend de nombreux stimuli comme l'engagement du TCR pour les LT, différentes cytokines comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-7, l'IL12, l'IL-15, le TNF $\alpha$  ou le TGF $\beta$  (*Tumor growth factor  $\beta$* ) ou encore des facteurs mitogènes. Comme pour les IL-2R $\beta$  et  $\gamma$  il y a une boucle de rétrocontrôle positive qui se met en place, l'IL-2 et la signalisation via l'IL-2R va potentialiser l'expression de l'IL2R $\alpha$ <sup>44,45</sup>.



**Figure 5 : IL-2R.** L'IL-2R de faible affinité est constitué de l'IL-2R $\alpha$  seul. Celui d'affinité intermédiaire est composé des chaînes  $\beta$  et  $\gamma$ . L'IL-2R de forte affinité est un hétérotrimère des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Figure adaptée de Spolski et al<sup>46</sup>.

Alors que les liens entre les LT et l'IL-2 sont largement documentés, les relations entre les DC et cette cytokine sont encore très mal connues. Comme je l'ai évoqué précédemment, les DC sont capables de produire et de sécréter de l'IL-2 suite à leur activation et cette production est nécessaire à une activation et prolifération efficace des LT dans les OLII.

Les DC peuvent également exprimer l'IL2R mais la fonction de ce récepteur sur les DC reste à élucider. Il a d'abord été décrit un mécanisme de trans-présentation de l'IL-2. L'IL-2 captée par l'IL-2R $\alpha$  de la DC n'induit pas de signalisation mais rend l'IL-2 facilement accessible au LT lorsque la DC sera en contact étroit avec ce dernier<sup>47,48</sup>.

Les travaux de *Lau-Kilby et al* ont démontré que l'IL-2 inhibe le développement dépendant du Flt3 des cDC et pDC. En effet, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de l'IL2R sont exprimées dans les précurseurs de ces cellules dès le stade MDP. La signalisation via de l'IL2R et de STAT5 dans ces cellules est associée à une diminution de la représentation des cDC et pDC. En effet, la différenciation *in vitro* de DC à partir de cellules de la MO en présence de Flt3L

avec ou sans IL-2 a montré que l'ajout d'IL-2 réduit le nombre de pDC et cDC. Cette étude a également montré que la présence d'IL-2 pendant le développement des DC aura un impact sur leurs fonctions, notamment une capacité réduite à stimuler les LT CD4+ et à induire leur prolifération<sup>49</sup>. Toutefois, ces conclusions restent controversées. Une autre étude a cherché à vérifier si l'IL-2 sur les DC serait directement responsable de la réduction de leur nombre. Pour cela, les auteurs ont comparé le nombre de DC dans les GL et la rate de souris déficientes pour l'IL-2 et pour la protéine RAG (*Recombination activating gene*), nécessaire au développement des LT et LB (IL-2<sup>-/-</sup>RAG<sup>-/-</sup>) ou de souris seulement déficientes pour RAG (IL-2<sup>+/+</sup>RAG<sup>-/-</sup>). La fréquence et le nombre des différentes populations de DC sont identiques dans les deux fonds génétiques. Ces résultats laissent supposer que l'impact de l'IL-2 sur le développement des DC n'est pas un effet direct mais un effet secondaire lié à l'impact de l'IL-2 sur les LT<sup>50</sup>. Cette étude ne s'intéresse cependant pas à la relation entre l'IL-2 et la fonction des DC. Un autre groupe ayant interrogé cette question a établi, dans des DC humaines matures différenciées à partir de cellules mononuclées de sang périphérique, un impact de l'IL-2 sur la fonctionnalité des DC. En effet, une stimulation avec de l'IL-2 de ces DC augmente leur capacité à activer des CTL et leur production d'IFN $\gamma$ . L'effet observé semble bien passer par la signalisation de l'IL-2R, puisque la phosphorylation de STAT5 a été observée après le traitement à l'IL-2<sup>51</sup>. Ces études suggèrent, sans créer de consensus, que la signalisation de l'IL-2 via l'IL-2R dans les DC peut impacter leur développement et/ou leur fonctionnalité.

## 2.1.2 Les Lymphocytes T CD4+

### 2.1.2.1 Développement

Les LT proviennent du processus de différenciation et spécialisation des HSC, qui a lieu dans la MO<sup>52</sup>. Les LT terminent leur processus de maturation en dehors de la MO, plus précisément dans le thymus. Après les stades MPP puis CLP, les cellules migrent jusqu'au thymus et y rentrent par les HEV, c'est le stade TSP (*Thymus seeding progenitor*). Une fois dans le thymus les cellules poursuivent leur spécialisation et différenciation en passant par plusieurs intermédiaires avant d'arriver aux LT CD4+ ou CD8+. Les cellules de l'épithélium thymique cortical (cTEC) ou médullaire (mTEC) dirigent les thymocytes à travers le thymus et orchestrent leur développement.

Le stade TSP est suivi par le stade double négatif (DN) (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) qui lui-même peut être divisé en quatre intermédiaires (DN 1, DN2, DN3, DN4).

Au stade DN1, aussi appelé ETP (*Early thymic progenitor*), les cellules ne sont pas encore définitivement engagées dans le lignage LT, elles peuvent se différencier en LT $\alpha\beta$ , LT $\gamma\delta$ , NK, LB ou DC<sup>53,54</sup>. Les signaux fournis par les cTEC via la production d'IL-7, SCF (*Stem cell factor*) et Dll4 (*Delta-like protein 4*), et l'expression de leurs récepteurs IL-7R, c-kit et Notch1 respectivement, à la surface des DN1, induisent la prolifération des DN1. L'activation de la voie Notch engage plus profondément la cellule dans le lignage LT<sup>55</sup>.

Les stades DN2 et DN3 se caractérisent par l'expression des molécules CD3, pT $\alpha$  et RAG1/2. Les protéines RAG permettent l'initiation de recombinaison V(D)J, que je détaillerai dans la partie développement des LB. Ces recombinaisons V(D)J conduisent au réarrangement des chaînes  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  du TCR, formant ainsi le pré-TCR composé d'une chaîne  $\beta$  et de la chaîne

invariante pT $\alpha$ . Le pré-TCR s'associe au CD3, ce qui renforce le signal résultant de la polymérisation de plusieurs pré-TCR et va diriger la cellule vers le lignage LT $\alpha\beta$ <sup>56</sup>. C'est ce que l'on appelle la sélection beta. Cela permet d'évaluer la capacité des TCR à activer un signal. Certaines cellules possèdent également des TCR $\gamma\delta$  qui induisent un signal plus fort que les pré-TCR. Si le signal est de forte intensité, le lignage LT $\gamma\delta$  sera favorisé. Si le signal est plus faible, ce sera le lignage LT $\alpha\beta$ <sup>57</sup>. Le signal pré-TCR et la voie Notch permettent la survie et la prolifération des cellules mais également un arrêt de l'expression des protéines RAG et donc du réarrangement de la chaîne  $\beta$  au stade DN4.

Les thymocytes passent ensuite au stade double positif (DP) (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) où ils expriment à nouveau les protéines RAG et réarrangent la chaîne  $\alpha$  du TCR. À la fin du stade DP, ces dernières possèdent un TCR complet et subissent alors une sélection positive. Cela consiste à sélectionner les cellules dont le TCR présente une affinité appropriée pour le complexe CMH/peptide à la surface des cTEC<sup>58</sup>. Si l'affinité est trop faible, la cellule ne reçoit pas suffisamment de signaux pour permettre sa survie (c'est la mort par négligence). Si l'affinité est trop forte, la cellule pourrait s'activer de manière non spécifique en périphérie, ce qui constitue un danger pour l'organisme, alors elles subissent un processus de sélection négative.

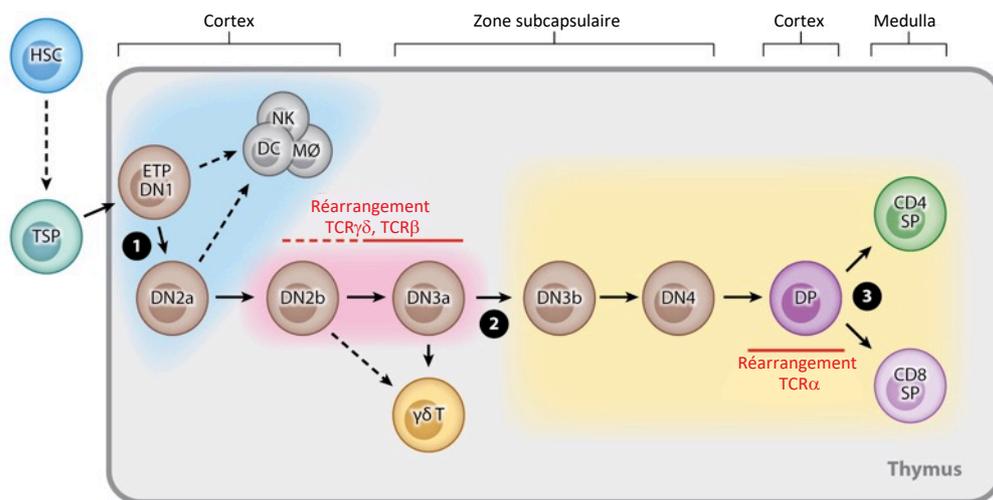
Pour les cellules ayant passé cette étape de sélection vient l'heure du choix du lignage CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Les cellules passeront de DP à simple positif (SP). Les cellules qui reconnaissent les complexes CMH-2/peptides deviendront SP4 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) et celles qui reconnaissent les complexes CMH-1/peptides seront SP8 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>)<sup>59</sup>.

À la suite d'une sélection positive, les TCR générés aléatoirement peuvent être spécifiques d'un Ag du non-soi ou d'un Ag du soi, et donc mener au développement de thymocytes auto-réactifs qui constitueraient un

danger. Ils pourraient notamment être responsables de développement de maladies auto-immunes. Les thymocytes subissent une autre étape de sélection, cela évite l'émergence de cellules auto-réactives. Cela correspond à la mise en place de la tolérance centrale. Il existe plusieurs moyens de mettre en place cette tolérance centrale, soit par l'induction de la délétion ou l'anergie des thymocytes auto-réactifs, soit en réorientant leur développement vers le lignage Treg. Je détaillerai le développement des Treg dans une partie ultérieure et me concentre ici sur le principe de sélection négative.

Les SP sont en contact avec différentes CPA dans le thymus (mTEC, cDC, pDC et LB). Ces CPA vont leur présenter des peptides du soi. Afin que tout le soi soit représenté et pas seulement l'environnement thymique, les mTEC et les LB thymiques expriment le facteur de transcription AIRE (*Autoimmune regulator*) qui leur permet de présenter des peptides spécifiques d'un tissu donné<sup>58,60</sup>. Cela permet aux mTEC d'exprimer environ 85% du génome chez la souris<sup>61</sup>. Les DC n'expriment pas AIRE, mais elles peuvent capturer et présenter les Ag produits par la mTEC via la phagocytose des débris de mTEC ou la sécrétion d'exosomes par ces dernières, contenant des complexes CMH/peptide<sup>62</sup>. De plus, des cDC ou pDC peuvent migrer des tissus vers le thymus et donc présenter des Ag capturés dans les tissus<sup>63,64</sup>. Cette capacité à migrer vers le thymus est perdue en cas d'activation des DC en périphérie<sup>65</sup>. La reconnaissance d'un Ag du soi par un thymocyte va induire son anergie, son apoptose ou sa différenciation en Treg selon le type cellulaire qui présente l'Ag au thymocyte et l'affinité de son TCR. Je reviendrai sur ce point lorsque je traiterai plus précisément du développement des Treg<sup>58</sup>.

Les cellules ayant passé avec succès toutes ces étapes de spécialisation, différenciation et sélection quittent ensuite le thymus pour gagner les OLI grâce à leur expression de CCR7 et CD62L puis la diminution de l'expression de CD69, rendant ainsi la cellule insensible à la sphingosine-1-phosphate (S1P) qui attire les cellules dans le sang.



**Figure 6 : Développement des LT dans le thymus.** Les TSP provenant des HSC, infiltrent le thymus et se différencient en LT CD4+ ou CD8+ en passant par différentes étapes, DN1 (ou ETP), DN2, DN3, DN4, DP et enfin SP (CD4 ou CD8). Aux stades DN2 et surtout DN3, il y a le réarrangement des TCR $\gamma\delta$  et  $\beta$ . Le réarrangement des TCR $\alpha$  se fait au stade DP. Figure adaptée de Koch et Radtke, 2011<sup>52</sup>.

### 2.1.2.2 Activation des LT CD4+

L'activation des LT CD4+ naïfs dépend de trois signaux qui lui sont délivrés lors du contact du LT CD4+ naïf et d'une DC. Le premier signal est la reconnaissance du complexe CMH-2/peptide par le TCR du LT CD4+, viennent ensuite des signaux de costimulation et enfin, les cytokines.

Après avoir capturé l'Ag, la DC mature et migre vers les OLI drainants le site d'inflammation (OLIID) où elle présente les peptides de cet Ag sur son CMH aux LT CD4+ naïfs. Les LT CD4+ scannent les DC présentes dans l'OLIID

jusqu'à rencontrer une DC qui présente le complexe CMH-2/peptide pour lequel son TCR est spécifique. Du fait de l'énorme diversité du répertoire TCR, la probabilité que le TCR d'un LT soit spécifique du complexe CMH-2/peptide présenté par la DC est faible. La DC doit donc être scannée par de nombreux LT pour avoir la chance d'en activer un. L'engagement du TCR par le complexe CMH-2/peptide induit une signalisation en aval du TCR qui permet de stabiliser l'interaction entre le LT et la DC et d'induire un programme d'activation du LT CD4+ naïf. L'intensité de cette signalisation dépend de la densité de complexe CMH-2/peptide à la surface de la DC et peut guider l'activation du LT<sup>66,67</sup>. Bien qu'essentiel, le signal du TCR n'est pas suffisant. Si les LT ne reçoivent pas de signaux de costimulation, ils deviennent anergiques<sup>68</sup>.

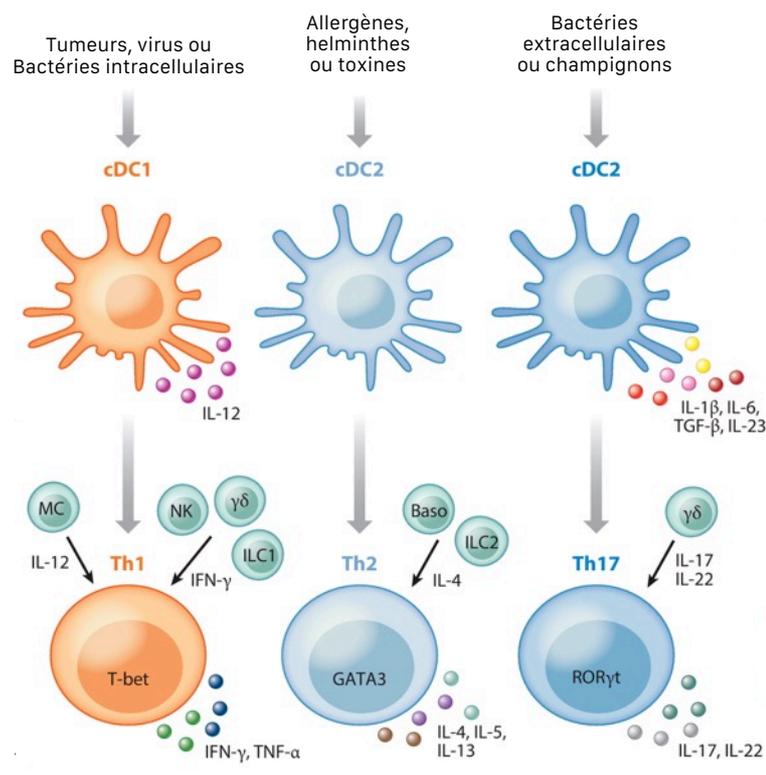
Cela nous amène au second signal, apporté par l'interaction des molécules de costimulation avec leurs récepteurs. L'engagement de CD28 à la surface du LT avec CD80 et CD86 à la surface de la DC permet la survie du LT. D'autres molécules présentes sur le LT, telles que le ligand du récepteur CD40 (CD40L), OX40, ICOS ou CD27 vont stimuler la DC et compléter sa maturation. Elle va ensuite exprimer davantage de molécules de costimulation et sécréter diverses cytokines.

Ces cytokines sont justement le troisième signal indispensable à l'activation fonctionnelle du LT. La première cytokine impliquée est l'IL-2, elle favorise la prolifération du LT<sup>44</sup>. La costimulation a pour effet d'augmenter l'expression de l'IL-2R $\alpha$  sur le LT, ce qui le rend plus sensible à l'IL-2 produite de manière autocrine ou paracrine. D'autres cytokines produites par la DC vont jouer un rôle essentiel dans la polarisation des LT CD4+, leur conférant ainsi des fonctions adaptées aux pathogènes rencontrés.

### 2.1.2.3 Polarisation des LT CD4+

On distingue plusieurs types d'immunités en fonction du danger ou pathogène rencontré. L'immunité de type I permet de lutter contre les virus et bactéries intracellulaires, l'immunité de type II contre les parasites et les allergènes et l'immunité de type III contre les champignons et bactéries extracellulaires. Selon le type de réponse immunitaire à mettre en place, la DC reçoit des signaux d'activation et de maturation spécifiques qui lui permettent de fournir les cytokines adaptées aux LT CD4+. Ces dernières vont orienter la polarisation des LT CD4+ en différentes sous-populations de LT auxiliaires (Th) qui répondront différemment selon le type d'immunité. Parmi ces sous-populations on trouve les Th1, Th2, Th17 ou d'autres populations décrites récemment comme les Th9 ou les Th22. Je vais me focaliser sur les Th1, Th2 et Th17, qui sont les mieux décrits à ce jour. Les cytokines et autres signaux fournis par les DC induisent également la différenciation de LT CD4+ naïfs en d'autres populations de LT dont je parlerai plus en détail par la suite.

On peut classer les différentes sous-populations de Th en fonction du type d'immunité à laquelle elles participent.



**Figure 7 : Polarisation des LT CD4+.** En fonction du contexte inflammatoire, les DC fournissent des signaux qui impactent la polarisation des LT CD4+. Dans le cadre de tumeurs ou infections par un virus ou une bactérie intracellulaire, les cDC1 produiront de l'IL-12 qui polarisera le LT naïf en Th1 (T-bet+) producteurs d'IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ . Suite à la rencontre avec un allergène, une toxine ou un helminthe, les cDC2 induiront la différenciation des LT naïfs en Th2 (GATA3+) producteurs d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. Dans le cadre d'une infection par une bactérie extracellulaire ou un champignon, les cDC2 produiront plusieurs cytokines, notamment de l'IL-6 et du TGF $\beta$ . Cela conduira à la polarisation des LT naïfs vers le lignage Th17 (ROR $\gamma$ t+) producteur d'IL-17 et d'IL-22. En plus des DC, d'autres populations cellulaires produisent les cytokines responsables de la polarisation des LT CD4+. Figure adaptée de Yin et al, 2021<sup>69</sup>.

Les Th1 sont impliqués dans l'immunité de type I. L'activation des DC en réponse à une infection par une bactérie intracellulaire par exemple, conduit à la production de l'IL-12 qui conduit à la polarisation des LT CD4+ en Th1<sup>70</sup>. La signalisation de l'IL-12 via STAT4 induit l'expression et la sécrétion d'IFN $\gamma$ , qui à son tour induit de manière autocrine une signalisation via STAT1 responsable de l'expression de Tbet (*T-box expressed in T cells*), considéré

comme le facteur de transcription clé ou *master regulator* du lignage Th1<sup>71</sup>. En plus du signal cytokinique, l'intensité du signal TCR a également une influence sur le choix de la polarisation. Un fort signal favorise l'expression d'IFN $\gamma$  et la polarisation Th1<sup>67</sup>. Le principal rôle des Th1 est d'apporter une aide aux LT CD8+ ou CTL. En effet, l'IFN $\gamma$  qu'ils produisent renforce la cytotoxicité des CTL et la présentation de l'Ag par les DC et les macrophages favorisant ainsi la réactivation des Th1 et LT CD8+ dans les tissus<sup>72</sup>. Les Th1 produisent également d'autres molécules pro-inflammatoires comme les TNF $\alpha$ , les GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) et la lymphotoxine  $\alpha$  (LT $\alpha$ ).

Les Th2, qui participent surtout à l'immunité de type II, sont polarisés par la cytokine IL-4. Elle va activer une voie de signalisation via STAT6 conduisant à l'expression de GATA-3 (*GATA binding protein 3*), le *master regulator* des Th2. L'IL-2 et l'activation de STAT5 participent également à la polarisation Th2. En effet, GATA-3 et STAT5 collaborent pour induire l'expression de gènes caractéristiques de ce lignage et réprimer ceux des autres lignages comme T-bet et STAT4 par exemple<sup>73</sup>. Contrairement au Th1, la polarisation Th2 est favorisée par une faible intensité de signal TCR<sup>67</sup>. Une fois les cellules engagées dans ce lignage, elles produisent de l'IL-4, IL-5 et IL-13. Ces cytokines participent directement ou indirectement à l'activation de basophiles, éosinophiles et mastocytes qui sont essentiels à une bonne réponse contre des parasites.

Dans un contexte d'immunité de type III, les LT CD4+ vont s'orienter vers la polarisation Th17. L'IL-6 et le TGF $\beta$  sont nécessaires à cette polarisation et l'IL-1 $\beta$  permet de la soutenir<sup>74</sup>. La signalisation de l'IL-6 via STAT3, induit l'expression du ROR $\gamma$ t (*RAR related orphan receptor  $\gamma$* ), le *master regulator* des Th17, et de l'IL-21<sup>75</sup>. Cette dernière va amplifier la voie de signalisation via STAT3 et induire l'expression de l'IL-23R qui permet de finaliser le choix du lignage Th17<sup>76</sup>. Ces cellules sont caractérisées par la

production d'IL-17A et d'IL-17F qui entraînent notamment une activation vasculaire. Cela aura pour effet d'augmenter le débit sanguin et de perméabiliser les vaisseaux au niveau de la production de cytokines. L'IL-17 induit la production de chimiokines comme CXCL1, CXCL2 ou CXCL8 par les cellules épithéliales. Ces chimiokines permettent l'attraction des neutrophiles<sup>77</sup>. Les Th17 sécrètent également de l'IL-22, qui active la production de peptides antimicrobiens par les cellules du système immunitaire inné, ainsi que par les épithéliums. De plus, l'IL-17 induit aussi cette production.<sup>78,79</sup>.

Les différentes sous-populations de Th sont décrites comme distinctes et mutuellement exclusives mais la réalité est plus complexe. En effet, au cours de leur polarisation, les cellules conservent une plasticité qui diminue avec le temps et l'engagement terminal dans le lignage. Si le microenvironnement et les cytokines qui le composent changent, les Th pourront aussi changer de polarisation. Cette plasticité permet aux Th de rester adaptés aux besoins<sup>80</sup>.

## **2.1.3 Les Lymphocytes B**

### **2.1.3.1 Le développement des LB**

Les LB se développent eux aussi à partir du CLP mais à la différence des LT, ils poursuivent toute leur différenciation dans la MO<sup>81</sup>. Après le stade CLP, la cellule passe au stade pro-B sous l'influence de divers facteurs transcriptomiques, notamment E2A, Ikaros et PU.1 qui induisent le facteur précoce des LB EBF1 (*early B-cell factor*). Le pro-B n'est pas encore totalement engagé dans le lignage LB, il peut se différencier en d'autres types cellulaires. La collaboration entre EBF1 et PAX5 (*paired box 5*) permet un engagement plus profond dans le lignage LB. Cela induit en particulier l'expression de plusieurs composants de la chaîne légère de substitution (SLC) du pré-BCR, Vpre-B et  $\lambda 5$ , ainsi que les sous-unités Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  nécessaires à la signalisation

de ce dernier<sup>82,83</sup>. L'expression des gènes Ikaros et PAX5 induit l'ouverture du locus IgH (qui correspond à la chaîne lourde du BCR) et par conséquent augmente son accessibilité<sup>84</sup>. Cela permet l'initiation du réarrangement du locus VDJ sous l'action des protéines RAG. Ainsi, l'expression de RAG1/2 est essentielle au bon développement des LB. Le pro-B n'exprime cependant pas encore le pré-BCR mais un pro-BCR composé de la chaîne légère de substitution associé à des glycoprotéines. Ce récepteur est incapable d'activer une voie de signalisation mais pourrait plutôt jouer un rôle dans l'adhésion des pro-B aux cellules stromales de la MO<sup>85</sup>. Par la suite, au stade pré-B, les cellules vont exprimer à leur surface le pré-BCR. Ce dernier est l'association d'un homodimère de chaînes lourdes, de deux chaînes légères de substitution et des sous-unités Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  ce qui permet d'induire une voie de signalisation dans les cellules.

Le passage du stade CLP au stade pro-B est contrôlé par trois principaux récepteurs, c-kit, Flt3 et l'IL-7R<sup>86</sup>. Ensemble, leur signalisation favorise la survie, la prolifération et le développement des CLP puis leur différenciation en pro-B.

Bien que l'IL-7R ne soit pas essentiel à la différenciation des CLP en pro-B, il joue néanmoins un rôle crucial dans le processus de développement des LB. En effet, sa voie de signalisation via STAT5 permet la survie des cellules et favorise le maintien de EBF1 et de PAX5<sup>87-89</sup>. Cette même voie permet également d'inhiber un réarrangement prématuré du locus Ig $\kappa$  de la chaîne légère du BCR<sup>89</sup>.

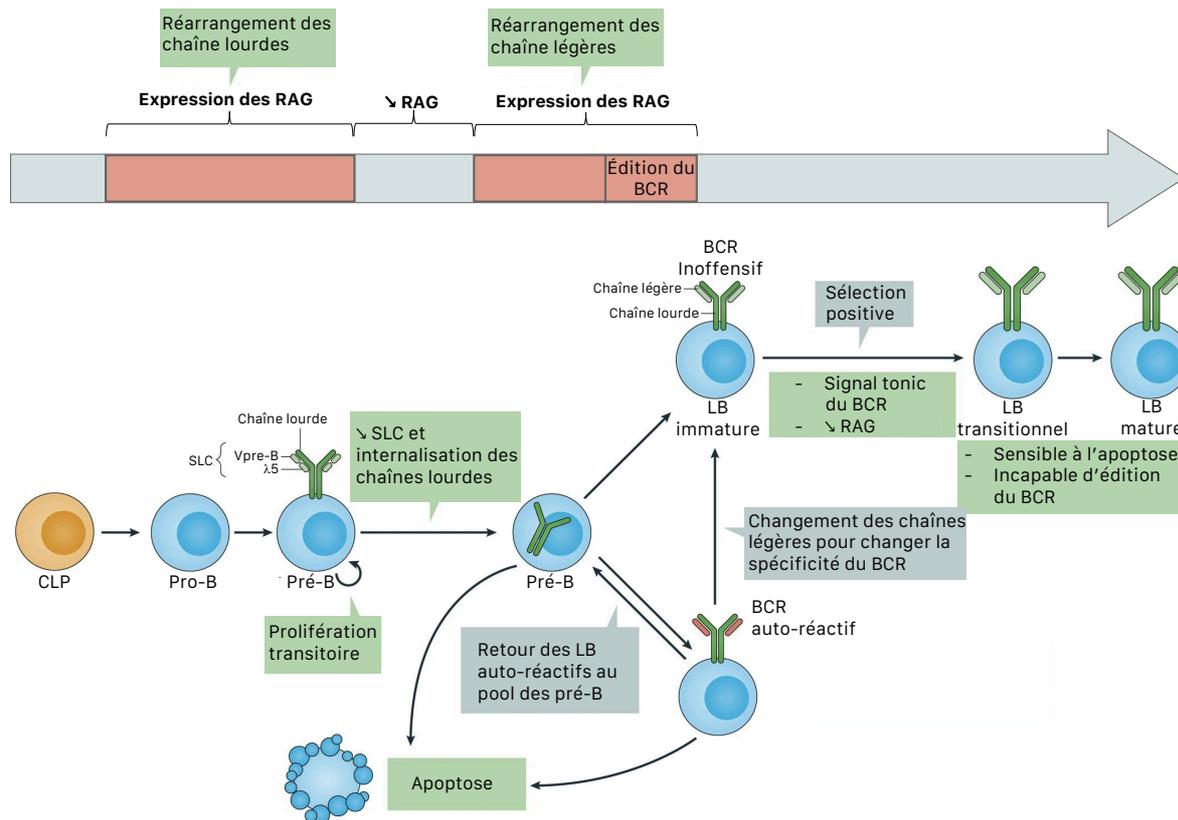
L'activation des voies Flt3 et l'IL-7R dans les pro-B induit l'expression du récepteur à chimiokine CXCR4. Les cellules pro-B vont alors s'éloigner des cellules stromales qui produisent l'IL-7 pour se rapprocher de celles qui produisent le CXCL12 (ligand de CXCR4). La signalisation via le pré-BCR va amplifier l'expression de CXCR4 et donc éloigner encore la cellule des cellules

sources d'IL-7. La baisse de signalisation par l'IL-7R associée aux signaux fournis par le pré-BCR, pourrait faciliter le réarrangement du locus Ig $\kappa$  de la chaîne légère<sup>90</sup>.

L'association des chaînes lourdes et légères réarrangées constitue le BCR. Ce dernier est exprimé à la surface des cellules qui sont alors des LB immatures. Afin d'éviter la génération de LB portant des BCR spécifiques contre des Ag du soi, des mécanismes de tolérance centrale se mettent en place à l'instar des LT. La reconnaissance d'un Ag du soi par le BCR d'un LB immature peut conduire soit à l'apoptose de la cellule soit à la réédition de la chaîne légère du BCR grâce à une nouvelle expression des protéines RAG. Si la réédition ne permet pas la génération de BCR inoffensif, c'est-à-dire spécifique d'un Ag du non-soi, alors la cellule meurt par apoptose<sup>91</sup>.

Les cellules ayant survécu à cette sélection négative passent ensuite par une étape de sélection positive. Un BCR qui n'est pas lié à son ligand présente un signal tonique via la phosphorylation de différents partenaires dont CD19. Si le signal tonique est suffisant, les cellules survivent et entrent dans le stade LB transitionnel<sup>91</sup>.

Les LB transitionnels quittent la MO pour gagner les OLII où ils vont terminer leur différenciation soit en LB de la zone marginale (MZB), soit en LB folliculaires que l'on retrouvera dans les follicules B évoqués plus tôt<sup>81</sup>.



**Figure 8 : Développement des LB.** Le LB provient du CLP dans la MO, il se différencie en pro-B qui à son tour se différencie en Pré-B. À cette étape, il y a expression des protéines RAG et réarrangement des chaînes lourdes du BCR. Elles s'associent à la SLC et forment le pré-BCR. Lors du passage du stade pré-B au stade LB immature, il y a une nouvelle expression des protéines RAG qui conduit au réarrangement des chaînes légères et former le BCR. Si le BCR est auto-réactif, alors il peut être réédité et changer de spécificité. Si la réédition ne conduit pas à un BCR inoffensif, le LB mourra par apoptose. D'immature à transitionnel, le LB reçoit un signal tonique du BCR et diminue l'expression des RAG. Il quitte ensuite la MO et va dans les OLII où il se différencie en LB mature. Figure adaptée de Nemazee et al, 2017<sup>91</sup>.

### 2.1.3.2 Activation des LB naïfs

Une fois dans le follicule B, la rencontre entre le LB et l'Ag pour lequel son BCR est spécifique conduit à son activation. Il peut directement capter un Ag soluble ou reconnaître un Ag capturé et présenté à la surface d'un macrophage de la capsule ou des FDC<sup>92,93</sup>. Ces dernières n'ont pas d'activité de phagocytose et peuvent retenir et présenter un Ag intact durant des semaines. En effet, les FDC capturent les Ag opsonisés via leur récepteur au complément 2. Cela induit l'internalisation du complexe immun dans des endosomes sans activité de dégradation, cela protège les Ag. Ils sont ensuite présentés à la surface de la FDC et sont alors accessibles aux LB, puis ils sont à nouveau internalisés de manière cyclique<sup>94</sup>. Le LB se déplace continuellement dans le follicule (6µm par minute) et scanne son environnement à la recherche de son Ag<sup>92,95,96</sup>.

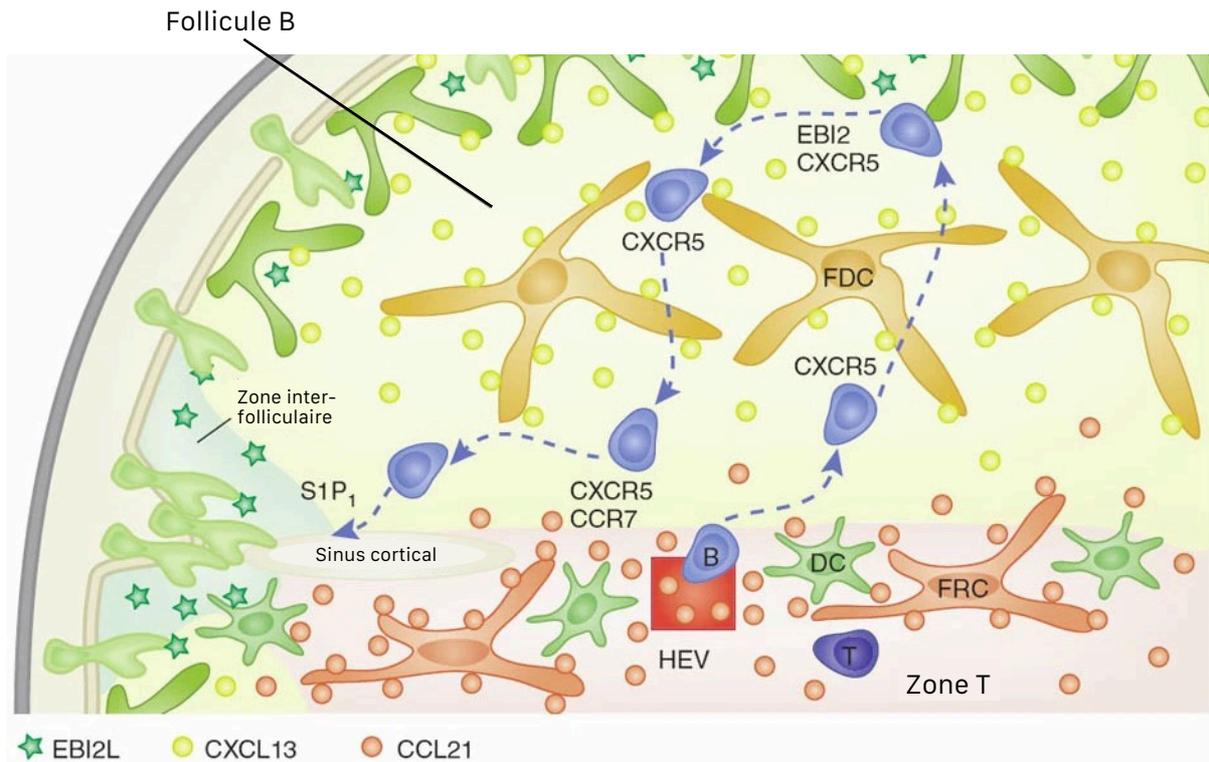
Une fois l'Ag rencontré, c'est le signal du BCR qui conduit à l'activation du LB. Le mécanisme par lequel cette signalisation se met en place reste toutefois à éclaircir. Plusieurs modèles sont proposés. Le premier suggère que la liaison de l'Ag sur le BCR conduit à la formation de clusters de BCR permettant au signal d'être transduit<sup>97</sup>. Le second modèle avance une préexistence des clusters de BCR avant la liaison avec l'Ag, et cette liaison induit la dissociation des BCR, rendant ainsi possible la signalisation<sup>98</sup>. Le LB naïf ne porte à sa surface que des BCR d'isotypes IgD ou IgM. Ces isotypes ne présentent pas de domaine intracellulaire significatif et n'induisent pas seuls, la transduction d'un signal. Le BCR doit s'associer à d'autres molécules parmi lesquelles les Igα et Igβ qui possèdent des motifs ITAM (*Immunoreceptor tyrosine activation motif*) pouvant être phosphorylés et ainsi, activer différentes voies de signalisation<sup>99</sup>. Un autre corécepteur important est CD19, il permet de déclencher la voie PI3-Kinase<sup>99</sup>. L'ensemble des voies de signalisation induites conduit à des modifications dans l'expression de nombreux gènes. Cela va mener à une augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86, de la molécule d'adhésion ICAM-1

(*Intracellular adhesion molecule 1*), de facteurs favorisant la survie du LB, de gènes du cycle cellulaire et des récepteurs de migration CCR7 et EBI2 (*Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2*), mais à une diminution de l'expression du S1PR1 (*Sphingosin-1-phosphate receptor 1*)<sup>100</sup>. Cette diminution de l'expression de S1PR1 permet de s'assurer que la cellule reste suffisamment dans le tissu où se met en place la réponse. Pour les Ag complexes, d'autres récepteurs peuvent intervenir comme les TLR ou le récepteur au complément (CR2). L'engagement de ces récepteurs peut entraîner une amplification et/ou une modification qualitative du signal en aval du BCR<sup>101,102</sup>.

Après avoir été reconnu par le BCR, l'Ag est internalisé. La force générée par les myosines lors de cette internalisation peut mener à la rupture des liaisons de faible intensité entre l'Ag et le BCR. Ce mécanisme pourrait permettre de sélectionner les BCR ayant une affinité suffisante pour l'Ag<sup>103</sup>. Une fois internalisé, l'Ag passe dans des lysosomes et endosomes où il est dégradé en peptides qui seront apprêtés sur des molécules de CMH-2. Le LB va alors exprimer le complexe CMH-2/peptide de façon à pouvoir le présenter à un LT.

La prolifération des LB activés suite à l'activation peut nécessiter ou non l'aide d'un LT. Pour les Ag de faible valence, l'activation du LB conduit à son passage de la phase G0 à la phase G1 du cycle cellulaire. Cela permettra une prolifération rapide en réponse aux signaux apportés par les LT. Pour les Ag présentant une grande multivalence et/ou s'accompagnant d'un fort signal via des corécepteurs comme les TLR, l'aide des LT n'est pas nécessaire. Une réponse B indépendante des LT se met alors en place.

Dans le cas des réponses dépendantes des LT, le LB doit se positionner au niveau de la frontière T-B de manière à rencontrer un LT. Cette migration est rendue possible grâce à l'expression de CCR7 et EBI2<sup>104</sup>.



**Figure 9 : Parcours du LB dans le follicule B.** Le LB rentre dans l'OLII par les HEV. Il exprime CXCR5 donc se dirige dans le follicule B en suivant le gradient de CXCL13. Une fois que le LB rencontre l'Ag, il exprime EB12 puis CCR7 qui le guident vers la frontière T-B. L'expression de S1P1 (ou S1PR1) quant à elle, permet à la cellule de quitter l'OLII et gagner la circulation sanguine. Figure adaptée de Cyster, 2010<sup>92</sup>.

### 2.1.3.3 Réponses B indépendantes des LT ou extra-folliculaires

Comme évoqué ci-dessus, une fois activé, le LB peut s'engager dans une réponse extra-folliculaire, indépendante des LT, ou une réponse folliculaire, dépendante des LT. Dans le premier cas, les LB prolifèrent rapidement et se différencient en PC à courte durée de vie qui produisent leurs Ac, alors que dans le second cas l'aide d'un LT et le passage dans un centre germinatif (CG) permet au LB de proliférer et se différencier en PC à longue durée de vie qui sécrèteront des Ac sur le long terme ou en cellules B mémoires porteurs d'Ac de forte affinité qui recirculeront dans tout l'organisme.

Dans les deux types de réponses, la prolifération est une étape cruciale. Elle a lieu très tôt, dès le quatrième jour post-infection, dans le cadre de la réponse extra-folliculaire, avec un pic du nombre de PC avant les deux semaines post-infection<sup>105</sup>. Ces cellules ont une demi-vie de seulement quelques jours, d'où leur appellation de PC à courte durée de vie, et le fait que la protection qu'elles apportent est généralement également de courte durée<sup>106</sup>. Il a toutefois été démontré que la réponse extra-folliculaire peut aussi générer une réponse Ac de longue durée de vie et de LB mémoires (LBm) notamment porteurs de l'isotype IgM souvent associé au PC à courte durée de vie<sup>107,108</sup>. Bien que dérivant de la réponse extra-folliculaire, la génération de ces LBm pourrait requérir le soutien des LT<sup>109</sup>.

Il a d'abord été suggéré que les événements de maturation des Ac, hypermutations somatiques (SHM pour *somatic hypermutation*) et commutations isotypiques (CSR pour *class switch recombination*) dont je parlerai plus en détail dans un prochain chapitre, avaient lieu exclusivement dans le cadre des CG mais plusieurs études ont montré que ces événements se déroulaient aussi lors des réponses extra-folliculaires<sup>105,110-112</sup>. Cela est rendu possible par l'expression de l'enzyme AID (*Activation-induced cytidine deaminase*) dans les LB extra-folliculaires<sup>113</sup>. Dans ce contexte, tous les LB ne vont pas passer par ces étapes de maturation. Cela suggère que les réponses extra-folliculaires soient moins efficaces que les réponses folliculaires pour générer des LB adaptés<sup>114</sup>.

La réponse extra-folliculaire peut être favorisée par la multivalence de l'Ag d'une part mais également par des cytokines comme BAFF (*B-cell activating factor*) ou APRIL (*a proliferation inducing ligand*) d'autre part. Ces cytokines vont agir principalement avec les récepteurs TACI (*transmembrane activator and CAML interactor*) et BCMA (*B cell maturation antigen*)<sup>115,116</sup>. L'expression de TACI peut être augmentée par la stimulation de certains

récepteurs de type TLR<sup>117</sup>. Les mécanismes par lesquels TACI favorise le développement des réponses extra-folliculaires restent à éclaircir.

## 2.2 Les LT folliculaires auxiliaires

J'ai déjà évoqué le fait que lorsqu'un LB s'engage dans la réponse folliculaire, le soutien d'un LT CD4<sup>+</sup> à la formation CG et à la finalisation de la maturation du LB. Il a longtemps été postulé que les LT impliqués étaient les Th2 car leur sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-6 favorise la production d'Ac (IgM, IgG1, IgA et IgE). Les Th1 quant à eux ont plutôt tendance à inhiber la réponse B mais leur sécrétion d'IFN $\gamma$  peut conduire à la production d'IgG2a<sup>118</sup>. Cette hypothèse a été remise en question. Des LT exprimant le récepteur à chimiokines CXCR5 ont été découverts, ce qui leur permet de se localiser dans le follicule B et d'aider les LB. Ces LT ont alors été appelés Tfh (*follicular helper T cells*)<sup>119–121</sup>. Il a été rapidement démontré que les Tfh sont un lignage bien distinct d'autres LT de par leurs phénotypes et leurs fonctions<sup>122–125</sup>. Ils se caractérisent notamment par une surexpression des gènes de CXCR5, Bcl6 (*B-cell lymphoma 6*), ICOS (*inductible T cell costimulator*), Ascl2 (*Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 2*), IL-21 et PD1 (*programmed cell death protein 1*) par rapport aux autres populations de LT<sup>126–130</sup>.

### 2.2.1 Rencontre avec une DC

La première étape menant à la différenciation des LT naïfs en Tfh est sa rencontre avec une DC. Cet événement est essentiel à la génération des Tfh et à une réponse Ac de qualité<sup>131</sup>. Comme détaillé précédemment, les DC sont une population très hétérogène et toutes les DC ne sont pas capables d'orienter la différenciation des LT naïfs en Tfh. Ce sont principalement les cDC2 migratoires localisées à la frontière T-B de l'OLII, qui sont responsables de la génération des Tfh<sup>132</sup>.

La reconnaissance du complexe CMH-2/peptides à la surface de la DC par le TCR du LT est primordiale, car elle détermine la suite des interactions entre les deux cellules. Comme je l'ai évoqué précédemment, l'intensité du signal engendré va guider le LT dans son choix de lignage. La reconnaissance d'un complexe CMH-2/peptide par le TCR avec une forte affinité pour ce complexe va induire un fort signal et favoriser la différenciation en Tfh en augmentant la production d'IL-21, une cytokine importante pour la différenciation et les fonctions des Tfh<sup>66</sup>.

Le second signal, celui de costimulation, est aussi important. Particulièrement, celui de CD28. Ce signal induit l'augmentation de l'expression d'OX40, d'ICOS et de CXCR5, essentiel au positionnement du Tfh à la frontière T-B puis dans le follicule B<sup>133,134</sup>. D'autres signaux de costimulation, tel que ICOS, CD30 ou OX40, vont également jouer un rôle majeur, mais ils interviennent après CD28. Ils peuvent être fournis par la DC mais dans le cas de CD30 et OX40, leurs ligands sont plutôt fournis par une population de LT particulière, les LTi (*inducer*)<sup>135</sup>.

J'aborde maintenant le troisième signal, les cytokines. Les deux cytokines menant à la différenciation des Tfh sont l'IL-6 et l'IL-21. Elles vont conduire à l'expression de Bcl6, considéré comme le *master regulator* des Tfh<sup>125,136</sup>.

Pour autant, après la rencontre avec la DC, la cellule n'a pas finalisé sa différenciation, elle n'exprime qu'un faible niveau de Bcl6. C'est le stade pré-Tfh. L'initiation de l'expression CXCR5 et la répression de CCR7, conduisent le positionnement du pré-Tfh à la frontière T-B indépendamment de Bcl6 mais via un autre facteur de transcription : Ascl2. En plus de moduler les récepteurs à chimiokines exprimés par le pré-Tfh, Ascl2 inhibe l'expression de gènes responsables de la différenciation des autres lignages comme Tbx21 (*T-box transcription factor 21*, le gène de T-bet), le gène de l'IFN $\gamma$  ou Rorc

(*RAR Related Orphan Receptor C*, le gène de ROR $\gamma$ t). En dépit de la répression des gènes de ces lignages, les pré-Tfh sont des producteurs importants des cytokines qui leur sont associées (IFN $\gamma$ , IL-4 ou IL-17 notamment)<sup>66,137,138</sup>. Cela va avoir une influence sur la CSR des LB. Ascl2 bloque aussi l'expression de l'IL-2 et des IL-2r  $\alpha$  et  $\beta$ <sup>139</sup>. Je reviendrai plus tard sur le rôle de l'IL-2 et de sa signalisation dans les Tfh.

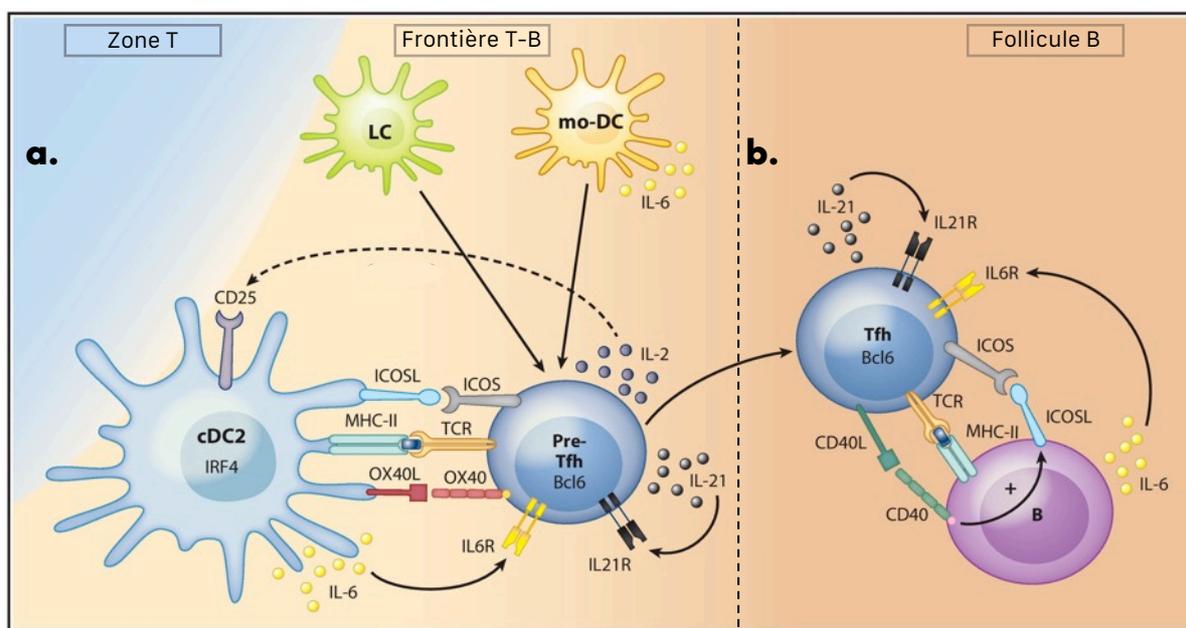
### 2.2.2 Rencontre avec un LB

Une fois à la frontière T-B, le pré-Tfh va rencontrer une autre CPA : un LB activé. Le LT engage à nouveau son TCR dans une interaction avec le complexe CMH-2/peptide à la surface du LB. Cette nouvelle interaction est essentielle pour finaliser le développement des Tfh et leur localisation dans un CG. La protéine SAP (*SLAM-associated protein*) joue alors un rôle important puisqu'elle stabilise les interactions entre le TCR et le complexe CMH-2/peptide, ce qui permet une forte signalisation via le TCR<sup>140</sup>.

Comme lors d'une rencontre avec une CPA classique, le signal de costimulation est crucial. En plus de l'activation du signal de CD28 par les molécules CD80/86, il y a un signal via l'interaction d'ICOS avec l'ICOS Ligand (ICOSL) sur le LB. Cela va induire l'expression de c-MAF, qui à son tour va augmenter l'expression d'IL-21<sup>138</sup>. Cette cytokine va agir en autocrine en favorisant l'expression de c-MAF, et donc sa propre expression, et surtout elle permet l'expression de Bcl6<sup>141</sup>.

Je traite enfin le rôle de Bcl6, le *master regulator* des Tfh. Il va amplifier l'expression de CXCR5, ICOS, PD1 et CXCR4 mais il agit plutôt comme un répresseur. En effet, il réprime l'expression de Blimp1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*) qui bloque la différenciation en Tfh, de CCR7, CCR6, S1PR1 et EBI2, favorisant ainsi la migration dans le follicule B<sup>126,142</sup>. Il cible également des promoteurs ou enhanceurs de gènes de lignages Th1 (Tbx21 et STAT4), Th2 (Gata3), Th17 (Rorc et IL-17F), cela inhibe leur expression<sup>118,127,141</sup>.

Le Tfh ayant finalisé sa différenciation migre à l'intérieur du follicule B et forme un CG avec un LB. On appelle ces Tfh, Tfh du CG ou CG-Tfh.



**Figure 10 : Différenciation des Tfh.** La différenciation des Tfh commence par la rencontre d'un LT naïf avec une cDC2 au niveau de la frontière T-B. Elle lui fournit les différents signaux dont il a besoin, le signal TCR, celui de costimulation et l'IL-6. Elle peut aussi capturer l'IL-2 de l'environnement, ce qui va favoriser la différenciation du pré-Tfh (a.). Par la suite, le Tfh se rapproche du follicule B et rencontre un LB qui lui fournit les signaux nécessaires à la finalisation de sa différenciation, signaux TCR et de costimulation ainsi que l'IL-6 (b.). L'IL-21 produite par les pré-Tfh et les Tfh, favorise aussi la différenciation des Tfh de manière autocrine. Figure adaptée de Yin et al, 2021<sup>69</sup>.

### 2.2.3 Rôle particulier de l'IL-2 pour les Tfh

Les Tfh et plus précisément les pré-Tfh sont de gros producteurs d'IL-2. Il y a un lien entre la force du signal TCR et la production d'IL-2. Les cellules recevant un fort signal TCR se différencient en pré-Tfh, comme je l'ai évoqué précédemment, et produisent de grosses quantités d'IL-2<sup>143</sup>. Cette cytokine joue bel et bien un rôle central dans la différenciation des Tfh mais ce n'est pas un rôle positif. Elle bloque la formation de Tfh au profit, notamment, de Th1<sup>144,145</sup>. L'IL-2 active la voie de signalisation via STAT5 qui entraîne deux effets : l'amplification de l'expression de Blimp1, un répresseur de Bcl6 et des gènes du lignage Tfh, ainsi que le remplacement de STAT3 sur le promoteur de Bcl6, ce qui réduit l'expression de ce dernier <sup>146-148</sup>.

IL-2 est donc un régulateur négatif intrinsèque aux LT de la différenciation des Tfh et donc de la réponse B dépendante des LT. En effet, en plus de bloquer la différenciation des Tfh, l'injection d'une forte dose d'IL-2 recombinante humaine (rIL-2) dans des souris infectées par Influenza pendant 10 jours réduit fortement la formation de CG et la production d'Ac spécifique du virus<sup>144</sup>.

Des mécanismes sont mis en place pour limiter ce signal IL-2, ils permettent la différenciation des Tfh. Au cours de l'initiation de ce processus, l'expression d'Ascl2 par les pré-Tfh puis de Bcl6 permet de réduire l'expression des IL-2R $\alpha$  et  $\beta$ <sup>139</sup>, ce qui diminue forcément la signalisation via l'IL-2 et son récepteur.

Un deuxième mécanisme consiste à limiter la disponibilité de l'IL2 dans le microenvironnement autour du LT destiné à devenir un Tfh. En effet, des cDC2 expriment l'IL-2R $\alpha$  à leur surface ou sécrètent des IL-2R $\alpha$  solubles qui capturent et bloquent l'IL-2 environnante, favorisant ainsi la différenciation

des Tfh. L'expression d'EBI2 par les pré-Tfh favoriserait leurs interactions avec ces cDC2 IL-2R $\alpha$ <sup>+</sup><sup>149</sup>.

### 3. Le Centre Germinatif

La rencontre entre le Tfh et le LB à la frontière T-B n'a pas seulement un impact sur le Tfh, elle est aussi cruciale pour le LB.

Le LB engage la CSR, avant la formation du CG<sup>150</sup>. Cet évènement consiste en un réarrangement de la chaîne lourde des Ig et dépend de l'expression des enzymes AID, UNG (*uracil-DNA glycosylase*) et APE1 (*apurinic-apurimidinic endonuclease 1*). Ces enzymes ciblent des régions introniques dans la partie constante des chaînes lourdes des Ig et y introduisent des cassures qui conduiront au réarrangement des séquences VDJ avec différentes parties constantes ou isotypes<sup>151</sup>. Ainsi, les LB matures qui expriment IgM et IgD pourront exprimer d'autres isotypes comme IgG, IgA, IgE selon les cytokines fournies par le Tfh et donc selon le contexte inflammatoire<sup>152</sup>. C'est ce que l'on appelle la polarisation des réponses B.

La rencontre du Tfh et du LB conduit aussi à une diminution de l'expression de CCR7 et d'EBI2, ainsi qu'à une augmentation de l'expression de S1PR2 dans les deux types cellulaires. La diminution de CCR7 et EBI2 leur permet de migrer à l'intérieur du follicule B et former un CG alors que S1PR2, en liant la S1P qui se trouve en faible quantité dans le follicule B, permet le maintien des cellules au sein du follicule B<sup>118,153-157</sup>. La S1P est produite par des cellules stromales en dehors du follicule B et est dégradée par les LB, ce qui explique sa faible concentration dans le follicule B<sup>156</sup>.

Une fois au centre du follicule B, le couple de cellules interagit une nouvelle fois. Cela conduit à la finalisation de la différenciation du Tfh et à la prolifération du LB afin de former et peupler le CG.

Au sein du CG, les LB seront soumis à des évènements de maturation et de sélection qui se dérouleront de façon dynamique, aussi bien spatialement que temporellement puisqu'ils se déplaceront dans différentes zones du CG, la zone sombre (ZS) et la zone claire (ZC). Les LB de la ZS sont identifiables de par la forte expression de CXCR4 et la faible expression de CD83 alors que les LB de la ZC expriment faiblement CXCR4 et fortement CD83.

### **3.1 La zone sombre**

Les cellules réticulaires productrices de CXCL12 (CRC) sont les cellules stromales qui permettent la formation et le maintien de la ZS. Leur principal rôle, comme leur nom l'indique, est de produire la chimiokine CXCL12 qui permet d'attirer les LB exprimant son récepteur, CXCR4<sup>3,158</sup>.

Dans la ZS, les LB prolifèrent de façon intense et subissent des SHM. En effet, lorsque la membrane nucléaire disparaît pendant le cycle cellulaire, cela facilite l'accès de l'ADN à l'enzyme AID, qui est responsable des SHM<sup>159</sup>. Si les SHM donnent lieu à l'expression de BCR non fonctionnels, les LB porteurs de ces BCR mourront par apoptose et seront éliminés par une population de macrophages à corps tangible (TBM) présente dans la ZS<sup>160</sup>.

La réduction de la prolifération des LB et des SHM s'accompagne d'une diminution de l'expression de CXCR4, ce qui favorise leur migration vers la ZC<sup>161</sup>.

Les Tfh quant à eux se localisent dans la ZC mais peuvent également exprimer le CXCR4. Cela leur permet de se positionner au plus près de la ZS<sup>162</sup>. Le rôle de cette expression de CXCR4 par les Tfh reste à établir, mais il est intéressant de noter que les Tfh exprimant CXCR4 et donc se localisant proche de la ZS produisent de grandes quantités d'IL-21, ce qui pourrait favoriser la prolifération des LB et leur maintien dans le CG<sup>118,163</sup>.

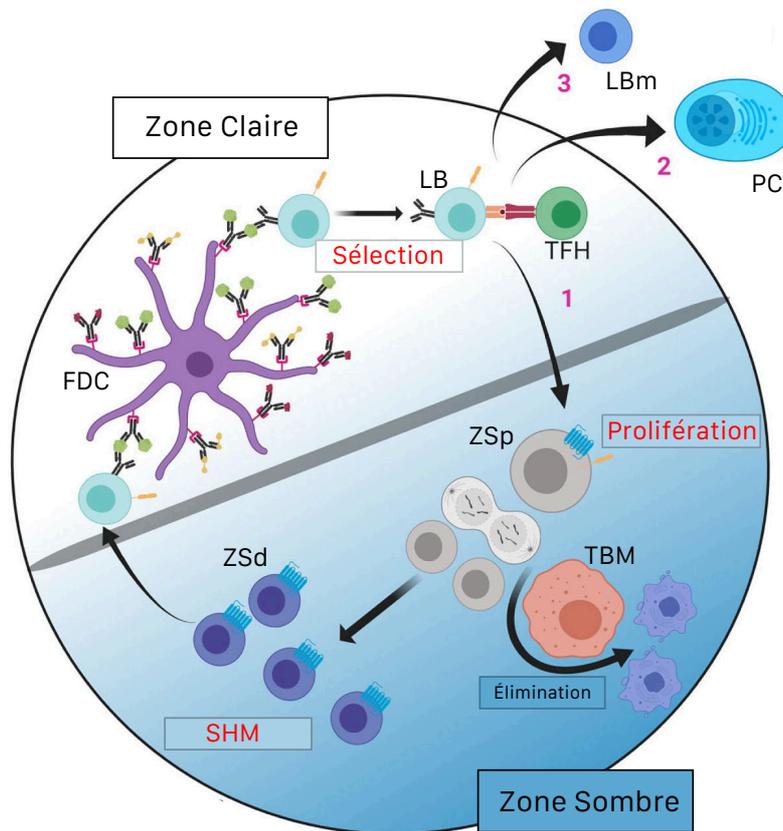
*Domenick Kennedy* et ses collègues proposent un modèle différent. Ils suggèrent que la ZS est en fait divisée en deux zones : la première qui conserve le nom de ZS et une seconde que l'on appelle la zone grise (ZG). Les LB prolifèreraient dans la ZG puis subirait les SHM et exprimeraient un nouveau BCR dans la ZS avant de passer dans la ZC. Pour établir ce modèle, les auteurs se sont basés sur l'expression différentielle de CXCR4 et CD83. Ils ont identifié trois clusters transcriptomiques de LB du CG, les CXCR4-CD83+, CXCR4+CD83+ et CXCR4+CD83-, qui correspondent respectivement aux LB de la ZC, ceux de la ZG, aussi appelés ZSp (prolifération) et ceux de la ZS ou ZSd (différenciation)<sup>164,165</sup>.

### **3.2 La zone claire**

Les cellules stromales qui structurent la ZC sont les FDC, lorsqu'elles sont activées via le TLR4 ou la Lymphotoxine  $\alpha 1\beta 2$  dérivée des LB, elles permettent le développement et le maintien des ZC<sup>166-168</sup>. Les FDC sécrètent les cytokines IL-6 et IL-5 qui vont promouvoir les SHM et la prolifération des LB<sup>3</sup>. Elles produisent également la molécule FDC-M1 qui marque les LB apoptotiques de manière à ce qu'ils soient reconnus et éliminés par les macrophages à corps tangible de la ZS<sup>169</sup>. Les FDC produisent également le CXCL13 qui attire les LB et les Tfh dans le follicule B et le CG<sup>170</sup>. Enfin, la dernière fonction des FDC que j'évoquerai est leur capacité à capter les Ag via leurs CD35, CD21 et FC $\gamma$ RII à leur surface. L'Ag est présent à la membrane de la FDC sans être dégradé mais dans des complexes immuns puis sera capté par le LB qui lui le dégradera et le présentera aux Tfh via son CMH-2<sup>168,171</sup>.

Viens alors l'étape de sélection par les Tfh. Les Tfh sont présents dans la ZC du fait de leur expression de CXCR5 mais y restent grâce à celle de S1PR2 et SAP qui soutiennent les interactions entre le TCR du Tfh et le complexe

CMH-2/peptide du LB<sup>172</sup>. Ces interactions vont permettre aux Tfh de fournir des signaux de survie aux LB avec lesquels ils interagissent. Si l'affinité du BCR du LB est forte, le LB pourra capturer plus d'Ag à la surface des FDC, présentera davantage de complexes CMH-2/peptide et recevra un signal plus fort de la part du Tfh. Les LB, ayant une forte affinité pour l'Ag, recevront alors les signaux induisant leur différenciation en PC et quitter le CG<sup>173</sup>. Si leur affinité est moins forte, les LB pourront soit se différencier en LBm et sortir du CG, soit exprimer à nouveau CXCR4 et repasser dans la ZS et subir un cycle supplémentaire de prolifération et de SHM<sup>174</sup>. Les clones qui seront repassés par la ZS retourneront dans la ZC où ils seront sélectionnés et ainsi de suite. Enfin, si leurs affinités sont insuffisantes, alors ils ne pourront pas interagir avec un Tfh et ne recevront donc pas de signaux de survie. Cela entraîne leur mort par négligence. Un autre mécanisme de régulation est également mis en place. Il fait intervenir une population de Treg capable de se localiser dans le follicule B et le CG, les LT folliculaires régulateurs (Tfr). Les Tfr participent à la terminaison du CG. J'aborderai ces cellules et leurs modes d'action dans un prochain chapitre.



**Figure 11: Dynamique et compartimentation du CG.** Les LB qui entrent dans la ZC sont sélectionnés par le Tfh et vont soit se différencier en LBm ou PC, soit migrer vers la ZS du CG. S'ils n'ont pas reçu de signaux pro-apoptotiques dans la ZC, les LB de la ZS (ZSp) ou ZC, vont rentrer en mitose. S'ils ont reçu ces signaux alors c'est dans la niche des ZSp qu'ils seront éliminés par les TBM. Après un ou plusieurs cycles de divisions, les LB passent dans la phase de différenciation (ZSd) où leur BCR vont subir des SHM. Ils présenteront alors un BCR modifié à leur surface et retourneront dans la ZC où ils captureront l'Ag sur la FDC et interagiront à nouveau avec des Tfh. Figure adaptée de Kennedy et Clark, 2021<sup>165</sup>.



## **4. La mémoire immunitaire**

La réponse immunitaire se déroule en trois phases : la phase d'expansion clonale, qui correspond à la réponse effectrice ; la phase de contraction, pendant laquelle la plupart des cellules immunitaires meurent une fois le danger éliminé ; et enfin la phase mémoire, au cours de laquelle les quelques cellules ayant survécu à la phase précédente vont persister sur le long terme et permettre une réponse rapide et efficace après une nouvelle rencontre avec le danger. Dans ce chapitre, nous allons nous concentrer sur cette phase mémoire.

La mémoire immunitaire n'est pas l'apanage de l'immunité adaptative, elle existe aussi dans le cadre de l'immunité innée mais fait intervenir d'autres mécanismes qui conduisent à préférer l'expression immunité entraînée plutôt que mémoire immunitaire.

### **4.1 La mémoire des LT CD4+**

Après la phase de contraction, l'immense majorité des LT CD4+ comme les LT CD8+, générés lors de la réponse effectrice sont éliminés. Ceux qui survivent deviennent alors des LT mémoires. Je me focaliserai ici sur les LT CD4+.

Les LT CD4+ mémoires (LTm) présentent une grande hétérogénéité et/ou plasticité, au même titre que les LT CD4+ effecteurs. Je vais d'abord décrypter cette hétérogénéité avant de m'intéresser aux facteurs qui permettent la différenciation et la survie des LTm.

### 4.1.1 Hétérogénéité des LT CD4+ mémoires

Les LTm présentent une hétérogénéité aussi bien phénotypique que fonctionnelle. J'aborderai ici deux niveaux d'hétérogénéité, la première correspond à des différences de localisations et de fonctions alors que la seconde correspond à la polarisation des LTm comme pour les LT effecteurs.

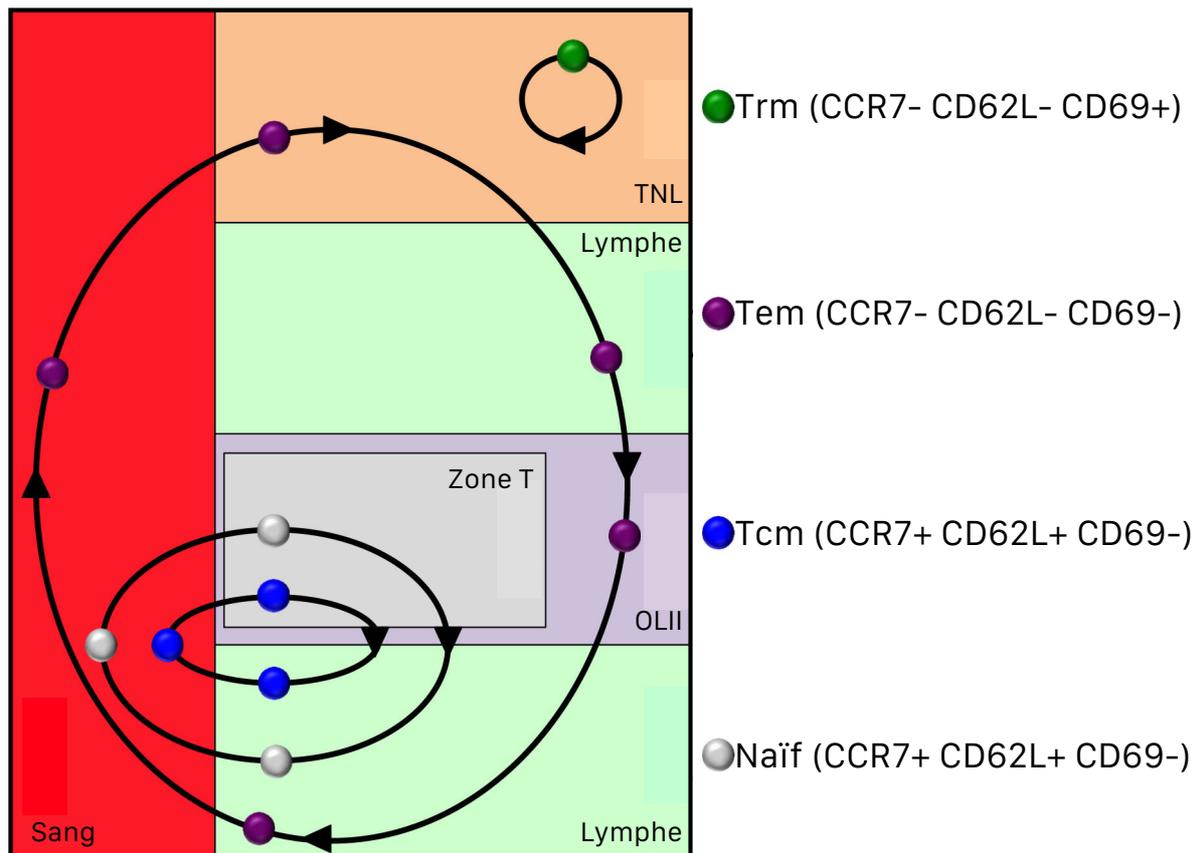
#### 4.1.1.1 Selon la localisation/circulation (Tcm, Tem, Tm)

Dans un premier temps, les LTm ont été décrits chez l'humain et ont divisés en deux populations sur la base de l'expression du récepteur à la chimiokine CCR7. Les LTm CCR7+ peuvent circuler dans les OLII via le sang et la lymphe, ils sont appelés LT centraux mémoires (Tcm). Les LTm CCR7- ne peuvent pas se localiser dans la zone T des OLII à cause de l'absence de ce récepteur mais ils circulent dans les OLII et les tissus non lymphoïdes (TNL) via le sang et la lymphe. Ils sont appelés LT effecteurs mémoires (Tem)<sup>175</sup>. Ces deux populations ont ensuite été décrites chez la souris<sup>176</sup>. En plus de leurs localisations distinctes, les Tcm et les Tem présentent des différences fonctionnelles.

Les Tcm partagent certaines caractéristiques avec les LT naïfs, leur expression de CCR7 et CD62L leur permet de se localiser dans la zone T des OLII. Les Tcm sont plus sensibles que les LT naïfs à la stimulation antigénique et sont moins dépendants aux signaux de costimulations pour leur activation et prolifération. Ils expriment davantage de CD40L, ce qui stimule de manière plus efficace les DC et les LB. Après l'engagement de leur TCR, les Tcm produisent principalement de l'IL-2 mais après leur prolifération et différenciation en LT effecteur, ils peuvent produire d'autres cytokines comme l'IFN $\gamma$  ou l'IL-4.

Les Tem n'expriment pas CCR7 mais d'autres récepteurs à chimiokine et molécules d'adhésion qui les dirigent vers les tissus inflammés. À la différence des Tcm, après une nouvelle rencontre avec leur Ag, les Tem ne vont pas rentrer dans un processus de prolifération et différenciation en LT effecteur, mais, produisent rapidement une grande quantité de molécules effectrices comme l'IFN $\gamma$ , IL-4 ou IL-5, afin de mettre en place rapidement une réaction immunitaire locale en s'appuyant sur les cellules de l'immunité adaptative ou innée.

Plus récemment, une troisième population de LTm a été décrite, les LT résidents mémoires (Trm) qui ne circulent pas et restent dans les TNL<sup>177</sup>. Ils ont un rôle de sentinelle et sont les premiers à réagir en cas d'une nouvelle rencontre avec le pathogène pour lequel ils sont spécifiques, avant même les Tem. Ils permettent une activation rapide de la réponse et le recrutement d'autres cellules immunitaires sur le site de l'inflammation. Ils protègent aussi contre les infections latentes en contrôlant les pathogènes persistants. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de CD69<sup>177</sup>. Cette molécule se fixe sur le S1PR1 et induit sa dégradation. Or ce récepteur est essentiel à la sortie des cellules des TNL. De cette manière, CD69 retient les Trm dans les TNL<sup>178</sup>.



**Figure 12 : Circulation des différentes sous-populations de LTm et de LT naïfs.** Les Trm (CCR7-CD62L-CD69+) ne circulent pas dans l'organisme et restent dans les TNL. Les Tem (CCR7-CD62L-CD69-) circulent dans tout l'organisme via le sang et la lymphe en passant aussi bien dans les TNL que dans les OLII. Les Tcm (CCR7+CD62L+CD69-), comme les LT naïfs, sont capables de circuler uniquement dans OLII via le sang et la lymphe. Figure adaptée de Schenkel et Masopust, 2014<sup>177</sup>.

#### 4.1.1.2 Selon la polarisation

Les LTm comme les LT effecteurs s'adaptent au contexte inflammatoire. Certains LTm générés dans un contexte d'immunité de type I vont présenter des phénotypes et fonctions de type Th1, ils expriment le facteur de transcription T-bet et produisent rapidement de l'IFN $\gamma$  quand ils sont réactivés. En effet, des LT effecteurs qui produisent de l'IFN $\gamma$  pourront se différencier en LTm producteurs d'IFN $\gamma$ <sup>179,180</sup>. Des LTm de type Th2 ont également été mis en évidence, notamment dans un modèle d'asthme

allergique chez la souris. Ils produisent des cytokines classiquement associés à ce lignage, l'IL-4 et l'IL-13<sup>181</sup>. Concernant le lignage Th17, des études chez l'humain et chez la souris ont montré que l'infection par *Candida albicans* (ou d'autres pathogènes induisant une immunité de type III) conduit à la génération de LTm de type Th17 (ROR $\gamma$ +) protecteur sur le long terme et capable de produire de l'IL-17 après réactivation<sup>182</sup>. Cette hétérogénéité pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité du compartiment effecteur car il semblerait que les Tem se différencient à partir de LT CD4+ polarisés et qu'ils conservent leur lignage. Les Tcm ne présentent pas de phénotype polarisé et pourront acquérir le phénotype adapté après leur réactivation<sup>183</sup>.

Il existe aussi de LTm de type Tfh mais j'en parlerai plus en détail par la suite.

#### **4.1.2 Génération des LT CD4+ mémoires**

Comme je l'ai présenté, les LTm forment une population hétérogène et par conséquent il est difficile de leur attribuer une seule voie de différenciation. Les signaux classiques induisant l'activation et la différenciation des LT naïfs en LT effecteurs, à savoir les signaux délivrés par le TCR, les molécules de costimulation et les cytokines, rentrent aussi en jeu dans la différenciation des LTm.

En effet, il a été montré qu'un fort signal TCR favorise la différenciation des LT naïfs en LT effecteurs qui à leur tour pourront se différencier en Tem, alors qu'un signal de faible intensité conduirait à la génération de Tcm<sup>183,184</sup>. Un fort signal TCR induit une expression élevée de l'IL-2R $\alpha$  importante pour la survie des LT, mais aussi un changement de métabolisme qui conduit à la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) qui endommagent les cellules et peuvent causer leur mort<sup>179</sup>. Ce phénomène peut causer en partie la phase de contraction. Les cellules recevant des signaux qui lui permettent de survivre à cette phase de contraction pourront se différencier en LTm.

Ces signaux peuvent être de nature cytokinique. Un fort signal TCR s'accompagne d'une forte expression de l'IL-2R $\alpha$ , les cellules IL-2R $\alpha$ + se différencieront alors majoritairement en LT effecteurs qui mourront mais une partie de ces cellules survivra en partie grâce au signal transduit par l'IL-2R justement. *McKinstry et al* ont montré dans un modèle murin, qu'une injection d'IL-2 à un temps tardif lors d'une infection virale (H1N1 ou H3N2) favorise la survie des LT et leur différenciation en LTm, notamment en amplifiant l'expression de l'IL-7R<sup>185</sup>. Ce récepteur est exprimé à la surface de tous les LT naïfs et participe à leur survie puis il est perdu par la majorité des LT effecteurs. Toutefois, au moment du pic de la réponse effectrice, environ 20% des LT conservent l'expression d'IL-7R. Cette proportion augmente fortement après la phase de contraction, jusqu'à atteindre plus de 90%<sup>186</sup>. Il est clairement établi que l'IL-7R joue un rôle important dans la survie et le maintien des LTm<sup>187</sup>. Il serait tentant de dire que les cellules qui conservent l'expression d'IL-7R durant la phase effectrice présentent un avantage dans la différenciation en LTm mais aucune donnée de la littérature ne permet de l'affirmer. Au contraire, *Marshall et al* montrent que des LT IL-7R+ comme IL-7R- isolés à partir de souris infectées par le virus LCMV (*lymphocytic choriomeningitis virus*) pendant la phase effectrice, sont capables de se différencier en LTm et d'exprimer l'IL-7R dans des souris receveuses infectées par le LCMV également<sup>186</sup>.

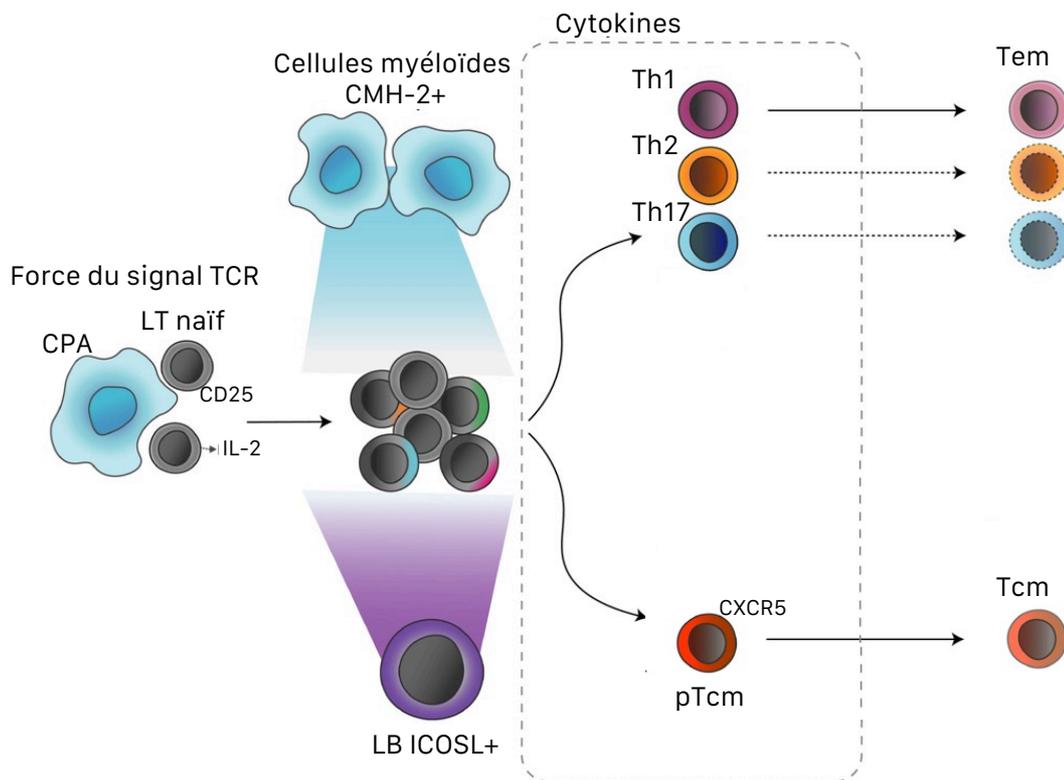
L'importance de ces cytokines est principalement démontrée dans le cadre de la différenciation des Tem mais certaines études mettent en évidence un rôle de l'IL-2 et de l'IL-7 dans la différenciation des Tcm<sup>188,189</sup>. Le rôle des cytokines dans la différenciation des Trm est difficile à appréhender, il dépend au moins en partie du tissu et du contexte dans lequel le LT se différencie. A titre d'exemple, pour ce qui est du poumon, la différenciation des Trm dépend soit de l'IL-2 soit de l'IL-15 en cas d'infection virale, alors qu'en cas d'allergie elle dépend de l'IL-2 et de l'IL-7<sup>190-192</sup>.

Il est intéressant de noter que les Trm du poumon dont la différenciation nécessite le signal de l'IL-7R n'expriment pas CD69, cela met en avant l'hétérogénéité de cette population<sup>192</sup>.

Les principales divergences dans la différenciation des Tem et des Tcm proviennent du fait que leur précurseur soit différent. Les Tem dérivent de LT effecteurs donc engagés dans un lignage, qui ont survécu à la phase de contraction, alors que les Tcm proviennent de précurseurs qui ne se sont pas engagés dans un lignage et ne passent pas par l'étape de LT effecteurs. Le choix entre LT effecteur ou précurseur de Tcm (pTcm) est guidé par le signal du TCR, par les cytokines mais également par la nature des CPA qui interagissent avec le LT et, par conséquent, de la nature des signaux de costimulation qu'ils lui fournissent<sup>193</sup>. Un LT qui interagit avec des cDC au cours de sa différenciation reçoit beaucoup de signaux de costimulation (notamment via CD28) qui amplifieront le signal du TCR. Il sera donc préférentiellement dirigé vers le lignage LT effecteur. À l'opposé, un LT qui interagit avec des LB reçoit un signal par l'interaction entre les molécules ICOS et ICOSL à la surface du LB. Cette interaction conduit à l'expression de Bcl6, qui, comme je l'ai mentionné précédemment, bloque l'expression des gènes spécifiques des lignages de LT effecteurs (hors Tfh). Comme les Tfh, les pTcm expriment CXCR5 et Bcl6 mais ils restent localisés dans la zone T. Les LT qui reçoivent le signal via ICOS pourront exprimer fortement Bcl6 et se différencieront en Tfh si le signal TCR est fort, si le signal TCR est plus faible la cellule exprimera un niveau de Bcl6 insuffisant pour se différencier en Tfh mais suffisant pour se différencier en pTcm<sup>145,193</sup>.

Enfin, j'évoquerai un dernier paramètre capable de moduler la différenciation des LTm. Il s'agit de la division asymétrique des cellules. En effet, lorsqu'une cellule se divise, les deux cellules filles n'héritent pas forcément de la même quantité protéique de telle ou telle molécule. Lorsque le LT est activé et commence à proliférer, il peut y avoir une répartition inégale de l'IL-2R $\alpha$  ou de molécules impliquées dans le changement

métabolique. Cela va fortement influencer le choix entre LT effecteur ou Tcm des cellules filles<sup>145,179</sup>.



**Figure 13 : Différenciation des Tem et des Tcm.** Un fort signal TCR fournit par les DC ou des cellules myéloïdes favorise la différenciation des LT naïfs en LT effecteurs (Th1, Th2 ou Th17) qui pourront éventuellement se différencier en Tem. Si le signal TCR est surtout fourni par les LB alors les signaux de costimulations seront différents (ICOSL-ICOS par exemple). Les LT naïfs se différencieront ainsi en pTcm (CXCR5+) qui donneront les Tcm. Figure adaptée de Soon et al, 2019<sup>193</sup>.

## 4.2 Les LTm de la MO

Comme je l'ai dit dans les premières pages de mon introduction la MO est un OLI, berceau de toutes les cellules du système immunitaire. Mais elle peut aussi dans certaines conditions être considérée comme un OLII et même comme un TNL. Elle est donc peuplée par diverses cellules immunitaires, notamment les LT CD4+.

Les LTm de la MO participent de manière active à la mémoire immunitaire. Ils possèdent un potentiel effecteur. Par exemple des LTm de MO isolés de patients atteints de différents types de cancer sont capables d'induire la mort de cellules cancéreuses autologues. Des essais cliniques basés sur ces cellules sont en cours, notamment pour le traitement du myélome multiple<sup>194,195</sup>. *Tokoyoda et al* ont montré que certains de ces LTm sont capables d'apporter une aide aux LB<sup>196</sup>. Enfin, les LTm influencent l'hématopoïèse et l'homéostasie de la MO<sup>197</sup>. Je discuterai de ces dernières fonctions dans des parties ultérieures.

### 4.2.1 Hétérogénéité des LTm de la MO

Les LT représentent entre 3% et 8% des cellules nucléées de la MO, il s'agit principalement de LTm mais on y trouve aussi des LT naïfs et effecteurs activés en cas d'une infection systémique<sup>198</sup>. C'est dans ce contexte que la MO est perçue comme un OLII. L'Ag est présenté aux LT naïfs par une DC migratoire ou résidente de la MO, mais les principales CPA présentes dans la MO sont les LB. Cela conduit à l'activation des LT et favorise la différenciation en LTm mais ne permet pas à la mise en place de CG<sup>197</sup>.

Quant aux LTm qui peuplent la MO, leur identité et leur représentation sont sujettes à controverse. Il a d'abord été postulé que la MO était un « réservoir » de LTm, une localisation dans laquelle les LTm font un arrêt

avant de repartir dans la circulation. Le compartiment de LTm de la MO serait alors constitué principalement de cellules circulantes donc Tem et Tcm<sup>194</sup>. Plusieurs résultats soutiennent cette hypothèse. D'abord en 1986, *Pabst et al* ont marqué spécifiquement les cellules de la MO de moutons avant de les retransférer dans la MO des mêmes moutons. Ils ont pu montrer que les LT marqués (donc de la MO) se retrouvent dans la MO mais également dans les autres organes lymphoïdes<sup>199</sup>. Les lymphocytes de la MO semblent alors être des cellules circulantes. D'autres approches expérimentales comme un modèle murin de parabiose, arrivent à la même conclusion, au moins pour les LTm CD8+<sup>200</sup>. D'autres études ont montré qu'il existe une population de LTm de la MO qui y réside et s'apparenterait à des Trm<sup>196,201</sup>. Entre 30% et 60% des LTm de la MO expriment CD69, une molécule qui permet de différencier les Trm des autres LTm. L'étude de leur transcriptome montre que ces cellules expriment des gènes caractéristiques des Trm présents dans les autres tissus comme *Inpp4b*, *Cxcr6* ou *Zfp683* (*zinc finger protein 683*) par exemple<sup>201</sup>. Ces résultats suggèrent, sans nier la présence de Tem et de Tcm, qu'une population de Trm est bien présente dans la MO.

#### **4.2.2 Signaux d'adressage à la MO**

Différents facteurs sont impliqués dans la migration des LTm vers la MO.

Parmi ces facteurs, il y a la chimiokine CXCL12 et son récepteur CXCR4 présents à la surface du LT. CXCL12 étant exprimé par certaines cellules stromales de la MO, cela attire les LT exprimant CXCR4<sup>202</sup>. En outre, comme c'est le cas d'autres types cellulaires, il est possible que le signal fourni par la liaison de CXCL12 à son récepteur favorise l'expression de Bcl2, un facteur anti-apoptotique<sup>203</sup>. L'IL-7 pourrait également être responsable de l'expression de Bcl2 et donc de la survie des cellules dans la MO.

Certaines molécules d'adhésion sont également importantes dans ce processus comme les intégrines  $\alpha 2$  et  $\beta 1$ , qui ensemble forment VLA-2 (*very late antigen 2*)<sup>196,204</sup>. VLA-2 interagit avec le collagène de type 1 abondant dans les os. L'intégrine VLA-4, par sa liaison à VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) joue également un rôle, comme le montre la diminution du nombre de LTm dans la MO de souris dans lesquelles VCAM-1 n'y est pas exprimé<sup>205</sup>. Il a également été observé que les LTm se nichent près des cellules stromales exprimant VCAM-1 et produisant l'IL-7<sup>196</sup>.

Comme je l'ai déjà évoqué, une partie des LTm de la MO expriment fortement CD69. Or CD69 diminue l'expression du S1PR1 et donc réduit la sensibilité des cellules au S1P qui se trouvent dans le sang. Ainsi, CD69 participe au maintien des LTm dans la MO<sup>206</sup>. D'autres molécules, dont l'implication dans la migration ou le maintien d'autres cellules dans la MO est connue, pourraient agir de la même manière pour les LTm. C'est par exemple le cas de CD44, mais cela n'a pas encore été expérimentalement démontré<sup>197</sup>.

### 4.3 Les Tfh mémoires

En 2007, *Fazilleau et al* ont démontré que les Tfh ne sont pas voués à mourir après la résolution de l'inflammation et la fin des CG. Une portion des Tfh générés lors de la réponse persiste dans la phase mémoire, nous les appellerons Tfh mémoires (mTfh). En effet, dans un modèle murin d'immunisation avec le PCC (*pigeon cytochrome C*) des cellules LT CXCR5+ sont retrouvées dans les OLII drainant le site d'injection à des temps tardifs après l'immunisation (jusqu'à 205 jours post-immunisation). Ils ont également montré que ces cellules, malgré une expression plus faible des molécules de costimulation ICOS et OX40 comparé aux Tfh effecteurs, répondent rapidement et efficacement lors d'une réponse secondaire<sup>207</sup>. Depuis de nombreuses études ont permis de souligner l'existence de ces mTfh, aussi bien chez la souris que chez l'humain.

### 4.3.1 Plasticité des mTfh

Le devenir et les fonctions de ces mTfh ne sont pas encore totalement élucidés.

Certains groupes affirment que ces mTfh n'ont pas vraiment de fonction de type Tfh lors d'une réponse secondaire mais qu'ils seraient plutôt des précurseurs multipotents de LTm. Je citerai deux expériences qui étayent cette hypothèse. La première montre que des LTm CXCR5+ spécifique de *L.monocytogenes* (identifiés à l'aide d'un tétramère LLOp:I-A<sup>b</sup>) isolés à partir de souris infectées par ce pathogène, peuvent générer à la fois une réponse Tfh et non-Tfh (notamment Th1) lorsqu'ils sont transférés dans des souris receveuses à leur tour infectées<sup>145</sup>. La deuxième expérience est fondée sur le même principe de transfert adoptif de LTm CXCR5+. Cette fois, les LT CXCR5+ ont été isolés de souris rapportrices IL-21-GFP infectées par *influenza*. De la même manière, les LTm CXCR5+ GFP+ pourront conserver des phénotype et fonctions de Tfh ou acquérir un phénotype et des fonctions non-Tfh<sup>208</sup>.

D'autres groupent suggèrent que les mTfh conservent bien des fonctions de Tfh lorsqu'ils sont réactivés. Lorsque des LTm CXCR5+ ou CXCR5- isolés à partir de souris TCR-transgéniques (tous les LT présentent le même TCR spécifique d'un complexe CMH-2/peptide précis) immunisées, sont transférés dans des souris receveuses qui seront ensuite immunisées avec le même Ag, les LTm CXCR5+ conserveront leur phénotype Tfh (CXCR5+,PD1+,Bcl6+ et IL-21+) alors que les CXCR5- resteront des non-Tfh<sup>209</sup>. Une autre étude basée sur le principe de transfert des mTfh TCR-transgéniques a été réalisée en utilisant des souris receveuses déficientes en LB. Après immunisation, les mTfh transférés conservent leur phénotype Tfh alors que l'absence des signaux fournis par les LB ne permet pas aux LT naïfs d'acquérir ce phénotype. Cela démontre qu'il y a un maintien du phénotype Tfh dans les mTfh et qu'il ne s'agit pas d'un phénotype lié à

l'activation des cellules par les LB<sup>210</sup>. Enfin, une approche a démontré que les LTm exprimant Bcl6 (les mTfh) isolés de souris rapportrices pour Bcl6, conservent ce phénotype et sont capables d'apporter une aide aux LB après leur réactivation. Cela souligne l'importance de Bcl6 dans les mTfh<sup>211</sup>.

Malgré des approches relativement proches, basées sur un transfert adoptif de LTm CXCR5+, les résultats de ces études conduisent à des conclusions différentes. Cela s'explique par les modèles utilisés, polyclonaux ou TCR-transgéniques donc monoclonaux. En effet, comme je l'ai déjà évoqué, le signal du TCR joue un rôle primordial dans l'engagement ou non des cellules vers le lignage Tfh. Un fort signal TCR favorisera une différenciation des cellules en Tfh effecteur et donc potentiellement en mTfh, alors qu'un signal plus faible peut induire une expression de Bcl6 insuffisante pour que la cellule se différencie en Tfh effecteur mais suffisante pour devenir un pTcm puis en Tcm. Les Tcm sont des cellules mémoires qui ne sont pas engagées dans un lignage. Elles correspondent sans doute aux cellules multipotentes observées dans les deux premiers exemples que j'ai cités. Les modèles polyclonaux permettent alors d'avoir à la fois des pTcm CXCR5+ et des mTfh. *Liu et al*, en sélectionnant les cellules qui coexpriment fortement Bcl6 et CXCR5, étudient bien les mTfh malgré leur modèle polyclonal<sup>211</sup>.

#### **4.3.2 Localisations des mTfh**

Comme les LTm dans leur ensemble, les mTfh peuvent être catégorisés en fonction de leur localisation ou leur capacité à circuler dans l'organisme. Les mTfh ne sont pas classés en Tcm, Tem et Trm comme les LTm mais leur classification présente certains parallèles avec celle des LTm. On parle alors de mTfh locaux, mTfh circulants (cTfh) ou mTfh résidents (Trh).

#### 4.3.2.1 Les mTfh locaux

Comme je l'ai évoqué, les mTfh ont été observés pour la première fois dans les OLII drainant un site d'immunisation, que ce soit dans des modèles polyclonaux ou avec des TCR transgéniques. Au fur et à mesure des semaines après une immunisation, l'expression de Bcl6 par les Tfh diminue. Ces Tfh avec une faible expression de Bcl6 ressemblent phénotypiquement à des Tcm. Ils sont quiescents et expriment CCR7 et l'IL-7R<sup>128</sup>. Il est possible que cette expression de CCR7 favorise une localisation à la frontière entre la zone T et le follicule B. Cette localisation leur permet d'être réactivé plus rapidement par un LB en cas de réponse secondaire et ainsi activer une réponse B plus rapidement<sup>212</sup>.

Les mTfh locaux diffèrent néanmoins des Tcm par l'absence d'expression de CD62L, caractéristiques des Tcm<sup>207</sup>. De la même manière, ils expriment CD69 qui participe à leur rétention dans les OLII<sup>213</sup>.

La génération et le maintien des mTfh locaux nécessitent la présence de LB et d'une stimulation antigénique donc de la persistance de l'Ag<sup>213,214</sup>. En effet, le blocage des interactions entre le TCR et le complexe CMH-2/peptide conduit à la sortie des mTfh locaux vers la circulation<sup>215</sup>.

#### 4.3.2.2 Les mTfh circulants (cTfh)

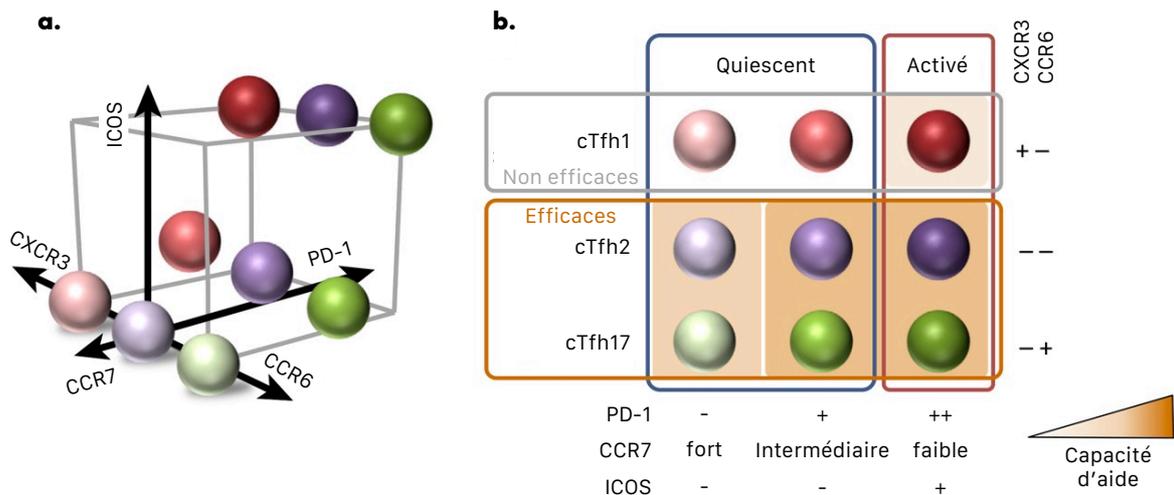
Comme leur nom l'indique les cTfh sont caractérisés par leur capacité à circuler dans l'organisme via le sang et la lymphe. Ils ont d'abord été identifiés dans le sang humain en 1994<sup>119</sup>. Ces observations ont depuis été largement confirmées, chez l'humain comme chez la souris.

En cas de nouvelle exposition à l'Ag pour lequel ils sont spécifiques, les cTfh migrent dans un OLII où ils apporteront une aide plus rapide et plus efficace au LB par rapport aux Tfh effecteurs<sup>216</sup>.

En effet, via leur production d'IL-21 et l'expression d'ICOS (qui interagit avec ICOSL à la surface des LB), les cTfh induisent la prolifération des LB et la différenciation de ces derniers en cellules productrices d'Ac<sup>217</sup>. Il a également été observé chez des patients présentant un rejet de greffe médié par les Ac, que les cTfh apportent une aide aux LB par la sécrétion d'exosomes<sup>218</sup>.

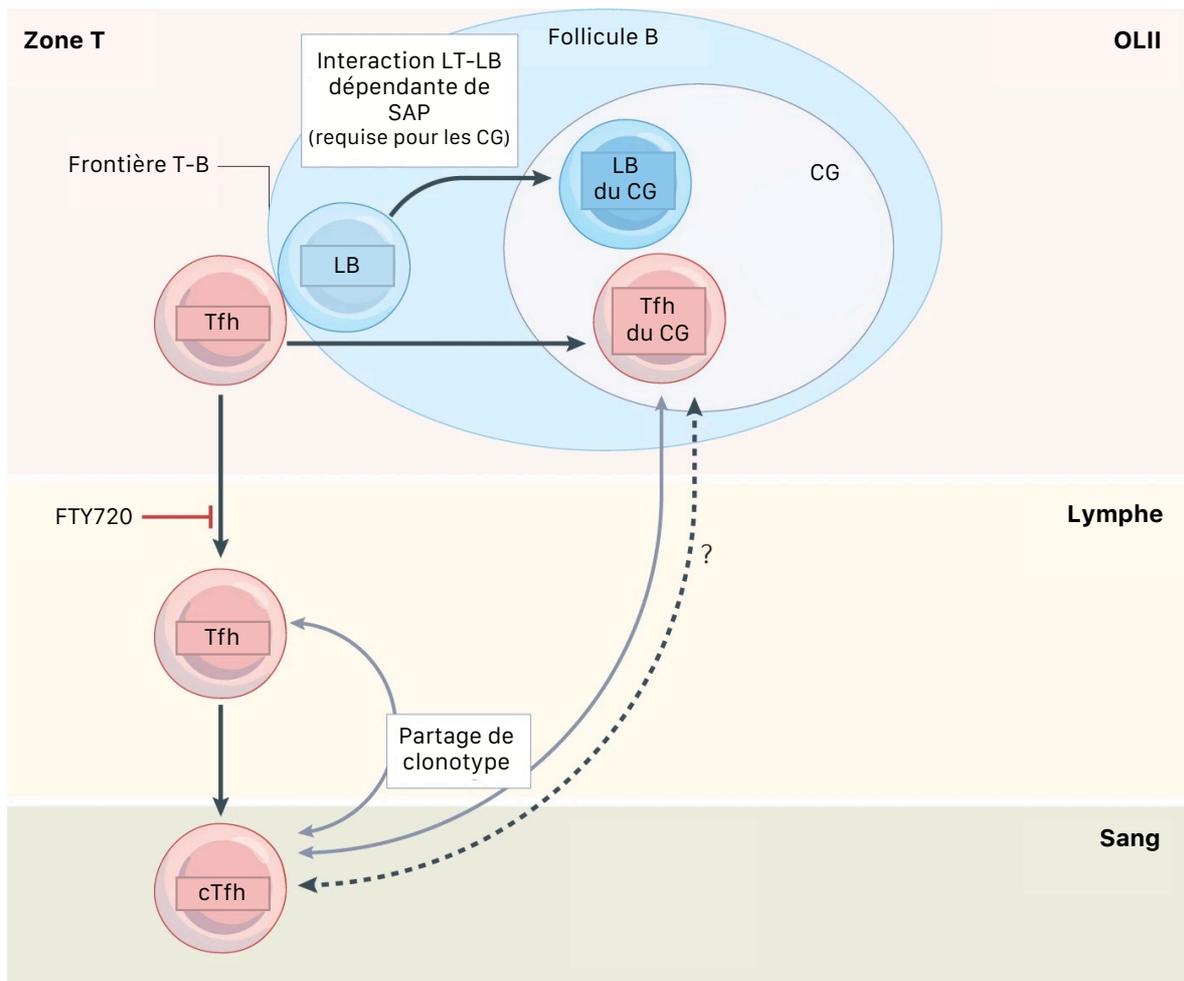
Les cTfh sont sans doute la population de mTfh la mieux caractérisée car elle est présente dans le sang et donc plus facilement accessible que dans les OLII. Les cTfh présentent une grande hétérogénéité et peuvent être classés selon leur polarisation. *Morita et al* ont identifié, sur la base de l'expression des récepteurs à chimiokines CXCR3 et CCR6, des cTfh polarisés de types cTfh1 (CXCR3+CCR6-), cTfh2 (CXCR3-CCR6-) ou cTfh17 (CXCR3-CCR6+). Ces cellules expriment alors les facteurs de transcriptions et cytokines caractéristiques de chaque polarisation, T-bet et IFN $\gamma$  pour les cTfh1, Gata3, IL-4, IL-5 et IL-13 pour les cTfh2, et Ror $\gamma$ t, IL-17A et IL-22 pour les cTfh17. Cette étude montre également que les cTfh1 apportent une aide aux LB moins efficace que les cTfh2 ou les cTfh17. Un déséquilibre dans la représentation de ces différentes populations est indicateur de développement de maladies auto-immunes<sup>217</sup>.

L'expression d'autres molécules, à savoir CD62L, CCR7, PD-1 et ICOS, permet aussi de séparer les cTfh en plusieurs sous-populations : une population quiescente qui n'exprime ni PD-1 ni ICOS mais un haut niveau de CCR7 et de CD62L, une autre population quiescente qui n'exprime pas ICOS mais un niveau intermédiaire de PD-1 et CCR7, si l'expression de CD62L est diminuée dans ces cellules alors on peut parler d'une population partiellement activée, enfin une population activée qui n'exprime pas CD62L mais exprime ICOS, un faible niveau de CCR7 et fortement PD-1. La diminution de l'expression de CCR7 lors de l'activation de ces cellules leur permet de migrer plus facilement dans le follicule B et donc d'apporter une aide plus robuste et plus rapide aux LB<sup>219,220</sup>.



**Figure 14 : Les différentes sous-populations de cTfh.** Les cTfh peuvent être séparés en neuf sous-populations. D'abord selon leur polarisation puis au sein de chaque polarisation, il y a une sous-population quiescente et une autre activée. Les récepteurs à chimiokines CXCR3 et CCR6 permettent de séparer les polarisations alors que l'expression de PD-1, CCR7 et ICOS permet de déterminer leur état activé ou quiescent. Les cTfh ne présentent pas tous la même capacité d'aide aux LB. En effet, les cTfh1 ne sont pas efficaces alors que les cTfh2 et les cTfh17 le sont. Ces neuf sous-populations sont représentées sur un graphique en trois dimensions (a.) ou sous la forme d'un tableau (b.). Figure adaptée de Schmitt et al, 2014<sup>219</sup>.

Concernant l'ontogénie des cTfh, plusieurs études s'accordent pour dire qu'ils ne proviendraient pas de Tfh effecteurs du CG mais qu'ils se différencieraient à partir des pré-Tfh<sup>221</sup>. Des expériences de microscopie biphotonique ont démontrées que les Tfh effecteurs, bien qu'ils soient très mobiles au sein de l'OLII, vont d'un CG à un autre mais ne quittent que très rarement les OLII<sup>222</sup>. Ils ne peuvent alors pas être les précurseurs des cTfh. Une autre étude montre que les LT CD4+ déficients pour la protéine SAP ont une capacité équivalente à se différencier en cTfh que les LT CD4+ sauvages. SAP est essentielle à l'interaction entre le pré-Tfh et le LB. C'est cette interaction qui permet le passage du stade pré-Tfh à Tfh effecteur du CG. La différenciation des LT naïfs en pré-Tfh est indépendante de cette interaction et donc de la protéine SAP. La génération des cTfh étant elle aussi indépendante de la protéine SAP, cela suggère que ces cellules se différencient à partir de précurseurs formés avant la différenciation en Tfh effecteur. Il s'agirait de pré-Tfh qui expriment CXCR5, PD-1 et un faible niveau de CCR7, ce qui leur permet de gagner la circulation<sup>223</sup>. *Asrir et al*, ont aussi montré que les mTfh locaux peuvent quitter l'OLII et enrichir le compartiment de cTfh s'ils n'interagissent plus avec une CPA<sup>215</sup>.



**Figure 15 : Les cTfh dérivent des Tfh des OLII.** Les Tfh résident généralement dans les OLII mais des cTfh se retrouvent dans la circulation. Ces cTfh ne dépendent pas de la présence de CG car ils sont retrouvés dans la circulation en absence d'interactions entre les Tfh et les LB dépendantes de SAP. Ils proviennent bien des OLII car le blocage de la sortie des OLII par le FTY720 (un inhibiteur de S1PR1) diminue la quantité de cTfh dans le sang. Les cTfh partagent des clonotypes avec les autres populations de Tfh de la lymph ou des OLII. Cela met en évidence un lien développemental entre les cTfh et les Tfh des OLII. Figure adaptée de Walker, 2022<sup>221</sup>.

### 4.3.2.3 Les mTfh résidents

Plus récemment, une nouvelle population de mTfh a été décrite, les Trh. En raison de sa localisation dans les TNL, cette population de Trh peut être considérée comme le pendant des Trm pour les Tfh. Les Trh ont été observés dans les poumons de souris infectées par le virus *influenza*, ou dans les tumeurs de patientes atteintes de cancer du sein<sup>224-226</sup>.

Les Trh sont caractérisés par un phénotype qui recoupe à la fois le phénotype Tfh et le phénotype Trm aussi bien au niveau transcriptomique que protéique. Ils expriment fortement PD-1 et FR4 (*folate receptor 4*), ce sont les molécules qui permettent de les identifier<sup>224</sup>. Ils expriment aussi *Bcl6*, *Cxcr5*, *Icos*, *Il21* et d'autres gènes caractéristiques des Tfh mais également une signature de Trm qui se traduit par l'expression des gènes *Cd69* ou *Bhlhe40* par exemple.

La génération de ces cellules dépend à la fois de *Bcl6* et de *Bhlhe40*, des gènes essentiels à la différenciation des Tfh et des Trm<sup>225</sup>. Ils dépendent aussi des LB puisqu'une déplétion des LB par l'injection d'un Ac déplétant anti-CD20 conduit à une diminution du nombre et de la proportion de Trh. Dans les temps précoces de la mémoire, les Trh se développent suite l'interaction entre leur TCR et le complexe CMH-2/peptide à la surface du LB, mais il semblerait que la dépendance vis-à-vis de cette interaction soit levée dans les temps plus tardifs<sup>224</sup>.

À l'instar des Tfh, les Trh sont des cellules plastiques. Cela leur permet de remplir différentes fonctions. Dans un contexte d'infection virale chez la souris, les Trh ont été montrés capables d'apporter une aide aux LT CD8+ et aux LB, et de promouvoir une production locale d'Ac. L'interaction de leur CD40L avec le CD40 à la surface du LB ainsi que leur production d'IL-21 sont deux mécanismes utilisés par les Trh qui favorisent une réponse secondaire efficace<sup>224</sup>. Les Trh retrouvés dans les tumeurs humaines ont été appelés

TfhX13 car ces cellules expriment la chimiokine CXCL13. L'expression de CXCL13 permet d'attirer les LB afin de les activer et d'induire leur maturation plus rapidement et plus efficacement<sup>226</sup>.

#### 4.3.2.4 Les mTfh de la MO

Des Tfh peuvent également être retrouvés dans la MO. Il a par exemple été observé une relativement forte proportion de Tfh dans la MO de patients atteints de pancytopenie à médiation immunitaire<sup>227</sup>. Ces Tfh peuvent provenir de la différenciation de LT en Tfh lorsque la MO joue un rôle de OLII, il s'agit alors de Tfh effecteurs. Aucune étude n'a, à ce jour, mis en évidence la présence de mTfh dans la MO. Une autre population de LTm caractérisée par l'expression de Ly6C et de CD69 mais pas de CXCR5 ou Bcl6, a toutefois été associée à des fonctions de type Tfh, c'est-à-dire un soutien aux LB dans leur maturation<sup>196,228</sup>.

## 4.4 La mémoire humorale

La mémoire immunologique se traduit aussi par une mémoire humorale qui fait intervenir des LTm et des cellules à longue durée de vie qui se différencient à partir des LB. Ces cellules peuvent être séparées en deux grandes sous-populations, les LBM et les PC, qui présentent des phénotypes et des fonctions bien différentes.

### 4.4.1 Les Plasmocytes à longue durée de vie

Les PC constituent l'état de différenciation terminale des LB. Ils ont un rôle crucial dans la réponse immunitaire, ce sont les cellules qui sécrètent les Ac. Une fois différenciés, les PC migrent dans la MO via la circulation sanguine. Ils s'y nichent et y sécrètent des Ac de manière constitutive.

C'est ce qui permet de garder un taux d'Ac sérique spécifique d'un Ag donné relativement constant dans le temps à la suite d'une infection ou d'un vaccin. Ces cellules jouent donc un rôle central dans l'efficacité vaccinale. Ici, je parlerai des changements qui s'opèrent lors de la différenciation des PC. Les mécanismes de migration et de maintien des PC dans la MO seront abordés dans une prochaine partie.

Bien que dans certains cas, des PC peuvent être générés indépendamment du CG, ils se différencient majoritairement à partir de LB du CG et plus précisément des LB qui présentent les BCR avec la plus haute affinité pour l'Ag<sup>229</sup>. Les signaux reçus tout au long de la durée du CG, y compris les signaux fournis par les Tfh, induisent un programme transcriptomique précis qui conduit à la différenciation des PC. Je citerai trois principaux acteurs de ce programme : Blimp1, IRF4 et XBP1 (*X-box binding protein 1*).

Une première étude suggérant un rôle de Blimp1 dans la différenciation des PC était basée sur une augmentation de l'expression de CD138, qui identifie les PC, dans une lignée de cellules LB surexprimant Blimp1. Les auteurs ont également observé dans ces lignées, un changement dans la taille et la granulosité des cellules, signe d'une forte activité de production de protéines<sup>230</sup>. Plus tard, il a été mis en évidence *in vivo*, l'expression de Blimp1 dans les PC mais pas dans les LBm. Dans le CG, certaines cellules commencent à exprimer Blimp1, elles expriment alors CD138 et IRF4 mais n'expriment plus Bcl6<sup>231</sup>. Blimp1 permettrait le développement des PC en réprimant de nombreux gènes constitutifs de l'identité LB<sup>232</sup>. Pour autant, il a été mis en évidence la présence de précurseur de PC dans un modèle de souris déficientes pour le gène codant Blimp1, *Prdm1* (*PR domain zinc finger protein 1*). L'initiation de la différenciation en PC ne dépend alors pas de Blimp1 mais dans un premier temps de la diminution de l'expression des gènes caractéristiques de l'identité LB. Blimp1 est exprimé ensuite, réprime définitivement ces gènes et permet de terminer la différenciation en PC<sup>233</sup>.

Blimp1 a aussi été associé à la survie des PC et à la régulation de la production d'Ac<sup>234</sup>.

IRF4 est essentiel tant au développement des CG que pour la différenciation des PC. En effet, les souris dans lesquelles les LB sont déplétés pour le gène *Irf4* sont incapables de générer des CG<sup>235</sup>. Une autre étude utilise des souris dont seulement les LB IgG1+, qui sont donc passés dans le CG, sont déplétés pour le gène *Irf4*. Ces souris ne développent pas de PC<sup>236</sup>. IRF4 présente alors deux fonctions qui paraissent presque contradictoires. À faible dose, il va permettre la mise en place des CG et des CSR, en augmentant l'expression de l'enzyme AID et de Bcl6. À l'opposé, à forte dose il permet la différenciation en PC, notamment en activant l'expression de Blimp1 et donc la répression de Bcl6<sup>237</sup>.

Plus que dans la différenciation, XBP1 joue plutôt un rôle dans la fonction de sécrétion d'Ac des PC. En effet, dans les souris avec des LB déficients pour XBP1, les LB se développent normalement mais il n'y a pas de sécrétion d'Ac par les PC. Cela démontre que cette protéine est essentielle à la différenciation terminale en PC fonctionnels<sup>238</sup>. Son expression est induite en réponse à un stress du réticulum endoplasmique (RE) mais elle est amplifiée par IRF4 et Blimp1<sup>236,239</sup>. La production des Ac entraîne à une très forte activité du RE. Cette activité intense conduit à l'accumulation de protéines présentant de mauvaise conformation. Cela provoque un stress du RE. L'activation des voies UPR (*unfolded protein response*) permet de limiter cette accumulation et donc de pallier à ce stress et produire les Ac. Ces voies UPR vont également entraîner l'épissage de XBP1 et cette forme épissée, appelé XBP1s (*spliced*) va augmenter l'activité et la taille du RE. Cela permet au PC de devenir une cellule productrice et sécrétrice de protéine, en l'occurrence les Ac<sup>239</sup>.

#### 4.4.2 Les LB mémoires

Contrairement aux PC, les LBm ne sont pas un état terminal de différenciation des LB. Ils ne sécrètent pas d'Ac, mais peuvent être réactivés en cas d'une nouvelle rencontre avec l'Ag. Cela conduira soit à la génération rapide de nouveaux CG, soit à la différenciation directe des LBm en PC sans passer par la phase de CG. Les LBm peuvent être générés de façon dépendante ou indépendante des LT. Je me focaliserai ici sur les LBm dépendants des LT. Chez la souris, ils sont caractérisés par l'expression de CD38, comme les LB naïfs, mais à la différence des LB du CG. Chez l'humain c'est l'inverse, les LBm n'expriment pas CD38 alors que les LB du CG l'expriment<sup>240</sup>. Il est important de souligner que les LBm forment une population hétérogène du point de vue phénotypique, fonctionnel et de la localisation. C'est cette hétérogénéité qui sera l'objet des lignes qui suivent.

Tous les LBm ne proviennent pas de LB étant passés par un CG. En effet, dans chaque sous-population que je vais présenter, on retrouve à la fois des LBm dont le BCR a subi des SHM et d'autres qui n'en ont pas subi<sup>241</sup>. La différenciation des LBm ne dépendant pas non plus des CSR. En effet, chez l'humain et la souris, des LBm IgM+ et même IgM+IgD+, ont été observés alors que ces isotypes sont connus pour être présents à la surface de LB naïfs, avant la CSR<sup>242</sup>. Les LBm IgM+IgD+ représenteraient environ 30% des LB CD27+ du sang humain<sup>243</sup>. CD27 est une protéine exprimée par la majorité des LBm chez l'humain. La différence entre les LBm qui ont passé la CSR (LBm CSR+) et les LB IgM+ et/ou IgD+ (LBm CSR-) est également fonctionnelle. Les LBm CSR+ se différencient directement et rapidement en PC suite à une réactivation, alors que les LBm CSR- permettent la génération de nouveau CG et à terme celle de PC<sup>244,245</sup>. Les LBm IgD+ persistent plus longtemps que les LBm IgM+ ou les LBm CSR+. Ils constitueraient alors un réservoir pour des réponses semblables à des réponses naïves après une nouvelle rencontre avec l'Ag<sup>240</sup>.

D'autres molécules permettent de classer les LBm en catégories, comme PD-L2 et CD80. Les LBm doubles négatifs correspondent aux cellules les plus plastiques. Après réactivation, elles induisent de nouveaux CG. Ces cellules expriment généralement IgM et/ou IgD. Les doubles positifs au contraire, sont moins plastiques et se différencient en PC après leur réactivation. Le transfert de LBm PD-L2+CD80+IgG1+, isolés à partir de souris immunisées avec l'haptène NP couplé à une protéine, conduit à la génération de PC IgG1+ mais pas de CG dans la souris receveuses. Le transfert de PD-L2-CD80-IgG1+ en revanche, mène à la formation de CG<sup>246</sup>.

Il est possible de séparer les LBm également en fonction de leur localisation. Bien que la majorité des LBm se trouvent dans la rate ou la circulation sanguine, comme pour les LT, il a été mis en évidence la présence de LBm dans les TNL. Ces cellules sont appelées LB résidents mémoires (Brm). Une expérience de parabiose avec des souris infectées par *Influenza*, montre que tout comme les Trm, les Brm ne circulent pas et restent dans le tissu, ici le poumon de leur souris d'origine<sup>247</sup>. Les similitudes avec les Trm ne s'arrêtent pas là. Comme les Trm, les Brm expriment CD69. L'expression de CD69 associée à celle de CD45RB, permet, au moins chez l'humain, d'identifier cette population<sup>248</sup>. L'aide des LT permet la génération rapide des Brm. Cette rapidité suggère qu'elle se déroule en dehors des CG<sup>247</sup>. D'un point de vue fonctionnel, ces cellules se différencient en PC après une nouvelle rencontre avec l'Ag, et produisent rapidement des Ac *in-situ*<sup>247</sup>.

### 4.4.3 Réponse anticorps secondaire

Après une nouvelle rencontre avec un Ag, il y a une production rapide et importante d'Ac de haute-affinité dirigé contre l'Ag, c'est la réponse Ac secondaire. Elle s'appuie principalement sur les LBm mais aussi sur les mTfh.

Comme je l'ai évoqué précédemment, les LBm peuvent soit se différencier directement en PC et produire des Ac, soit former de nouveaux CG. Les deux choix présentent des avantages pour la réponse secondaire.

La différenciation rapide et directe en PC producteurs d'Ac de haute affinité pour l'Ag, permet une réaction très rapide après la réinfection ou le rappel vaccinal. La génération de nouveaux CG, permet aux BCR portés par les LBm de subir ou de re-subir les CSR et SHM. De cette manière, le répertoire d'Ac spécifique de l'Ag se diversifie. Cela constitue un atout majeur, notamment dans la lutte contre des virus qui mutent rapidement et/ou ceux dont plusieurs variants circulent comme le SARS-CoV-2.

Le choix entre ces deux destinées se fait principalement avant la réactivation, durant la réponse primaire. En effet, les différentes sous-populations que j'ai présentées dans la partie précédente, n'ont pas toutes les mêmes capacités à s'engager dans un type de réponse ou un autre. Mais tout n'est pas totalement décidé avant la réponse secondaire. Les mTfh ont aussi leur rôle à jouer. Bien que la différenciation des LBm en PC ne nécessite pas forcément l'aide des mTfh, ils sont essentiels à la génération de nouveaux CG<sup>249,250</sup>. Plus que la simple présence des mTfh, c'est l'interaction Ag-spécifique entre le mTfh et le LBm qui est essentielle, autant pour le mTfh que pour le LBm. La présentation de l'Ag via le CMH-2 du LBm induit une augmentation de l'expression de Bcl6 chez le mTfh et permet sa différenciation en Tfh effecteur qui participera au CG. De manière intéressante, les LBm permettent cette activation et différenciation alors que la présentation par les cDC ne le permet pas<sup>212</sup>. Le transfert de LBm qui

présentent ou non des molécules de CMH-2 à leur surface et de LT issus de souris immunisées, dans des souris Rag2<sup>-/-</sup>CMH-2<sup>-/-</sup> (qui n'ont donc ni LT ni LB), apporte une illustration de l'importance de ces interactions. En effet, dans les souris ayant reçu les LBm sans CMH-2, aucune réponse Ac secondaire n'est détectée alors que chez les souris ayant reçu les LBm avec CMH-2, il y a bien différenciation des LBm en cellules productrices d'Ac après une immunisation avec le même Ag que pour la souris donneuse<sup>251</sup>.

## **4.5 La niche plasmocytaire de la moelle osseuse**

La MO tient un rôle particulier dans le système immunitaire. C'est l'organe dans lequel est générée la quasi-totalité des cellules immunitaires, mais elle est aussi la niche pour les PC. Dans la MO, les PC vont survivre sur le long terme et produire constamment des Ac, ce qui permet d'avoir un titre d'Ac stable dans le sang permettant de réagir et d'alerter rapidement en cas d'une infection par un pathogène déjà rencontré par exemple. Le maintien de l'homéostasie au sein de la niche plasmocytaire est essentiel à la migration, au maintien et à la fonction des PC. Cette fonction est remplie par diverses molécules et acteurs cellulaires.

### **4.5.1 Migration vers la MO**

Une fois différenciés, les PC vont devoir quitter les OLII pour se loger dans la MO. La MO n'étant pas drainée par la lymphe, c'est la circulation sanguine qui permet de les y amener. Les cellules endothéliales régulent alors l'entrée dans la MO. Les cellules stromales périvasculaires qui expriment le CXCL12, l'IL-7 et l'IL-15 sont particulièrement importantes. Elles décident quelles cellules peuvent entrer et se loger dans la MO<sup>202</sup>. La chimiokine CXCL12 est la principale qui guide les cellules exprimant son récepteur CXCR4 comme les PC, vers la MO<sup>252</sup>.

Les PC différenciés réduisent leur expression de CXCR5 et de CCR7, et augmentent en même temps leur expression de S1PR1 et de CXCR4<sup>252,253</sup>. La diminution de CXCR5 et CCR7 permet de sortir de l'OLII, S1PR1 attire la cellule dans le sang, riche en S1P, et l'expression de CXCR4 la guide vers la MO. Une fois dans la MO, l'expression de S1PR1 diminue à la surface des PC et CXCL12 change de fonction. Il passe de chimioattractant à facteur de survie<sup>254</sup>.

#### 4.5.2 Une niche pour survivre

En 2003, Cassese *et al* ont mis en culture des suspensions de MO ou PC isolés de MO de souris dans du milieu de culture. Les PC seuls ne survivent pas plus de trois jours alors que les PC avec le reste de la MO peuvent survivre sur le long terme. Avec cette expérience, les auteurs ont montré que la longue durée de vie des PC n'est pas une capacité qui leur est intrinsèque, mais dépend de l'environnement de la MO<sup>255</sup>. Cet environnement propice à la survie des PC est appelé une niche. Les signaux qui permettent à la niche de se développer proviennent de diverses populations cellulaires, comme des cellules stromales, des monocytes, lymphocytes, éosinophiles, basophiles, mégacaryocytes, ostéoclastes ou ostéoblastes<sup>256</sup>.

En plus des différents signaux fournis par ces types cellulaires que j'aborderai juste après, l'hypoxie au sein de la MO favorise aussi la survie des cellules<sup>257</sup>.

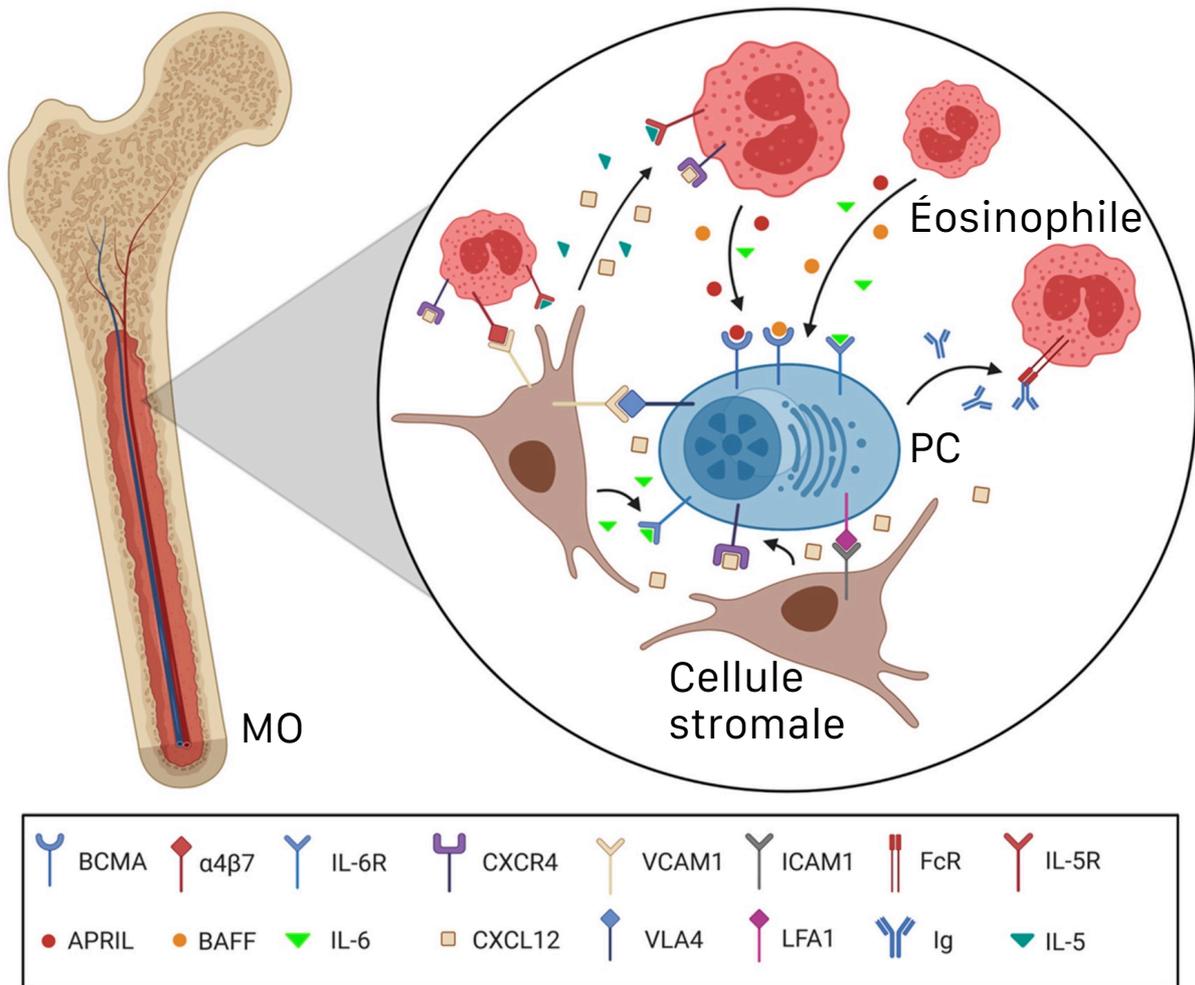
Via des contacts directs ou la sécrétion de CXCL12 notamment, les cellules stromales organisent la niche. Les intégrines VCAM1 et ICAM1 qu'elles portent, sont essentielles au maintien des PC dans la niche. Si ces deux molécules sont bloquées, il y a une déplétion des PC dans la MO<sup>258</sup>. L'activation de CD28 sur le PC par le CD80/86 à la surface des cellules stromales active la voie NFκB (*nuclear factor kappa B*) et conduit à l'expression de protéines anti-apoptotiques<sup>259</sup>. Enfin, les cellules stromales produisent de l'IL-6 qui induit une phosphorylation de STAT3 et l'expression de protéines

anti-apoptotiques<sup>260</sup>. Cette production d'IL-6 est potentialisée par l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire des cellules stromales par le CD44<sup>261</sup>.

D'autres molécules solubles sont importantes à la survie des PC comme CXCL12, IL-15, TNF $\alpha$  ou BAFF mais surtout APRIL. En effet, en se liant sur son récepteur BCMA, APRIL induit la production du facteur anti-apoptotique Mcl1 (*induced myeloid leukemia cell differentiation protein*) via l'activation de la voie NF $\kappa$ B<sup>197,255,262</sup>.

Bien qu'à eux seuls ils ne soient pas suffisants pour permettre la survie des PC, les éosinophiles sont particulièrement importants dans cette niche. Ils se localisent à proximité des PC. Après l'engagement de leur récepteur Fc, leur IL-5R ou leur  $\alpha$ 4 $\beta$ 7, ils constituent la principale source d'IL-6 et d'APRIL<sup>197,263</sup>.

Le fait que les PC, des cellules à longue durée de vie, nichent et interagissent avec des éosinophiles à courte durée de vie, conduit à l'élaboration de la théorie de la niche statique et dynamique. Les PC forment des contacts stables avec les cellules stromales et s'immobilisent dans la niche tout en étant intégrés dans un nid d'éosinophiles. Les éosinophiles sont la composante dynamique de la niche car elles ont une courte durée de vie. Elles prolifèrent de façon intense ce qui conduit au remplacement permanent des cellules mortes et à la conservation des interactions stables avec les PC. D'autres cellules participent certainement à ce réseau de soutien au sein de la niche plasmocytaire<sup>197</sup>.



**Figure 16 : Soutien apporté au PC par les cellules stromales et les éosinophiles dans le maintien de la niche plasmocytaire dans la MO.** Les PC sont attirés dans la MO par le gradient de CXCL12 produit par les cellules stromales. Une fois dans la MO, CXCL12 devient un facteur de survie pour le PC. De la même manière les PC sont retenus dans la niche par les interactions de leur VLA4 et LFA1 avec VCAM1 et ICAM1 respectivement, à la surface des cellules stromales. En plus du maintien physique dans la MO, ces intégrines fournissent des signaux de survie aux PC. Les éosinophiles font également partie de la niche, après l'engagement de leurs récepteurs Fc (FcR), IL-5R et  $\alpha4\beta7$ , ils produisent plusieurs facteurs de survie pour les PC comme l'IL-6, BAFF et surtout APRIL. Figure adaptée de Slamanig et al, 2021<sup>197</sup>

Les PC de la MO sont plus hétérogènes qu'on pourrait le croire. Environ 40% à 50% des PC de la MO sont des cellules récemment formées qui sécrètent des Ac IgM de faible affinité<sup>264</sup>.

Des études transcriptomiques révèlent une grande hétérogénéité de la niche elle-même<sup>265</sup>. Cela se traduit par des niches de plus ou moins bonne qualité en fonction du temps et de l'espace, ce qui va impacter la durée de vie du PC dans la niche.

#### **4.5.3 Compétition pour la niche**

Les PC ne sont pas regroupés en clusters dans la MO mais dispersés sur le parenchyme. C'est le cas de toutes les cellules mémoires dans la MO, y compris les LTm. Cela suggère qu'une cellule stromale ne peut permettre qu'à un seul PC de se nicher et qu'il y a donc une compétition pour accéder à cette niche<sup>197</sup>. *Odendahl et al* illustrent cette compétition dans un modèle d'immunisation de souris avec la toxine tétanique. Six à sept jours après l'immunisation, des PC nouvellement formés (neoPC) spécifiques de la toxine sont retrouvés dans la MO alors que des PC non spécifiques de la toxine sont retrouvés dans le sang. Cela suggère que les neoPC ont chassé les PC et qu'ils occupent à présent la niche<sup>266</sup>. L'arrivée de neoPC dans la MO conduit à une compétition pour l'attribution de la niche. Seule la cellule qui obtiendra le plus de signaux de survie pour accéder à la niche recevra la totalité de ces signaux de survie.

## 5. Les Treg, gardiens de l'équilibre

Depuis le début de cette introduction je n'ai pas abordé la problématique du contrôle de la réponse immunitaire, je l'ai volontairement gardée pour la fin. Cette question est primordiale. La réponse doit être suffisamment forte pour être efficace et éliminer le danger, mais dans le cas où elle est trop forte, trop longue, non spécifique ou même auto-spécifique, la réponse peut s'attaquer à l'intégrité de l'individu. Les maladies auto-immunes ou les allergies sont des exemples qui illustrent parfaitement le danger que peut représenter le système immunitaire lorsqu'il n'est pas, ou mal, contrôlé. Au cours de l'évolution, plusieurs mécanismes de contrôle ont été mis en place. Cependant, je n'aborderai ici qu'un seul de ces mécanismes, sans doute parmi les plus importants, le développement de LT CD4+ spécialisés dans la régulation de la réponse immunitaire dans son ensemble et particulièrement dans la réponse humorale, les Treg.

### 5.1 Ontogénie des Treg

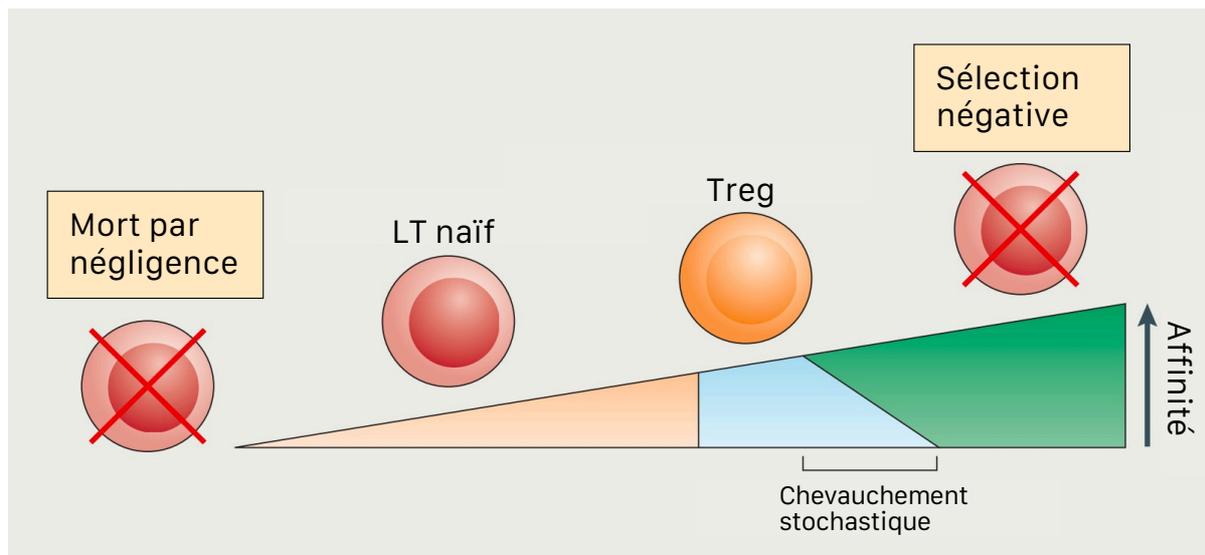
Les Treg sont généralement caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3 (*forkhead box P3*). Il existe d'autres populations de LT régulant la réponse qui n'expriment pas Foxp3, les Tr1 ou les Th3, mais cette thèse se concentre sur les Treg Foxp3+ qui forment une population hétérogène. En effet, les Treg peuvent être séparés selon leur ontogénie. Les Treg dit naturel ou thymique (tTreg) qui se développent dans le thymus, et les Treg induits en périphérie (pTreg) qui se différencient à partir de LT naïfs dans les OLI.

### 5.1.1 Les tTreg

Lors du développement des LT dans le thymus, une partie des cellules va se différencier en tTreg. Les tTreg sont enrichis en TCR auto-réactifs qui les rendent aptes à bloquer l'activation des LT auto-spécifiques qui échappent à la tolérance centrale<sup>267</sup>. Le TCR et la force du signal transduit, influencent la différenciation des tTreg. Un signal relativement fort favorise le développement des tTreg. Je dis relativement fort car comme évoqué dans la partie consacrée à la sélection des LT CD4+ dans le thymus, un signal de trop forte intensité entraîne la mort de la cellule<sup>268</sup>. En plus de la force du signal et donc de l'affinité du TCR pour le complexe CMH-2/peptide, l'origine du peptide semble aussi jouer un rôle. Un peptide présenté de manière dépendante de AIRE favorise la différenciation en tTreg<sup>269</sup>. *Malchow et al* ont montré que les souris déficientes pour le gène AIRE présentent également une diminution des tTreg<sup>270</sup>.

La forte signalisation du TCR induit une augmentation de l'expression de l'IL-2R $\alpha$ . La cellule va capter l'IL-2 environnant, ce qui va conduire à l'expression de Foxp3<sup>271</sup>. D'autres cytokines comme l'IL-15 ou le TGF $\beta$ , participent à la différenciation des tTreg.

L'expression de Foxp3 est nécessaire mais pas suffisante. C'est l'expression de Foxp3 accompagnée ou précédée de modifications épigénétiques qui verrouillent la cellule dans le lignage Treg et conduisent à la différenciation en tTreg<sup>272</sup>.



**Figure 17 : Modèle de développement des LT selon l'affinité du TCR.** Les LT incapables de reconnaître le complexe CMH-2/peptide mourront par négligence. Ceux dont les TCR ont une faible affinité deviendront des LT naïfs alors que ceux dont l'affinité des TCR est trop grande ne passeront pas la sélection négative. Seuls les LT d'une affinité intermédiaire se différencieront en tTreg. Figure adaptée de Klein et al, 2014<sup>58</sup>.

### 5.1.2 Les pTreg

Les pTreg se différencient dans les OLI à partir de LT naïfs après avoir reçu les différents types de signaux d'activation classiques des LT naïfs, particulièrement le signal TCR et le signal cytokinique.

À la différence des tTreg, le répertoire des TCR des pTreg est surtout constitué de TCR spécifiques du non-soi. Il est toutefois différent de celui des autres sous-populations de LT effecteurs. Le TCR semble alors intervenir dans la différenciation des pTreg<sup>273</sup>. Lorsque le TCR présente une forte affinité pour un complexe CMH-2/peptide, mais que le peptide est présenté en petite quantité, alors le LT activé peut se différencier en pTreg. Si le peptide est présenté en grande quantité, cela va activer différentes voies de signalisation, notamment celles impliquant NFκB, qui vont conduire à la

production d'IFN $\gamma$  ou de TNF $\alpha$ , et ainsi bloquer la différenciation en pTreg<sup>274,275</sup>.

Le rôle tenu par les cytokines IL-2 et TGF $\beta$ , est au moins double. D'abord, elles bloquent la différenciation en Th17 pour l'IL-2 et en Th1 ou Th2 pour le TGF $\beta$ , mais elles promeuvent l'expression de Foxp3 par des voies de signalisation impliquant STAT5 ou Smad2/3 (*Suppressor of Mothers against Decapentaplegic 2 or 3*), respectivement<sup>276</sup>. Ces cytokines conduisent aussi l'expression de facteurs de survie qui contrebalancent les signaux pro-apoptotiques liés à l'expression de Foxp3.

## 5.2 Les LT folliculaires régulateurs (Tfr)

Une autre population de Treg Foxp3+ a été décrite plus récemment, elle se localise dans le follicule B et est spécialisée dans le contrôle des CG. Ce sont les LT folliculaires régulateurs (Tfr). Les Tfr ont un phénotype hybride avec des caractéristiques à la fois de Tfh, ils expriment CXCR5 et Bcl6 notamment, et de Treg avec l'expression de Foxp3 ou d'autres molécules impliquées dans les fonctions suppressives des Treg comme CTLA4 (*Cytotoxique-T-Lymphocyte- Antigen 4 protein*)<sup>277,278</sup>. Il a été suggéré que les Tfr se différenciaient uniquement à partir de tTreg mais *Aloulou et al* ont montré dans un modèle murin d'immunisation, que les Tfr peuvent être spécifiques de l'Ag immunisant (qu'il soit un Ag du soi ou du non-soi) et qu'ils peuvent être générés à partir de pTreg<sup>279</sup>. L'étude de leur répertoire de TCR montre qu'il s'agit d'une population oligoclonale. Ce répertoire ressemble davantage à celui des pTreg qu'à celui des Tfh<sup>280</sup>.

Comme pour les Tfh, la différenciation des Tfr se déroule en plusieurs étapes et est dépendante du facteur de transcription Bcl6.

La première étape correspond à la présentation de l'Ag par la DC dans la zone T de l'OLII. Comme pour les Tfh, cette étape conduit à l'expression de CXCR5 de manière indépendante de Bcl6. Cette expression de CXCR5 ne dépendant pas d'Ascl2, comme c'est le cas pour les Tfh, mais de NAFT2 (*nuclear factor of activated T cells 2*)<sup>139,281</sup>.

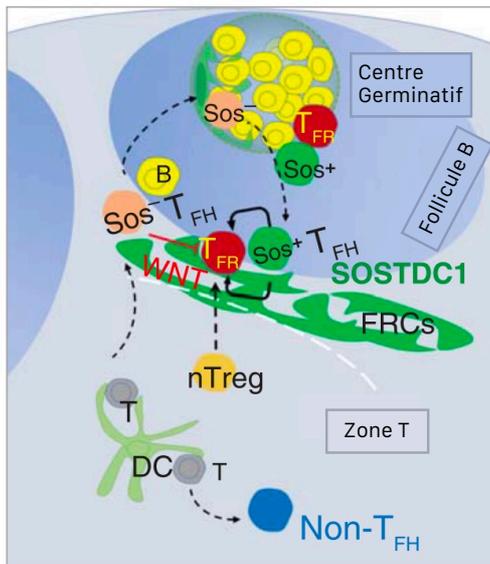
La seconde étape est la rencontre avec un LB activé, elle permet l'expression de Bcl6, donc la finalisation de la différenciation des Tfr et leur entrée dans le CG. L'interaction avec un LB est primordiale puisque les souris déficientes pour la protéine SAP (qui facilite les interactions entre le LT et le LB) présentent une forte réduction du nombre de Tfr<sup>277</sup>. En plus du signal TCR, les signaux de costimulation comme CD28 et ICOS vont favoriser la différenciation des Tfr alors que les signaux de co-inhibition comme PD1 et CTLA4, pourtant essentiels aux fonctions des Tfr, vont limiter leur développement<sup>277,282,283</sup>.

La voie de signalisation de l'IL-2 via l'IL-2R joue elle aussi un rôle important. Deux sous-populations de Tfr peuvent être identifiées selon leur expression de l'IL-2R $\alpha$ . Une population IL-2R $\alpha$ + qui se localise en dehors du CG et une population IL-2R $\alpha$ - dans le CG<sup>284</sup>. L'IL-2 bloque la différenciation terminale des Tfr (comme des Tfh) en induisant l'expression de Blimp1 qui bloque celle de Bcl6<sup>285</sup>. Blimp1 est un facteur de transcription exprimé dans les Tfr. La balance entre Bcl6 et Blimp1 permet ou non la différenciation des Tfr, leur migration dans le CG et la mise en place des fonctions des Tfr<sup>286</sup>.

Les voies impliquant STAT3 participent également à la différenciation des Tfr. Que ce soit via l'activation de TRAF3 (*TNF receptor associated factor 3*) ou de la voie de mTOR, la phosphorylation de STAT3 induit l'expression de Bcl6 et favorise la différenciation des Tfr<sup>287-289</sup>.

L'IL-21 est connue pour favoriser la différenciation des Tfh mais de manière intéressante, il semblerait qu'elle inhibe celle des Tfr. Elle est responsable de l'augmentation de Bcl6 qui réprime l'expression de l'IL-2R $\alpha$  et donc la prolifération des Tfr IL-2R $\alpha$ <sup>+</sup><sup>290</sup>. Des résultats obtenus lors de cocultures de Tfh, LB et Tfr vont également dans ce sens. L'IL-21 produite par les Tfh réduit la prolifération des Tfr<sup>291</sup>.

Ces résultats suggèrent que les Tfh exercent une régulation négative sur les Tfr. Il a toutefois été récemment décrit une population de Tfh exprimant SOSTDC1 (*sclerotin domain-containing protein 1*) qui n'apporte pas d'aide au LB mais faciliterait la différenciation des Tfr<sup>292</sup>. SOSTDC1 est une molécule sécrétée, qui a la capacité de bloquer l'axe WNT- $\beta$ -caténine, connu pour inhiber la différenciation des Treg<sup>293</sup>.



**Figure 18 : Les Tfh SOSTDC1+ favorisent la différenciation des Tfr.** Les Tfh SOSTDC1+ n'apportent pas d'aide au LB dans la formation des CG, contrairement aux SOSTDC1-. Ils se localisent au niveau de la frontière T-B et favorisent le développement de Tfr en bloquant la voie WNT. Figure adaptée de Wu et al, 2020<sup>276</sup>.

## 5.3 Fonctions des Treg

Les Treg ont d'abord été définis comme des cellules suppressives de la réponse immunitaire. Ils n'auraient qu'un rôle de régulateurs négatifs. Cette définition des fonctions des Treg est maintenant obsolète car d'autres fonctions qui favorisent la réponse immunitaire et particulièrement la qualité de cette réponse ont été définies. En plus d'une régulation négative, ils exercent aussi une régulation positive. Dans un premier temps, je vais m'intéresser aux fonctions classiques de suppression de la réponse immunitaire. Puis dans un second temps, je m'attarderai sur les fonctions moins classiques de promotion ou de façonnage de la réponse immunitaire.

### 5.3.1 Fonctions « classiques » suppressives

Le rôle principal, ou qui apparaît comme tel, des Treg est de limiter l'amplitude de la réponse immunitaire. Cette fonction est liée à la mise en place des mécanismes suppressifs.

#### 5.3.1.1 Des Treg

Ces mécanismes sont de plusieurs natures, je vais ici en évoquer quelques-uns parmi les plus importants.

Le premier consiste en la production de cytokines inhibitrices ou anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF $\beta$  bien connus, ou l'IL34 et l'IL35 qui ont été décrites plus récemment<sup>294,295</sup>.

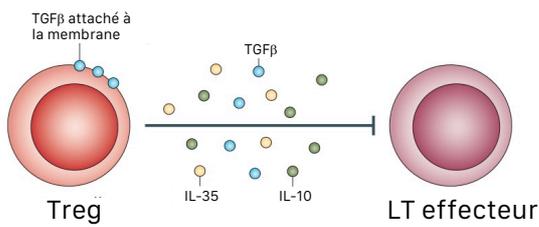
Les Treg possèdent la machinerie classique de la cytolyse : perforines et granzymes. La cytolyse est alors une des armes utilisées par le Treg pour éliminer les cellules à inhiber<sup>296</sup>. Dans ce cas, la fonction suppressive porte bien son nom.

L'expression de CTLA4 est un autre de ces mécanismes. Comme CD28, il se lie à CD80 ou CD86 avec une affinité seize fois supérieure. Cela entraîne une compétition entre les LT effecteurs porteurs de CD28 et les Treg qui expriment CTLA4, pour les signaux de costimulation fournis par l'interaction entre CD28 et CD80/86<sup>297</sup>. Cela impacte alors la fonction des CPA. De plus, la liaison de CTLA4 à CD80/86 entraîne la production d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) par la DC. Cette enzyme inhibe les LT effecteurs en catabolisant le tryptophane, essentiel aux LT, en métabolites pro-apoptotiques<sup>298</sup>. Cette liaison induit aussi la trans-endocytose des CTLA4-CD80/86 par le Treg et donc limite le nombre de molécules de costimulation à la surface de la DC<sup>299</sup>.

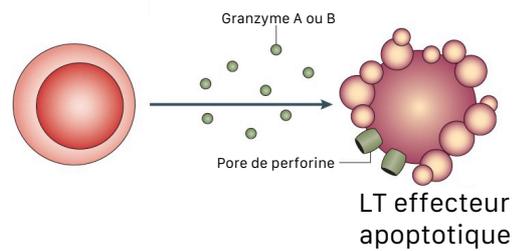
De la même manière, le Treg peut capturer le CMH-2 de la DC via des interactions le TCR et le complexe CMH-2/peptide. Non seulement la DC présente moins de molécules de costimulation, mais également moins de complexes CMH-2/peptide. La fonction CPA de ces cellules est alors fortement impactée<sup>300</sup>.

Enfin, le Treg va perturber le métabolisme de ses cellules cibles, et ce, par plusieurs moyens. D'abord, la forte expression de l'IL-2R $\alpha$  lui permet de capter l'IL-2 de l'environnement et donc de rendre la cytokine inaccessible aux autres LT. Les privant ainsi des signaux de survie et de prolifération apportés par cette cytokine<sup>301</sup>. Les Treg produisent aussi les ecto-enzymes CD39 et CD73, qui métabolisent l'ATP (adénosine triphosphate) en ADP (adénosine diphosphate) puis en adénosine. En plus de priver les LT effecteurs d'ATP, l'adénosine peut directement les inhiber<sup>302,303</sup>.

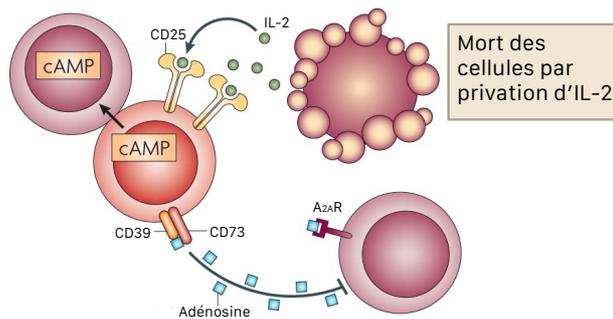
### a. Cytokines inhibitrices



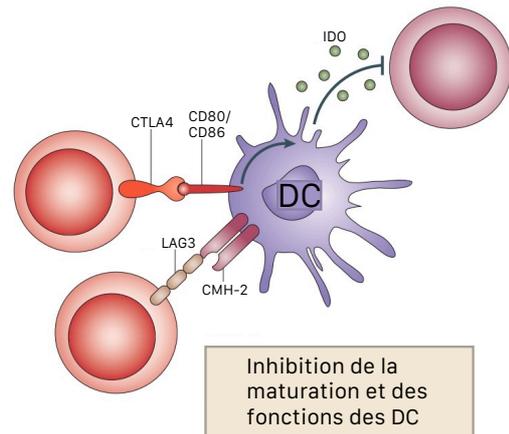
### b. Cytolyse



### c. Perturbation métabolique



### d. Inhibition des DC



**Figure 19 : Les fonctions suppressives des Treg.** Les Treg disposent de plusieurs outils pour exercer leur rôle de régulateur négatif de la réponse immunitaire et principalement de l'activation des LT. Ils produisent des cytokines inhibitrices comme l'IL-10 et l'IL-35 (a.). Les Treg peuvent conduire à la cytolyse des cellules cibles par la sécrétion de perforine et de granzymes A et B (b.). Ils induisent aussi la perturbation du métabolisme des cellules cibles en les privant d'IL-2 par la capture de cette cytokine grâce à la forte expression de CD25 ( $IL-2R\alpha$ ), ou en métabolisant l'ATP en adénosine via CD39 et CD73. L'adénosine inhibe les LT effecteurs (c.). Enfin, les Treg inhibent la maturation et les fonctions des DC. Cela passe par un blocage de l'activité CPA de la DC en empêchant les signaux provenant de CD80/CD86 ou du CMH-2 d'être transduit à cause la fixation de CTLA4 et LAG3 respectivement. En plus du blocage du signal en prenant la place de CD28, l'interaction de CTLA4 avec CD80 /CD86 induit la production de IDO par la DC, ce qui inhibe les LT effecteurs (d.). Figure adaptée de Vignali et al, 2008<sup>304</sup>.

### 5.3.1.2 Des Tfr

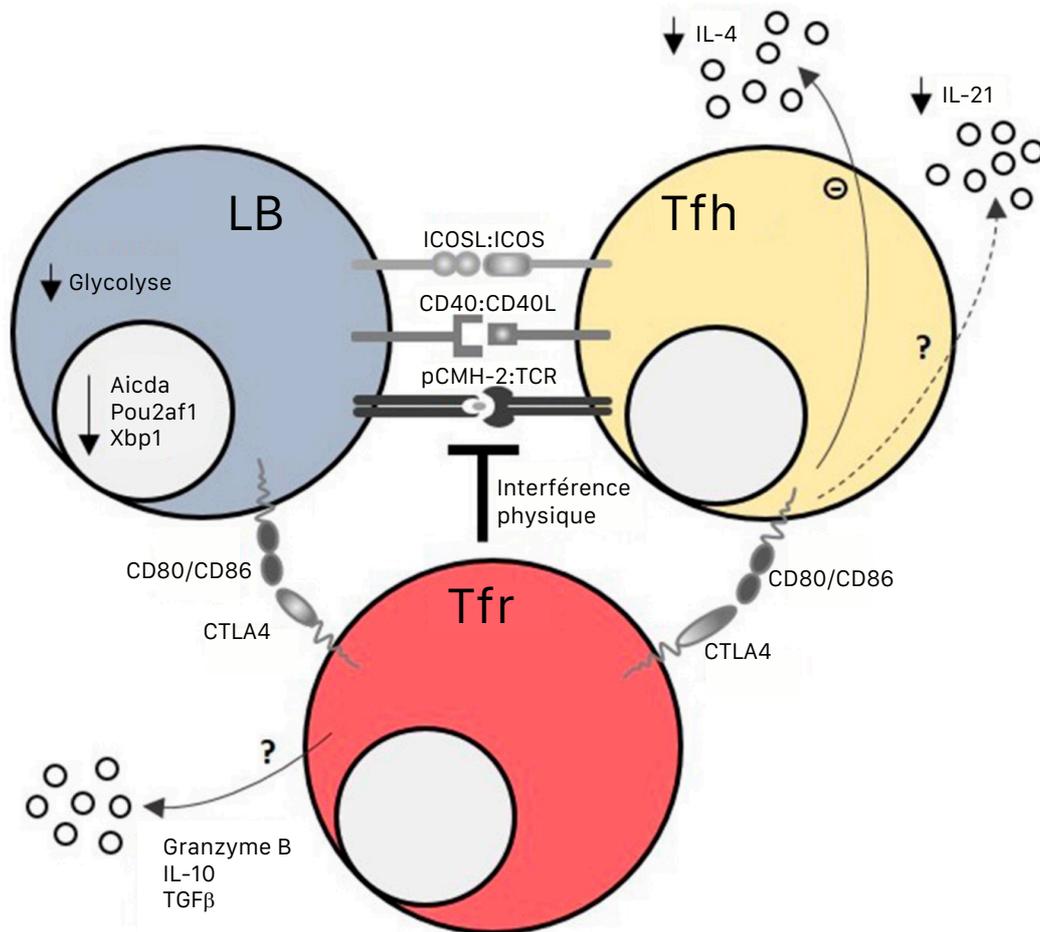
Les fonctions suppressives des Tfr permettent de limiter la taille et l'amplitude des CG mais également les CSR et SHM.

Des cocultures *in vitro* de LB et Tfh en présence ou en absence de Tfr montrent que les Tfr diminuent la prolifération et les fonctions des Tfh. Cela se traduit par une diminution de l'expression de Ki67 et une réduction de leur expression de cytokines pro-inflammatoires<sup>216,291</sup>. Cela entraîne également une diminution de la prolifération des LB et des changements épigénétiques et métaboliques qui conduisent à une diminution de l'expression de Pou2af1 (important pour la formation des CG), de Xbp1 (dont j'ai déjà évoqué le rôle dans la production d'Ac) et de Aicda (le gène de l'enzyme AID essentielle aux CSR). Comme les LB, les Tfh en présence ou en absence de Tfr, ne perdent pas leur signature transcriptionnelle et leur potentiel d'activation, mais ils n'expriment pas de molécules effectrices. Les modifications apportées par les Tfr sont préservées par les LB mais elles sont néanmoins réversibles. En effet, l'IL-21 ajouté dans la coculture *in vitro* permet d'inhiber les Tfr, d'augmenter le métabolisme des LB ainsi que de restaurer des CSR et une production d'Ac<sup>291</sup>.

Il a été montré que les agonistes du récepteur à l'adénosine A2a inhibent les CG et les Tfh. L'adénosine pourrait alors être un mécanisme suppressif mis en place par les Tfr comme décrit pour les Treg<sup>305</sup>.

Un autre élément commun aux fonctions suppressives des Treg et des Tfr est l'expression de CTLA4. Je ne détaillerai pas à nouveau par quels mécanismes agit CTLA4, mais CTLA4 fait partie des molécules suppressives les plus importantes des Tfr, ou au moins des mieux connues. Les Tfr déficients pour CTLA4 présentent des capacités suppressives des CSR ou de la prolifération des LB et Tfh largement réduites par rapport aux Tfr sauvages *in vivo*<sup>283</sup>.

D'autres mécanismes de régulation négative sont probablement utilisés par les Tfr, je citerai la production de cytokines anti-inflammatoires, l'expression de CD40L ou encore de granzyme B, mais cela reste encore à confirmer<sup>306</sup>.



**Figure 20 : Fonctions suppressives des Tfr.** Les Tfr régulent les interactions entre les LB et les Tfh de plusieurs manières. D'abord en interférant physiquement dans la synapse immunologique, cela empêche le LB et le Tfh d'interagir, mais également via son expression de CTLA4. Cette molécule se fixe sur les molécules CD80 ou CD86 et de fait, bloque les signaux de costimulation. Cette interaction entre le CTLA4 et le CD80/CD86 à la surface du LB induit chez ce dernier, un changement dans le métabolisme (diminution de la glycolyse) mais également une diminution de l'expression de gènes importants pour la maturation des LB dans le CG (Aicda, Pou2af1 et Xbp1). Le Tfr réduit aussi la production de cytokines effectrices par les Tfh (IL-4 et IL-21). Enfin il est possible que la sécrétion de granzyme B, d'IL-10 ou de TGFβ participe aux fonctions suppressives des Tfr. Figure adaptée de Stebbeg et al, 2018<sup>3</sup>.

### 5.3.2 Fonctions « moins classiques »

Il est maintenant largement admis que les Treg sont plus que de simples régulateurs négatifs. Ils optimisent la réponse de manière quantitative et qualitative.

#### 5.3.2.1 À l'initiation de la réponse

Les Treg impactent la différenciation des Tfh, mais de manière plutôt inattendue, ils l'impactent positivement. En utilisant le modèle DERE (Foxp3-DTR), une lignée de souris exprimant le récepteur à la toxine diphtérique (DTR) sous contrôle du promoteur Foxp3, il est possible de dépléter les Treg de façon transitoire par injection de toxine diphtérique (DTX). Dans ce modèle, il a été montré que l'absence de Treg lors des 10 premiers jours après infection par *Influenza*, conduit à une diminution du nombre et de la fréquence de Tfh dans le CG. Le mécanisme qui mène à ce résultat est la capacité des Treg à capturer l'IL-2 environnante. Cela a un impact négatif sur la survie et la prolifération des LT effecteurs, mais comme je l'ai évoqué dans la partie consacrée au développement des Tfh, l'IL-2 bloque la différenciation Tfh. C'est donc par ce mécanisme que les Treg favorisent la différenciation des Tfh<sup>307</sup>.

#### 5.3.2.2 Dans le CG

Les Tfr sont des régulateurs du CG, mais comme les Treg, ils n'ont pas seulement un rôle suppressif sur la réponse humorale. En exerçant leurs fonctions suppressives et créant une compétition pour les interactions avec le LB, ils vont permettre de sélectionner les LB de forte affinité pour l'Ag. Seul un signal de très forte intensité fourni par les Tfh permet de passer outre la suppression des Tfr<sup>308</sup>. *Laidlaw et al* ont montré que les Tfr promeuvent les CG en produisant de l'IL-10, une cytokine généralement considérée comme inhibitrice<sup>309</sup>.

### 5.3.2.3 Pendant la phase mémoire

Enfin, les Treg vont participer à la promotion de la mémoire immunitaire. Ils sont aussi capables de se nicher dans la MO et d'interagir avec les PC. La relation entre ces cellules est ambiguë, puisqu'elle permet à la fois le maintien des PC dans la MO, et la diminution de l'expansion et l'activité des PC. D'un côté, l'absence de Treg dans un modèle Foxp3-DTR conduit à une diminution du nombre de PC dans la MO, cela souligne l'importance des Treg dans le maintien des PC dans leur niche. D'un autre côté, ces Treg ont un phénotype régulateur plus intense. Ils expriment plusieurs de leurs molécules effectrices, notamment CTLA4 qui a pour effet de limiter le nombre de PC dans la MO. Lorsque les Treg de la MO sont déficients pour CTLA4, il est observé une augmentation de la fréquence de PC dans la MO<sup>310</sup>.



# OBJECTIFS



Je ne pense pas que ce soit nécessaire de rappeler ici les enjeux liés à la vaccination et surtout la vaccination efficace, donc protectrice. Il semble cependant peu probable de produire des vaccins efficaces sans une compréhension de la réponse immunitaire et plus précisément de la réponse vaccinale. C'est là l'importance de la recherche fondamentale dans ce domaine. C'est dans ce contexte que se situe cette thèse.

Pour qu'un vaccin soit efficace, il doit induire une réponse Ac forte et spécifique, et cette réponse doit apporter une protection durable sur le long terme. Ces deux conditions organisent mes travaux de thèse en deux axes.

Le premier se penche sur l'initiation de la réponse Ac et sur le rôle que jouent les Treg et les DC dans la différenciation des LT naïfs en Tfh, lymphocytes essentiels à la génération de PC sécréteurs d'Ac de haute-affinité pour l'Ag et de cellules B mémoires. Les DC et, principalement les cDC2 sont considérées comme les CPA permettant le développement initial des Tfh. Les Treg favorisent la différenciation terminale des Tfh en privant le pré-Tfh d'IL-2. L'impact des Treg sur les toutes premières étapes de la différenciation des Tfh reste jusque-là inconnu. Dans ce contexte, mes travaux ont cherché à comprendre les mécanismes par lesquels les Treg vont agir sur les cDC2 et potentialiser leur capacité à induire la différenciation de LT naïfs en Tfh.

Le second axe de cette thèse se focalise sur la mémoire immunitaire et les cellules qui se nichent dans la MO. Les principales cellules qui peuplent la MO pendant la phase mémoire de la réponse sont les PC, qui une fois dans leur niche, survivent sur le long terme et sécrètent des Ac de haute-affinité de manière constitutive. Cela garantit un titre relativement stable d'Ac dans le sang, conférant ainsi une première ligne de défense rapide et efficace en cas de nouvelle rencontre avec l'Ag. D'autres types cellulaires, notamment des Treg, sont présents dans la MO. Ces Treg régulent finement les PC en favorisant leur maintien dans la niche, mais en inhibant leur prolifération.

Au sein de mon équipe, nous avons mis en évidence la présence d'un autre type cellulaire dans la MO, des lymphocytes T CD4+ CXCR5+ mémoires (mTfh). Mes travaux s'intéressent au rôle de ces cellules dans cette niche. Ces cellules ont un phénotype particulier qui indique qu'elles pourraient contribuer au maintien de la niche plasmocytaire en dialoguant avec les Treg et avec les PC.

# RÉSULTATS



## **Les Treg promeuvent la capacité des DC à induire la différenciation des Tfh**

Le premier axe de mes travaux de thèse porte sur le rôle des Treg dans la régulation des réponses humorales, et plus précisément la différenciation des cellules Tfh. *León et al* ont étudié le rôle des Treg dans la différenciation des Tfh lors d'une infection virale. Ils ont utilisé un modèle d'injection de DTX dans des souris Foxp3-DTR de manière à obtenir une déplétion des Treg au moins 12 jours après l'infection des souris. Cela leur a permis de démontrer qu'en capturant l'IL-2, les Treg promeuvent les Tfh et la réponse humorale<sup>307</sup>. Dans ce modèle, les Tfr sont également absents tout au long du développement des Tfh, on ne peut alors pas exclure que leur absence participe au phénotype observé.

En se focalisant sur les Tfh 10 à 12 jours après l'infection et la déplétion des Treg, ils ont étudié le rôle des Treg dans la promotion des Tfh, pendant la phase effectrice de la réponse, et non pas au stade précoce, au moment de l'initiation du lignage Tfh. C'est précisément sur ce point que portent mes travaux.

En utilisant le modèle expérimental de souris Foxp3-DTR, nous avons réalisé une déplétion transitoire des Treg seulement les premiers jours après l'immunisation des souris grâce à un traitement avec de la DTX aux J-1 et J0 de l'immunisation. Dans ce modèle, les Tfr fonctionnels se développent normalement, dès le J5 post-immunisation. Ainsi, nous pouvons étudier le rôle des Treg dans cette fenêtre temporelle qui correspond à l'initiation de la différenciation des Tfh. Cette déplétion transitoire des Treg induit une moins bonne réponse humorale (qualitativement et quantitativement), qui est corrélée à la diminution de la fréquence et du nombre de Tfh et de pré-Tfh spécifiques à l'Ag immunisant en l'absence de Treg. Les mêmes résultats

sont observés lorsque les LT naïfs transférés sont déficients pour Bcl6. L'absence de Treg altère la différenciation des Tfh de façon indépendante de Bcl6, dès le stade pré-Tfh, avant l'expression de Bcl6.

Des analyses par cytométrie en flux des PBMC de sujets vaccinés contre le SARS-CoV2 et les tests d'ELISA effectués sur le sérum de ces mêmes sujets montrent une corrélation positive entre la fréquence de Treg et le titre d'Ac spécifiques de la protéine Spike. De la même manière, l'analyse d'amygdales humaines révèle une corrélation positive entre la fréquence de Treg et celle de pré-Tfh (CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>faible</sup>). Ces résultats suggèrent un rôle des Treg dès la différenciation des pré-Tfh, c'est-à-dire lors de l'initiation du lignage Tfh au moment de l'interaction de la DC avec le LT.

Afin de tester la capacité des DC à promouvoir *in vivo* la différenciation des LT naïfs en Tfh, nous avons transféré dans des souris receveuses dépourvues de LT CD4<sup>+</sup>, à la fois des LT CD4<sup>+</sup> naïfs porteurs d'un TCR transgénique spécifique de l'Ag immunisant, et des DC activées en présence ou en absence de Treg. Nous avons démontré que, bien que les DC issues de souris déplétées en Treg présentent la même capacité à activer les cellules T CD4 naïves, elles présentent néanmoins une moindre capacité à induire la différenciation en Tfh. La déplétion des Treg a donc un impact sur le développement précoce des Tfh, en agissant sur les DC.

Afin de comprendre la nature de cet impact, nous avons comparé le transcriptome des DC issues de souris Foxp3-DTR et sauvages traitées à la DTX. Nous avons d'abord observé une augmentation de l'expression du gène *Ccr7* dans les cDC2 en absence de Treg. Ce résultat a été confirmé au niveau protéique par cytométrie en flux. De plus, cette différence d'expression de *Ccr7* modifierait le positionnement des cDC2 dans les OLII drainants. En effet, des analyses en microscopie confocale, sur coupes de ganglions lymphatiques drainant le site d'immunisation de souris Foxp3-DTR ou sauvages traitées à la DTX, montrent qu'en absence de Treg, les cDC2 se

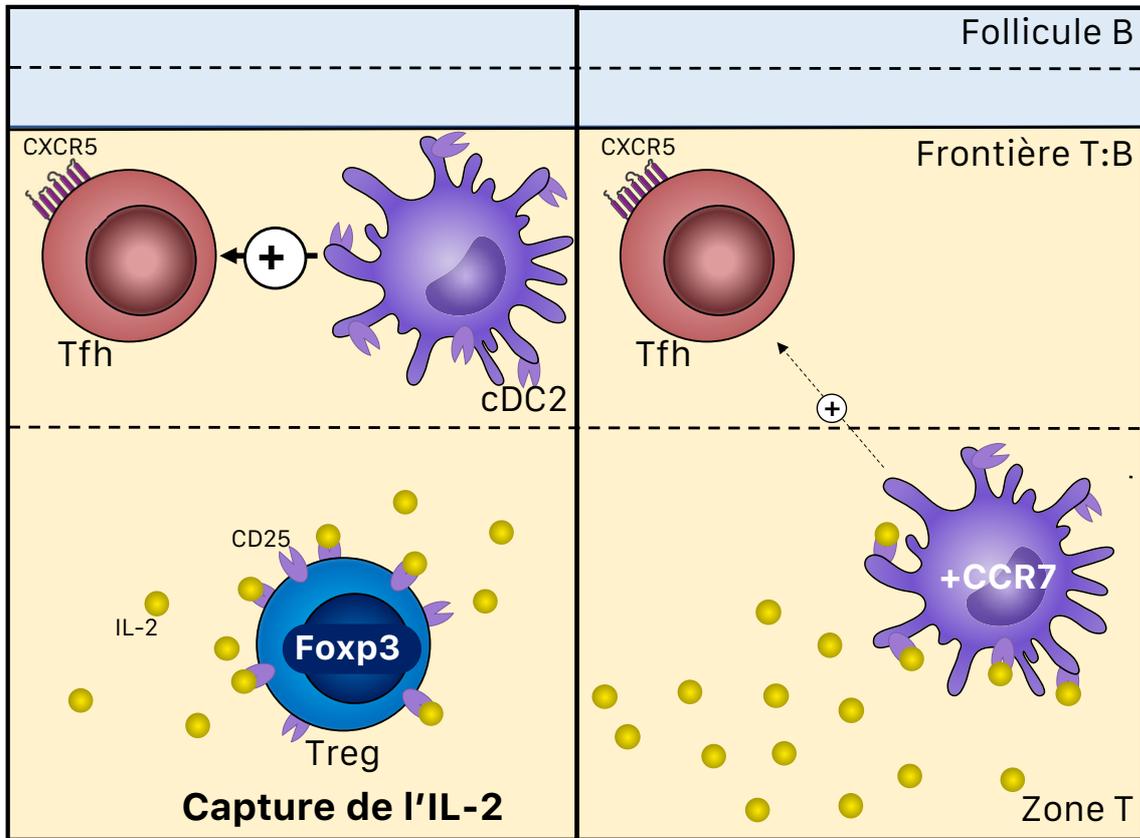
localisent plus loin de la frontière T-B qu'en présence de Treg. Or, *Krishnaswamy et al* ont montré que les cDC2 à la frontière T-B induisent efficacement la différenciation des Tfh<sup>132</sup>.

L'analyse des données transcriptomiques par le logiciel IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) prédit que la voie de signalisation de l'IL-2 serait exacerbée dans les cDC2 en absence de Treg et pourrait être responsable de l'augmentation de l'expression de *Ccr7*. Nous avons ensuite démontré que les cDC2 expriment les IL-2R $\alpha$  et  $\gamma$  mais pas l'IL-2R $\beta$ . Ces cellules expriment une version de l'IL-2R à faible affinité, et non pas la version à haute affinité, composée des trois chaînes IL-2R $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Néanmoins, une stimulation *in vitro* des cDC2 avec de l'IL-2 induit la phosphorylation de STAT5 dans ces cellules en cytométrie en flux et en cytométrie en image. Cela prouve qu'un signal peut être transduit dans les cDC2 après la fixation de l'IL-2 sur son récepteur.

La stimulation *in vitro* par l'IL-2 de DC isolées de souris sauvages récapitule les résultats observés en absence de Treg. À savoir, une capacité équivalente à activer les LT CD4<sup>+</sup> naïfs mais une efficacité moindre à induire la différenciation en Tfh, dans le modèle de transfert adoptif évoqué plus haut.

Ensemble, ces résultats permettent de proposer le modèle suivant :

Les Treg en capturant l'IL-2 environnant privent les cDC2 de la signalisation via l'IL-2R qui cause une diminution de l'expression de CCR7 à leur surface. Les cDC2 peuvent alors migrer à la frontière T-B et induire efficacement la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en Tfh.



**Figure 21 : Résumé graphique.** Les Treg capturent l'IL-2 environnant grâce à une forte expression de CD25 (IL-2R $\alpha$ ). Or, la signalisation de l'IL-2 dans la cDC2 conduit à l'augmentation de l'expression de CCR7, ce qui cantonne la cDC2 dans la zone T. En privant les cDC2 d'IL-2, les Treg leur permettent de migrer à la frontière T-B et donc d'induire efficacement la différenciation des Tfh.

# Regulatory T cells promote T follicular helper cell commitment by promoting spatial dendritic cell polarizing capacities

M. Aloulou<sup>1\*\*</sup>, J. Novarino<sup>1\*</sup>, C. Pérals<sup>1</sup>, R. Houmadi<sup>1</sup>, V. Duplan-Eche<sup>1</sup>, F. Martinez<sup>1</sup>, C. Bories<sup>1</sup>, C. Cotineau<sup>1</sup>, R. Jean<sup>2</sup>, P. Amé<sup>2</sup>, S. Guyonnet<sup>3</sup>, Y. Rolland<sup>3</sup>, B. Vellas<sup>3</sup>, N. Gaudenzio<sup>1</sup>, N. Fazilleau<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires (Infinity), CNRS U5051, INSERM U1291, University Toulouse III, Toulouse, France

<sup>2</sup>UMR INSERM S1236, LabEx IGO, Univ Rennes, EFS, Rennes, France; CHU Rennes, SITI Laboratory, Pôle Biologie, Rennes, France.

<sup>3</sup>Cerpop Inserm UMR 1295, Toulouse, France; University of Toulouse III, Toulouse, France; Gérontopôle, Department of Geriatrics, CHU Toulouse, Toulouse, France

\* These authors have contributed equally to this work

†Corresponding Authors: Meryem Aloulou (meryem.aloulou@inserm.fr) and Nicolas Fazilleau (nicolas.fazilleau@inserm.fr)

Keywords: regulatory T cells, follicular helper T cells, priming, dendritic cells

Abbreviations: Antigen (Ag), Germinal centre (GC), B cell receptor (BCR), Dendritic cells (DC), T follicular helper cells (Tfh), T follicular regulatory cells (Tfr), Regulatory T cells (Treg).

## Abstract

Foxp3<sup>+</sup> T cells, broadly known as regulatory T cells (Treg), orchestrate and maintain tolerance to self and foreign antigens. As such, Treg control ongoing immune responses by restraining the magnitude of activated T cells but also B cell immunity in ways that are still not all understood. The T follicular helper (Tfh) are the cognate regulators of B cells, and play an essential role in the generation of high-affinity antibodies and memory B cells in germinal centres (GC). We found that Treg promote Tfh precursor formation in Human and mice. Transient Treg depletion at the time of antigen priming repressed the Tfh cell differentiation and correlated with a defective GC reaction and a decrease of antigen-specific high-affinity antibodies in mice. We further demonstrated that Treg, through IL-2 consumption, controlled the positioning of dendritic cells, promoting Tfh cell commitment to the T-B border of the secondary lymphoid organs where Tfh cell priming is initiated. Ultimately, this study opens new perspectives for manipulating and enhancing high-affinity antibody production *in vivo*.

## Introduction

Vaccination is an effective public health initiative with demonstrated utility in the prevention of infectious diseases. Protein vaccination generates a strong immune response to a specific administered antigen (Ag), providing long-term protection against infection. CD4<sup>+</sup> follicular helper T (Tfh) cells constitute a subset of effector T cells that participate in the generation of high-affinity antibody (Ab) responses. Tfh cells express the chemokine receptor CXCR5, which allows them to migrate into the B follicle in response to CXCL13. Tfh cells also express high levels of ICOS, PD-1 and bear T cell receptor (TCR) with high-affinity for the immunizing Ag<sup>1</sup>. Germinal centers (GC) are highly organized structures in which B cells undergo maturation. GC formation and maturation are controlled by several signals provided by Tfh cells, allowing generation of memory B cells and long-lived plasma cells (PC)<sup>2</sup>. Therefore, efficient B cell responses depend strongly on Tfh cell differentiation.

After immunization with T-dependent Ag, CD4<sup>+</sup> naïve T cells commit into distinct effector T helper (Th) cell subsets such as Th1, Th2, Th17 and Tfh. Priming of each effector T cell subset requires specific activating signals provided by matured Dendritic cells (DC). These cells comprise different subsets on the basis of their phenotype and function. DC can be subdivided into three main groups: conventional DC (cDC), plasmacytoid DC (pDC) and monocyte-derived DC (moDC). A further division of cDC can be made based on their ontogeny: batf3-dependent type 1 cDC1 and irf4-dependent type 2 cDC2<sup>3</sup>. Interestingly, some DC subsets are more prone to induce Tfh cell development, such as cDC2 and moDC, which were shown to be more effective than cDC1<sup>4,5</sup>. Different positive signals provided by matured DC are required in this process, abundant peptide-MHC complexes (pMHCII), OX40L and ICOSL co-stimulatory signals and IL-6 and IL-21 polarizing cytokines<sup>2</sup>. Furthermore, spatial localization of matured DC in the draining lymph nodes (LN) is also essential since an ideal positioning of cDC2 at the T-B border promotes Tfh cell formation<sup>4,6,7</sup>. Notably, the spatial localization of DC, similar to that of Th cells, is regulated by the

expression of CCR7 and CXCR5, which both allow sensing of CXCL13, CCL19 and CCL21 gradients<sup>4, 6, 8</sup>.

Tfh cell fate starts early during DC/T cell engagement<sup>9</sup>. First, following T cell priming, the Tfh cell program is initiated through the transcription factor achaete-scute homologue 2 (Ascl2), which promotes CXCR5 expression. Subsequent cognate interactions of pre-committed Tfh cells (pre-Tfh) with B cells provide expression of Bcl6, which terminally completes the Tfh cell program<sup>10</sup>. In contrast, Tfh cell differentiation is negatively regulated by the transcription factors Blimp-1<sup>11,12</sup> and STAT5<sup>13,14,15</sup>, both repressing Bcl6 expression. Interestingly, Foxp3 regulatory T cells (Treg), the main regulator of the immune system, have distinct impacts on Tfh cell differentiation, depending on the stage of the ongoing immune response. Early on after T cell priming, Treg allow Tfh cell differentiation by limiting IL-2 availability, which prevents STAT5 signaling through the IL-2-receptor (CD25) on pre-Tfh cells, thus allowing in turn Bcl6 expression<sup>15,16</sup>. Later on, within the GC, specific Treg called follicular regulatory T (Tfr) cells, suppress Tfh cell function<sup>17</sup>. However, how Treg at priming modulate the polarizing capacity of DC towards the Tfh cell program has never been addressed. Here, we found that transient depletion of Treg at priming in mice decreased the quality of the affinity maturation processes that occur in GC. This phenomenon correlated with lower Tfh cell differentiation. Interestingly, the frequency of Treg correlated positively with the magnitude of vaccine response in Human blood and with pre-Tfh cells in tonsils. We further demonstrated that Treg promoted Tfh cell commitment early at a stage that precedes Bcl6 expression in primed T cells in mice. This phenomenon resulted from an increase in the capacities of DC to favor Tfh cell commitment in presence of the Treg at priming through an appropriate positioning of DC in draining LN. Interestingly, enhancement of Tfh cell commitment was reversed when DC were subjected to high-dose of IL-2 *in vitro* and *in vivo*. Overall, this study reveals that Treg through IL-2 consumption modulate the capacities of DC at priming, which in turn allows the emergence of Tfh cells, a finding that may, ultimately, have significant impact for vaccine design.

## Results

### Treg at priming are critical for induction of high-affinity B cell response

To investigate the contribution of Treg on B cell responses during priming, we took advantage of DEREK mice, in which the gene encoding GFP and the human diphtheria toxin (DTx) receptor are under the control of the Foxp3 promoter, allowing specific transient depletion of Foxp3<sup>+</sup> cells after DTx injection<sup>18</sup>. Mice were subcutaneously (sc) immunized and treated with DTx one day before and on the day of immunization. This DTx regimen induced complete Foxp3<sup>+</sup> cell depletion in draining LN from DEREK mice during the first 48 hours after immunization while it had no effect in wild-type (WT) littermates (Supplementary Fig. 1a). The Foxp3<sup>+</sup> compartment started to be reconstituted at day 3 post-immunization in DEREK mice, and from day 5, the number of total Foxp3<sup>+</sup> cells and of CXCR5<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> cells, mainly Tfr cells, became similar to the ones observed in littermates (Supplementary Fig. 1a). This model therefore allows for a specific and transient depletion of Treg during priming while the number of Tfr cells is maintained intact.

To determine whether this transient depletion had any impacts on the Ag-specific B cell response, we immunized mice with the hapten 4-hydroxy-3-nitrophenyl (NP)-conjugated to ovalbumin (OVA) in Sigma Adjuvant System (SAS). 40 days after immunization, the frequency and number of total (NP<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>, **Fig. 1a**) and memory (CD38<sup>+</sup>, **Fig. 1b**) NP-specific B cells were reduced in draining LN from DEREK mice. Further, we found that NP-specific memory B cells from DEREK mice had a lower binding to NP as measured by NP gMFI (**Fig. 1b**). Moreover, the levels of high-affinity NP-specific IgG, IgG2b and IgG1 day 40 after immunization were decreased in DEREK mice (**Fig. 1c**).

To test whether the reduction in the extent and affinity of Ag-specific memory B cell response was a consequence of Treg absence during priming rather than the modulation of Tfr cell properties, we tested Tfr cell function from both experimental conditions using an *in vitro* suppression assay in which Tfr cells were co-cultured with Tfh and B cells, and the suppression of B cell responses by Tfr cells was monitored<sup>19</sup>. Naïve B cells (CD19<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup>) were sorted from unimmunized mice, while Tfh cells (CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> GFP/Foxp3<sup>-</sup>) and Tfr cells (CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> GFP/Foxp3<sup>+</sup>)

were sorted from draining LN from DEREg mice 17 days after immunization with NP-OVA. Then, B and Tfh cells were co-cultured in presence or absence of Tfr cells, along with NP-OVA, the immunizing Ag. We found that Tfr cells either from mice treated with saline or DTx displayed the same suppressive capacity (Supplementary Fig. 1b). These data suggest that transient depletion of Foxp3<sup>+</sup> cells at priming had no impact on Tfr cell function and that Treg absence at priming lowered the extent and affinity of the B cell response.

Finally, in order to test whether what we observed in mice can be translated to Human, we monitored the response of healthy subjects to SARS-CoV-2 vaccine. We found that the frequency of circulating Treg (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup>) in the blood before vaccination correlated positively with the quantity of Spike-specific IgG at day 90 post-vaccination (**Fig. 2a**). Overall, we demonstrated that Treg presence and abundance at priming are required for the induction of a high-affinity B cell response in mice and Human.

### **Treg at priming promote Tfh cell formation**

As Tfh cells are essential to drive high-affinity B cell responses, we investigated how Treg at priming influence their development. In vaccinated subjects, we found that the frequency of circulating Treg before vaccination correlated with circulating Tfh cells (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> CXCR5<sup>+</sup>) 40 days after the first vaccine shot (**Fig. 2a**). Moreover, when looking in secondary lymphoid organs of healthy subjects, we found that the frequency of tonsil Treg (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup>) correlated positively with pre-Tfh cells (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>int</sup>) (**Fig. 2b**).

In mice, we evaluated Tfh cell response following sc immunization by the 1W1K peptide variant (EAWGALANKAVDKA) of E $\alpha$ 1, the I-E alpha chain immunodominant peptide (ASFEAQGALANIAVDKA) conjugated to OVA in SAS. 1W1K-I-Ab tetramer staining provided direct access to 1W1K-specific Th cells in draining LN from immunized DTx-treated DEREg and WT littermates. We found that transient depletion of Treg at priming repressed the Tfh cell lineage at the early stage of an ongoing immune response. This is shown by the large decrease of pre-Tfh (CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>lo</sup>) and GC-Tfh (CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>) among the 1W1K-specific Th cells at day 5 post-

immunization (Supplementary Fig. 2), suggesting that Treg may promote Tfh cell formation at early stage. However, the number of 1W1K-specific Th cell was largely increased in DERE mice (Supplementary Fig. 2b), due to the uncontrolled expansion of total T cells in the absence of Treg at priming. In order to erase this phenomenon, we adoptively transferred large number of naïve TCR transgenic (tg) Th cells specific for E $\alpha$ 1 into DERE and WT littermates, followed by DTx injection and immunization with E $\alpha$ 1-OVA in SAS. At day 5 post-immunization, DERE and WT littermates displayed similar number of activated tg T cells in draining LN (**Fig. 3a**). Moreover, transient depletion of Treg at priming reduced the frequency and number of Tfh cells (CXCR5<sup>+</sup>), while it increased Th1 cells (t-bet<sup>+</sup>) (**Fig 3b**). Notably, CXCR5<sup>+</sup> tg T cells from both DERE and WT littermates expressed similar levels of bona-fide markers of Tfh cells such as Bcl6 and PD-1, but higher levels than t-bet<sup>+</sup> tg T cells (**Fig. 3c**). Interestingly, increase of Tfh cell differentiation in presence of Treg at priming was not peculiar to E $\alpha$ 1-specific 1H3.1 tg T cells but was also observed using OVA-specific OT-II tg T cells after OVA immunization (Supplementary Fig. 3a, b). In conclusion, Treg at priming support naïve T cells to commit to the Tfh cell program.

### **Treg promote Tfh cell commitment in Bcl6-independent mechanism**

Tfh and Th1 lineages are known to be interconnected through antagonistic interplay between the transcription factors t-bet and Bcl6<sup>20, 21, 22</sup>. Moreover, Treg are known to suppress Th1 cell differentiation<sup>23, 24</sup>. Thus, decrease of Tfh cells in the absence of Treg at priming could either result from the lack of an active process on activated T cells or from the promotion of Th1 cells over their interconnected Tfh cells. In order to test that, we assessed how Treg at priming impact Tfh cell differentiation in the absence of Th1 cells. To do so, we generated t-bet<sup>-/-</sup> 1H3.1 tg mice and analyzed the ability of these cells to differentiate into Tfh cells. We found that, likewise to WT 1H3.1 tg T cells, more t-bet<sup>-/-</sup> 1H3.1 tg T cells expressed CXCR5 in the presence of Treg at priming, a phenotype that correlated with intracellular expression of the bona-fide Tfh cell marker Bcl6 (Supplementary Figure 3c, d, e). Thus, our results demonstrate that Treg at priming positively regulate Tfh cell differentiation, irrespective of t-bet expression.

Although Bcl6 potentiates Tfh cell generation *in vivo*, recent data demonstrated that the transcription factor Ascl2 initiates CXCR5 expression at early stage of Tfh cell development in a Bcl6-independent manner<sup>10</sup>. In this context, we evaluated whether Treg at priming promote Tfh cell differentiation before the appearance of Bcl6 expression. To do so, we generated Bcl6<sup>-/-</sup> 1H3.1 tg mice that we adoptively transferred into DEREK or WT littermates before E $\alpha$ 1-OVA immunization. Interestingly, we observed CXCR5 expression at the surface of Bcl6<sup>-/-</sup> tg T cells in both experimental settings (**Fig. 3d**). Further, transient depletion of Treg after DTx injection in DEREK mice decreased the frequency and number of CXCR5<sup>+</sup> tg T cells (**Fig. 3e**) while it increased the frequency and number of t-bet<sup>+</sup> tg T cells (**Fig. 3f**). CXCR5<sup>+</sup> Bcl6<sup>-/-</sup> tg T cells displayed higher level of Ascl2 compared to t-bet<sup>+</sup> T cells (**Fig. 3g**). Thus, Treg at priming promote early Tfh cell engagement through Bcl6-independent mechanism.

#### **Treg at priming enhance the capacities of DCs to promote Tfh cell commitment**

To better understand how Treg at priming promote Tfh cell commitment, due to their essential role in T cell priming, we studied mature DC within the draining LN of WT and DEREK littermates 24 hours after immunization and DTx injection. We found that the number of total DC (F4/80<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup>) was similar in WT and DEREK littermates but that the frequency and number of I-Ab<sup>hi</sup> CD11c<sup>+</sup> DC were increased in presence of Treg at priming in WT mice (**Fig. 4a**). Moreover, the absence of Treg had no significant changes on I-Ab, CD80 and CD86 expression at the surface of I-Ab<sup>hi</sup> CD11c<sup>+</sup> DC cells (**Fig. 4b**), nor on the proportion of the different DC subsets (Supplementary Figure 4a and **Fig 4c**). To better evaluate how Treg modulate at priming the polarizing capacities of DC, we used an experimental approach that allowed us to synchronize Ag presentation by DC and to evaluate the DC/T cell interactions in a similar inflammatory context. To do so, DC were sorted from draining LN of DTx-treated WT and DEREK littermates twenty-four hours after immunization and were loaded with a similar large amount of the immunodominant peptide of OVA. Then, these cells were injected in each footpad of T-cell deficient recipients to allow the *in vivo* priming of transferred naïve OT-II tg T cells (**Fig. 4d**). Five days after, OT-II T cells in draining popliteal LN were similarly activated by both types of DC as demonstrated by CD44 expression and

the number of collected cells (**Fig. 4e**). In contrast, DC arising from WT littermates induced many more CXCR5<sup>+</sup> OT-II tg T cells than DC from DEREK mice ( $16.02 \pm 1.6\%$  versus  $8.30 \pm 0.7\%$ , **Fig. 4e**). CXCR5<sup>+</sup> tg OT-II T cells expressed high levels of Bcl6 and PD-1, suggesting that they were bona-fide Tfh cells (**Fig. 4e**). Overall, this series of experiments demonstrated that the presence of Treg at priming intrinsically impacts the polarizing capacities of DC towards Tfh cell commitment.

### **cDC2 localize at the T-B border in presence of Treg**

One could hypothesize that the effect of Treg on Tfh cell commitment through DC could result from the emergence of specific DC subsets known to promote Tfh cell differentiation and/or from modulating pro-Tfh cell signals provided by DC. To assess the cellular and molecular composition of DC at priming in presence or absence of Treg, we performed single cell RNA sequencing (scRNA-seq) on sorted I-Ab<sup>hi</sup> CD11c<sup>+</sup> DCs from draining LN 24 hours after immunization and DTx treatment of WT and DEREK littermates. FACS isolated CD11c<sup>+</sup>I-Ab<sup>hi</sup> DCs were analyzed using the 10x Genomics single-cell 3' followed by Illumina HiSeq 3000 sequencing. 4393 DC from WT mice and 4013 DC from DEREK mice were analyzed and distributed in four different cell clusters (Supplementary Figure 4b). Clusters C1 and C2 were the predominant clusters, with C1 equally represented in both experimental conditions, and C2 more important in DC from WT mice (Supplementary Figure 4c). C3 and C4 clusters were less prominent in both WT and DEREK mice (Supplementary Figure 4c). We found that C1 showed higher expression levels of genes associated with monocyte origin (CCL17, Mcemp1 and CD11b) suggesting that these cells were moDC. C2 had increased expression of genes consistent with cDC2 (Sirp $\alpha$ , CD11b), C3 comprised cDC1 as indicated by the expression of CD24 and CD8 $\alpha$ , and C4 carried common genes from both cDC1 and cDC2 (Supplementary Figure 4d). Since cDC2 are known to promote Tfh cell formation<sup>4</sup>, we compared the highly variable genes expressed by DC from WT and DEREK mice belonging to C2. Interestingly, genes with higher expression in DEREK mice comprised markers of DC positioning in LN (*Ccr7*)<sup>4, 8</sup> and of the type-II interferon signaling (*Cxcl9*, *Cxcl10*)<sup>25</sup> (**Fig. 5a**). Notably, *Cxcr5* transcript level, was similar in DC from WT and DEREK mice, even though was at low scribed

level (**Fig. 5a**). To confirm what observed by scRNA-seq, we used a conventional flow cytometry approach and found that cDC2 from WT mice expressed to higher levels surface proteins that lead to DC positioning (CXCR5/CCR7 ratio, **Fig 5b**)<sup>4, 8</sup>. Finally, we used a multiparameter confocal microscopy to simultaneously visualize B cells and DC within the draining LN twenty-four hours after immunization of DTx-treated WT and DEREK mice (**Fig. 5c**). We defined the B follicles by IgD staining and the T-B border by the ended of the B follicles. We observed that cDC2 in presence of Treg in WT mice localized closer to the T-B border than cDC2 in absence of Treg in DEREK mice (**Fig. 5c**). Overall, we found that Treg at priming promote the Tfh cell polarizing capacities of cDC2 by modulating molecule expression important for their localization.

### **IL-2 prevents Tfh cell development by limiting DC pro-Tfh signals**

Using Ingenuity Pathways Analysis, increased CCR7 expression at the surface of cDC2 in absence of Treg in DEREK mice was predicted to result from IL-2 signaling in these cells (Supplementary Figure 5a). Moreover, when comparing the IL-2 signaling pathway in cells of C2, we found a significative increase of this pathway in cells in absence of Treg (**Fig. 6a**). We thus inspected the expression levels of IL-2 subunits at the transcript level in the cells from C2. We found that *Il2ra* and *Il2rg* were expressed to a similar level in DTx-treated WT and DEREK mice (**Fig. 6b**). In contrast, no *Il2rb* transcripts were found (**Fig. 6b**). At the protein level, we found an increase level of CD25 and CD132 at the surface of cDC2 in absence of Treg (**Fig. 6b**). Thus, cDC2 are equipped to sense IL-2 and IL-2 signaling is observed in these cells in absence of Treg. Notably, when looking at the expression level of CD25 at the surface of tonsil cDC2, we found that this expression inversely correlated with pre-Tfh frequency in tonsils (Supplementary Figure 5b), suggesting that IL-2 signaling in cDC2 impacts DC capacities to promote the Tfh lineage. We thus analyzed the DC phenotype and function in the presence of a high IL-2 environment. To do so, we injected WT mice with either 15,000 units (U) of recombinant IL-2 or phosphate-buffered saline (PBS) one day before and the day of immunization. 24 hours after immunization, the frequency and number of CD11c<sup>+</sup> DCs in draining LN were similar in the two experimental conditions (Supplementary Figure 6a). Notably, DC from IL-2-treated

mice expressed higher level of CCR7 and the CXCR5/CCR7 ratio was decreased (Supplementary Figure 6b). Moreover, DC from IL-2-treated mice expressed higher level of CD25 like DC from mice in absence of Treg (Supplementary Figure 6c). Next, we tested whether IL-2 impacts DC Tfh cell polarizing capacity. To do so, we transferred sorted I-Ab<sup>hi</sup> DC from draining LN of PBS and IL-2-treated mice into T cell-deficient recipients in which naïve 1H3.1 tg T cells were previously transferred (Supplementary Figure 6d). Five days after, we found that both types of DC similarly activated transferred tg T cells. In contrast, DC from IL-2-treated mice were less efficient to promote Tfh cell development (CXCR5<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup>) while, they increased Th1 cells (t-bet<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup>) (Supplementary Figure 6e). In this experimental condition, IL-2 effect on DC could be indirect. We thus treated DC with a high-dose of IL-2 *in vitro*. We first assessed whether IL-2 was sensed by DC and signaled in DC. To do so, we monitored the phosphorylation of STAT5 in treated cells using flow cytometry and flow imaging. We found that DC treated with IL-2 had a higher frequency of pSTAT5 than non-treated DC (**Fig. 7a**) and that pSTAT5 was nuclear (**Fig. 7b**). Moreover, treated DC were used to prime T cells *in vivo* as described above. We found that PBS-treated or IL-2 treated DC similarly activated transferred 1H3.1 tg T cells 5 days post-transfer. In contrast, IL-2-treated DC were less efficient to promote Tfh cell development (**Fig. 7c**). Overall, these results indicate that the high-IL-2 environment acts intrinsically on DC and modifies their Tfh cell polarizing capacities.

## Discussion

In this study, we have collected evidence that presence of Treg at priming promotes the development of Tfh cells and, in turn, allows the generation of high-affinity B cell responses. More precisely, we found that transient Treg depletion at the time of antigen priming represses the Tfh cell differentiation and correlates with a decrease of antigen-specific high-affinity memory B cells and antibodies in mice. Interestingly, we found that the frequency of Treg before vaccination positively correlates with tonsil pre-Tfh frequency and with the circulating vaccine response in human. Furthermore, we demonstrated that Treg promotes Tfh cell commitment early at a stage that precedes Bcl6 expression in activated T cells. We comprehensively demonstrated that this phenomenon occurs through IL-2 consumption by Treg. Indeed, in absence of Treg at priming, IL-2 signaling in cDC2 leads to higher expression of CCR7 at their surface and ultimately modifies their positioning in the secondary lymphoid organs. In presence of Treg at priming, IL-2 signaling in cDC2 is absent and these cells localize at the T-B border where Tfh cell priming is initiated. Interestingly, when DC are subject to high-dose of IL-2 in vitro and in vivo, they decrease their priming capacities towards Tfh cell commitment. Overall, this study reveals that, through IL-2 consumption, Treg modulate the capacities of DC at priming, which in turn allows the emergence of Tfh cells, a finding that may, ultimately, have high impact for vaccine design.

It is not the first time that it has been demonstrated that Treg promote Tfh-dependent B cell responses, and that the IL-2/CD25 axis regulates Tfh cell fate intrinsically in T cells has been well investigated<sup>9, 26</sup>. Two studies suggested that a common mechanism for CD25<sup>+</sup> DC<sup>27</sup> and Treg<sup>16</sup> based on IL-2-quenching favors a free-IL2 area that would be suitable for Tfh cell development intrinsically in primed T cells. In one of these studies, transient depletion of Treg in mice was used in the context of viral infection. Leon et al have shown that absence of Treg leads to the decrease of GC B cells specific to viral proteins, which correlates with the decrease of Tfh cells specific for viral proteins<sup>16</sup>. The authors further showed that Treg capture and consume the surrounding IL-2, thus protecting the Tfh cells from the inhibitory effect of this cytokine on their differentiation program. To be able to highlight this new function

of Treg, the authors relied on a model of inducible depletion of Treg. For this study, they carried out DTx injections at different times after the infection so as to obtain a depletion of Treg 10 to 12 days after the infection, that is to say at the time when they analyzed the impact on Tfh and B cells. Additionally, at this time of analysis, the Tfr, cells expressing Foxp3 and controlling the GC reactions, can be depleted in addition to the classical Treg. Consequently, this model makes it possible to evaluate the functions of Foxp3+ cells on the development and/or maintenance of Tfh in a global way until the GC, but not to evaluate the role of Treg at priming of naïve T cells. In this context, we have adapted this mouse model to obtain a transient depletion only in the early phase of the response when the mice are immunized. With DTx injections on days -1 and 0 of immunization, we observed Treg depletion only on the first three days post-immunization. In this way, the Tfr cells are not impacted. Indeed, we compared the kinetics and functionality of Tfr cells from DTx-treated WT or DEREGL littermates and observed no difference in the number of these cells or in their functionality in vitro.

Moreover, it was demonstrated that CD25 expression at the surface of DC could serve to present IL-2 in trans to T cells<sup>28</sup>. Still, how IL-2 could impact DC function and their capacity to promote Tfh cells was not investigated yet. Here, we found that DC express CD25 and CD122 but not CD132. Even though DC are not equipped with the high-affinity receptor for IL-2 composed of the three subunits CD25, CD122 and CD132, we have been able to show that DC are sensible to IL-2, which induces phosphorylation and nuclear translocation of STAT5. Interestingly, we also found that the more CD25 is expressed at the surface of cDC2, the less pre-Tfh cells are present in tonsils. Thus, Treg by consuming the surrounding IL-2 allows its effect to be intrinsically felt in primed T cells but also in the DC that prime the naïve T cells towards the pre-Tfh program.

Unlike terminal differentiation of GC-Tfh cells, the differentiation of naïve T cells into pre-Tfh cells does not depend on the transcription factor Bcl6. The expression of CXCR5 during pre-Tfh differentiation is essential for the latter to localize at the T/B border. This expression of CXCR5 is first mediated by Ascl2<sup>10</sup>. It is then supported and amplified by Bcl6 during the differentiation of pre-Tfh into GC-Tfh cells, allowing the cells to migrate inside the B follicle. When we transferred Bcl6-deficient CD4<sup>+</sup> T

cells into Treg-depleted recipient mice, the decrease in the frequency of CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> T cells in the transferred cells was still observed. The results were comparable whether the cells were Bcl6 competent or deficient. Thus, Treg can act upstream of the expression of Bcl6 by promoting the differentiation of the pre-Tfh cells.

One other question raised by our studies concerns the fact that transient absence of Treg at priming is accompanied with a decrease of I-Ab<sup>high</sup> mature DC in draining LN twenty-four hours after immunization. Among these cells, we found that the representation of the different DC subsets is similar in presence or absence of Treg. It has been described that differentiation into Tfh cells is favored when naïve T cells express a high-affinity TCR for the peptide/MHCII complex<sup>1, 29</sup>. We found that the absence of Treg has no impact on T cell activation but a decrease of Tfh cell differentiation. By inducing a decrease in DC in the draining LN in the absence of Treg, the activation of Tfh cells could have been favored since these cells express a TCR more likely to interact with DC, especially in a competitive context. However, we observed that the surface expression of MHCII and co-stimulatory molecules (CD80, CD86) by DC is comparable in the two experimental conditions. Moreover, in absence of Treg, DC express more CCR7 at their surface and localize further to the T-B border. On the other hand, this quantitative impact is accompanied by a qualitative impact. To circumvent the bias related to the number of DC and assess the ability of DC to promote pre-Tfh cell differentiation, we used a transfer model in mice lacking T cells, DC from mice with or without Treg and naïve CD4<sup>+</sup> T cells bearing a transgenic TCR. In this model, DC have comparable capacities to activate naïve transgenic T cells. In contrast, transferred transgenic T cells further differentiate into Tfh cells when DC are from mice in the presence of Treg. These data suggest that Treg promote the intrinsic ability of DC to induce Tfh cell differentiation.

The positioning of cDC2 at the T/B border is essential for efficient differentiation of Tfh cells<sup>30</sup>. By exploring the phenotype of cDC2 by flow cytometry and transcriptomic approaches, we revealed an overexpression of CCR7 at the surface of these cells in the absence of Treg. This has the consequence of lowering the CXCR5/CCR7 ratio which dictates the positioning of these cells in the draining LN. The greater this ratio, the closer cDC2 is to follicle B (or in follicle B), the weaker it is, the

further cDC2 is from follicle B and confined to the T zone. In the absence of Treg, the cDC2 expressing more CCR7 on their surface would move away from the T/B border. We further tested this hypothesis by confocal microscopy analysis of draining LN from immunized mice in the presence or absence of Treg, which showed that Treg modulate the localization of cDC2 by limiting the expression of CCR7.

IL-2 consumption is certainly not the only mechanism by which Treg modulate cDC2 functions. In addition to IL-2 signaling, our transcriptomic analysis highlights other signaling pathways positively or negatively impacted by the absence of Treg. In the absence of Treg, the IL-10 signaling pathway genes in cDC2 are less expressed. Treg are major producers of IL-10, so it seems consistent that signaling linked to this cytokine is reduced in cDC2 in the absence of Treg. Moreover, this cytokine is generally described as a regulatory or inhibitory cytokine but it is now accepted that its role is more ambiguous. In the context of viral infection, the production of IL-10 by Tfr increases the amplitude of the GC, thus promoting the humoral response and not inhibiting it<sup>31</sup>. IL-10 signaling in cDC2 could then also have a beneficial effect on the antibody response, but it remains to be explored.

In summary, our results clearly indicate that by absorbing IL-2, Treg deprive cDC2 of signaling via CD25, which promotes their ability to induce Tfh differentiation and, ultimately, a protective high-affinity B cell response. Hence, it is tempting to speculate that modulating IL-2 signaling in DC would then make it possible to increase the differentiation of Tfh cells and therefore the intensity and quality of the antibody response. Amplifying an immune response following vaccination and inducing the differentiation of Tfh cells could be interesting. In this context, it would be necessary to block the signaling of IL-2 in the DC in the early times after the vaccine injection. Blocking the IL-2 signal in general with an injection of anti-IL-2R antibodies would have harmful consequences on the immune response as a whole since IL-2 contributes to the activation of most T cells. It would then be necessary to block the signal specifically in the DC. Several tools could be used, such as bispecific antibodies. One can then imagine the injection of one of these tools at the same time as the vaccine emulsion to promote the differentiation of Tfh cells and, consequently, a more effective antibody response.

## Figure legends

### **Figure 1: Treg during priming promote induction of high affinity memory B cell response in mice.**

Forty days after sc immunization with NP-OVA, draining LN of DEREg and WT littermates treated with DTx at day -1 and day 0 were analyzed for the detection of NP-specific B cells. Representative flow plots of B cells (**a**) and memory B cells (CD38<sup>+</sup>GL-7<sup>+</sup>) among NP-specific B cells (**b**)(mean±SEM). Numbers and gMFI of NP in total NP-specific B cell (**a**, n≥11) and NP-specific memory B cells (**b**, n≥11). (**c**) Levels of immunoglobulins specific for NP7 in the sera (n≥13). Each dot represents an individual mouse, horizontal lines denote the mean value. Data are representative of three independent experiments. \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

### **Figure 2: Treg frequency correlates positively with vaccine response and with tonsil pre-Tfh frequency in Human.**

(**a**) Healthy donors received 2 doses of COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 at day 0 and day 40 post-prime. Blood samples were collected at day 0, day 40 before the second vaccine shot and at day 90. Representative flow cytometry plots of Treg (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>) and Tfh (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup>) cells (mean±SEM, n=11) and linear regression curves of frequencies of Treg at day 0 with serum anti-Spike IgG levels at day 90 and blood Tfh at day 40. (**b**) Representative flow cytometry plots of tonsil Treg (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>) and pre-Tfh cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>int</sup>)(mean±SEM, n=20) and linear regression curve of frequencies of Treg and pre-Tfh.

### **Figure 3: Treg promote Tfh lineage**

(**a**) Representative flow cytometry plots of transferred 1H3.1 CD4<sup>+</sup> T cells into DEREg and WT littermates followed by DTx treatment and immunization and analyzed 5 days later (left, mean±SEM, n=6). Frequency and number of 1H3.1 CD45.1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (right) (**b**) Frequency and number of CXCR5<sup>+</sup>, t-bet<sup>+</sup> and CXCR5<sup>+</sup>t-bet<sup>+</sup> among CD45.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells. (**c**) gMFI of Bcl6 in CXCR5<sup>+</sup>, t-bet<sup>+</sup> and CXCR5<sup>+</sup>t-bet<sup>+</sup> CD45.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells. (**d**) Representative flow plots of transferred Bcl6<sup>-/-</sup> 1H3.1 CD4<sup>+</sup>

T cells into DEREK and WT littermates followed by DTx treatment and immunization and analyzed 5 days later (left, mean $\pm$ SEM, n=7). Frequency and number of Bcl6<sup>-/-</sup> 1H3.1 CD45.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells (right). Frequency and number of CXCR5<sup>+</sup> (e), t-bet<sup>+</sup> (f) and gMFI of Ascl2 in CXCR5<sup>+</sup> or t-bet<sup>+/+</sup> among Bcl6<sup>-/-</sup> 1H3.1 CD45.1<sup>+</sup> T cells (g). Each dot represents an individual mouse. Data are representative of three independent experiments. \*P<0.05; \*\*P<0.01

**Figure 4: Capacities of DC to promote Tfh formation are increased in presence of Treg**

(a) Representative flow plots of DCs from draining LNs twenty-four hours after sc immunization of DTx-treated DEREK and WT littermates. Graphs of number of total DC and frequency and number of I-Ab<sup>+</sup> among CD11c<sup>+</sup> DCs. (b) gMFI of I-Ab, CD80 and CD86 on I-Ab<sup>hi</sup> CD11c<sup>+</sup> cells. (c) Repartition of DC subsets among CD11c<sup>+</sup> DCs. (d) Experimental outline. (e) Representative flow plots of follicular T cells (CXCR5<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) among transferred OT-II T cells in popliteal LN 5 days after footpad injection of DC in Zap70<sup>-/-</sup> mice. Number and frequency of total OT-II T cells, of CXCR5<sup>+</sup> among OT-II T cells and gMFI of Bcl6 and PD-1 among CXCR5<sup>+</sup> and CXCR5<sup>-</sup> OT-II T cells. Data are representative of three independent experiments. ns, non-significant; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01

**Figure 5: cDC2 localize to the T-B border of draining LN in presence of Treg.**

(a) Average expression of normalized data for representative genes *Ccr7*, *Cxcr5*, *Cxcl9*, *Cxcl10* in cluster C2 from DTx-treated WT and DEREK littermates. (b) gMFI of CCR7 and CXCR5 at the surface of cDC2 (CD11c<sup>+</sup> I-Ab<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD64<sup>-</sup>) from draining LN 24 hours after immunization of DTx-treated WT and DEREK littermates. Data are representative of three independent experiments. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; (c) Immunofluorescence images indicating B follicles (purple) and cDC2 (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>, green) from draining LN 24 hours after immunization of DTx-treated WT and DEREK littermates. Quantification of distance of cDC2 to the T-B border.

**Figure 6: cDC2 are more sensible to IL-2 in absence of Treg.**

(a) t-SNE plot by single cell signature explorer of C2 with single signature analysis of IL-2 signature. (b) Expression of transcripts of IL2R subunits in C2. (c) Protein expression levels of CD25, CD122 and CD132 at the surface of cDC2 (CD11c<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD64<sup>-</sup> I-Ab<sup>+</sup>) from draining LN twenty-four hours after sc immunization of DTx-treated DEREK and WT littermates.

**Figure 7: IL-2 signals in cDC2 and inhibits their capacities to promote Tfh cells**

Sorted DC from WT mice were treated *in vitro* with IL-2 (200U/ml). Phosphorylation of STAT5 in cDC2 was assessed by flow cytometry (a) and flow imaging (b). (c) Flow cytometry dot plots showing CXCR5<sup>+</sup> 1H3.1 T cells in popliteal LN 5 days after footpad injection of treated DC in Zap70<sup>-/-</sup> mice. Number of 1H3.1 T cells and frequency of CXCR5<sup>+</sup> 1H3.1 T cells. Data shown are representative of 3 independent experiments. \*\*P < 0.01.

## Methods

### Human samples

The Inspire-T human cohort protocol was approved by the Rennes (France) Ethical Committee (CPP Ouest V) and has been registered on the site <http://clinicaltrials.gov> (Identifier: NCT04224038). 11 subjects of this cohort who had not have COVID-19 were vaccinated with COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 from whom blood samples were collected just before vaccination, day 40 post-vaccination just before a second vaccine shot and on day 90 post-prime. PBMC and serum were prepared as previously described<sup>32</sup>. Pediatric tonsil samples were obtained from children who underwent adenotonsillectomy. Samples were collected after all participants gave informed consent. The study was registered at the French Ministry of Higher Education and Research (DC-2019-3778). All experiments were performed in agreement with the guidelines of the Declaration of Helsinki.

### Mice

C57BL/6 mice were purchased from Envigo (Ganat, France). CD45.1 mice were obtained from O. Joffre, DREG from T Sparwasser, Bcl6<sup>-/-</sup> from T Okada, T-bet<sup>-/-</sup> from A. Dejean, OT-II from S. Guerder and Zap70<sup>-/-</sup> from N. Taylor. C57BL/6 1H3.1 TCR transgenic mice were obtained from EMMA (European Mouse Mutant Archive). All intercrosses to generate additional strains, such as generate OT-II CD45.1+, 1H3.1 CD45.1+, Bcl6<sup>-/-</sup> 1H3.1 CD45.1+, and tbet<sup>-/-</sup> 1H3.1 CD45.1+ were generated at UMS006 on a C57BL/6 background. All mice were bred in UMS006 and only females of 8-12 weeks of age were used for experimental procedures. Mouse experimental protocols were approved by the French 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche' (ethical review N° MP/19/58/06/12).

### Immunization

Sigma Adjuvant System (SAS) and OVA was from Sigma-Aldrich, E $\alpha$ 1-OVA (ASFEAQGALANIAVDKA-OVA), 1W1K-OVA (EAWGALANKAVDKA-OVA), E $\alpha$ 1 (ASFEAQGALANIAVDKA) and OVA323-339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) from

Genecust and NP17-OVA from Biosearch Technologies. Mice were immunized sc at the base of tail with 100µl each side with 40µg of peptide in adjuvant.

Immunization of transgenic naive T cells by DC in vivo was performed as followed. Naive CD4 T cell isolations from LN has been performed using a bead-based negative selection (Dynabeads™ Untouched™ Mouse CD4 Cells Kit, Invitrogen). 40µg/ml of an anti-CD25 Ab (PC61.5.3, BioXcell) was added to the kit to remove activated T cells. 10<sup>6</sup> were iv transferred into ZAP70ko mice recipient. In parallel, draining LN of WT or DEREK immunized mice (24 hours after immunization) were immediately mashed using cell strainers and digest in DNase (40µg/ml)-Liberase (200µg/ml) buffer during 30 min at 37°C. DC isolation has been performed using a positive selection with CD11c MicroBeads UltraPure (Miltenyi). DC were loaded with peptide (10µM) and WT DC were stimulated in vitro with 200U/ml of rIL-2 (Peprotech) or without for 4 hours at 37°C. 10<sup>5</sup> loaded DC were transferred in the footpad of ZAP70ko mice.

### **In vivo treatment**

WT and DEREK mice received an intraperitoneal injection of 50 µg/kg of DTx (Sigma) on days -1 and 0 of the immunization. For IL-2 treatment, mice were intraperitoneally administered 15,000 U of mouse recombinant IL-2 (Peprotech) on days -1 and 0 of the immunization. Control mice received injections of PBS.

### **In vitro culture**

In *vitro* suppression assays were performed as described previously<sup>19</sup>. Briefly, DEREK mice treated with saline or DTx were immunized with NP-OVA and 17 days later the draining LN were harvested. Tfh cells (CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> GFP/Foxp3<sup>-</sup>) and Tfr cells (CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> GFP/Foxp3<sup>+</sup>) from immunized mice and naïve B cells (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>) from unimmunized mice were purified by cell sorting. B and Tfh cells were cultured alone or with Tfr cells. 5×10<sup>4</sup> B cells, 2×10<sup>4</sup> Tfh cells and 1×10<sup>4</sup> Tfr cells were plated in 96-well plates along with 20ug/ml of NP-OVA. Cultures were harvested after 6 days later. For analysis, GC B cells were gated as CD19<sup>+</sup>I-Ab<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgG<sup>+</sup>GL-7<sup>+</sup> cells

## **ELISA**

NP-specific IgG (Southern Biotechnology Associates) were detected in plasma from blood by ELISA using the hapten NP conjugated to the protein carrier bovine serum albumin (BSA) for which the conjugation ratio was estimated to detect high-affinity IgG. ELISA plates (Thermo scientific) were coated with 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  NP7-BSA (Biosearch Technologies Inc).

Serum spike-specific IgG levels were evaluated using Human SARS-CoV-2 Spike (Trimer) IgG ELISA Kit as described by the manufacturer (Invitrogen).

## **Flow cytometry analysis and cell sorting**

Mouse cell suspensions were prepared in PBS/2% FCS, 5mM EDTA. The following mAbs were used: anti-B220 (RA3-6B2, BV785, BD), anti-CD132 (TUGm2, PE, Biolegend), anti-CD11b (M1/70, PE, eBioscience), anti-T-bet (04-46, V450, BD), anti-CD44 (IM7, APC-eFluor780, Biolegend), anti-ICOS (HK5.3, PE, eBioscience), anti-Bcl6 (K112-91, Alexa fluor 488, BD), anti-PD-1 (J43, PE-Cy7, eBioscience), anti-CD4 (RM4-5, PerCP-eFluor710, Invitrogen), anti-CXCR5 (REA215, APC, Miltenyi Biotec), anti-CD11c (HL3, FITC, BD), anti-I-Ab (AF6.120.1, PerCP-eFluor710, Invitrogen), anti-CD64 (X54-5/7.1, APC, BD), anti-CD24 (M1/69, APC-Fire750, Biolegend), anti-CD4 (RM4-5, eFluor450, Invitrogen), anti-CD25 (PC61, PE-Cy7, BD), anti-I-Ab (25-9-17, FITC, BD), anti-CD11c (HL3, PE-CF594, BD), anti-CD11b (M1/70, PerCP-Cy5.5, BD), anti-CCR7 (4B12, PE, BD), anti-CD45.1 (A20, PE, BD), anti-Ascl2 (G-16, Santa Cruz), anti-CD38 (90, PE-Cy5, eBioscience), anti-Fas (Jo2, PE-Cy7, BD), anti-GL7 (GL7, Alexa Fluor 647, BD), anti-B220 (RA3-6B2, APC-Cy7, BD), anti-IgD (11-26c.2a, BV421, Biolegend), anti-CD3 (500A2, V500, BD), anti-CD138 (281-2, Biotin, Biolegend). Streptavidin-BV605 was used from Biolegend. Anti-Ascl2 was coupled using 488 Antibody Labeling Kit, Invitrogen. 1W1K-IAb tetramers were obtained from NIH Tetramer core facility and NP-PE from LGC Biosearch Technologies. For intracellular staining cell suspensions were fixed and permeabilized using BD Fixation/Permeabilization kit. Before permeabilization cells were stained with Fixable Viability Dye eFluor450 or eFluor660 (eBioscience). To assess pSTAT5 level directly ex vivo, 18h after immunization, purified DC were stimulated 10 min with mouse recombinant IL-2 (rIL-2) (200U/ml) at 37°C, not stimulated DC were used as control.

After the stimulation, DC were fixed into 2%PFA during 30 min at room temperature. Then, cells were washed, resuspended in Methanol 100% and incubated on ice for 30 min. After an additional wash, cells were stained for surface and intracellular antigens, including pSTAT5 (pY694, BD Biosciences) overnight at 4°C.

Human cells were stained with anti-CD3 VioBlue (BW264/56, Miltenyi Biotec), anti-CD45RA PE-Vio615 (REA562, Miltenyi Biotec), anti-CXCR5 PeVio770 (REA103, Miltenyi Biotec), anti-FoxP3 APC (REA1253, Miltenyi Biotec), anti-PD-1 BV605 (EH12.1, BD Biosciences), anti-CD4 BV786 (SK3, BD Biosciences), anti-CD25 BV650 (m-A251, BD), anti-CD3 FITC (HIT3a, Miltenyi Biotec), anti-CD19 FITC (HIB19, Biolegend), anti-CD11c PE (REA618, Miltenyi Biotec), anti-BDCA3 BV510 (1A4, BD), anti-CXCR5 PE-Vio615 (REA103, Miltenyi Biotec), anti-CD132 BUV615 (TUGm4, BD), anti-CD25 BV650 (M-A251, BD), anti-CCR7 PerCP-Vio700 (REA546, Miltenyi Biotec), anti-BDCA1 PE-Vio770 (AD5-8E7, Miltenyi Biotec), anti-HLA-DR APC-Vio770 (AC122, Miltenyi Biotec), anti-BDCA2 APC (AC144, Miltenyi Biotec), anti-CD14 VioBlue (TUK4, Miltenyi Biotec). Cells were incubated at room temperature for 30 min.

Stained cells were acquired using a LSRII flow-cytometer or a BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer (BD Biosciences, San Jose, CA), sorted using FACSARIA-SORP (BD Biosciences) or FACSARIA-FUSION (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). Doublets and dead cells were excluded using appropriate FSC/SSC gates.

## **Imaging**

Mosaic Z-stack images were acquired with a Leica-Microsystems SP8 and analyzed with imaris software (version 9.3). Image stream flow cytometry. Cells were incubated with Fixable Viability Dye prior staining with fluorochrome-conjugated anti-CD11c, CD11b, pSTAT5 antibodies and DAPI and acquired on an ImageStreamX apparatus from Millipore. Data were analyzed using the IDEAS analysis software from Millipore.

## **scRNA-seq**

An estimated 9000 single cells per sample were subjected to 10x Genomics single-cell isolation and RNA sequencing following the manufacturer's recommendations. Illumina HiSeq 3000 was used for deep sequencing.

### **Analysis of scRNA-seq data**

Sequences from scRNA-seq were processed with Cellranger (v.3.0.2) software (10x Genomics). Demultiplexing, UMI (unique molecular identifier) collapsing and alignment to the mouse transcriptome (mm10) were performed. Raw data generated by Cellranger were analyzed in R, using the Seurat package (3.0.2)<sup>33</sup>. Ribosomal and mitochondrial features were removed. Gene expression was log-normalized and read back into the original Seurat object. In Seurat, the normalized data were scaled. Principal components were calculated on the basis of all genes present in the dataset and a JackStrawPlot was used to determine the significant principal components. Cells were then divided into unsupervised clusters using a shared-nearest-neighbour modularity optimization-based clustering algorithm<sup>34</sup>. The optimal resolution of the clustering was determined by plotting a cluster tree at increasing ranges of resolutions from 0 to 4 with a step of 0.3 using the clustree package<sup>35</sup>. Cells were then plotted using the t-SNE method<sup>36</sup>. Differentially expressed genes for each cluster were then identified using the Wilcox test in Seurat and the top genes (<0.05 P value and >0.25 log fold change) were used to identify different cell types. All data plotting and analyses were done in R. Differentially expressed genes between C2 from WT and DEREK mice were also analyzed with the Ingenuity Pathway Analysis Software (Qiagen)<sup>37</sup> to assess which pathways were different between the two conditions.

### **Statistical analysis**

Differences between variables were evaluated using the non-parametric Mann-Whitney test or Wilcoxon test. All statistical analyses were carried out with Prism 7.0 software (GraphPad). *p*-values less than 0.05 were considered statistically different.

## Acknowledgements

The authors wish to thank all the members of the Guerder team for helpful comments. We also thank the Infinity core facilities and the 'Toulouse Réseau Imagerie' network (F. L'Faqih, A.L. Iscache, S. Allart and S. Lachambre), the animal house staff members (INSERM UMS06), the GET core facility and the NIH Tetramer Facility. This work was supported by ARSEP (2020 Emergence), ANR (ANR-22-CE15-BAT-M-S), FRM-FA (R20085BB), grant EUR CARE N°ANR-18-EURE-0003 and the Inspire Program from the Region Occitanie/Pyrénées-Méditerranée (#1901175) and the European Regional Development Fund (MP0022856). The authors declare no competing financial interests.

## References (50)

1. Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J., Rosen, H. & McHeyzer-Williams, M.G. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nature immunology* **10**, 375-384 (2009).
2. Vinuesa, C.G., Linterman, M.A., Yu, D. & MacLennan, I.C. Follicular Helper T Cells. *Annual review of immunology* **34**, 335-368 (2016).
3. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology* **31**, 563-604 (2013).
4. Krishnaswamy, J.K. *et al.* Migratory CD11b(+) conventional dendritic cells induce T follicular helper cell-dependent antibody responses. *Science immunology* **2** (2017).
5. Chakarov, S. & Fazilleau, N. Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation. *EMBO molecular medicine* **6**, 590-603 (2014).
6. Leon, B. *et al.* Regulation of T(H)2 development by CXCR5+ dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells. *Nature immunology* **13**, 681-690 (2012).
7. Gerner, M.Y., Kastenmuller, W., Ifrim, I., Kabat, J. & Germain, R.N. Histo-cytometry: a method for highly multiplex quantitative tissue imaging analysis applied to dendritic cell subset microanatomy in lymph nodes. *Immunity* **37**, 364-376 (2012).
8. Ohl, L. *et al.* CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* **21**, 279-288 (2004).
9. DiToro, D. *et al.* Differential IL-2 expression defines developmental fates of follicular versus nonfollicular helper T cells. *Science* **361** (2018).
10. Liu, X. *et al.* Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. *Nature* **507**, 513-518 (2014).

11. Johnston, R.J. *et al.* Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* **325**, 1006-1010 (2009).
12. Crotty, S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* **50**, 1132-1148 (2019).
13. Nurieva, R.I. *et al.* STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (Tfh) cell generation and function. *J Biol Chem* **287**, 11234-11239 (2012).
14. Johnston, R.J., Choi, Y.S., Diamond, J.A., Yang, J.A. & Crotty, S. STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *The Journal of experimental medicine* **209**, 243-250 (2012).
15. Ballesteros-Tato, A. *et al.* Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity* **36**, 847-856 (2012).
16. Leon, B., Bradley, J.E., Lund, F.E., Randall, T.D. & Ballesteros-Tato, A. FoxP3+ regulatory T cells promote influenza-specific Tfh responses by controlling IL-2 availability. *Nature communications* **5**, 3495 (2014).
17. Sage, P.T. *et al.* Suppression by TFR cells leads to durable and selective inhibition of B cell effector function. *Nature immunology* **17**, 1436-1446 (2016).
18. Kim, J.M., Rasmussen, J.P. & Rudensky, A.Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nature immunology* **8**, 191-197 (2007).
19. Sage, P.T., Alvarez, D., Godec, J., von Andrian, U.H. & Sharpe, A.H. Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. *The Journal of clinical investigation* **124**, 5191-5204 (2014).
20. Nurieva, R.I. *et al.* Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* **325**, 1001-1005 (2009).
21. Nakayamada, S. *et al.* Early Th1 cell differentiation is marked by a Tfh cell-like transition. *Immunity* **35**, 919-931 (2011).

22. Oestreich, K.J., Mohn, S.E. & Weinmann, A.S. Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile. *Nature immunology* **13**, 405-411 (2012).
23. Koch, M.A. *et al.* The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature immunology* **10**, 595-602 (2009).
24. Shafiani, S., Tucker-Heard, G., Kariyone, A., Takatsu, K. & Urdahl, K.B. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* **207**, 1409-1420 (2010).
25. Tannenbaum, C.S. *et al.* The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor. *J Immunol* **161**, 927-932 (1998).
26. Ray, J.P. *et al.* The Interleukin-2-mTORc1 Kinase Axis Defines the Signaling, Differentiation, and Metabolism of T Helper 1 and Follicular B Helper T Cells. *Immunity* **43**, 690-702 (2015).
27. Li, J., Lu, E., Yi, T. & Cyster, J.G. EB12 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-queenching dendritic cells. *Nature* **533**, 110-114 (2016).
28. Wuest, S.C. *et al.* A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. *Nature medicine* **17**, 604-609 (2011).
29. Tubo, N.J. *et al.* Single naive CD4+ T cells from a diverse repertoire produce different effector cell types during infection. *Cell* **153**, 785-796 (2013).
30. Krishnaswamy, J.K., Alsen, S., Yrlid, U., Eisenbarth, S.C. & Williams, A. Determination of T Follicular Helper Cell Fate by Dendritic Cells. *Front Immunol* **9**, 2169 (2018).
31. Laidlaw, B.J. *et al.* Interleukin-10 from CD4(+) follicular regulatory T cells promotes the germinal center response. *Science immunology* **2** (2017).

32. Guyonnet, S. *et al.* The INSPIRE Bio-Resource Research Platform for Healthy Aging and Geroscience: Focus on the Human Translational Research Cohort (The INSPIRE-T Cohort). *J Frailty Aging* **10**, 110-120 (2021).
33. Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E. & Satija, R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol* **36**, 411-420 (2018).
34. Waltman, L. & Van Eck, N.J. A smart local moving algorithm for large-scale modularity-based community detection. *The European Physical Journal B* **471** (2013).
35. Zappia, L. & Oshlack, A. Clustering trees: a visualization for evaluating clusterings at multiple resolutions. *Gigascience* **7** (2018).
36. van der Maaten, L.J.P. & G.E., H. Visualizing High-Dimensional Data Using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research* **9**, 2579-2605 (2008).
37. Kramer, A., Green, J., Pollard, J., Jr. & Tugendreich, S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics* **30**, 523-530 (2014).

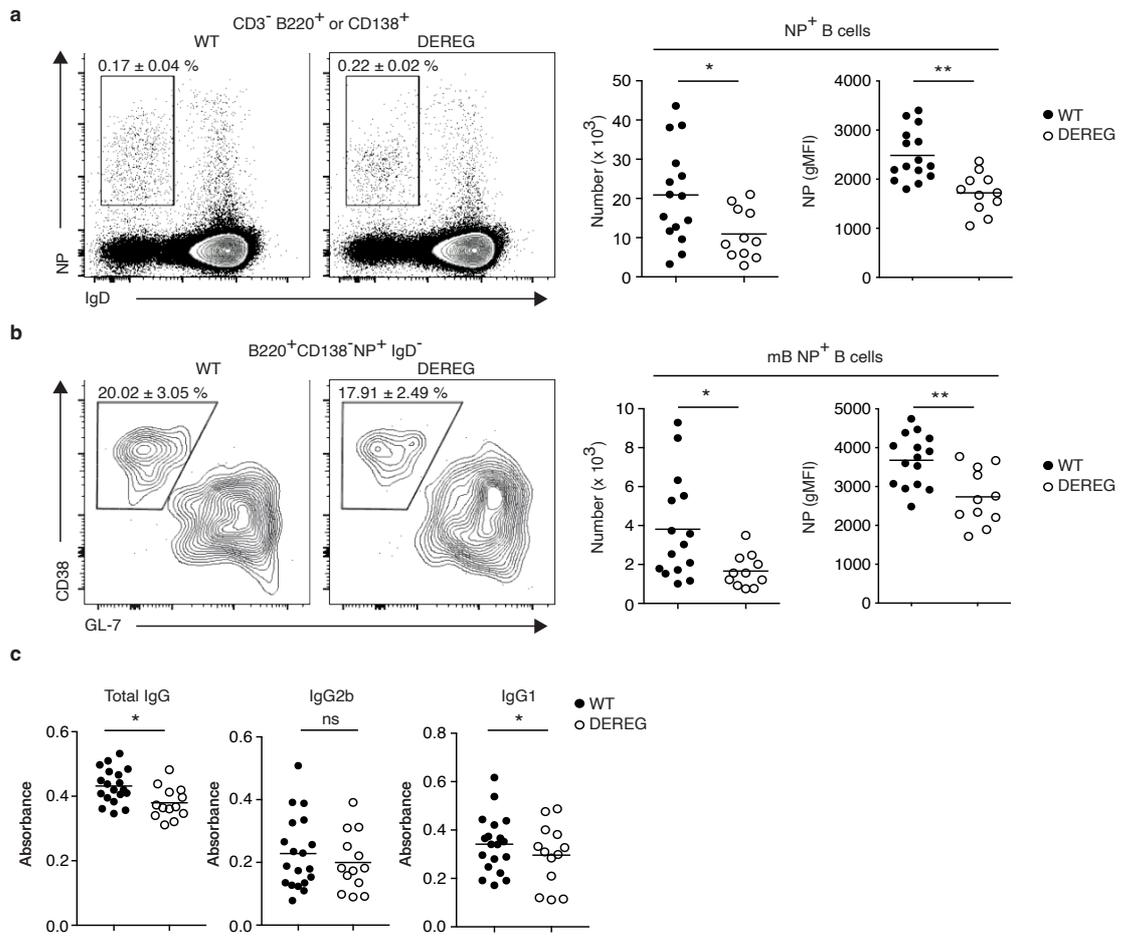


Figure 1

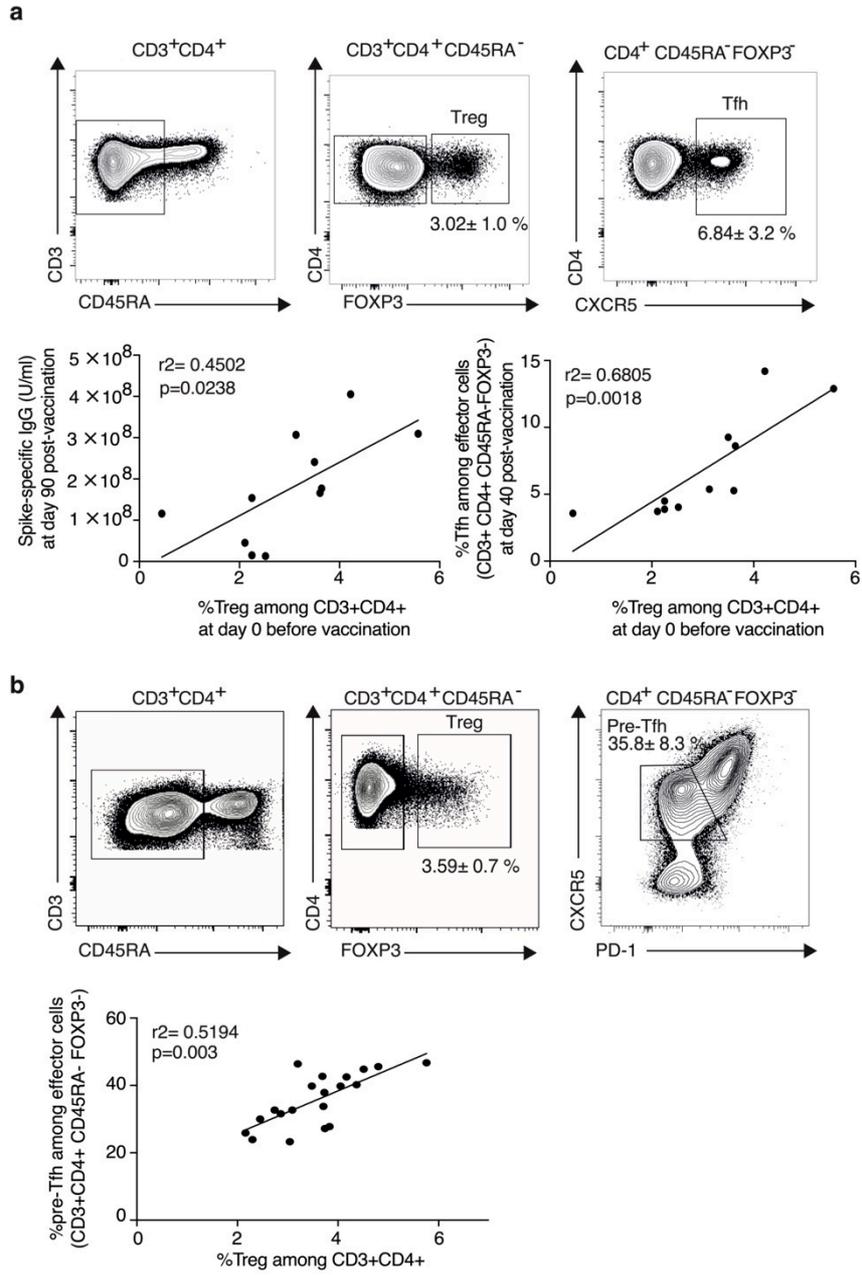


Figure 2

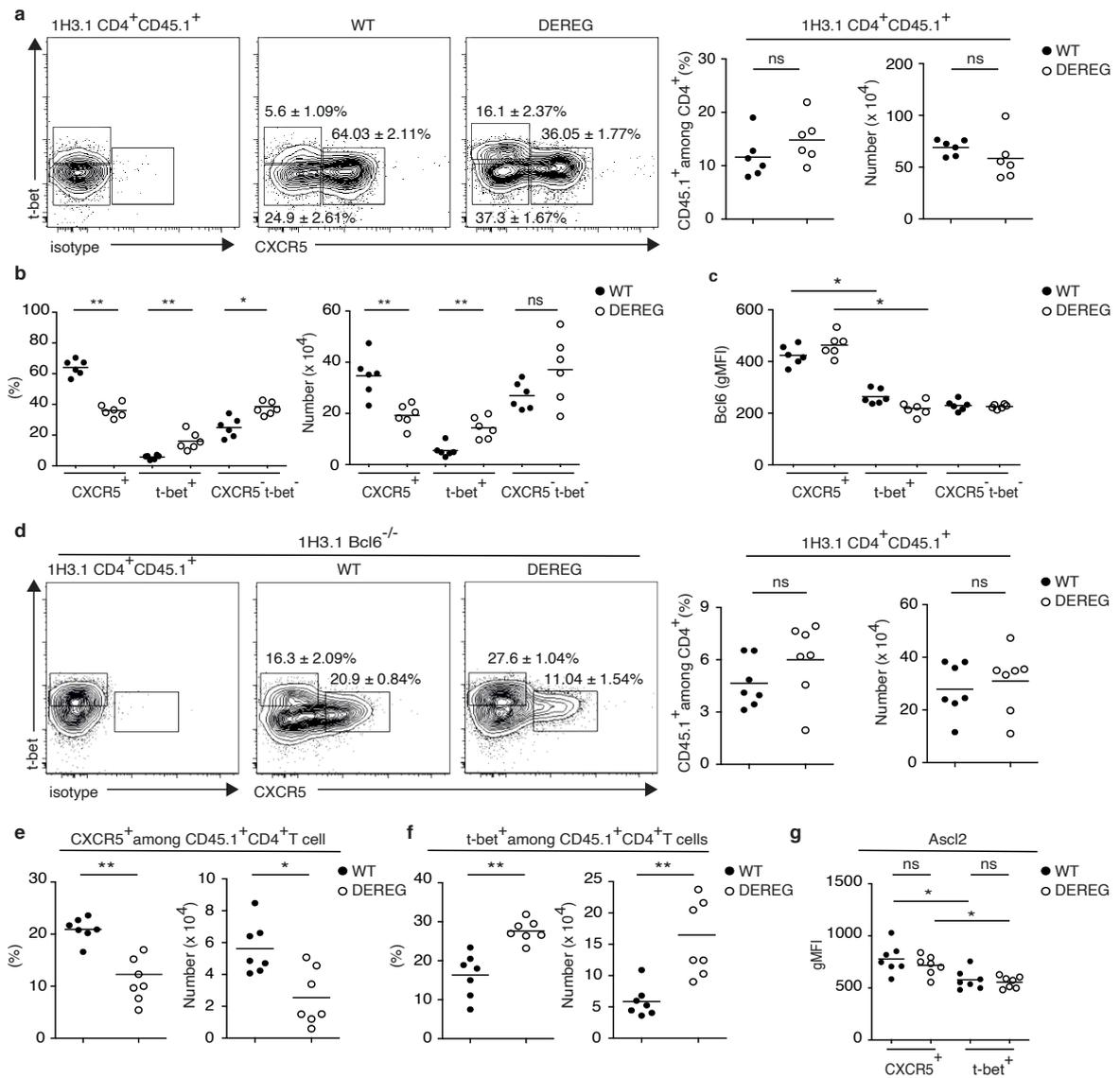


Figure 3

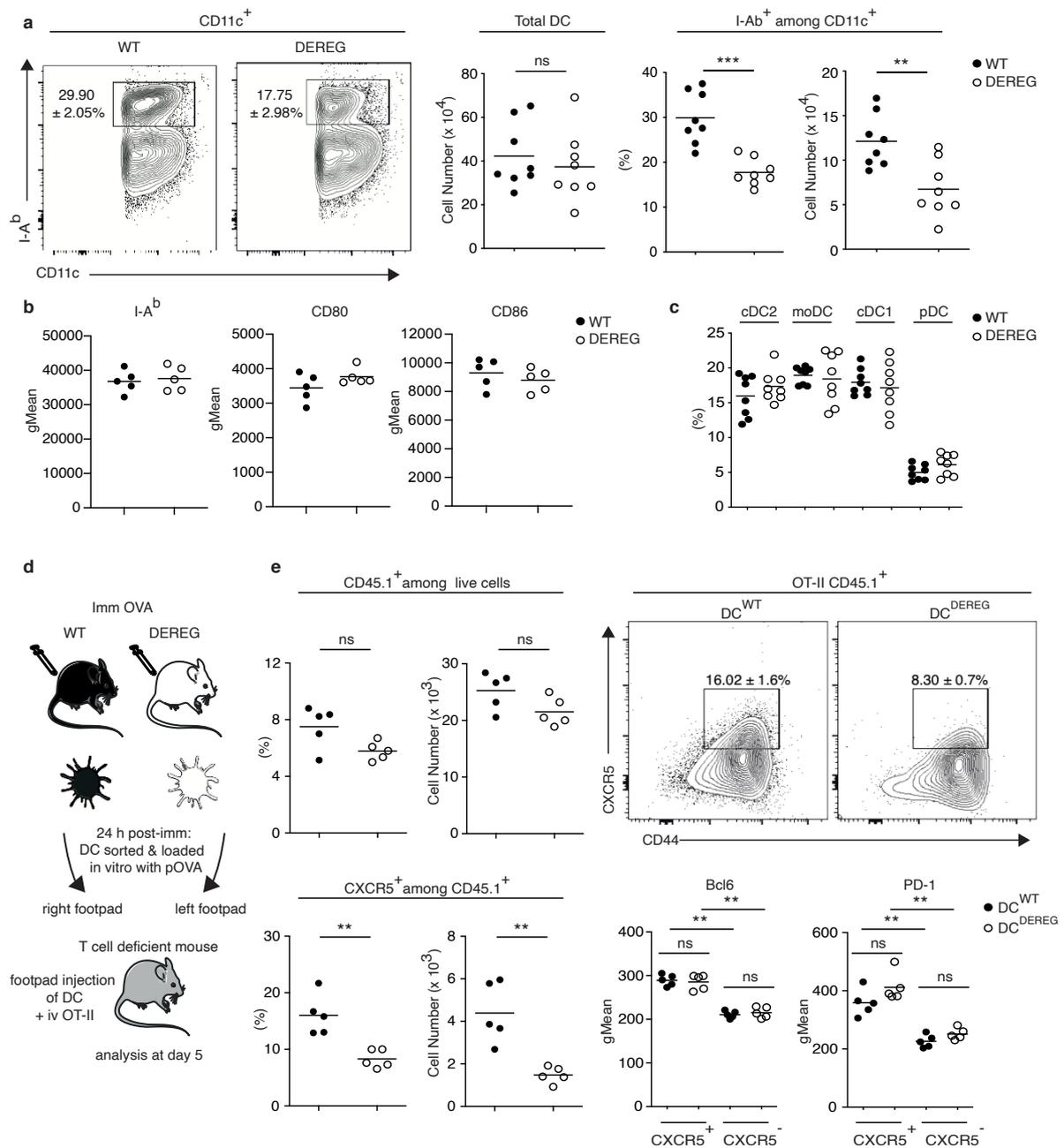


Figure 4

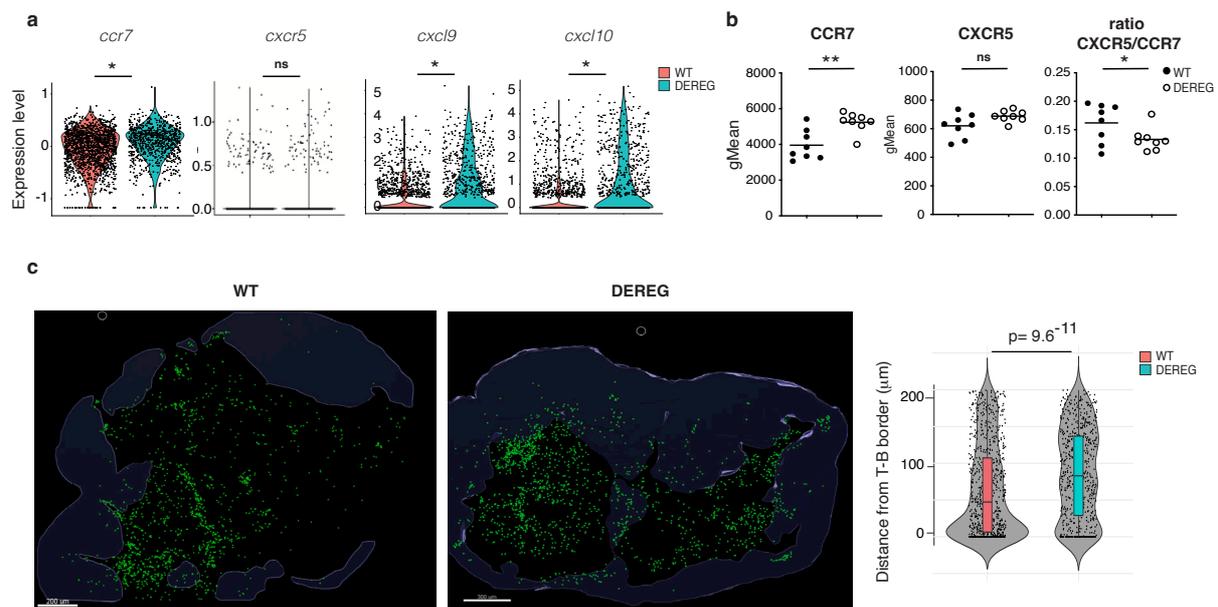


Figure 5

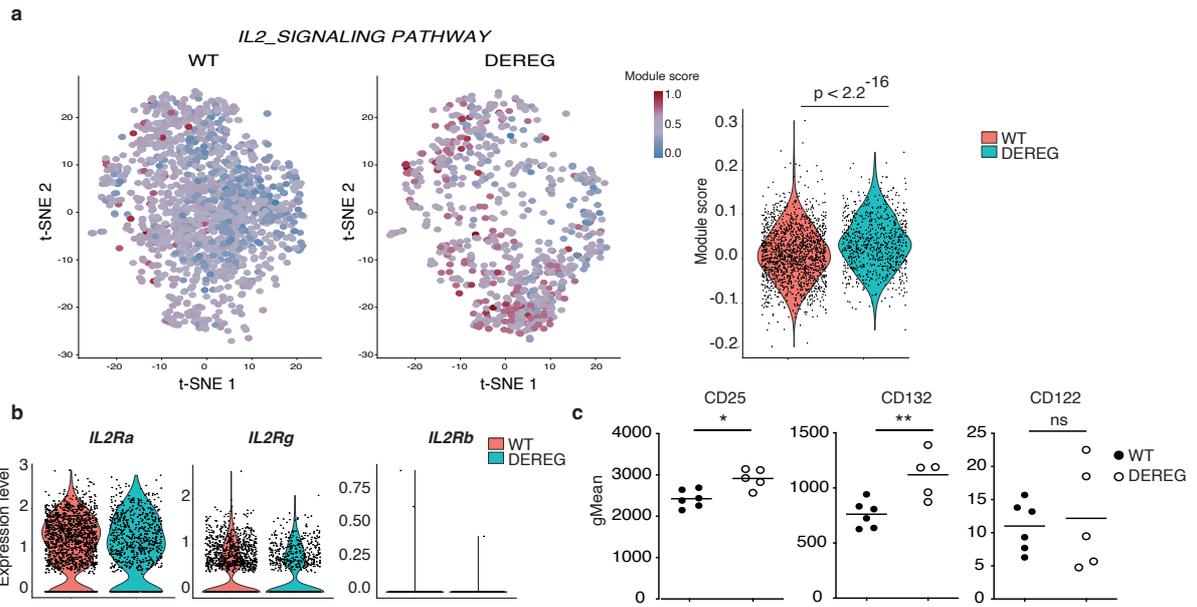


Figure 6

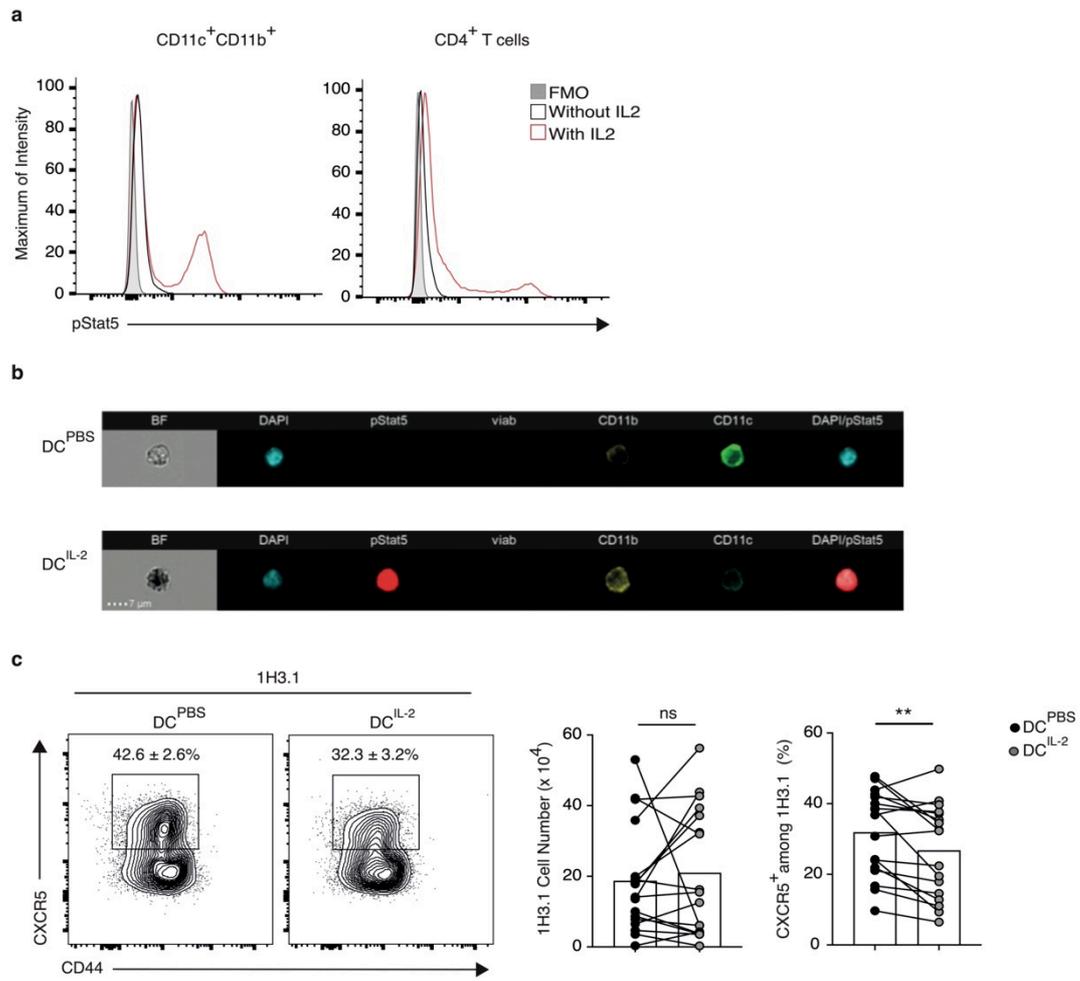
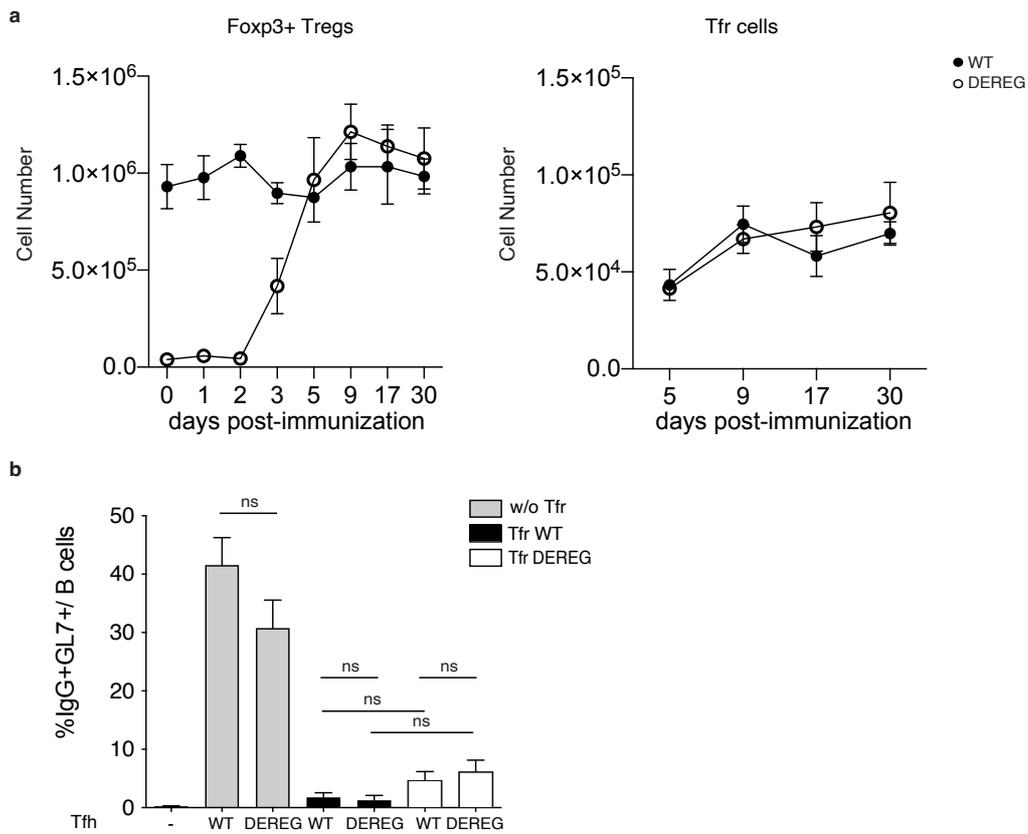
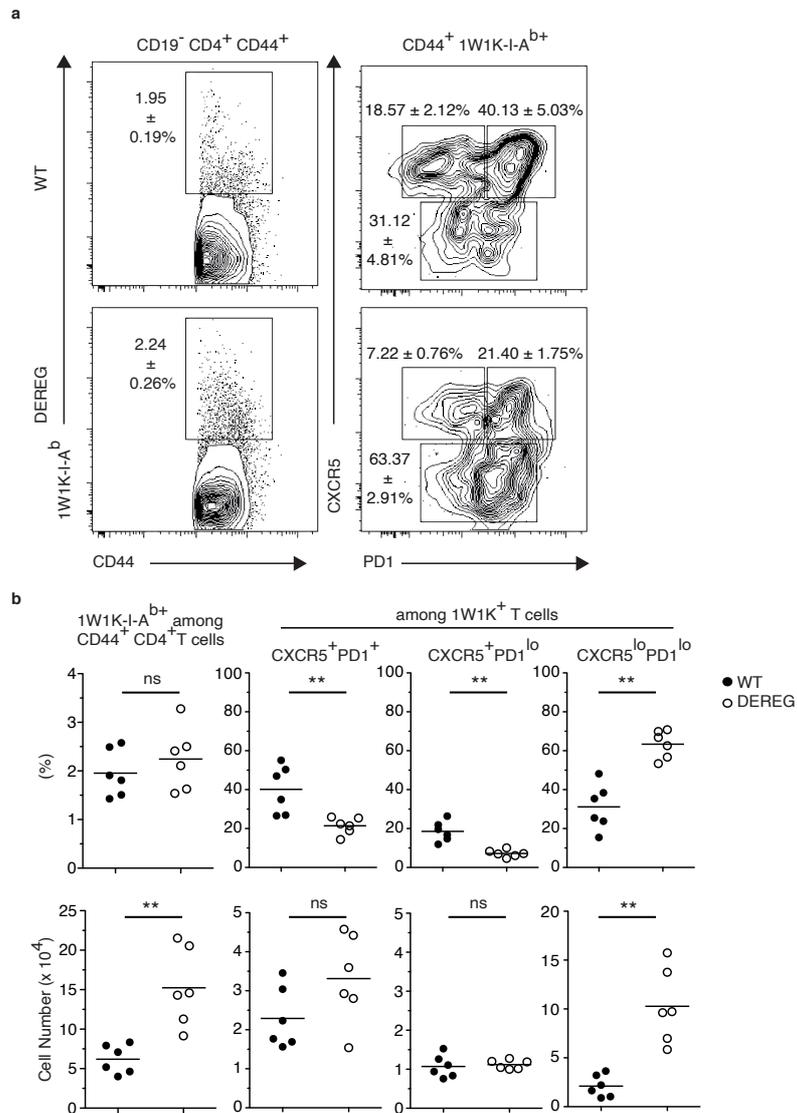


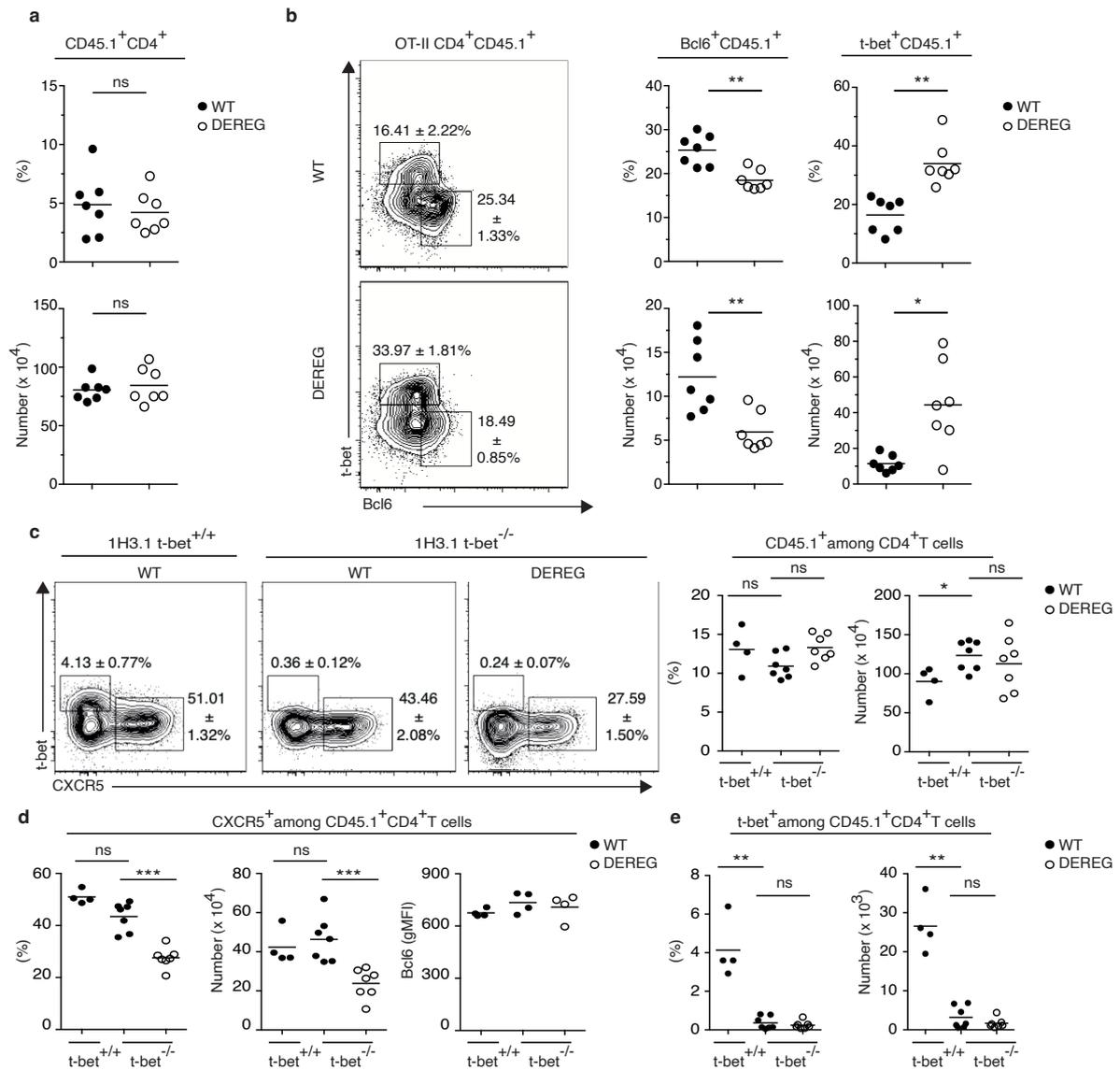
Figure 7



**Supplementary Figure 1: Impact of DTx treatment on Treg and Tfr cells in WT and DEREГ littermates.**  
 (a) Cell Numbers of Foxp3+ Tregs and Tfr cells in dLN from DEREГ and WT littermates after DTx treatment and immunization.  
 (b) Frequency of IgG+GL7+ cells among B cells from in vitro co-cultures of Tfh, B cells and Tfr from WT and DEREГ mice.

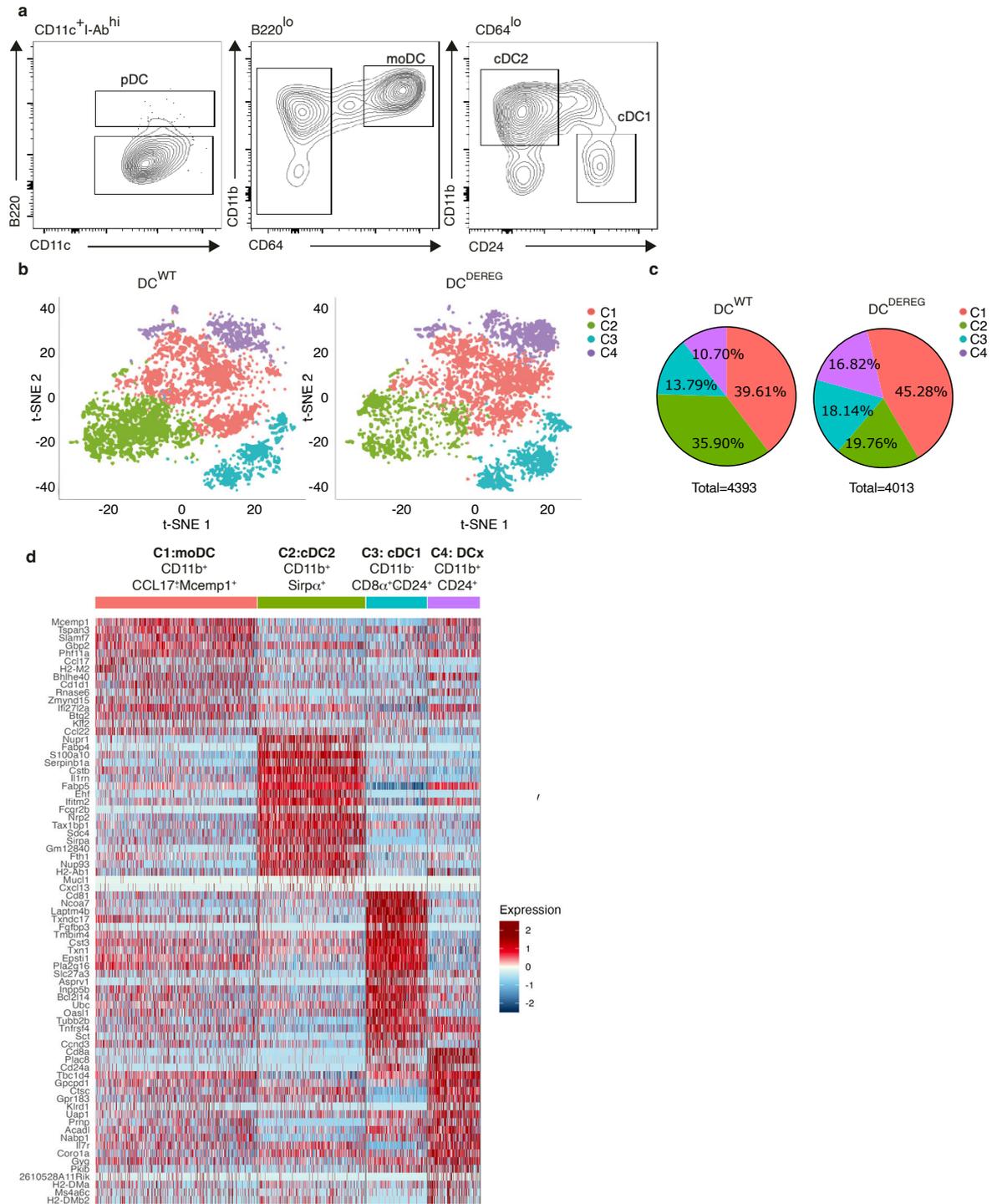


**Supplementary Figure 2: Treg at priming promote the development of 1W1K-specific oligoclonal Tfh cells.** Five days after sc immunization with 1W1K-OVA, dLN of Dereg and WT littermates treated with DTx at day -1 and day 0 were analyzed for the detection of 1W1K-specific T cells. Representative flow plots of 1W1K-specific T cells and CXCR5 and PD1 expression among 1W1K-specific T cells (a)(mean±SEM). Frequencies and numbers of 1W1K-specific T cells among CD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> T cells and CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>, CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>low</sup> and CXCR5<sup>low</sup> PD1<sup>low</sup> among 1W1K-specific T cells (b).



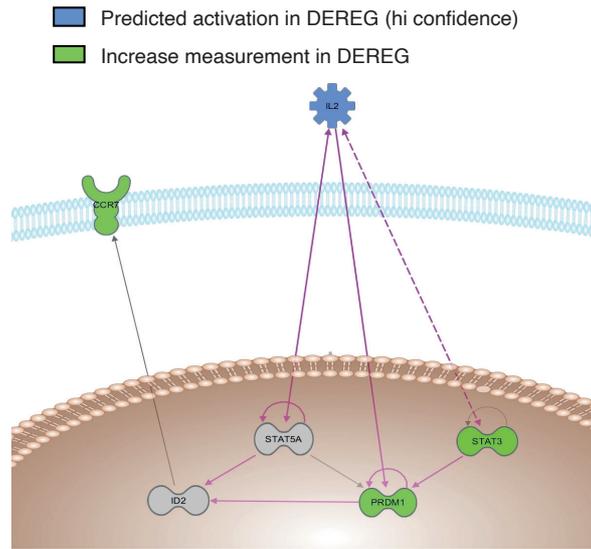
**Supplementary Figure 3: Treg induce Tfh formation even in absence of Th1 lineage.**

(a) Transfer of naive OT-II CD4<sup>+</sup> T cells into DEREK and WT littermates followed by DTx treatment and immunization with OVA and analyzed 5 days later (left, mean±SEM). Frequency and number of OT-II CD45.1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (b) Representative flow cytometry plots of OT-II CD45.1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. Frequency and number of Bcl6<sup>+</sup> and t-bet<sup>+</sup> among CD45.1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. (c) Representative flow plots of transferred t-bet<sup>+/+</sup> or t-bet<sup>-/-</sup> 1H3.1 CD4<sup>+</sup> T cells into WT or DEREK littermates followed by DTx treatment and immunization and analyzed 5 days later (left, mean±SEM). Frequency and number of t-bet<sup>+/+</sup> or t-bet<sup>-/-</sup> 1H3.1 CD45.1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (right). (d) Frequency, number and Bcl6 gMFI of CXCR5<sup>+</sup> among t-bet<sup>+/+</sup> or t-bet<sup>-/-</sup> 1H3.1 CD45.1<sup>+</sup> T cells. (e) Frequency and number of t-bet<sup>+</sup> among t-bet<sup>+/+</sup> or t-bet<sup>-/-</sup> 1H3.1 CD45.1<sup>+</sup> T cells. Each dot represents an individual mouse. Data are representative of two independent experiment. Mann-Whitney test, \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001

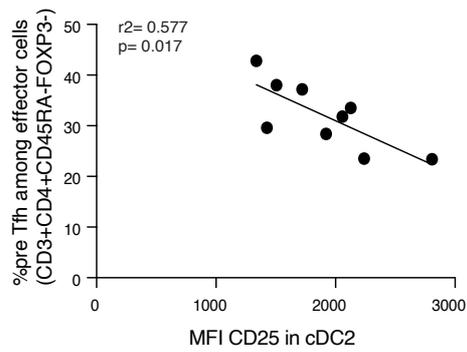


**Supplementary Figure 4: Gating strategy for identification of DC subsets and DC clusters by scRNAseq.** (a) 24 hours after sc immunization with OVA, dLN of DERE and WT littermates treated with DTx at day -1 and day 0. Were analyzed for the detection of I-Abhi CD11c<sup>+</sup> cell subsets. Representative flow plots of DC. (b) t-SNE analysis of single-cell I-Abhi CD11c<sup>+</sup> sorted from littermate controls (n= 4393) and DERE mice (n= 4013) at day 1 after immunization by OVA, Colors indicate unbiased DC classification via graph-based clustering. Each dot represents an individual cell. Numbers of successfully profiled single cells per cluster: C1 (n = 1740); C2 (n = 1577); C3 (n = 606); C4 (n = 470) in DC from littermate and C1 (n = 1817); C2 (n = 793); C3 (n = 728); C4 (n = 675) in DC from DERE. (c) Percentage of cells in each cluster (d) Heatmap of the top 20 genes significantly enriched in each cluster; representative gene names are shown close to each cluster. Color scheme is based on z-score distribution from -2.5 (blue) to 2.5 (red)

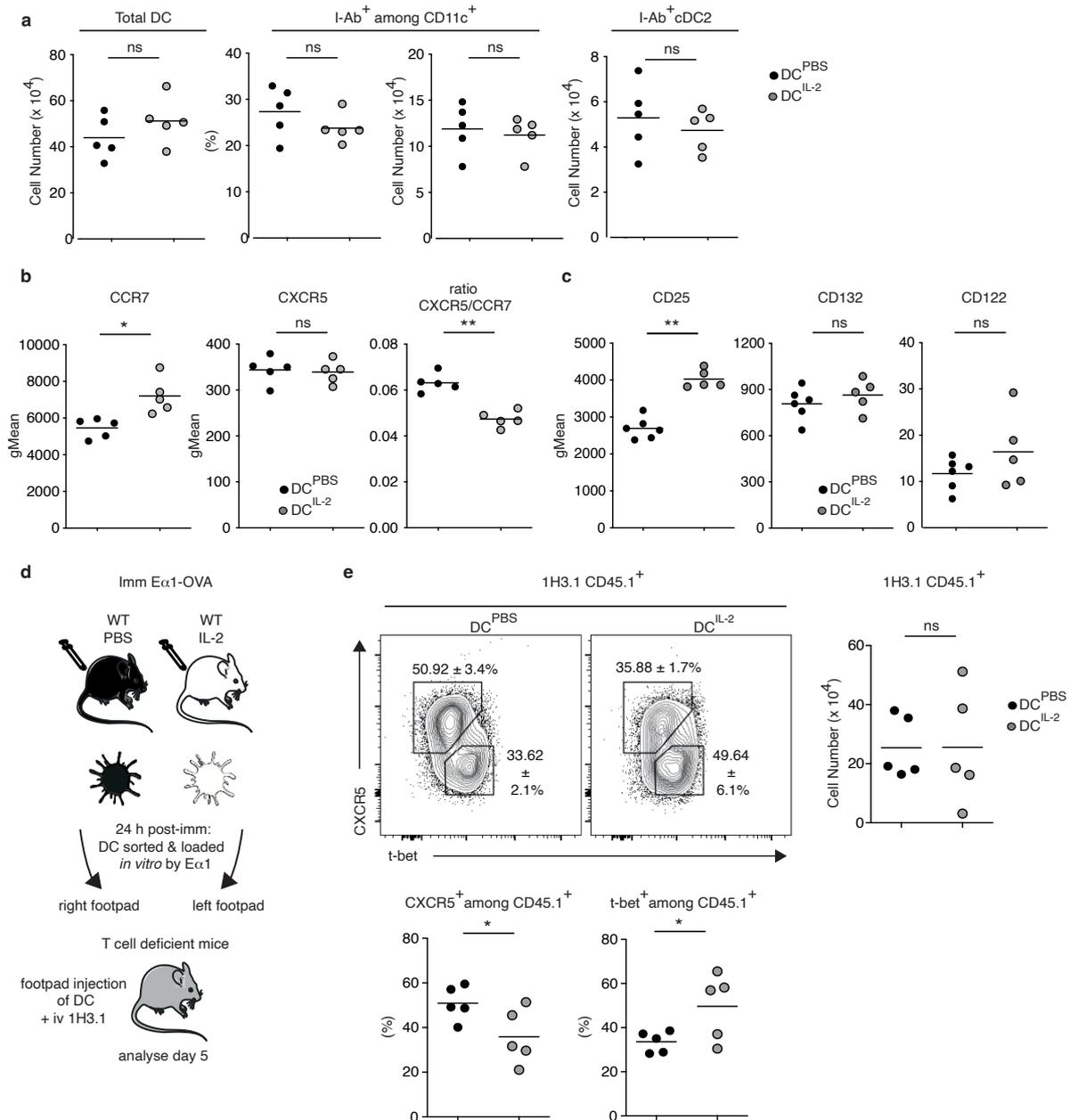
a



b



**Supplementary Fig. 5: Predicted impact of Treg absence in cDC2 in mice and correlation in human tonsils.** (a) Predictions of activation and increased measurements in C2 from DERE mice. (b) Linear regression curve of frequency of tonsil pre-Tfh cells (CD3+CD4+CD45RA-FoxP3-CXCR5+ PD-1int) and gMFI of CD25 at the surface of tonsil cDC2 (CD3- CD11c+ HLA-DR+ BDCA2- BDCA3- BDCA1+).



**Supplementary Fig. 6: IL-2 directly inhibits DC capacity to promote Tfh commitment *in vivo*.**

WT mice were immunized with Ea1-OVA in SAS and treated at day -1 and day 0 with 15,000 U of recombinant IL-2 or PBS. Cells from draining LN were analyzed by flow cytometry on day 1. (a) Number of CD11c<sup>+</sup> DCs and frequency and number of I-Abhi among total DC and cDC2 (CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD64<sup>-</sup>). (b) gMFI of CCR7, CXCR5 on cDC2 as well as ratio gMFI of CXCR5/CCR7. (c) gMFI of CD25, CD132 and CD122 on cDC2 (d) experimental outline (e) Flow cytometry dot plots showing CXCR5<sup>+</sup> and t-bet<sup>+</sup> 1H3.1 T cells in popliteal LN 5 days after footpad injection of DCs in Zap70<sup>-/-</sup> mice. Number of total 1H3.1 T cells (upper panel) and frequency of CXCR5<sup>+</sup> and t-bet<sup>+</sup> 1H3.1 T cells (lower panel). Data shown are from one experiment with five mice per group and are representative of 3 independent experiments. Mann-Whitney test, \*P < 0.05; \*\*P < 0.01.



## Les mTfh de la MO

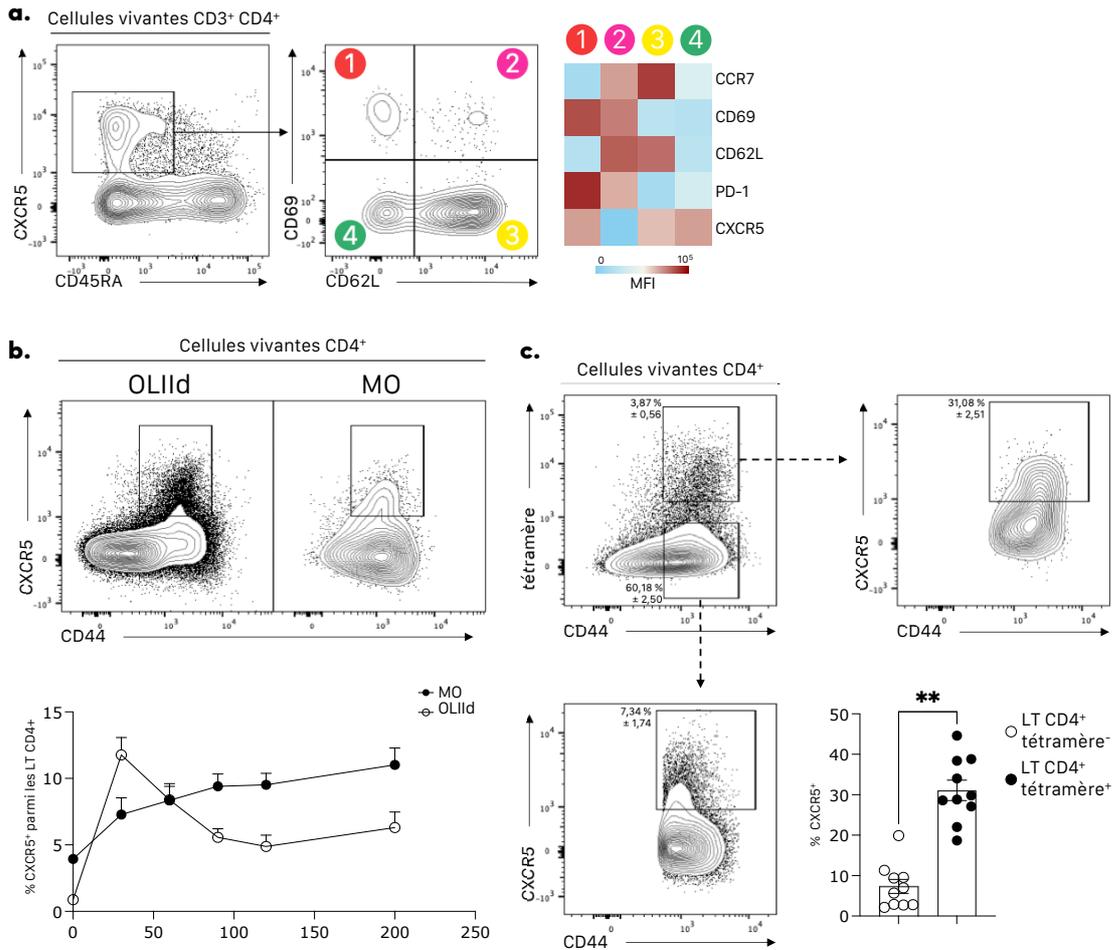
Dans le second axe de mes travaux de thèse, je me suis intéressé aux Tfh qui peuplent la MO durant la phase mémoire d'une réponse B T-dépendante.

Nous avons mis en évidence la présence de cellules T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> dans la MO chez l'humain et chez la souris, que nous avons explorées de façon approfondie.

Chez l'humain, l'étude par cytométrie en flux de MO de donneurs sains révèle l'existence d'une population de LT CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup>, que nous nommerons des Tfh. Ces cellules se répartissent en plusieurs populations selon l'expression de CD69 et de CD62L. La présence de la population CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> qui pourraient être des mTfh locaux, pourrait s'expliquer par la possibilité qu'elle ait été générée dans la MO lors d'une réponse in-situ, la MO pouvant servir d'OLII<sup>197</sup>. Deux populations de cellules aux caractéristiques de Tfh circulantes sont également retrouvées dans la MO, une population non activée (CD69<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>PD-1<sup>faible</sup>) et une activée (CD69<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>faible</sup>PD-1<sup>intermédiaire</sup>). Enfin, une quatrième population est également présente avec des caractéristiques de Trh (CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>PD-1<sup>fort</sup>) (figure 22a.).

Cette population de Trh dans la MO est également présente chez la souris. Grâce à des modèles d'immunisations en sous-cutané, nous avons pu identifier des LT CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> dans les OLII drainant (OLII<sub>d</sub>) le site d'immunisation et dans la MO. Ces cellules ont été observées jusqu'à 200 jours post-immunisation. Après immunisation en sous-cutané, les Tfh présents dans les OLII<sub>d</sub> sont principalement des mTfh locaux<sup>215</sup>. Dans la MO, il s'agirait de Trh puisque la MO ne servirait pas d'OLII suite à une immunisation en sous-cutané. Ces expériences nous ont permis de

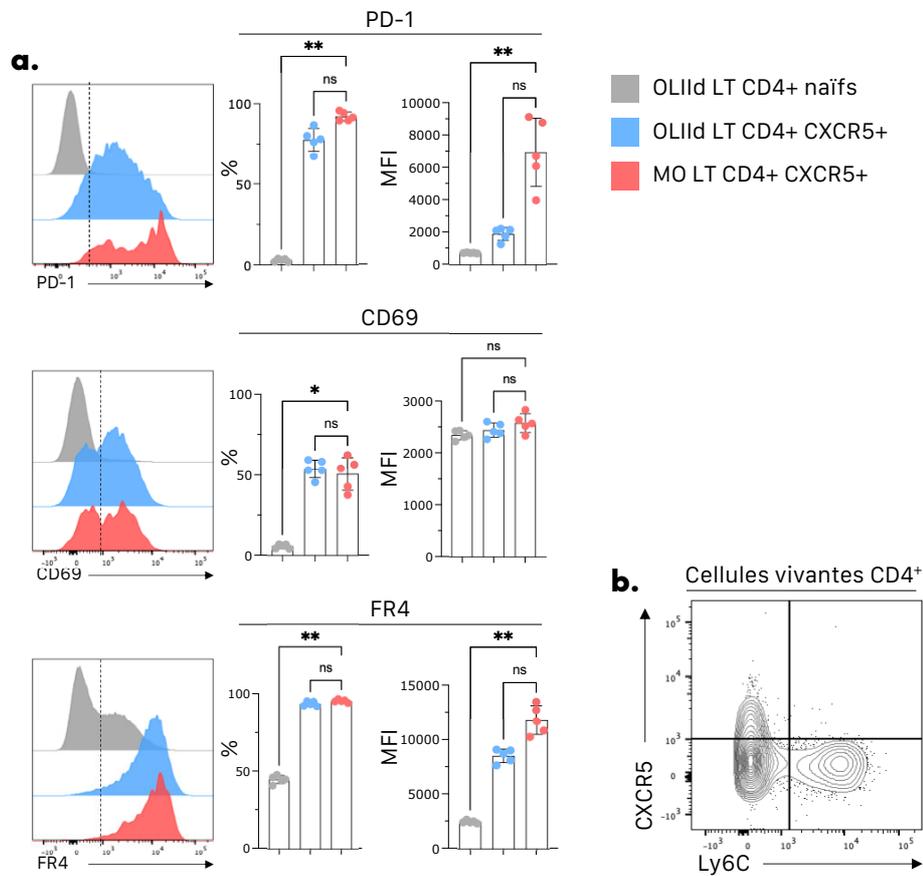
démontrer l'existence de ces mTfh de la MO chez la souris puis d'en établir la cinétique. Contrairement aux mTfh locaux des OLII dont la fréquence parmi les LT CD4<sup>+</sup> diminue avec le temps pour se stabiliser autour des 5%, la fréquence des mTfh parmi des LT CD4<sup>+</sup> dans la MO augmente avec le temps, elle dépasse les 10% à 200 jours post-immunisation (figure 22b.). De façon intéressante, ces cellules sont particulièrement enrichies parmi les cellules spécifiques de l'Ag immunisant, détectées à l'aide d'un tétramère I-A<sup>b</sup>/1W1K, dans le cadre d'une immunisation avec l'Ag 1W1K-OVA (figure 1c.). Cela suggère que l'émergence de ces cellules est bien liée à leur activation par une CPA dans les OLII.



**Figure 22 : Identification de mTfh dans les MO humaine et murine.** Analyse par cytométrie en flux, de MO de donneurs sains et identification de quatre populations de Tfh (CXCR5<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) sur la base de l'expression de CD62L, CD69, CCR7 et PD1. Contour Plots à gauche et heatmap de la MFI des différentes protéines citées dans les quatre sous-populations à droite (a.) Cinétique de la fréquence des cellules CXCR5<sup>+</sup> parmi les LT CD4<sup>+</sup> de la MO et des OLIId chez des souris immunisées en sous-cutané. Contour Plots en haut et courbe de cinétique en bas (b.) Fréquence des cellules CXCR5<sup>+</sup> parmi les LT CD4<sup>+</sup> spécifiques de l'Ag immunisant dans la MO 90 jours après immunisation (tétramère<sup>+</sup>). Contour Plots et histogramme (c.) \*\*: p-value < 0,01

Ce modèle d'immunisation et d'analyse par cytométrie en flux nous a permis d'établir le phénotype de ces cellules. Elles expriment CD69 et fortement PD-1, ce qui correspond au phénotype de Trh (figure 23a.). Par contre, elles n'expriment pas Ly6C, ce qui nous permet d'affirmer qu'il s'agit

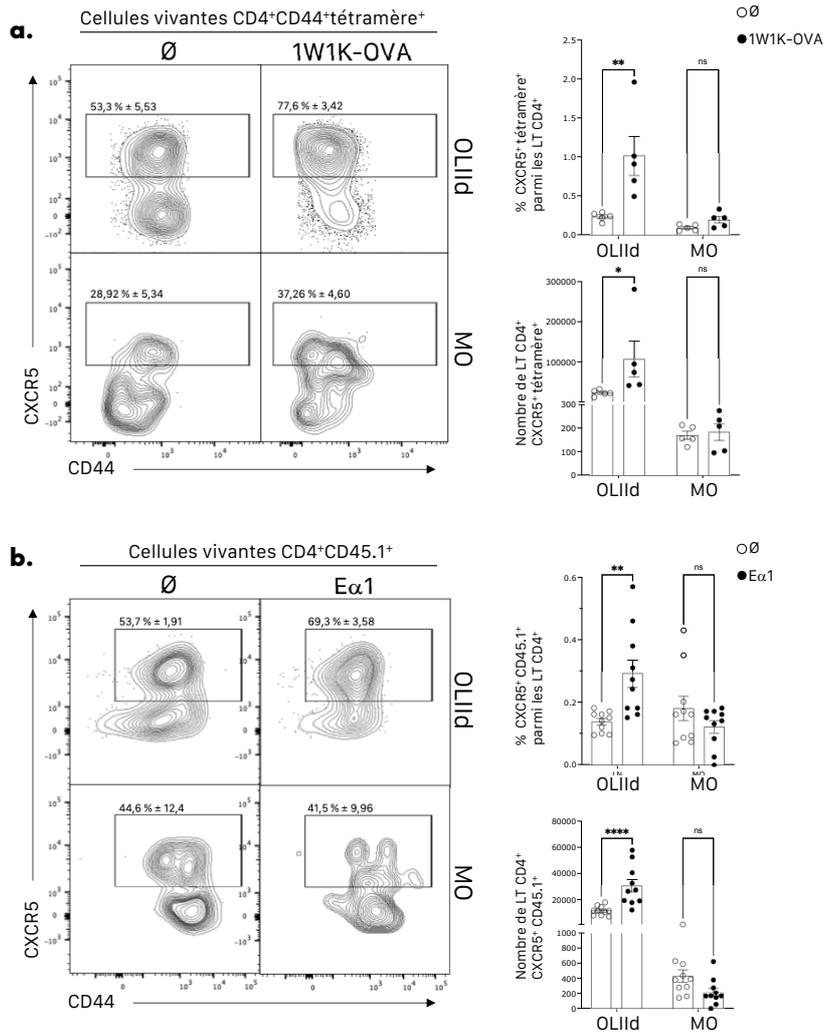
d'une population différente de celle décrite par *Tokoyoda et al*, capable d'apporter une aide aux LB<sup>196</sup> (figure 23b.).



**Figure 23 : Phénotype des mTfh de la MO.** 90 jours après immunisation des souris, leurs OLIId et MO sont analysés par cytométrie en flux. Expression de PD-1, CD69 et FR4 dans les LT naïfs des OLIId, les mTfh des OLIId, de la MO. Histogramme sur la gauche, suivie de la fréquence des populations positives puis de la MFI de la protéine dans la population positive. (a.) Contour Plot de l'expression de CXCR5 et de Ly6C dans les LT CD4<sup>+</sup> de la MO. (b.) \* : p-value < 0,05 ; \*\* : p-value < 0,01

Concernant la fonction de ces cellules, la première hypothèse que l'on peut faire serait, que la MO sert de réservoir pour les mTfh, qui pourraient alors être remobilisés vers les OLIId en cas d'une nouvelle rencontre avec l'Ag. Nous avons testé cette hypothèse en immunisant des souris sauvages avec l'Ag 1W1K-OVA adjuvanté en adjuvant incomplet de Freund (IFA) et CpGb (IFA-CpGb en sous-cutané, suivi d'une seconde immunisation avec 1W1K-OVA 90

jours plus tard. Cela nous a permis d'analyser les LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du complexe CMH-2/1W1K à l'aide d'un tétramère I-A<sup>b</sup>/1W1K. Cinq jours après la seconde immunisation, la fréquence et le nombre de Tfh tétramère<sup>+</sup> augmentent dans les OLId alors que dans la MO l'immunisation secondaire n'a aucun impact sur la fréquence ou le nombre de ces Tfh (figure 24a.). Dans ce modèle polyclonal, les TCR spécifiques de l'Ag immunisant ne sont pas identiques et ne présentent pas forcément la même affinité pour l'Ag. Pour s'assurer que les résultats observés ne sont pas dus à l'affinité du TCR, nous avons utilisé un modèle TCR transgénique, dans lequel les LT CD4<sup>+</sup> sont monoclonaux et portent un TCR de même spécificité et affinité pour l'Ag immunisant. Nous avons alors utilisé un modèle de transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup> 1H3.1 CD45.1<sup>+</sup> (qui portent des TCR transgéniques spécifiques du complexe CMH-2/E $\alpha$ 1) dans des souris sauvages immunisées en sous-cutané avec l'Ag E $\alpha$ 1-OVA adjuvanté en IFA-CpGb. 90 jours après la première immunisation, les souris sont immunisées à nouveau avec l'Ag E $\alpha$ 1. Cinq jours plus tard, nous pouvons suivre, par cytométrie en flux, les cellules 1H3.1 grâce à l'expression de CD45.1. La fréquence et le nombre de Tfh 1H3.1 augmentent dans les OLId après l'immunisation secondaire mais ne varie pas dans la MO (figure 24b.). Ces deux approches expérimentales suggèrent, soit une mobilisation des cTfh vers les OLId, soit une prolifération des mTfh locaux dans les OLId, et ces mécanismes ne dépendent pas de l'affinité des TCR, tandis que les Tfh de la MO ne semblent pas impactés par l'immunisation secondaire. Nous pouvons alors écarter l'hypothèse selon laquelle la MO constituerait un réservoir de Tfh voué à devenir des cellules effectrices en réponse secondaire.

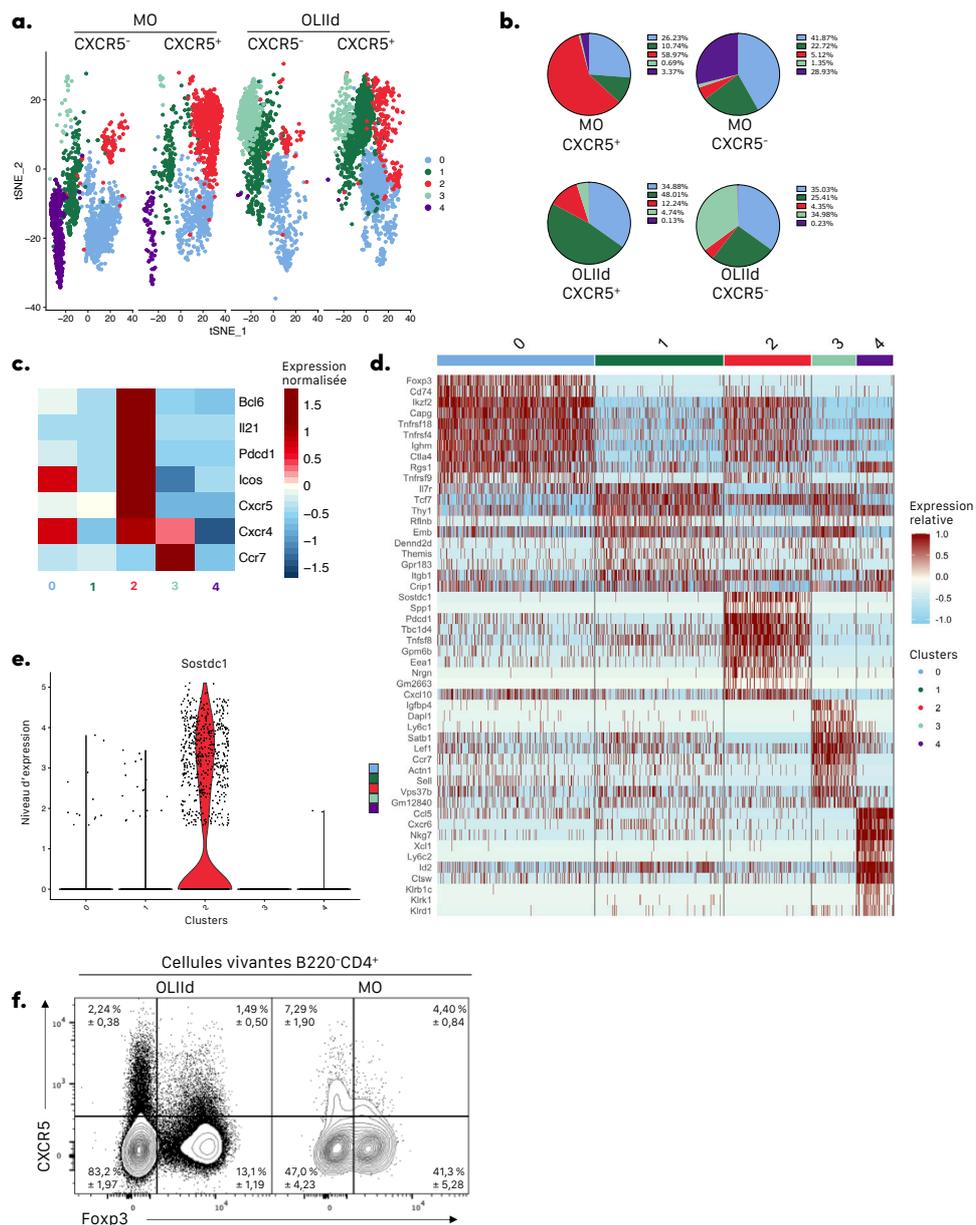


**Figure 24 :** Les mTfh de la MO ne sont pas impactés après une immunisation secondaire. Des souris ont été immunisées en sous-cutané avec l'Ag 1W1K-OVA en IFA-CpGb puis immunisées à nouveau avec l'1W1K-OVA 90 jours plus tard. Contour Plots de l'expression de CXCR5 et CD44 par les LT CD4<sup>+</sup> tétramère<sup>+</sup> dans les OLIIid et la MO sans immunisation secondaire (∅) ou avec (1W1K-OVA) à gauche, fréquence des cellules tétramère<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> parmi les LT CD4<sup>+</sup> et nombre de ces cellules à droite, cinq jours après l'immunisation secondaire. (a.) Des souris ont été immunisées en sous-cutané avec l'Ag Eα1-OVA en IFA-CpGb et transférées avec des LT CD4<sup>+</sup> 1H3.1 CD45.1<sup>+</sup>. Elles ont été réimmunisées avec l'Eα1 90 jours plus tard. Cinq jours après la seconde immunisation, les LT CD4<sup>+</sup> 1H3.1 de la MO et des OLIIid de ces souris ont été analysés par cytométrie en flux. Contour Plots de l'expression de CXCR5 et CD44 par les LT CD4<sup>+</sup> CD45.1<sup>+</sup> dans les OLIIid et la MO sans immunisation secondaire (∅) ou avec (Eα1) à gauche, fréquence des cellules CD45.1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> parmi les LT CD4<sup>+</sup> et leur nombre à droite. (b.) \* : p-value < 0,05 ; \*\* : p-value < 0,01 ; \*\*\*\* : p-value < 0,0001.

Pour explorer plus en profondeur le phénotype et les potentielles fonctions de ces mTfh de la MO, nous avons opté pour une approche transcriptomique par *single cell RNA sequencing* (scRNAseq). Nous avons comparé le transcriptome de LT CD4<sup>+</sup> activés (CD44<sup>+</sup>) CXCR5<sup>+</sup> ou CXCR5<sup>-</sup> provenant de la MO ou des OLId du site d'immunisation des souris 90 jours après immunisation. Les cellules ont été isolées par cytométrie en flux, les bibliothèques d'ADNc ont été obtenues suivant le protocole de 10Xgenomics puis ont été séquencées. L'outil Seurat sur le logiciel R nous a permis de séparer les cellules de chaque groupe en cinq clusters, que l'on peut visualiser sur un t-SNE. Un cluster caractéristique des LT CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> des OLId (cluster 3), un des LT CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> des OLId (cluster 1), un des LT CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> de la MO (cluster 4) et un cluster caractéristique des LT CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> de la MO (cluster 2). Dans ce dernier cluster on retrouve les mTfh de la MO qui nous intéressent. Un cinquième cluster est retrouvé dans tous les groupes et dans des proportions comparable (cluster 0) (figure 25a,b.). Nous avons recherché l'expression de gènes caractéristiques des Tfh (*Bcl6*, *Il21*, *Pdcd1*, *Icos* et *Cxcr5*). De manière intéressante, le cluster des cellules CXCR5<sup>+</sup> de la MO (cluster 2) exprime très fortement cette signature de Tfh alors que les cellules CXCR5<sup>+</sup> des OLId (cluster 1) l'expriment peu. Nous avons également observé l'expression de *Cxcr4* dans les mTfh de la MO mais pas par le cluster 4 correspondant aux LT non Tfh de la MO. Le récepteur CXCR4 permet au PC de se nicher dans la MO, l'expression de ce récepteur à chimiokine par les mTfh de la MO suggère que les deux types cellulaires pourraient partager la même niche (figure 25c).

L'analyse des gènes différentiellement exprimés dans ces différents clusters, représentée sous forme de heatmap, montre que le cluster commun, le cluster 0, exprime *Foxp3* ainsi que d'autres gènes codant pour des molécules régulatrices comme *Ctla4* ou *Tnfrsf18* (codant pour GITR) (figure 25d.). Le cluster 0 correspond alors à des Treg ou des Tfr dans les groupes de cellules CXCR5<sup>+</sup>. Cela met en évidence la présence de Tfr dans la MO.

Des analyses par cytométrie en flux nous ont permis de confirmer ce résultat (figure 25f.). Ces cellules régulatrices  $\text{Foxp3}^+$  expriment également *Cxcr4* (figure 25c). Or, les Treg peuvent partager la niche avec les PC dans la MO<sup>310</sup>. Les mTfh de la MO pourraient alors partager la niche à la fois des PC et des Treg. Cette proximité spatiale pourrait permettre à ces trois types cellulaires d'interagir.



**Figure 25 : Les mTfh de la MO expriment Sostdc1.** Analyse transcriptomique en scRNAseq de cellules CXCR5<sup>+/ou-</sup> issus des OLIId ou de la MO 90 jours après l'immunisation des souris en sous-cutané. Les données ont été analysées avec l'outil Seurat sur R. Séparation des cellules en 5 clusters, un caractéristique de chaque échantillon et un commun à tous. Représentation sous la forme de t-SNE (a.) et quantification des cellules par cluster et par échantillon. (b.) Expression moyenne normalisée, de Bcl6, Il21, Pdc1, Icos, Cxcr5, Cxcr4 et Ccr7, par cluster, représentés sur une heatmap (c.) Heatmap des gènes différentiellement exprimés par chaque cluster. (d.) Violin Plot du niveau d'expression de Sostdc1 dans chaque cluster. (e.) Contour Plots de l'analyse par cytométrie en flux de l'expression de CXCR5 et Foxp3 dans les LT CD4<sup>+</sup> des OLIId et de la MO de souris immunisées (J90 post-immunisation). (f.)

La poursuite de l'analyse des gènes différentiellement exprimés dans les différents clusters, en se focalisant sur le cluster 2 (mTfh de la MO), révèle que ces cellules expriment fortement *Sostdc1* (figure 25e.). L'expression de ce gène a été rapportée par *Wu et al* dans les des Tfh des OLIId. Ces Tfh SOSTDC1<sup>+</sup> n'apportent pas d'aide aux LB durant le CG mais favorisent la différenciation de Tfr, en bloquant la voie Wnt- $\beta$ -caténine<sup>292</sup>. Il est possible que les mTfh de la MO exprimant SOSTDC1 puissent avoir un rôle similaire et interagir avec les Treg et favoriseraient leur maintien dans la MO.

L'outil Nichenet permet, à partir du transcriptome, de prédire les interactions entre les cellules. Il se base sur l'expression de ligands par des cellules donneuses et des récepteurs correspondants par les cellules receveuses, mais également des gènes induits par ces interactions. Nous avons donc pu comparer les interactions entre les mTfh de la MO et les Treg (et Tfr) de la MO et celles entre les mTfh locaux des OLIId et les Treg (et Tfr) des OLIId (tableau 1). En se basant sur les 30 ligands présentant le score le plus élevé, nous pouvons constater que, dans un premier temps, les mTfh de la MO interagissent plus avec les Treg que les mTfh locaux, ou du moins, qu'ils expriment plus de ligands susceptibles d'interagir avec les Treg (figure 26a.).

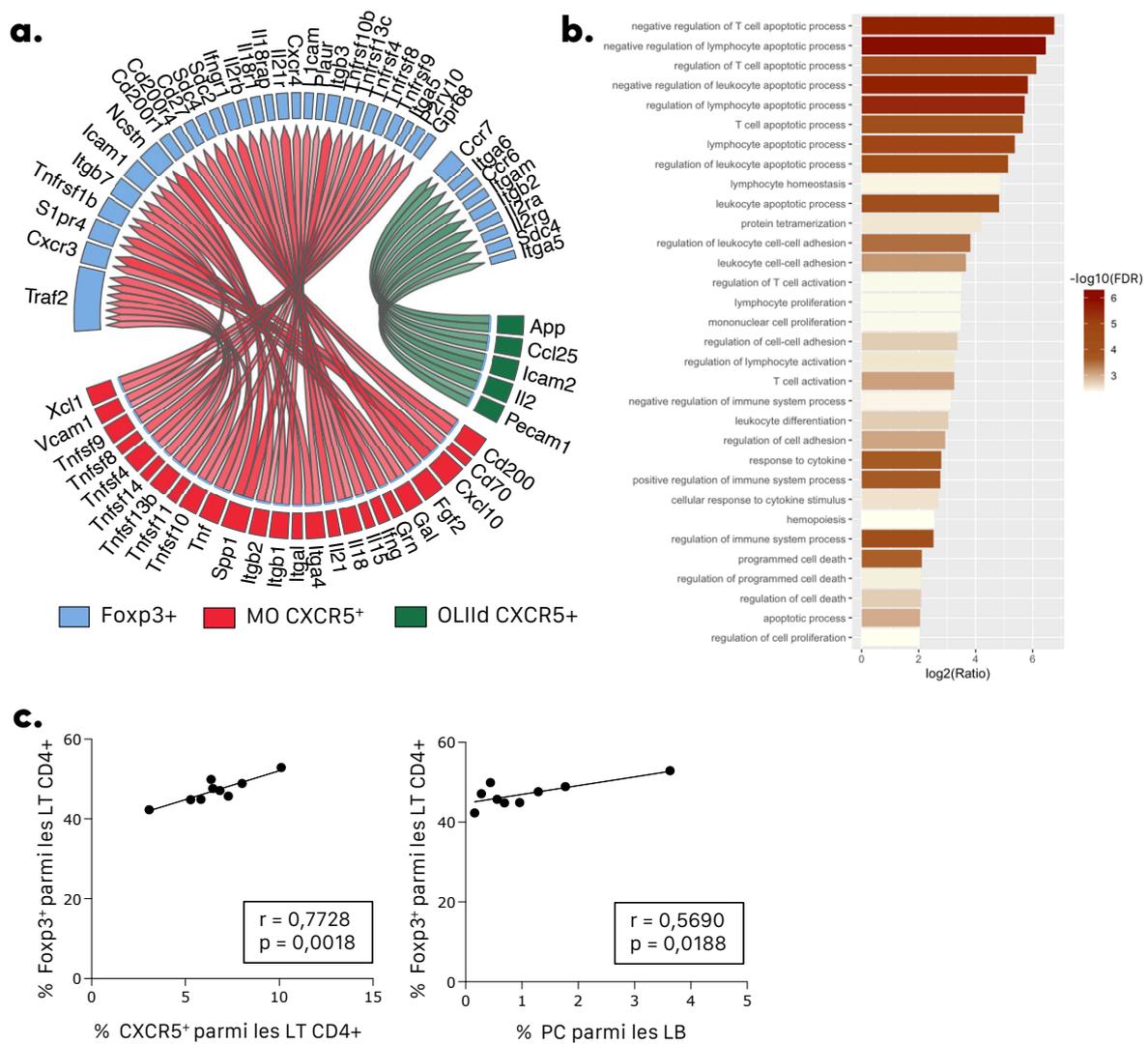
Ligand	Niche	Donneur	Receveur	Prioritization_score
Cxcl10	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,856651716
Spp1	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,851315045
Ifng	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,806448378
Il21	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,793411373
Fgf2	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,763120647
Cd200	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,761373358
Icam2	niche_OLlId	c1_OLlId	c0_OLlId	0,741108748
Tnf	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,73747305
Tnfsf11	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,729216407
Itgal	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,725467758
Tnfsf8	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,721340686
Grn	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,708675773
Tnfsf4	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,696955409
Il2	niche_OLlId	c1_OLlId	c0_OLlId	0,690341849
Tnfsf9	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,682355102
Itga4	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,675300085
Il15	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,674164202
Pecam1	niche_OLlId	c1_OLlId	c0_OLlId	0,674039689
Itgb2	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,672504779
Tnfsf14	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,667303981
App	niche_OLlId	c1_OLlId	c0_OLlId	0,666501005
Il18	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,66271663
Vcam1	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,659416941
Tnfsf13b	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,658575157
Tnfsf10	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,650909543
Itgb1	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,649292017
Cd70	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,647318159
Gal	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,646235776
Xcl1	niche_MO	c2_MO	c0_MO	0,643393063
Ccl25	niche_OLlId	c1_OLlId	c0_OLlId	0,639884736

**Tableau 1 : Tableau 30 ligands des mTfh de la MO (c2) ou des OLlId (c1) avec le plus haut « prioritization score », prédits par Nichenet pour interagir avec des récepteurs exprimés par les cellules Foxp3+ de la niche MO ou OLlId.**

Si l'on s'intéresse ensuite aux gènes cibles de ces interactions (tableau 2), des analyses ORA (*over representation analysis*) montrent qu'ils participent principalement à des voies de régulation négative de l'apoptose (figure 26b.). Par conséquent, les mTfh de la MO favoriseraient la survie des Treg dans la MO. Nos observations en cytométrie en flux vont également dans ce sens. En effet, on observe une corrélation positive entre les mTfh et les cellules Foxp3<sup>+</sup> dans la MO (figure 26c.).

Gènes cibles			
Ahnak	S100a10	Lilr4b	Cd69
Aldoa	Ccl5	Anxa2	Lsp1
Dusp1	Cd74	Hif1a	Rgs16
Fos	Ifngr1	Ctla4	Rhob
Fosb	Tnfrsf4	Cyba	Ier5l
Gapdh	Tnfrsf9	Gpx4	Emp3
Jund	Tsc22d3	Il7r	Mdh1
Klf6	Ucp2	Cd3e	Hmgb1
Pfn1	Batf	Itga4	Hist1h1c
Tagln2	Lag3	Asb2	H2afz

**Tableau 2 : Gènes cibles des interactions prédites par NicheNet entre les mTfh de la MO et les Treg (et Tfr) de la MO.**



**Figure 26 : Les mTfh de la MO participent à la survie des PC en favorisant celle des Treg.** Circo Plot qui représente des prédictions d'interactions entre des ligands exprimés par les mTfh de la MO (en rouge) ou des OLIId (en vert) avec les récepteurs exprimés par les LT Foxp3<sup>+</sup> de la MO ou des OLIId respectivement. Il a été réalisé à partir des données de scRNAseq présentées dans la figure précédente, à l'aide de l'outil Nichenet sur R (a.). Histogramme des groupes fonctionnels de gènes liés à ces interactions dans les cellules Foxp3<sup>+</sup> de la MO d'après une analyse ORA sur les gènes cibles des interactions identifiées via Nichenet (b.). Corrélations positives, de gauche à droite, entre la fréquence de cellules Foxp3<sup>+</sup> parmi les LT CD4<sup>+</sup> et celle des cellules CXCR5<sup>+</sup> parmi les LT CD4<sup>+</sup>, et entre la fréquence de cellules Foxp3<sup>+</sup> parmi les LT CD4<sup>+</sup> et celle des PC (CD138<sup>+</sup>) parmi les LB (CD19<sup>+</sup>). D'après une analyse par cytométrie en flux de la MO de souris à J100 post-immunisation (c.).

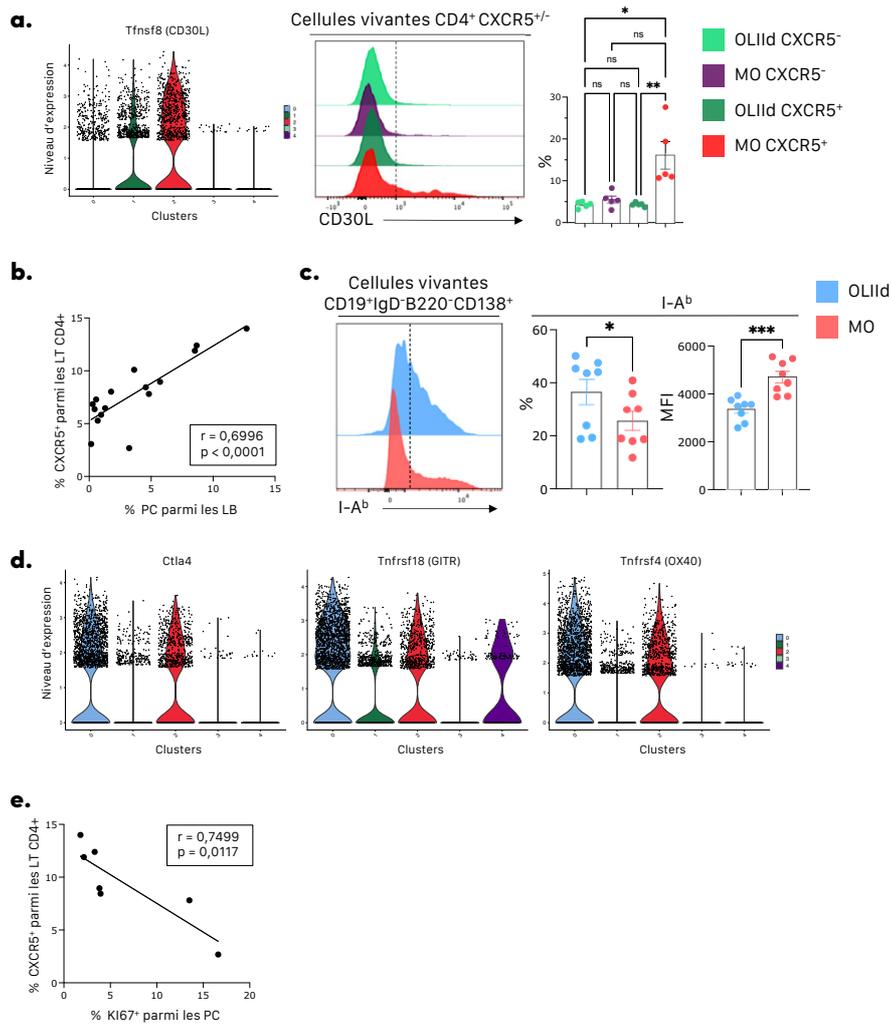
Les Treg sont des cellules importantes dans la niche plasmocytaire, ils permettent notamment la survie des PC<sup>310</sup>. Cela peut s'illustrer par la corrélation positive que nous observons entre la fréquence des Treg et celle des PC dans la MO (figure 26c.). En favorisant la survie des Treg, les mTfh de la MO participeraient indirectement au maintien de la niche.

Les mTfh de la MO expriment aussi CD30L qui suggère des interactions directes avec les PC qui expriment son récepteur CD30 (figure 27a.). Or l'engagement de CD30 dans les PC favorise leur survie et leur production d'Ac<sup>311</sup>. L'expression de CD30L par les mTfh de la MO leur permettrait de soutenir la survie des PC. Nos résultats de cytométrie en flux montrent une corrélation positive entre la fréquence des mTfh et celle des PC dans la MO 100 jours après l'immunisation de la souris (figure 27b.). Toutefois, il ne s'agit que d'une corrélation, cela ne permet pas d'affirmer que les mTfh soutiennent directement les PC ou qu'il s'agit d'un soutien indirect qui passe par les Treg (figure 26).

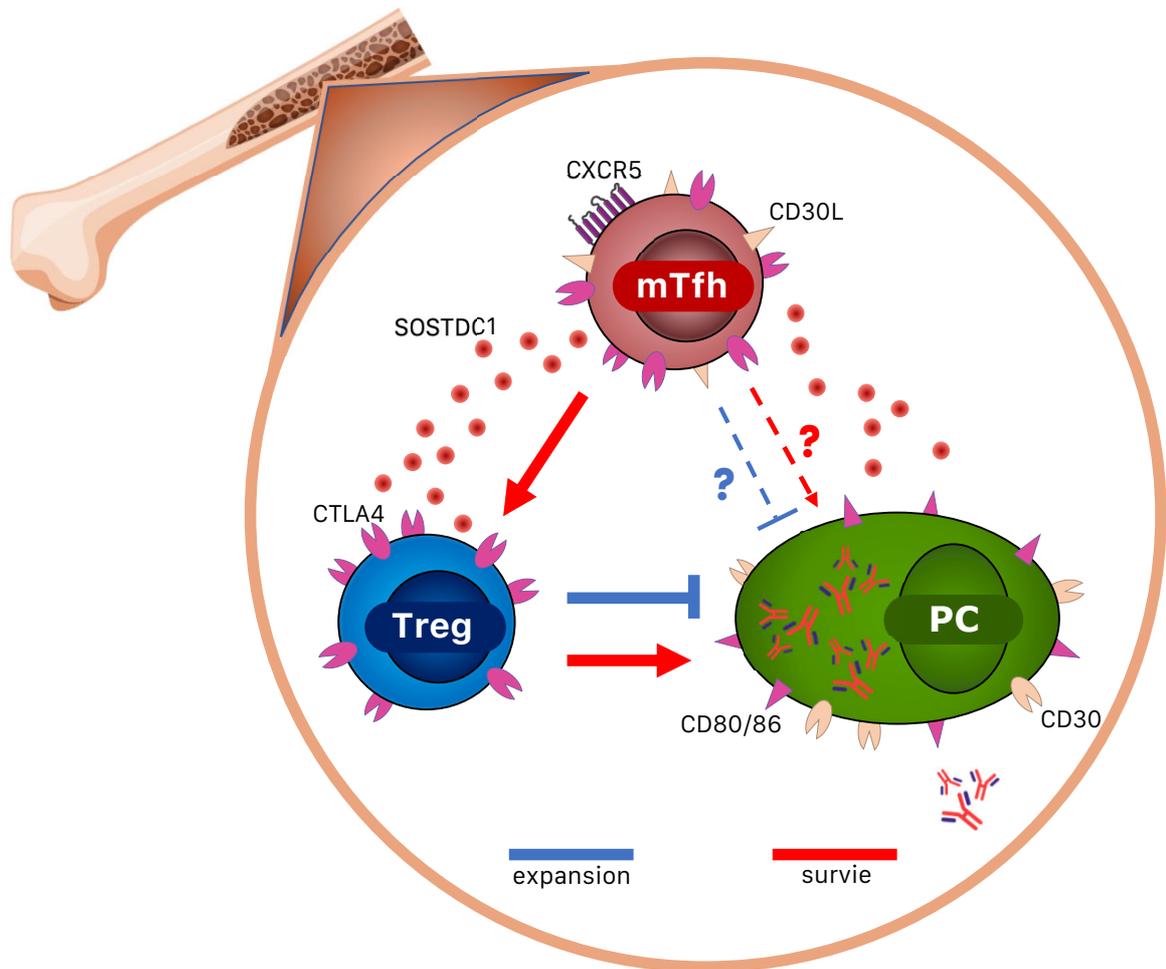
En étudiant les PC de souris immunisées (100 jours post-immunisation), nous avons observé l'expression du CMH-2 (I-A<sup>b</sup>) par les PC des OLId et de la MO. La fréquence de PC exprimant I-A<sup>b</sup> dans la MO est plus faible que dans les OLId, mais ils l'expriment à un niveau plus élevé dans la MO par rapport aux OLId (figure 27c.). La reconnaissance des complexes CMH-2/peptides à la surface des PC par les TCR à la surface des mTfh dans la MO, pourrait être un autre moyen d'interaction directe entre ces deux types cellulaires qui pourrait impacter à la fois les PC et les mTfh de la MO.

Les mTfh de la MO présentent un phénotype proche de celui des Treg dans la MO, ils expriment plusieurs des gènes codant pour des molécules effectrices de ces derniers comme CTLA4, GITR ou OX40L (figure 27b). Les Treg de la MO favorisent la survie des PC mais leur expression de molécules effectrices, particulièrement CTLA4, leur permet de limiter l'expansion des PC et de garantir l'équilibre de la niche<sup>310</sup>. De la même manière, les mTfh de la

MO pourraient favoriser la survie des PC, soit indirectement en agissant sur les Treg, soit directement *via* des interactions CD30L-CD30 et la sécrétion de SOSTDC1, un inhibiteur des facteurs apoptotiques BMP (*bone morphogenic protein*)<sup>312</sup>. La corrélation positive entre la fréquence des mTfh et celle des PC dans la MO suggère fortement que les mTfh participent à la survie des PC. Cependant, elle ne permet pas de déterminer si ce signal de survie passe par un impact direct sur les PC, indirect *via* les Treg ou par les deux mécanismes combinés. Les mTfh de la MO pourraient aussi réguler l'expansion des PC *via* l'expression de molécules régulatrices, comme CTLA4. D'après nos résultats, plus la fréquence de mTfh dans la MO est élevée, plus celle des PC qui prolifèrent (Ki67<sup>+</sup>) est faible (figure 27e.). Cette corrélation indique que les mTfh de la MO participent à la régulation de l'expansion des PC. Cependant, il est impossible de dire à ce stade si cette régulation se produit de manière directe ou indirecte.



**Figure 27 : Les mTfh de la MO pourraient agir directement sur les PC.** Violin Plot de l'expression de *Tnfsf8* (CD30L) suite à notre analyse transcriptomique, histogramme de l'expression de CD30L analysée par cytométrie en flux dans les OLIIId ou la MO de souris immunisées (100 jours post-immunisation), puis quantification dans cette analyse de cytométrie en flux, de la fréquence des cellules CD30L<sup>+</sup> parmi les cellules CXCR5<sup>+</sup> dans les OLIIId ou la MO. (a.) Corrélation positive entre la fréquence de cellules CXCR5<sup>+</sup> parmi les LT CD4<sup>+</sup> et celle de PC parmi les LB, analysé par cytométrie en flux de la MO de souris immunisées (100 jours post-immunisation). (b.) Expression de I-A<sup>b</sup> par les PC des OLIIId et de la MO de souris immunisées (100 jours post-immunisation), Histogramme à gauche, fréquence des cellules I-A<sup>b</sup> parmi les PC au centre, puis MFI de I-A<sup>b</sup> dans les PC I-A<sup>b</sup>+. (c.) Violin Plot de l'expression de *Ctla4*, *Tnfrsf18* (GITR) et *Tnfrsf4* (OX40) dans les différents clusters caractérisés lors de l'analyse transcriptomique. (d.) Corrélation positive entre la fréquence de cellules CXCR5<sup>+</sup> parmi les LT CD4<sup>+</sup> et celle de cellules Ki67<sup>+</sup> parmi les PC, analysé par cytométrie en flux de la MO de souris immunisées (90 jours post-immunisation). (e.) \* : p-value < 0,05 ; \*\* : p-value < 0,01.



**Figure 28 : Résumé graphique.** Les mTfh de la MO participent à l'équilibre de la niche plasmocytaire en favorisant la survie des Treg via la production de SOSTDC1 notamment. Les Treg quant à eux favorisent la survie des PC mais limitent leur expansion. Les mTfh pourraient également interagir directement avec les PC et soutenir leur survie via le CD30L et réguler leur expansion via le CTLA4, à la manière des Treg.



# DISCUSSION



# Les Treg promeuvent la capacité des DC à induire la différenciation des Tfh

Dans le premier axe de mes travaux de thèse, je me suis intéressé au rôle des Treg dans la différenciation des LT naïfs en pré-Tfh. Les Treg ont longtemps été considérés comme des régulateurs négatifs de la réponse immune mais il est maintenant établi que leur rôle est plus complexe que supposé. Ils peuvent aussi promouvoir des réponses immunes quantitativement ou qualitativement, y compris la réponse humorale.

Selon *Leon et al*, l'absence de Treg durant la mise en place des CG conduit à une diminution du nombre de LB du CG totaux et de façon encore plus importante pour les LB du CG spécifiques des protéines virales. Cet impact sur les LB est en réalité lié à l'impact des Treg sur le développement des Tfh. En absence de Treg, la fréquence des Tfh spécifiques des protéines virales est moins importante. Les Treg favorisent donc la différenciation ou le développement des Tfh. Ils ont aussi pu identifier le mécanisme impliqué. L'IL-2 est une cytokine importante à la survie de la plupart des LT, mais elle inhibe la différenciation des Tfh<sup>148</sup>. Or, les Treg expriment un niveau important d'IL-2R $\alpha$  à leur membrane qui leur permet de capturer l'IL-2 environnant, et de protéger les Tfh de l'inhibition de cette cytokine sur leur programme de différenciation<sup>144,307</sup>. Pour pouvoir mettre en évidence cette nouvelle fonction des Treg, les auteurs se sont appuyés sur un modèle de déplétion inductible des Treg. Ils ont utilisé des souris Foxp3-DTR. Dans ces souris, les cellules Foxp3+, donc principalement des Treg, expriment le DTR. Un traitement en à la DTX permet de dépléter spécifiquement les cellules Foxp3+. Pour cette étude, ils ont réalisé des injections à différents temps après l'infection des souris de manière à obtenir une déplétion des Treg de 10 à 12 jours après l'infection. A ce temps d'analyse, les Tfr, cellules

exprimant Foxp3 et contrôlant les réactions du CG, peuvent aussi être déplétées en plus des cellules Treg. Par conséquent, ce modèle permet d'évaluer les fonctions des cellules Foxp3<sup>+</sup> sur le développement et/ou le maintien des Tfh de façon globale jusqu'au CG. Cependant, il ne permet pas d'évaluer le rôle des Treg au moment de la différenciation des Tfh.

Dans ce contexte, nous avons adapté ce modèle de souris Foxp3-DTR de manière à obtenir une déplétion transitoire seulement pendant la phase précoce de la réponse immunitaire. Avec des injections aux jours -1 et 0 de l'immunisation, nous observons une déplétion des Treg seulement sur les trois premiers jours post-immunisation. De cette façon, les Tfr ne sont pas impactés car ils ne se différencient qu'après ce laps de temps. Plus précisément, nous avons comparé la cinétique et la fonctionnalité des Tfr issus de souris sauvages ou Foxp3-DTR et nous n'avons constaté aucune différence aussi bien sur le nombre de ces cellules que sur leur fonctionnalité *in vitro*. Ce modèle semble donc approprié pour étudier le rôle des Treg dans les étapes précoces de la différenciation des Tfh. Ainsi, nous avons constaté une diminution de la réponse Ac, de la fréquence et du nombre de pré-Tfh en absence de Treg. Chez l'humain, nos résultats vont également dans ce sens. Dans le sang de sujets vaccinés contre le SARS-CoV-2, nous observons une corrélation positive et significative entre la fréquence des Treg avant vaccination et le titre d'Ac spécifiques de la Spike du virus après vaccination. Nous avons également observé dans des organes lymphoïdes secondaires (amygdales), une corrélation significative entre la fréquence de Treg et celle de pré-Tfh. Au global, nos résultats suggèrent que les Treg contribuent positivement à la différenciation des pré-Tfh chez l'humain comme chez la souris.

Contrairement à la différenciation terminale des Tfh, la différenciation des LT naïfs en pré-Tfh n'est pas dépendante du facteur de transcription Bcl6. L'expression de CXCR5 lors de la différenciation en pré-Tfh est essentielle pour que ce dernier se localise à la frontière T-B.

Cette expression de CXCR5 est d'abord médiée par Ascl2<sup>139</sup>. Elle est ensuite soutenue et amplifiée par Bcl6 lors de la différenciation du pré-Tfh en Tfh, permettant aux cellules de migrer à l'intérieur du follicule B. Les LT CD4<sup>+</sup> déficients pour Bcl6 peuvent alors se différencier en pré-Tfh CXCR5<sup>+</sup> mais pas en Tfh du CG. Lorsque nous transférons ces LT CD4<sup>+</sup> Bcl6 déficients dans des souris receveuses déplétées en Treg, la diminution de la fréquence de cellules T CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> dans les cellules transférées est toujours observée. Les résultats sont comparables, que les cellules soient Bcl6 compétentes ou déficientes. Les Treg agissent alors en amont de l'expression de Bcl6, en favorisant la différenciation des pré-Tfh.

Nous nous sommes ensuite concentrés sur le ou les mécanismes mis en jeu par les Treg en se focalisant sur les DC. Les DC et plus précisément les cDC2 sont responsables de l'activation et de la différenciation des LT naïfs en pré-Tfh<sup>132</sup>. Dans notre modèle d'étude, nous constatons une réduction du nombre de DC en absence de Treg sans que cela n'affecte la représentation des différentes sous-populations de DC. Il a été décrit que la différenciation en cellules effectrices Tfh est favorisée lorsque les cellules T naïves expriment un TCR de haute-affinité pour le complexe CMH-2/peptide<sup>66,313</sup>. L'absence de Treg induit une baisse du nombre DC dans les OLI drainants le site d'immunisation. L'activation des cellules Tfh en absence de Treg aurait alors pu être favorisée puisque ces cellules expriment un TCR de haute affinité, donc plus susceptible d'interagir avec les DC dans un contexte de compétition avec d'autres LT. Toutefois, nous observons que l'expression de surface des molécules de CMH-2 et de costimulation (CD80, CD86) par les DC est comparable dans les deux conditions expérimentales. Cela suggère un niveau de maturation équivalent. Pour contourner le biais lié au nombre de DC et évaluer la capacité des DC à promouvoir la différenciation des pré-Tfh, nous avons utilisé un modèle de transfert dans des souris dépourvues de LT. Nous avons co-transféré dans ces dernières des DC issues de souris avec ou sans Treg en nombre égal et chargées préalablement avec la même quantité de peptide E $\alpha$ 1, et des LT CD4<sup>+</sup> naïfs porteurs de TCR

transgéniques spécifiques du complexe I-A<sup>b</sup>/E $\alpha$ 1. Dans ce modèle, les DC ont des capacités comparables d'activation des cellules T naïves, car on retrouve autant de cellules T activées dans les OLIId drainants. En revanche, les LT transférés se différencient davantage en pré-Tfh et Tfh lorsque les DC proviennent de souris en présence de Treg. Ces données suggèrent que les Treg favorisent la capacité intrinsèque des DC à induire la différenciation des Tfh.

En explorant le phénotype de ces cDC2 par des approches de cytométrie en flux et transcriptomique par scRNAseq, nous avons révélé une surexpression de CCR7 à la surface de ces cellules en l'absence de Treg. Ceci a pour conséquence de baisser le ratio CXCR5/CCR7 qui dicte le positionnement de ces cellules dans l'OLIId. Plus ce ratio est élevé, plus la cDC2 est proche du follicule B (ou dans le follicule B), plus il est faible, plus la cDC2 est éloignée du follicule B et cantonnée au cœur de la zone T. En absence de Treg, les cDC2 exprimant plus de CCR7 à leur surface s'éloigneraient de la frontière T-B. Cette hypothèse a pu être testée par une analyse en microscopie confocale des OLIId de souris immunisées en présence ou absence de Treg qui a montré que les Treg modulent la localisation des cDC2 dans l'OLIId en limitant l'expression de CCR7. Or, le positionnement de la cDC2 au niveau de la frontière T-B est essentiel à une différenciation efficace des Tfh.

Notre analyse transcriptomique appuyée par le logiciel d'analyse IPA, nous a mis sur la piste d'un potentiel responsable de l'augmentation de CCR7, l'IL-2. En effet, IPA prédit qu'une signalisation induite par l'IL-2, via la phosphorylation de STAT5, pourrait conduire à l'augmentation de CCR7 que nous observons. Toutefois, aucune signalisation par l'IL-2R n'a été rapportée dans les cDC2 murines jusqu'à présent. L'expression de l'IL-2R $\alpha$  par les DC et plus précisément les cDC2 a été associée à plusieurs fonctions. La première consiste en la capture de l'IL-2 environnant du milieu afin de le trans-

présenter aux LT qu'elle active. Ainsi les LT rencontrent efficacement l'IL-2, ce qui conduit à une forte signalisation *via* leur IL-2R et favorise ainsi leur survie<sup>47</sup>. C'est le cas pour la plupart de LT mais pour les Tfh au contraire, l'IL-2 inhibe leur développement. Néanmoins, cette expression de l'IL-2R $\alpha$  peut aussi favoriser les Tfh. Les cDC2 peuvent capturer l'IL-2 grâce à leur IL-2R $\alpha$  de surface mais elles peuvent également libérer de l'IL-2R $\alpha$  clivé qui va bloquer l'IL-2 et en préserver les Tfh<sup>314</sup>. Dans les cDC2 murines, aucune signalisation *via* l'IL-2 n'a été rapportée parce qu'elles n'expriment pas la totalité des sous-unités composant l'IL-2R de forte affinité. Ce dernier est composé des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Cette dernière sous-unité est commune à plusieurs récepteurs de cytokines. La sous-unité  $\alpha$  permet de capter l'IL-2 efficacement, alors que les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont impliquées dans la transduction du signal dans la cellule. Le complexe IL-2R $\beta/\gamma$  est considéré comme un récepteur de l'IL-2 d'affinité intermédiaire. Mes travaux de thèse ont mis en évidence l'expression, au niveau transcriptomique et protéique, des sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  de l'IL-2R mais pas de la sous-unité  $\beta$  dans les cDC2 murines. Les cDC2 n'expriment donc pas l'IL-2R de forte affinité mais elles possèdent la sous-unité responsable de la capture de l'IL-2 et une responsable de la signalisation. Les cDC2 seraient alors capables d'induire un signal lié à l'IL-2. Par un traitement *in vitro* de ces cellules à l'IL-2, nous avons démontré que cette stimulation induit la phosphorylation de STAT5 dans les cDC2 visualisée par cytométrie en flux et la translocation de STAT5 phosphorylé dans le noyau des cDC2 par cytométrie en image. Ces observations concordent avec les résultats obtenus à partir de DC humaines<sup>51</sup>. En plus d'être capturé par la cDC2, l'IL-2 peut donc y induire un signal responsable, ou au moins impliqué, dans l'augmentation de l'expression de CCR7 observée en absence de Treg. Les Treg capturent l'IL-2 environnant, ce qui prive les cDC2 de cette signalisation et leur permet ainsi de se positionner à la frontière T-B.

De plus, nous avons montré qu'un traitement des DC *in vitro* par l'IL-2 modifie également les capacités de ces cellules à induire la différenciation des Tfh. Lorsque des DC traitées ou non avec de l'IL-2 sont transférées, de la même manière que présenté précédemment, les DC traitées à l'IL-2 induisent une différenciation moins importante des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en Tfh. Ces résultats ont été observés lors d'un traitement *in vitro* des DC par IL-2 mais également par DC après traitement *in vivo* des souris par l'IL-2. On observe une diminution de la fréquence et du nombre de Tfh lorsque les souris sont traitées avec des injections d'IL-2 aux jours -1 et 0 de l'immunisation. L'augmentation de l'IL-2 dans les temps précoces, avant même l'initiation de la différenciation des Tfh, réduit la capacité des DC à promouvoir la différenciation des Tfh.

L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer le modèle selon lequel les Treg, en capturant l'IL-2 dans les OLIId, en réduisent l'accessibilité pour les cDC2. Elles ne reçoivent alors pas de signal via cette cytokine et n'augmentent pas leur expression de CCR7. Elles se positionnent au niveau de la frontière T-B et induisent plus efficacement la différenciation de Tfh. Cela favorise à terme, une réponse anticorps plus abondante et efficace.

La capture de l'IL-2 n'est certainement pas l'unique mécanisme par lequel les Treg modulent les fonctions des cDC2. En plus d'une signalisation de l'IL-2, notre analyse transcriptomique met en évidence d'autres voies de signalisation impactées positivement ou négativement, par l'absence des Treg. Par exemple, en absence de Treg, les gènes de la voie de signalisation de l'IL-10 dans les cDC2 sont moins exprimés. Les Treg sont de gros producteurs d'IL-10, il paraît alors cohérent que la signalisation liée à cette cytokine soit réduite dans les cDC2 en absence de Treg. De plus, cette cytokine est généralement décrite comme une cytokine régulatrice ou inhibitrice, mais il est maintenant admis que son rôle est plus ambigu. Dans le cadre d'une infection virale, la production d'IL-10 par les Tfr augmente l'amplitude des CG, elle favorise ainsi la réponse humorale et ne l'inhibe pas.

La signalisation de l'IL-10 dans les cDC2 pourrait alors également avoir un effet bénéfique sur la réponse Ac mais cela reste à explorer.

En absorbant l'IL-2, les Treg privent les DC de la signalisation via l'IL-2R, ce qui favorise leurs capacités à induire la différenciation des Tfh. Moduler le signal IL-2 dans les DC permettrait alors d'augmenter la différenciation des Tfh et donc l'intensité et la qualité de la réponse Ac. Dans un contexte de pathologies menant à une réponse Ac incontrôlée, il paraît illusoire de chercher à réduire la production d'Ac en réduisant la différenciation des Tfh. Ces derniers sont déjà différenciés. Par contre, pour amplifier ou amorcer une réponse suite à une infection ou une vaccination, induire la différenciation de Tfh pourrait être intéressant. Pour ne prendre que l'exemple de la vaccination, il faudrait bloquer la signalisation de l'IL-2 dans les DC dans les temps précoces après l'injection du vaccin. Bloquer le signal de l'IL-2 de manière générale avec une injection d'anticorps anti-IL-2R aurait des conséquences néfastes sur la réponse immune dans son ensemble puisque l'IL-2 participe à l'activation de la plupart des LT. Il faudrait alors bloquer le signal spécifiquement dans les DC. Plusieurs outils pourraient être utilisés, comme des Ac bispécifiques pour l'IL-2R et pour un marqueur de DC, CD11c par exemple. L'Ac se fixerait alors sur l'IL-2R des DC, ce qui bloquerait son activité. Un autre moyen serait un Ac anti-CD11c (ou autre molécule spécifique des DC) couplé à un antagoniste de l'IL-2R. Là encore, l'Ac se fixerait sur la DC et l'antagoniste pourrait bloquer spécifiquement l'IL-2R sur la DC. Ainsi, on peut envisager l'injection d'un de ces deux outils en même temps que l'émulsion vaccinale pour favoriser la différenciation des Tfh et, par conséquent, une réponse Ac plus efficace.



## Les mTfh de la MO

Avant de discuter la seconde partie de mes travaux, je tiens à me préciser que certains des résultats présentés sont encore préliminaires et doivent être reproduits.

Cette partie de mes travaux de thèse a mis en évidence la présence de mTfh dans la MO à la fois chez la souris et chez l'humain. La diversité du compartiment mémoire des Tfh est largement établie (tableau 3). Il existe des mTfh locaux dans les OLII drainants le site d'immunisation, des cTfh activés ou non et des Trh. Ces différentes populations de mTfh se distinguent par des localisations, des phénotypes et des fonctions différents.

Les mTfh locaux vont rapidement s'expandre après une nouvelle rencontre avec l'Ag. La fréquence de LT spécifiques de l'Ag étant bien supérieure dans les mTfh par rapport aux LT naïfs. Les mTfh locaux permettent une réponse plus rapide et plus efficace. Des cocultures de mTfh locaux OTII (spécifiques du peptide immunodominant de la protéine OVA) avec des LB préalablement activés et chargés avec le peptide spécifique des OTII, ont permis de démontrer que les mTfh locaux induisent préférentiellement la différenciation des LB en PC plutôt qu'en LB du CG. Lorsque les mTfh locaux n'interagissent plus avec une CPA et ses complexes CMH-2/peptide, ils quittent l'OLII et enrichissent le pool de cTfh<sup>215</sup>. Les cTfh circulent dans tout l'organisme *via* la lymphe et le sang. Lors d'une nouvelle rencontre avec l'Ag, ils migrent dans les OLII afin de soutenir et amplifier rapidement les réactions du CG et donc la réponse Ac. Contrairement aux mTfh locaux, les cTfh favorisent la différenciation des LB en LB du CG<sup>215</sup>. Les Trh, enfin, ne circulent pas du tout dans l'organisme, ils restent dans les TNL. Lorsqu'ils rencontrent à nouveau l'Ag dans leur TNL, ils favorisent la mise en place d'une réponse B et la production d'Ac *in situ*<sup>224</sup>. Cette nouvelle

population de mTfh de la MO que nous décrivons, apporte un niveau de diversité supplémentaire.

	mTfh locaux	cTfh	Trh
localisation	OLII	tout l'organisme (circulants)	TNL
phénotype	FR4 <sup>+</sup> CCR7 <sup>-/intermédiaire</sup> CD69 <sup>+</sup> PD-1 <sup>intermédiaire</sup>	FR4 <sup>+</sup> CCR7 <sup>faible/+</sup> CD69 <sup>-</sup> PD-1 <sup>-/intermédiaire</sup>	FR4 <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup> CD69 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup>
fonctions	- Réponse secondaire - Différenciation des LB en PC - Réservoir pour les cTfh	- Réponse secondaire - Différenciation des LB en LB du GC	- Réponse secondaire - Activation de la réponse B et production d'Ac <i>in situ</i>

**Tableau 3 : Localisation, phénotype et fonctions des trois sous-population de mTfh décrites dans la littérature : mTfh locaux, cTfh et Trh.**

D'un point de vue phénotypique, les mTfh de la MO ressemblent aux Trh. Ils expriment fortement PD-1, CD69 ou encore FR4. Mais, il semblerait qu'ils possèdent des fonctions qui leurs soient propres. Nos résultats suggèrent qu'ils ne contribuent pas à la réponse secondaire. Dans nos expériences présentées, l'immunisation primaire et secondaire ont été effectuées par voie sous-cutanée, mais des résultats similaires sont obtenus en changeant la voie d'immunisation secondaire, avec une seconde immunisation en intrapéritonéal par exemple. Une immunisation en intraveineux, au cours de laquelle la MO pourrait être un organe drainant, serait intéressante pour évaluer si les mTfh de la MO sont capables de s'activer et de soutenir une réponse des LB *in situ*, à l'instar des Trh.

Une analyse transcriptomique en scRNAseq de populations de LT CD4<sup>+</sup> activés (CD44<sup>+</sup>) exprimant CXCR5 ou non, issus de la MO ou des OLId de souris immunisées, a mis en évidence une particularité de ces mTfh de la MO, l'expression de SOSTDC1. Ce résultat observé au niveau transcriptomique chez la souris reste à être confirmé au niveau protéique. SOSTDC1 est une molécule sécrétée qui rend sa détection par cytométrie en flux plus complexe. L'utilisation d'un modèle de souris rapportrice SOSTDC1-GFP semble être la meilleure option pour analyser son expression protéique, modèle utilisé par *Wu et al* pour identifier les Tfh exprimant SOSTDC1 dans les OLId de souris immunisées<sup>292</sup>. Des analyses transcriptomiques en scRNAseq de MO humaine sont en cours d'analyse en collaboration avec une équipe de recherche du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse. Elles nous permettront d'évaluer si les mTfh de la MO observés en cytométrie en flux expriment également SOSTDC1 chez l'humain. Dans les OLId, contrairement aux Tfh SOSTDC1<sup>-</sup>, ces Tfh qui expriment SOSTDC1 ne fournissent pas d'aide aux LB dans les réactions du CG. Dans un modèle murin dont les Tfh sont déficients pour SOSTDC1, une réduction de la représentation des Tfr est observée. Les Tfh SOSTDC1<sup>+</sup> interagissent avec les Tfr et favorisent leur développement et leur survie en bloquant la voie de signalisation Wnt-β-Caténine dans les Tfr. Via ce mécanisme, ils favorisent également la survie des Treg dans leur globalité puisque la voie Wnt-β-Caténine inhibe les Treg<sup>292</sup>.

Ce soutien aux Treg est également une fonction suggérée par notre analyse transcriptomique. En plus de SOSTDC1, l'outil Nichenet sur R prédit que les mTfh de la MO expriment les gènes codants pour de nombreux ligands de récepteurs exprimés par les Treg, au moins au niveau transcriptomique. Les gènes induits par ces interactions ligand/récepteur dans les Treg sont prédits pour être impliqués dans la régulation négative de l'apoptose. Ainsi, ces interactions favoriseraient la survie des Treg. Cette hypothèse est appuyée par la corrélation positive entre les fréquences observées en cytométrie en flux des cellules T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> et des cellules T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>

de MO de souris immunisées. Les Treg dans la MO promeuvent la survie des PC<sup>310</sup>. En favorisant la survie des Treg dans la MO, les mTfh favoriseraient indirectement la survie des PC à longue durée de vie nichés dans la MO et donc la production d'Ac sur le long terme.

Les mTfh de la MO pourraient aussi interagir directement avec les PC via l'expression de diverses molécules, à commencer par le CD30L exprimé fortement à la surface des mTfh de la MO. Les interactions du CD30L avec le CD30 à la surface des PC favoriseraient la survie de ces derniers ainsi que leur production d'Ac<sup>311</sup>. Ces interactions directes peuvent également être médiées par l'expression de molécules régulatrices, et particulièrement CTLA4. L'expression de CTLA4 est un mécanisme de régulation largement utilisé par les Treg. Les Treg de la MO expriment CTLA4, ce qui leur permet de limiter la prolifération des PC<sup>310</sup>. En exprimant cette molécule, les mTfh de la MO agiraient en cellules régulatrices de l'expansion des PC. D'autres mécanismes pourraient être impliqués, comme la production d'IL-21 par les mTfh de la MO. Cette cytokine pourrait agir sur les Treg porteurs de son récepteur. De manière générale, les mTfh de la MO participeraient à l'équilibre de la niche plasmocytaire.

Cette hypothèse se base principalement sur une analyse transcriptomique et des outils bio-informatiques. Pour déterminer réellement leurs fonctions, plusieurs approches sont possibles et sans doute nécessaires. D'abord, un modèle de déplétion des Tfh dans la phase mémoire de la réponse permettrait d'évaluer l'impact de l'absence de mTfh dans la MO sur les Treg, les PC, et sur le titre d'Ac circulants. Pour cela nous pouvons utiliser des souris CD4<sup>cre</sup>ERT2-Bcl6<sup>flox</sup>. Dans ce le modèle, un traitement au Tamoxifène induit l'activation de la Cre-recombinase dans les cellules CD4<sup>+</sup> puis l'excision de Bcl6 dans ces cellules. Cela conduit à la déplétion inductible et spécifique des Tfh. Un traitement au Tamoxifène dans la phase mémoire de la réponse permettrait d'éliminer les mTfh une fois que toutes

les cellules sont nichées dans la MO et d'évaluer l'impact de l'absence des mTfh de la MO sur la niche plasmocytaire.

La deuxième approche consiste en des co-cultures de mTfh de la MO ou des OLIId avec des Treg et/ou des PC de la MO. Ainsi nous pourrions évaluer l'impact direct des mTfh sur ces populations cellulaires. Afin de décrypter les mécanismes mis en jeu, des anticorps bloquants SOSTDC1, CD30L ou CTLA4 pourraient être utilisés.

L'expression de *Cxcr4* observée dans les mTfh de la MO *via* notre analyse transcriptomique suggère que les mTfh de la MO partagent la même niche que les Treg et les PC, qui expriment également *Cxcr4*. Cela faciliterait les interactions entre ces trois populations cellulaires. Des analyses microscopiques sur des coupes de MO seront nécessaires pour s'assurer que les mTfh se localisent dans la niche plasmocytaire.

Ces travaux s'intéressent principalement, pour ne pas dire exclusivement, à l'impact des mTfh de la MO sur les autres types cellulaires mais les interactions sont probablement réciproques. Les Treg et/ou les PC pourraient contribuer au maintien ou la localisation des mTfh dans la MO. Dans ce contexte, des résultats préliminaires du laboratoire montrent une réduction de la fréquence et du nombre de mTfh de la MO dans un modèle de déplétion des PC par injection d'un anticorps anti-CD138 (résultats non présentés).

Les interactions entre les différents acteurs cellulaires de la MO, parmi lesquels nous pouvons maintenant inclure les mTfh, mais aussi les Treg, les PC ou autres, garantissent l'équilibre de la niche plasmocytaire.



## Conclusion générale

L'ensemble de mes travaux de thèse s'est concentré sur la collaboration entre les Treg et les Tfh au cours de la réponse humorale. Lors de l'initiation de la réponse, les Treg favorisent la différenciation des pré-Tfh puis des Tfh et dans les temps tardifs de la mémoire immunitaire, les mTfh de la MO favoriseraient la survie des Treg. Il s'agit alors d'un partenariat efficace pour une réponse humorale intense et durable.

Une question demeure : Est-ce qu'une augmentation de la différenciation des pré-Tfh entraîne une augmentation de la quantité de mTfh dans la MO ? Cela semble probable si l'on part du postulat que les mTfh de la MO sont issus des Tfh ou pré-Tfh des OLId. Étudier l'ontogénie des mTfh de la MO paraît alors intéressant.

Un point qui pourrait nous apporter des indications sur l'ontogénie des mTfh de la MO, serait la cinétique d'apparition des mTfh dans la MO. Nous observons qu'elles apparaissent tardivement avec un pic cellulaire à partir de 90 jours après immunisation. Les mTfh locaux au niveau des OLII drainants, au contraire, diminuent progressivement. Une des hypothèses serait que les précurseurs des mTfh de la MO proviennent des OLId. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions bloquer la sortie en phase mémoires des mTfh des OLId avec du FTY720 pour évaluer si le compartiment mTfh de la MO est impacté.

Nous pourrions aussi faire une analyse de trajectoire cellulaire à partir de nos données de scRNAseq. Cela nous donnera une première indication si oui ou non les mTfh de la MO proviennent des Tfh des OLIId. Néanmoins, s'ils ne se différencient pas à partir des Tfh mais à partir des pré-Tfh, alors nous ne pourrions pas le déterminer par notre analyse bio-informatique car cette population est absente de notre jeu de données.

Enfin, un autre moyen d'évaluer si la différenciation des pré-Tfh est liée à la quantité de mTfh dans la MO est de moduler la différenciation des pré-Tfh avec un traitement des DC à l'IL-2 ou anti-IL-2 et mesurer la fréquence et le nombre de mTfh dans la MO. Si ce lien est avéré alors, le traitement avec des Ac bispécifiques ou des Ac couplés avec un antagoniste de l'IL-2R serait particulièrement intéressant dans le cadre de la vaccination puisqu'il permettrait non seulement d'obtenir une réponse humorale plus intense, mais également plus durable.

Dans leur globalité, mes travaux de thèses ont mis en lumière des nouvelles relations les Treg et les Tfh. Dans ce partenariat, que ce soit au moment de l'initiation de la réponse ou pendant la phase mémoire, les Treg ne présentent pas les fonctions de suppression classiques pour lesquelles ils ont été décrits, mais ils participent positivement à la réponse. De la même manière, nous avons mis en évidence une fonction non classique des mTfh de la MO : ils n'apportent pas d'aide aux LB pour la génération de CG mais permettent la survie des Treg et des PC. Mes travaux apportent de nouvelles connaissances sur le lien étroit entre les Treg et les Tfh, cependant, il reste encore à élucider les mécanismes de cette coopération et son impact sur la fine régulation de la réponse humorale.

# RÉFÉRENCES



1. Canoui, E. & Launay, O. History and principles of vaccination. *Rev. Mal. Respir.* **36**, 74–81 (2019).
2. Elwood, J. M. Smallpox and its eradication. *J. Epidemiol. Community Heal.* **43**, 92–92 (1989).
3. Stebegg, M. *et al.* Regulation of the germinal center response. *Front. Immunol.* **9**, 1–13 (2018).
4. Hjernø, K. & Peter, H. *PeptideAntibodies. Methods in Molecular Biology* vol. 1348 (2015).
5. Lu, L. L., Suscovich, T. J., Fortune, S. M. & Alter, G. Beyond binding: Antibody effector functions in infectious diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 46–61 (2018).
6. Higgins, B. W., McHeyzer-Williams, L. J. & McHeyzer-Williams, M. G. Programming Isotype-Specific Plasma Cell Function. *Trends Immunol.* **40**, 345–357 (2019).
7. Rodrigues, P. F. *et al.* Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol.* **19**, 711–722 (2018).
8. Villani, A. C. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science (80-. ).* **356**, (2017).
9. Eisenbarth, S. C. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 89–103 (2019).
10. Gaya, M. *et al.* Inflammation-induced disruption of SCS macrophages impairs B cell responses to secondary infection. **347**, (2015).
11. Nakano, H. *et al.* Migratory properties of pulmonary dendritic cells are determined by their developmental lineage. *Mucosal Immunol.* **6**, 678–691 (2013).
12. Schlenner, S. M. *et al.* Fate Mapping Reveals Separate Origins of T Cells and Myeloid Lineages in the Thymus. *Immunity* **32**, 426–436 (2010).
13. Becker, A. M. *et al.* IRF-8 extinguishes neutrophil production and promotes dendritic cell lineage commitment in both myeloid and lymphoid mouse progenitors. *Blood* **119**, 2003–2012 (2012).
14. Lee, J. *et al.* Lineage specification of human dendritic cells is marked by

- IRF8 expression in hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Nat. Immunol.* **18**, 877–888 (2017).
15. Kurotaki, D. *et al.* Epigenetic control of early dendritic cell lineage specification by the transcription factor IRF8 in mice. *Blood* **133**, 1803–1813 (2019).
  16. Schlitzer, A. *et al.* Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nat. Immunol.* **16**, 718–728 (2015).
  17. Carotta, S. *et al.* The transcription factor PU.1 controls dendritic cell development and Flt3 cytokine receptor expression in a dose-dependent manner. *Immunity* **32**, 628–641 (2010).
  18. Laouar, Y., Welte, T., Fu, X. Y. & Flavell, R. A. STAT3 Is Required for Flt3L-Dependent Dendritic Cell Differentiation. *Immunity* **19**, 903–912 (2003).
  19. Sathaliyawala, T. *et al.* Mammalian target of rapamycin controls dendritic cell development downstream of Flt3 ligand signaling. *Immunity* **33**, 597–606 (2010).
  20. Ginhoux, F. *et al.* The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J. Exp. Med.* **206**, 3115–3130 (2009).
  21. Waskow, C. *et al.* The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* **9**, 676–683 (2008).
  22. McKenna, H. J. *et al.* Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95**, 3489–3497 (2000).
  23. Onai, N., Obata-Onai, A., Tussiwand, R., Lanzavecchia, A. & Manz, M. G. Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development. *J. Exp. Med.* **203**, 227–238 (2006).
  24. Sichien, D., Lambrecht, B. N., Guilliams, M. & Scott, C. L. Development of conventional dendritic cells: From common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues. *Mucosal Immunol.* **10**, 831–844 (2017).

25. Sichien, D. *et al.* IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. *Immunity* **45**, 626–640 (2016).
26. Suzuki, S. *et al.* Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b highCD8 $\alpha$ - dendritic cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8981–8986 (2004).
27. Satpathy, A. T. *et al.* Notch2-dependent classical dendritic cells orchestrate intestinal immunity to attaching-and-effacing bacterial pathogens. *Nat. Immunol.* **14**, 937–948 (2013).
28. Briseño, C. G. *et al.* Notch2-dependent DC2s mediate splenic germinal center responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 10726–10731 (2018).
29. Tussiwand, R. *et al.* Klf4 Expression in Conventional Dendritic Cells Is Required for T Helper 2 Cell Responses. *Immunity* **42**, 916–928 (2015).
30. Pooley, J. L., Heath, W. R. & Shortman, K. Cutting Edge: Intravenous Soluble Antigen Is Presented to CD4 T Cells by CD8 – Dendritic Cells, but Cross-Presented to CD8 T Cells by CD8 + Dendritic Cells . *J. Immunol.* **166**, 5327–5330 (2001).
31. Roche, P. A. & Furuta, K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 203–216 (2015).
32. Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I. & Trombetta, E. S. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science (80-. )*. **307**, 1630–1634 (2005).
33. Lamendour, L., Deluce-Kakwata-nkor, N., Mouline, C., Gouilleux-Gruart, V. & Velge-Roussel, F. Tethering innate surface receptors on dendritic cells: A new avenue for immune tolerance induction? *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–15 (2020).
34. Trombetta, E. S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M. & Mellman, I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science (80-. )*. **299**, 1400–1403 (2003).
35. Cycling, C. *et al.* Developmental regulation of MHC class II transport in

- mouse dendritic cells. *Nature* **657**, 655–657 (1997).
36. Abbas, A. K., Trotta, E., R Simeonov, D., Marson, A. & Bluestone, J. A. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci. Immunol.* **3**, (2018).
  37. Hershko, A. Y. *et al.* Mast Cell Interleukin-2 Production Contributes to Suppression of Chronic Allergic Dermatitis. *Immunity* **35**, 562–571 (2011).
  38. Telusma, G. *et al.* Dendritic cell activating peptides induce distinct cytokine profiles. *Int. Immunol.* **18**, 1563–1573 (2006).
  39. Feau, S. *et al.* Dendritic cell-derived IL-2 production is regulated by IL-15 in humans and in mice. *Blood* **105**, 697–702 (2005).
  40. Granucci, F., Feau, S., Angeli, V., Trottein, F. & Ricciardi-Castagnoli, P. Early IL-2 Production by Mouse Dendritic Cells Is the Result of Microbial-Induced Priming. *J. Immunol.* **170**, 5075–5081 (2003).
  41. Whyte, C. E. *et al.* Context-dependent effects of IL-2 rewire immunity into distinct cellular circuits. *J. Exp. Med.* **219**, (2022).
  42. Boder, E. T. Tighter ties that bind. *Nature* **484**, 463–464 (2012).
  43. JX, L. & WJ, L. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene* **19**, 2566 (2000).
  44. Liao, W., Lin, J. X. & Leonard, W. J. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity* **38**, 13–25 (2013).
  45. Kim, H. P., Imbert, J. & Leonard, W. J. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 349–366 (2006).
  46. Spolski, R., Li, P. & Leonard, W. J. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 648–659 (2018).
  47. Wuest, S. C. *et al.* A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. *Nat. Med.* **17**, 604–609 (2011).
  48. Kulhankova, K., Rouse, T., Nasr, M. E. & Field, E. H. Dendritic Cells Control

- CD4+CD25+ Treg Cell Suppressor Function In Vitro through Juxtacrine Delivery of IL-2. *PLoS One* **7**, 1–13 (2012).
49. Lau-Kilby, A. W. *et al.* Interleukin-2 inhibits FMS-like tyrosine kinase 3 receptor ligand (flt3L)-dependent development and function of conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 2408–2413 (2011).
  50. Bolton, H. A., Roediger, B. & Groth, B. F. de S. The effects of IL-2 and Treg cells on dendritic cell homeostasis are mediated indirectly via activation of conventional T cells. *Eur. J. Immunol.* **45**, 1141–1147 (2015).
  51. Herr, F. *et al.* IL-2 Phosphorylates STAT5 To Drive IFN- $\gamma$  Production and Activation of Human Dendritic Cells. *J. Immunol.* **192**, 5660–5670 (2014).
  52. Koch, U. & Radtke, F. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 539–562 (2011).
  53. Bhandoola, A., von Boehmer, H., Petrie, H. T. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Commitment and Developmental Potential of Extrathymic and Intrathymic T Cell Precursors: Plenty to Choose from. *Immunity* **26**, 678–689 (2007).
  54. Bell, J. J. & Bhandoola, A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature* **452**, 764–767 (2008).
  55. Maillard, I., Fang, T. & Pear, W. S. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 945–974 (2005).
  56. Yamasaki, S. *et al.* Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nat. Immunol.* **7**, 67–75 (2006).
  57. Hayes, S. M., Shores, E. W. & Love, P. E. An architectural perspective on signaling by the pre-,  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell receptors. *Immunol. Rev.* **191**, 28–37 (2003).
  58. Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 377–391 (2014).

59. Laky, K. & Fowlkes, B. J. Notch signaling in CD4 and CD8 T cell development. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 197–202 (2008).
60. Anderson, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science (80-. )*. **298**, 1395–1401 (2002).
61. Sansom, S. N. *et al.* Population and single-cell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. *Genome Res.* **24**, 1918–1931 (2014).
62. Hubert, F. X. *et al.* Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood* **118**, 2462–2472 (2011).
63. Hadeiba, H. *et al.* Plasmacytoid Dendritic Cells Transport Peripheral Antigens to the Thymus to Promote Central Tolerance. *Immunity* **36**, 438–450 (2012).
64. Lopes, N., Sergé, A., Ferrier, P. & Irla, M. Thymic crosstalk coordinates medulla organization and T-cell tolerance induction. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
65. Bonasio, R. *et al.* Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat. Immunol.* **7**, 1092–1100 (2006).
66. Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L. J., Rosen, H. & McHeyzer-Williams, M. G. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat. Immunol.* (2009) doi:10.1038/ni.1704.
67. Van Panhuys, N. TCR signal strength alters T-DC activation and interaction times and directs the outcome of differentiation. *Front. Immunol.* **7**, 1–14 (2016).
68. Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 305–334 (2003).
69. Yin, X., Chen, S. & Eisenbarth, S. C. Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **39**, 759–790 (2021).
70. Heufler, C. *et al.* Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- $\gamma$  production by

- T helper 1 cells. *Eur. J. Immunol.* **26**, 659–668 (1996).
71. Thieu, V. T. *et al.* Signal Transducer and Activator of Transcription 4 Is Required for the Transcription Factor T-bet to Promote T Helper 1 Cell-Fate Determination. *Immunity* **29**, 679–690 (2008).
  72. Tuzlak, S. *et al.* Repositioning TH cell polarization from single cytokines to complex help. *Nat. Immunol.* **22**, 1210–1217 (2021).
  73. Zhu, J. & Paul, W. E. CD4 T cells : fates , functions , and faults ASH 50th anniversary review CD4 T cells: fates , functions , and faults. *Immunobiology* **112**, 1557–1569 (2009).
  74. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179–189 (2006).
  75. Ivanov, I. I. *et al.* The Orphan Nuclear Receptor ROR  $\gamma$  t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17 + T Helper Cells. 1121–1133 (2006) doi:10.1016/j.cell.2006.07.035.
  76. Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123–1132 (2005).
  77. Rajarathnam, K., Schnoor, M., Richardson, R. M. & Rajagopal, S. How do chemokines navigate neutrophils to the target site: Dissecting the structural mechanisms and signaling pathways. *Cell. Signal.* **54**, 69–80 (2019).
  78. Miossec, P. & Kolls, J. K. Targeting IL-17 and T H 17 cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 763–776 (2012).
  79. Eyerich, K., Dimartino, V. & Cavani, A. IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology. *Eur. J. Immunol.* **47**, 607–614 (2017).
  80. Dupage, M. & Bluestone, J. A. Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 149–163 (2016).
  81. Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. B-cell biology and development. *J.*

- Allergy Clin. Immunol.* **131**, 959–971 (2013).
82. Sigvardsson, M., O’Riordan, M. & Grosschedl, R. EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous immunoglobulin surrogate light chain genes. *Immunity* **7**, 25–36 (1997).
  83. O’Riordan, M. & Grosschedl, R. Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* **11**, 21–31 (1999).
  84. Subrahmanyam, R. *et al.* Localized epigenetic changes induced by D H recombination restricts recombinase to DJ H junctions. *Nat. Immunol.* **13**, 1205–1212 (2012).
  85. Ohnishi, K., Melchers, F. & Shimizu, T. Lymphocyte-expressed BILL-cadherin/cadherin-17 contributes to the development of B cells at two stages. *Eur. J. Immunol.* **35**, 957–963 (2005).
  86. Nutt, S. L. & Kee, B. L. The Transcriptional Regulation of B Cell Lineage Commitment. *Immunity* **26**, 715–725 (2007).
  87. Kikuchi, K., Lai, A. Y., Hsu, C. L. & Kondo, M. IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *J. Exp. Med.* **201**, 1197–1203 (2005).
  88. Hirokawa, S., Sato, H., Kato, I. & Kudo, A. EBF-regulating Pax5 transcription is enhanced by STAT5 in the early stage of B cells. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1824–1829 (2003).
  89. Malin, S. *et al.* Role of STAT5 in controlling cell survival and immunoglobulin gene recombination during pro-B cell development. *Nat. Immunol.* **11**, 171–179 (2010).
  90. Johnson, K. *et al.* Regulation of Immunoglobulin Light-Chain Recombination by the Transcription Factor IRF-4 and the Attenuation of Interleukin-7 Signaling. *Immunity* **28**, 335–345 (2008).
  91. Nemazee, D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 281–294 (2017).
  92. Cyster, J. G. B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nat. Immunol.* **11**, 989–996 (2010).
  93. Allen, C. D. C. & Cyster, J. G. Follicular dendritic cell networks of primary

- follicles and germinal centers: Phenotype and function. *Semin. Immunol.* **20**, 14–25 (2008).
94. Heesters, B. A., Myers, R. C. & Carroll, M. C. Follicular dendritic cells: Dynamic antigen libraries. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 495–504 (2014).
  95. Batista, F. D. & Harwood, N. E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 15–27 (2009).
  96. Qi, H., Kastenmüller, W. & Germain, R. N. Spatiotemporal basis of innate and adaptive immunity in secondary lymphoid tissue. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 141–167 (2014).
  97. Liu, W., Wang, H. & Xu, C. Antigen Receptor Nanoclusters: Small Units with Big Functions. *Trends Immunol.* **37**, 680–689 (2016).
  98. Yang, J. & Reth, M. The dissociation activation model of B cell antigen receptor triggering. *FEBS Lett.* **584**, 4872–4877 (2010).
  99. Kurosaki, T., Shinohara, H. & Baba, Y. B cell signaling and fate decision. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 21–55 (2010).
  100. Cyster, J. G. & Allen, C. D. C. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* **177**, 524–540 (2019).
  101. Carroll, M. C. & Isenman, D. E. Regulation of Humoral Immunity by Complement. *Immunity* **37**, 199–207 (2012).
  102. Suthers, A. N. & Sarantopoulos, S. TLR7/TLR9- and B cell receptor-signaling crosstalk: Promotion of potentially dangerous B Cells. *Front. Immunol.* **8**, 1–8 (2017).
  103. Natkanski, E. *et al.* B Cells Use Mechanical Energy to Discriminate Antigen Affinities. *Science (80-. ).* **340**, 1587–1590 (2013).
  104. Cyster, J. G., Dang, E. V., Reboldi, A. & Yi, T. 25-Hydroxycholesterols in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 731–743 (2014).
  105. Di Niro, R. *et al.* SalmOnella Infection Drives Promiscuous B Cell Activation Followed By Extrafollicular Affinity Maturation. *Immunity* **43**, 120–131 (2015).
  106. Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K. & Ahmed, R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* **8**, 363–372 (1998).
  107. Allman, D., Wilmore, J. R. & Gaudette, B. T. The continuing story of T-cell

- independent antibodies. *Immunol. Rev.* **288**, 128–135 (2019).
108. Foote, J. B., Mahmoud, T. I., Vale, A. M. & Kearney, J. F. Long-Term Maintenance of Polysaccharide-Specific Antibodies by IgM-Secreting Cells. *J. Immunol.* **188**, 57–67 (2012).
  109. Yates, J. L., Racine, R., McBride, K. M. & Winslow, G. M. T Cell-Dependent IgM Memory B Cells Generated during Bacterial Infection Are Required for IgG Responses to Antigen Challenge. *J. Immunol.* **191**, 1240–1249 (2013).
  110. Herlands, R. A., William, J., Hershberg, U. & Shlomchik, M. J. Anti-chromatin antibodies drive in vivo antigen-specific activation and somatic hypermutation of rheumatoid factor B cells at extrafollicular sites. *Eur. J. Immunol.* **37**, 3339–3351 (2007).
  111. Sang, A. *et al.* Activation of Rheumatoid Factor-Specific B Cells Is Antigen Dependent and Occurs Preferentially Outside of Germinal Centers in the Lupus-Prone NZM2410 Mouse Model. *J. Immunol.* **193**, 1609–1621 (2014).
  112. Cunningham, A. F. *et al.* Salmonella Induces a Switched Antibody Response without Germinal Centers That Impedes the Extracellular Spread of Infection. *J. Immunol.* **178**, 6200–6207 (2007).
  113. Cattoretti, G. *et al.* Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* **107**, 3967–3975 (2006).
  114. Elsner, R. A. & Shlomchik, M. J. Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity. *Immunity* **53**, 1136–1150 (2020).
  115. Groom, J. R. *et al.* BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J. Exp. Med.* **204**, 1959–1971 (2007).
  116. Hardenberg, G., Van Bostelen, L., Hahne, M. & Medema, J. P. Thymus-independent class switch recombination is affected by APRIL. *Immunol. Cell Biol.* **86**, 530–534 (2008).
  117. Trembl, L. S. *et al.* TLR Stimulation Modifies BLYS Receptor Expression in Follicular and Marginal Zone B Cells<sup>1</sup>. *J. Immunol.* **178**, 7531–7539 (2007).
  118. Vinuesa, C. G., Linterman, M. A., Yu, D. & MacLennan, I. C. M. Follicular

- Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* (2016) doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055605.
119. Förster, R., Emrich, T., Kremmer, E. & Lipp, M. Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood* **84**, 830–840 (1994).
  120. Breitfeld, D. *et al.* Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.* **192**, 1545–1551 (2000).
  121. Schaerli, P. *et al.* CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J. Exp. Med.* **192**, 1553–1562 (2000).
  122. Chtanova, T. *et al.* T Follicular Helper Cells Express a Distinctive Transcriptional Profile, Reflecting Their Role as Non-Th1/Th2 Effector Cells That Provide Help for B Cells. *J. Immunol.* **173**, 68–78 (2004).
  123. Arnold, C. N., Campbell, D. J., Lipp, M. & Butcher, E. C. The germinal center response is impaired in the absence of T cell-expressed CXCR5. *Eur. J. Immunol.* **37**, 100–109 (2007).
  124. Kim, C. H. *et al.* Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J. Exp. Med.* **193**, 1373–1381 (2001).
  125. Nurieva, R. I. *et al.* Generation of T Follicular Helper Cells Is Mediated by Interleukin-21 but Independent of T Helper 1, 2, or 17 Cell Lineages. *Immunity* **29**, 138–149 (2008).
  126. Johnston, R. J. *et al.* Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science* (80-. ). **325**, 1006–1010 (2009).
  127. Yu, D. *et al.* The Transcriptional Repressor Bcl-6 Directs T Follicular Helper Cell Lineage Commitment. *Immunity* **31**, 457–468 (2009).
  128. Kitano, M. *et al.* Bcl6 Protein Expression Shapes Pre-Germinal Center B Cell Dynamics and Follicular Helper T Cell Heterogeneity. *Immunity* **34**, 961–972 (2011).
  129. Choi, Y. S. *et al.* ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus

- Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6. *Immunity* **34**, 932–946 (2011).
130. Lee, S. K. *et al.* B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *J. Exp. Med.* **208**, 1377–1388 (2011).
  131. Goenka, R. *et al.* Cutting Edge: Dendritic Cell-Restricted Antigen Presentation Initiates the Follicular Helper T Cell Program but Cannot Complete Ultimate Effector Differentiation. *J. Immunol.* **187**, 1091–1095 (2011).
  132. Krishnaswamy, J. K. *et al.* Migratory CD11b<sup>+</sup> conventional dendritic cells induce T follicular helper cell-dependent antibody responses. *Sci. Immunol.* **2**, (2017).
  133. Walker, L. S. K. *et al.* Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers. *J. Exp. Med.* **190**, 1115–1122 (1999).
  134. McAdam, A. J. *et al.* Mouse Inducible Costimulatory Molecule (ICOS) Expression Is Enhanced by CD28 Costimulation and Regulates Differentiation of CD4<sup>+</sup> T Cells. *J. Immunol.* **165**, 5035–5040 (2000).
  135. Lane, P. J. L., Gaspal, F. M. C. & Kim, M. Y. Two sides of a cellular coin: CD4<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> cells regulate memory responses and lymph-node organization. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 655–660 (2005).
  136. Vogelzang, A. *et al.* A Fundamental Role for Interleukin-21 in the Generation of T Follicular Helper Cells. *Immunity* **29**, 127–137 (2008).
  137. Reinhardt, R. L., Liang, H. E. & Locksley, R. M. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat. Immunol.* **10**, 385–393 (2009).
  138. Bauquet, A. T. *et al.* The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat. Immunol.* **10**, 167–175 (2009).
  139. Liu, X. *et al.* Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. *Nature* **507**, 513–518 (2014).
  140. Linterman, M. A. & Vinuesa, C. G. Signals that influence T follicular

- helper cell differentiation and function. *Seminars in Immunopathology* (2010) doi:10.1007/s00281-009-0194-z.
141. Nurieva, R. I. *et al.* Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* **325**, 1001–1005 (2009).
  142. Hatzi, K. *et al.* BCL6 orchestrates Tfh cell differentiation via multiple distinct mechanisms. *J. Exp. Med.* **212**, 539–553 (2015).
  143. Ditoro, D. *et al.* Differential IL-2 expression defines developmental fates of follicular versus nonfollicular helper T cells. *Science (80-. )*. **361**, (2018).
  144. Ballesteros-Tato, A. *et al.* Interleukin-2 Inhibits Germinal Center Formation by Limiting T Follicular Helper Cell Differentiation. *Immunity* **36**, 847–856 (2012).
  145. Pepper, M., Pagán, A. J., Igyártó, B. Z., Taylor, J. J. & Jenkins, M. K. Opposing Signals from the Bcl6 Transcription Factor and the Interleukin-2 Receptor Generate T Helper 1 Central and Effector Memory Cells. *Immunity* **35**, 583–595 (2011).
  146. Nurieva, R. I. *et al.* STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (Tfh) cell generation and function. *J. Biol. Chem.* **287**, 11234–11239 (2012).
  147. Oestreich, K. J., Mohn, S. E. & Weinmann, A. S. Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in T H1 cells to regulate flexibility with a T FH-like gene profile. *Nat. Immunol.* **13**, 405–411 (2012).
  148. Johnston, R. J., Choi, Y. S., Diamond, J. A., Yang, J. A. & Crotty, S. STAT5 is a potent negative regulator of T FH cell differentiation. *J. Exp. Med.* **209**, 243–250 (2012).
  149. Li, J., Lu, E., Yi, T. & Cyster, J. G. EB12 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-queenching dendritic cells. *Nature* (2016) doi:10.1038/nature17947.
  150. Roco, J. A. *et al.* Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity* **51**, 337-350.e7 (2019).
  151. Stavnezer, J., Guikema, J. E. J. & Schrader, C. E. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 261–

- 292 (2008).
152. Gowthaman, U. *et al.* Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE. *Science* (80-. ). **365**, eaaw6433 (2019).
  153. Haynes, N. M. *et al.* Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and Appearance of a Programmed Cell Death Gene-1 High Germinal Center-Associated Subpopulation . *J. Immunol.* **179**, 5099–5108 (2007).
  154. Pereira, J. P., Kelly, L. M., Xu, Y. & Cyster, J. G. EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature* **460**, 1122–1126 (2009).
  155. Suan, D. *et al.* T Follicular Helper Cells Have Distinct Modes of Migration and Molecular Signatures in Naive and Memory Immune Responses. *Immunity* **42**, 704–718 (2015).
  156. Green, J. A. *et al.* The sphingosine 1-phosphate receptor S1P2 maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nat. Immunol.* **12**, 672–680 (2011).
  157. Moriyama, S. *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers. *J. Exp. Med.* **211**, 1297–1305 (2014).
  158. Rodda, L. B., Bannard, O., Ludewig, B., Nagasawa, T. & Cyster, J. G. Phenotypic and Morphological Properties of Germinal Center Dark Zone Cxcl12 -Expressing Reticular Cells . *J. Immunol.* **195**, 4781–4791 (2015).
  159. Wang, Q. *et al.* The cell cycle restricts activation-induced cytidine deaminase activity to early G1. *J. Exp. Med.* **214**, 49–58 (2017).
  160. Gurwicz, N. *et al.* Tingible body macrophages arise from lymph node–resident precursors and uptake B cells by dendrites. *J. Exp. Med.* **220**, 1–15 (2023).
  161. Bannard, O. *et al.* Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity* **39**, 912–924 (2013).
  162. Elsner, R. A., Ernst, D. N. & Baumgarth, N. Single and Coexpression of CXCR4 and CXCR5 Identifies CD4 T Helper Cells in Distinct Lymph Node

- Niches during Influenza Virus Infection. *J. Virol.* **86**, 7146–7157 (2012).
163. Weinstein, J. S. *et al.* T FH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat. Immunol.* **17**, 1197–1205 (2016).
  164. Kennedy, D. E. *et al.* Novel specialized cell state and spatial compartments within the germinal center. *Nat. Immunol.* **21**, 660–670 (2020).
  165. Kennedy, D. E. & Clark, M. R. Compartments and Connections Within the Germinal Center. *Front. Immunol.* **12**, 1–8 (2021).
  166. Garin, A. *et al.* Toll-like Receptor 4 Signaling by Follicular Dendritic Cells Is Pivotal for Germinal Center Onset and Affinity Maturation. *Immunity* **33**, 84–95 (2010).
  167. Myers, R. C., King, R. G., Carter, R. H. & Justement, L. B. Lymphotoxin  $\alpha 1\beta 2$  expression on B cells is required for follicular dendritic cell activation during the germinal center response. *Eur. J. Immunol.* **43**, 348–359 (2013).
  168. Denton, A. E. & Linterman, M. A. Stromal networking: cellular connections in the germinal centre. *Curr. Opin. Immunol.* **45**, 103–111 (2017).
  169. Kranich, J. *et al.* Follicular dendritic cells control engulfment of apoptotic bodies by secreting Mfge8. *J. Exp. Med.* **205**, 1293–1302 (2008).
  170. Cyster, J. G. *et al.* Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol. Rev.* **176**, 181–193 (2000).
  171. Suzuki, K., Grigorova, I., Phan, T. G., Kelly, L. M. & Cyster, J. G. Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *J. Exp. Med.* **206**, 1485–1493 (2009).
  172. Qi, H., Cannons, J. L., Klauschen, F., Schwartzberg, P. L. & Germain, R. N. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* **455**, 764–769 (2008).
  173. Phan, T. G. *et al.* High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J. Exp. Med.* **203**, 2419–2424

- (2006).
174. Lau, A. W. & Brink, R. Selection in the germinal center. *Curr. Opin. Immunol.* **63**, 29–34 (2020).
  175. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745–763 (2004).
  176. Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T. & Jenkins, M. K. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* **410**, 101–105 (2001).
  177. Schenkel, J. M. & Masopust, D. Tissue-resident memory T cells. *Immunity* **41**, 886–897 (2014).
  178. Cyster, J. G. & Schwab, S. R. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 69–94 (2012).
  179. Krueger, P. D., Osum, K. C. & Jenkins, M. K. CD4+ Memory T-Cell Formation during Type 1 Immune Responses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **13**, (2021).
  180. Harrington, L. E., Janowski, K. M., Oliver, J. R., Zajac, A. J. & Weaver, C. T. Memory CD4 T cells emerge from effector T-cell progenitors. *Nature* **452**, 356–360 (2008).
  181. Hondowicz, B. D. *et al.* Interleukin-2-Dependent Allergen-Specific Tissue-Resident Memory Cells Drive Asthma. *Immunity* **44**, 155–166 (2016).
  182. McGeachy, M. J. Th17 memory cells: live long and proliferate. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 921–926 (2013).
  183. Pepper, M. & Jenkins, M. K. Origins of CD4+ effector and central memory T cells. *Nat. Immunol.* **12**, 467–471 (2011).
  184. Snook, J. P., Kim, C. & Williams, M. A. TCR signal strength controls the differentiation of CD4(+) effector and memory T cells. *Sci. Immunol.* **3**, (2018).
  185. McKinstry, K. K. *et al.* Effector CD4 T-cell transition to memory requires late cognate interactions that induce autocrine IL-2. *Nat. Commun.* **5**, (2014).

186. Marshall, H. D. *et al.* Differential Expression of Ly6C and T-bet Distinguish Effector and Memory Th1 CD4 + Cell Properties during Viral Infection. *Immunity* **35**, 633–646 (2011).
187. Seddon, B., Tomlinson, P. & Zamoyska, R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat. Immunol.* **4**, 680–686 (2003).
188. Polonsky, M. *et al.* Induction of CD4 T cell memory by local cellular collectivity. *Science (80-. ).* **360**, (2018).
189. Colpitts, S. L., Dalton, N. M. & Scott, P. IL-7 Receptor Expression Provides the Potential for Long-Term Survival of Both CD62L high Central Memory T Cells and Th1 Effector Cells during *Leishmania major* Infection . *J. Immunol.* **182**, 5702–5711 (2009).
190. Nguyen, Q. P., Deng, T. Z., Witherden, D. A. & Goldrath, A. W. Origins of CD4+ circulating and tissue-resident memory T-cells. *Immunology* **157**, 3–12 (2019).
191. Strutt, T. M. *et al.* IL-15 supports the generation of protective lung-resident memory CD4 T cells. *Mucosal Immunol.* **11**, 668–680 (2018).
192. Yeon, S. M. *et al.* IL-7 plays a critical role for the homeostasis of allergen-specific memory CD4 T cells in the lung and airways. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
193. Soon, M. S. F., Engel, J. A., Lee, H. J. & Haque, A. Development of circulating CD4+ T-cell memory. *Immunol. Cell Biol.* **97**, 617–624 (2019).
194. Di Rosa, F. & Gebhardt, T. Bone marrow T cells and the integrated functions of recirculating and tissue-resident memory T cells. *Front. Immunol.* **7**, 1–13 (2016).
195. Noonan, K. A. *et al.* Adoptive transfer of activated marrow-infiltrating lymphocytes induces measurable antitumor immunity in the bone marrow in multiple myeloma. *Sci. Transl. Med.* **7**, (2015).
196. Tokoyoda, K. *et al.* Professional Memory CD4+ T Lymphocytes Preferentially Reside and Rest in the Bone Marrow. *Immunity* **30**, 721–730 (2009).
197. Slamanig, S. A. & Nolte, M. A. The bone marrow as sanctuary for plasma

- cells and memory t-cells: Implications for adaptive immunity and vaccinology. *Cells* **10**, (2021).
198. Di Rosa, F. & Pabst, R. The bone marrow: A nest for migratory memory T cells. *Trends Immunol.* **26**, 360–366 (2005).
  199. Pabst, R., Miyasaka, M. & Dudler, L. Numbers and phenotype of lymphocytes emigrating from sheep bone marrow after in situ labelling with fluorescein isothiocyanate. *Immunology* **59**, 217 (1986).
  200. Klonowski, K. D. *et al.* Dynamics of blood-borne CD8 memory T cell migration in vivo. *Immunity* **20**, 551–562 (2004).
  201. Siracusa, F. *et al.* CD69+ memory T lymphocytes of the bone marrow and spleen express the signature transcripts of tissue-resident memory T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **49**, 966–968 (2019).
  202. Goedhart, M. *et al.* CXCR4, but not CXCR3, drives CD8 + T-cell entry into and migration through the murine bone marrow. *Eur. J. Immunol.* **49**, 576–589 (2019).
  203. Tokoyoda, K. & Radbruch, A. Signals controlling rest and reactivation of T helper memory lymphocytes in bone marrow. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 1609–1613 (2012).
  204. DeNucci, C. C. & Shimizu, Y.  $\beta$  1 Integrin Is Critical for the Maintenance of Antigen-Specific CD4 T Cells in the Bone Marrow but Not Long-Term Immunological Memory . *J. Immunol.* **186**, 4019–4026 (2011).
  205. Koni, P. A. *et al.* Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: Impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J. Exp. Med.* **193**, 741–753 (2001).
  206. Maeda, Y., Seki, N., Sato, N., Sugahara, K. & Chiba, K. Sphingosine 1-phosphate receptor type 1 regulates egress of mature T cells from mouse bone marrow. *Int. Immunol.* **22**, 515–525 (2010).
  207. Fazilleau, N. *et al.* Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. *Nat. Immunol.* **8**, 753–761 (2007).
  208. Lüthje, K. *et al.* The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. *Nat. Immunol.* **13**, 491–498 (2012).

209. Weber, J. P., Fuhrmann, F. & Hutloff, A. T-follicular helper cells survive as long-term memory cells. 1981–1988 (2012) doi:10.1002/eji.201242540.
210. Hale, J. S. *et al.* Distinct memory cd4+ t cells with commitment to t follicular helper- and t helper 1-cell lineages are generated after acute viral infection. *Immunity* **38**, 805–817 (2013).
211. Liu, X. *et al.* Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo. *J. Exp. Med.* (2012) doi:10.1084/jem.20120219.
212. Ise, W. *et al.* Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression by memory follicular helper T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 11792–11797 (2014).
213. Ugur, M., Schulz, O., Menon, M. B., Krueger, A. & Pabst, O. Resident CD4+ T cells accumulate in lymphoid organs after prolonged antigen exposure. *Nat. Commun.* **5**, 1–10 (2014).
214. Baumjohann, D. *et al.* Persistent Antigen and Germinal Center B Cells Sustain T Follicular Helper Cell Responses and Phenotype. *Immunity* **38**, 596–605 (2013).
215. Asrir, A., Aloulou, M., Gador, M., Péral, C. & Fazilleau, N. Interconnected subsets of memory follicular helper T cells have different effector functions. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
216. Sage, P. T., Alvarez, D., Godec, J., Von Andrian, U. H. & Sharpe, A. H. Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. *J. Clin. Invest.* (2014) doi:10.1172/JCI76861.
217. Morita, R. *et al.* Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity* **34**, 108–121 (2011).
218. Yang, J. *et al.* Follicular Helper T Cell Derived Exosomes Promote B Cell Proliferation and Differentiation in Antibody-Mediated Rejection after Renal Transplantation. *Biomed Res. Int.* **2019**, (2019).
219. Schmitt, N., Bentebibel, S. E. & Ueno, H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol.* **35**, 436–442 (2014).
220. Tan, L. *et al.* The role of circulating T follicular helper cells in kidney

- transplantation. *Transpl. Immunol.* **69**, 101459 (2021).
221. Walker, L. S. K. The link between circulating follicular helper T cells and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 567–575 (2022).
222. Shulman, Z. *et al.* T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science* **341**, 673–677 (2013).
223. He, J. *et al.* Circulating precursor CCR7<sup>lo</sup>PD-1<sup>hi</sup> CXCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells indicate tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity* **39**, 770–781 (2013).
224. Swarnalekha, N. *et al.* T resident helper cells promote humoral responses in the lung. *Sci. Immunol.* **6**, (2021).
225. Son, Y. M. *et al.* Tissue-resident CD4<sup>+</sup> T helper cells assist the development of protective respiratory B and CD8<sup>+</sup> T cell memory responses. *Sci. Immunol.* **6**, 1–16 (2021).
226. Gu-Trantien, C. *et al.* CXCL13-producing TFH cells link immune suppression and adaptive memory in human breast cancer. *JCI Insight* **2**, (2017).
227. Yu, H. *et al.* Increased frequency of bone marrow T follicular helper cells in patients with immune-related pancytopenia. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, (2013).
228. Shinoda, K. *et al.* Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 7409–7414 (2012).
229. Shlomchik, M. J. & Weisel, F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol. Rev.* **247**, 52–63 (2012).
230. Turner, C. A., Mack, D. H. & Davis, M. M. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* **77**, 297–306 (1994).
231. Angelin-Duclos, C., Cattoretti, G., Lin, K.-I. & Calame, K. Commitment of B Lymphocytes to a Plasma Cell Fate Is Associated with Blimp-1 Expression In Vivo. *J. Immunol.* **165**, 5462–5471 (2000).
232. Shaffer, A. L. *et al.* Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by

- extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* **17**, 51–62 (2002).
233. Kallies, A. *et al.* Initiation of Plasma-Cell Differentiation Is Independent of the Transcription Factor Blimp-1. *Immunity* **26**, 555–566 (2007).
234. Tellier, J. *et al.* Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nat. Immunol.* **17**, 323–330 (2016).
235. Willis, S. N. *et al.* Transcription Factor IRF4 Regulates Germinal Center Cell Formation through a B Cell–Intrinsic Mechanism. *J. Immunol.* **192**, 3200–3206 (2014).
236. Klein, U. *et al.* Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* **7**, 773–782 (2006).
237. Sciammas, R. *et al.* Graded Expression of Interferon Regulatory Factor-4 Coordinates Isotype Switching with Plasma Cell Differentiation. *Immunity* **25**, 225–236 (2006).
238. Todd, D. J. *et al.* XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *J. Exp. Med.* **206**, 2151–2159 (2009).
239. Shaffer, A. L. *et al.* XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* **21**, 81–93 (2004).
240. Cancro, M. P. & Tomayko, M. M. Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. *Immunol. Rev.* **303**, 72–82 (2021).
241. Toyama, H. *et al.* Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity* **17**, 329–339 (2002).
242. Krishnamurthy, A. T. *et al.* Somatic Hypermutated Plasmodium-Specific IgM+ Memory B Cells Are Rapid, Plastic, Early Responders upon Malaria Rechallenge. *Immunity* **45**, 402–414 (2016).
243. Klein, U., Rajewsky, K. & Küppers, R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry

- somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J. Exp. Med.* **188**, 1679–1689 (1998).
244. Dogan, I. *et al.* Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* **10**, 1292–1299 (2009).
  245. Seifert, M. *et al.* Functional capacities of human Igm memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E546–E555 (2015).
  246. Zuccarino-Catania, G. V. *et al.* CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nat. Immunol.* **15**, 631–637 (2014).
  247. Allie, S. R. *et al.* The establishment of resident memory B cells in the lung requires local antigen encounter. *Nat. Immunol.* **20**, 97–108 (2019).
  248. Weisel, N. M. *et al.* Comprehensive analyses of B-cell compartments across the human body reveal novel subsets and a gut-resident memory phenotype. *Blood* **136**, 2774–2785 (2020).
  249. Hebeis, B. J. *et al.* Activation of Virus-specific Memory B Cells in the Absence of T Cell Help. *J. Exp. Med.* **199**, 593–602 (2004).
  250. Ochsenbein, A. F. *et al.* Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13263–13268 (2000).
  251. Aiba, Y. *et al.* Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 12192–12197 (2010).
  252. Hargreaves, D. C. *et al.* A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J. Exp. Med.* **194**, 45–56 (2001).
  253. Kabashima, K. *et al.* Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. *J. Exp. Med.* **203**, 2683–2690 (2006).
  254. Hauser, A. E. *et al.* Chemotactic Responsiveness Toward Ligands for

- CXCR3 and CXCR4 Is Regulated on Plasma Blasts During the Time Course of a Memory Immune Response. *J. Immunol.* **169**, 1277–1282 (2002).
255. Cassese, G. *et al.* Plasma Cell Survival Is Mediated by Synergistic Effects of Cytokines and Adhesion-Dependent Signals. *J. Immunol.* **171**, 1684–1690 (2003).
256. Nguyen, D. C., Joyner, C. J., Sanz, I. & Lee, F. E. H. Factors Affecting Early Antibody Secreting Cell Maturation Into Long-Lived Plasma Cells. *Front. Immunol.* **10**, 8–10 (2019).
257. Eliasson, P. & Jönsson, J. I. The hematopoietic stem cell niche: Low in oxygen but a nice place to be. *J. Cell. Physiol.* **222**, 17–22 (2010).
258. Wols, H. A. M., Underhill, G. H., Kansas, G. S. & Witte, P. L. The Role of Bone Marrow-Derived Stromal Cells in the Maintenance of Plasma Cell Longevity. *J. Immunol.* **169**, 4213–4221 (2002).
259. Rozanski, C. H. *et al.* Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells. *J. Exp. Med.* **208**, 1435–1446 (2011).
260. Rodríguez-Bayona, B., Ramos-Amaya, A., López-Blanco, R., Campos-Caro, A. & Brieva, J. A. STAT-3 Activation by Differential Cytokines Is Critical for Human In Vivo-Generated Plasma Cell Survival and Ig Secretion. *J. Immunol.* **191**, 4996–5004 (2013).
261. Uchiyama, H., Barut, B. A., Mohrbacher, A. F., Chauhan, D. & Anderson, K. C. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* **82**, 3712–3720 (1993).
262. Peperzak, V. *et al.* Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nat. Immunol.* **14**, 290–297 (2013).
263. Chu, V. T. *et al.* Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat. Immunol.* **12**, 151–159 (2011).
264. Chernova, I. *et al.* Lasting Antibody Responses Are Mediated by a Combination of Newly Formed and Established Bone Marrow Plasma Cells Drawn from Clonally Distinct Precursors. *J. Immunol.* **193**, 4971–4979 (2014).

265. Addo, R. K. *et al.* Single-cell transcriptomes of murine bone marrow stromal cells reveal niche-associated heterogeneity. *Eur. J. Immunol.* **49**, 1372–1379 (2019).
266. Odendahl, M. *et al.* Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* **105**, 1614–1621 (2005).
267. Romagnoli, P., Hudrisier, D. & van Meerwijk, J. P. M. Preferential Recognition of Self Antigens Despite Normal Thymic Deletion of CD4 + CD25 + Regulatory T Cells . *J. Immunol.* **168**, 1644–1648 (2002).
268. Klein, L., Robey, E. A. & Hsieh, C. S. Central CD4 + T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 7–18 (2019).
269. Malhotra, D. *et al.* Tolerance is established in polyclonal CD4 + T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nat. Immunol.* **17**, 187–195 (2016).
270. Malchow, S. *et al.* Aire Enforces Immune Tolerance by Directing Autoreactive T Cells into the Regulatory T Cell Lineage. *Immunity* **44**, 1102–1113 (2016).
271. Lio, C. W. J. & Hsieh, C. S. A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development. *Immunity* **28**, 100–111 (2008).
272. Samstein, R. M. *et al.* Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell* **151**, 153–166 (2012).
273. Lathrop, S. K., Santacruz, N. A., Pham, D., Luo, J. & Hsieh, C. S. Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population. *J. Exp. Med.* **205**, 3105–3117 (2008).
274. Gottschalk, R. A., Corse, E. & Allison, J. P. TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *J. Exp. Med.* **207**, 1701–1711 (2010).
275. Molinero, L. L., Miller, M. L., Evaristo, C. & Alegre, M.-L. High TCR Stimuli Prevent Induced Regulatory T Cell Differentiation in a NF- $\kappa$ B-Dependent Manner. *J. Immunol.* **186**, 4609–4617 (2011).

276. Zheng, Y. *et al.* Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* **463**, 808–812 (2010).
277. Linterman, M. A. *et al.* Foxp3<sup>+</sup> follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* (2011) doi:10.1038/nm.2425.
278. Wollenberg, I. *et al.* Regulation of the Germinal Center Reaction by Foxp3<sup>+</sup> Follicular Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **187**, 4553–4560 (2011).
279. Aloulou, M. *et al.* Follicular regulatory T cells can be specific for the immunizing antigen and derive from naive T cells. *Nat. Commun.* (2016) doi:10.1038/ncomms10579.
280. Maceiras, A. R. *et al.* T follicular helper and T follicular regulatory cells have different TCR specificity. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
281. Vaeth, M. *et al.* Follicular regulatory T cells control humoral autoimmunity via NFAT2-regulated CXCR5 expression. *J. Exp. Med.* **211**, 545–561 (2014).
282. Sage, P. T., Francisco, L. M., Carman, C. V. & Sharpe, A. H. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat. Immunol.* **14**, 152–161 (2013).
283. Sage, P. T., Paterson, A. M., Lovitch, S. B. & Sharpe, A. H. 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 (2014).
284. Wing, J. B. *et al.* A distinct subpopulation of CD25<sup>+</sup> T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. doi:10.1073/pnas.1705551114.
285. Fonseca, V. R., Ribeiro, F. & Graca, L. T follicular regulatory (Tfr) cells: Dissecting the complexity of Tfr-cell compartments. *Immunol. Rev.* **288**, 112–127 (2019).
286. Shen, E. *et al.* Control of Germinal Center Localization and Lineage Stability of Follicular Regulatory T Cells by the Blimp1 Transcription Factor. *Cell Rep.* **29**, 1848–1861.e6 (2019).
287. Wu, H., Xie, M. M., Liu, H. & Dent, A. L. Stat3 Is Important for Follicular Regulatory T Cell Differentiation. *PLoS One* (2016)

- doi:10.1371/journal.pone.0155040.
288. Chang, J. H. *et al.* TRAF3 regulates the effector function of regulatory T cells and humoral immune responses. *J. Exp. Med.* **211**, 137–151 (2014).
  289. Xu, L. *et al.* The Kinase mTORC1 Promotes the Generation and Suppressive Function of Follicular Regulatory T Cells. *Immunity* (2017) doi:10.1016/j.immuni.2017.08.011.
  290. Jandl, C. *et al.* IL-21 restricts T follicular regulatory T cell proliferation through Bcl-6 mediated inhibition of responsiveness to IL-2. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
  291. Sage, P. T. *et al.* Suppression by T FR cells leads to durable and selective inhibition of B cell effector function. *Nat. Immunol.* (2016) doi:10.1038/ni.3578.
  292. Wu, X. *et al.* SOSTDC1-producing follicular helper T cells promote regulatory follicular T cell differentiation. *Science* **369**, 984–988 (2020).
  293. Sumida, T. *et al.* Activated  $\beta$ -catenin in Foxp3+ regulatory T cells links inflammatory environments to autoimmunity. *Nat. Immunol.* **19**, 1391–1402 (2018).
  294. Bézie, S. *et al.* IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *J. Clin. Invest.* **125**, 3952–3964 (2015).
  295. Collison, L. W. *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566–569 (2007).
  296. Cao, X. *et al.* Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity* **27**, 635–646 (2007).
  297. Van Der Merwe, A. P., Bodian, D. L., Daenke, S., Linsley, P. & Davis, S. J. Affinity and Very Fast Kinetics. *J. Exp. Med.* **185**, 393–403 (1997).
  298. Fallarino, F. *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 1206–1212 (2003).
  299. Qureshi, O. S. *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell extrinsic function of CTLA-4. *Science (80-. ).* **332**, 600–603 (2011).

300. Akkaya, B. *et al.* Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide–MHC class II from dendritic cells. *Nat. Immunol.* **20**, 218–231 (2019).
301. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* **8**, 1353–1362 (2007).
302. Borsellino, G. *et al.* Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* **110**, 1225–1232 (2007).
303. Lappas, C. M., Rieger, J. M. & Linden, J. Adenosine Receptor Induction Inhibits IFN-. (2011).
304. Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 523–532 (2008).
305. Schmiel, S. E., Yang, J. A., Jenkins, M. K. & Mueller, D. L. Cutting Edge: Adenosine A2a Receptor Signals Inhibit Germinal Center T Follicular Helper Cell Differentiation during the Primary Response to Vaccination. *J. Immunol.* **198**, 623–628 (2017).
306. Fonseca, V. R., Ribeiro, F. & Graca, L. T follicular regulatory (Tfr) cells: Dissecting the complexity of Tfr-cell compartments. *Immunol. Rev.* **288**, 112–127 (2019).
307. León, B., Bradley, J. E., Lund, F. E., Randall, T. D. & Ballesteros-Tato, A. FoxP3<sup>β</sup> regulatory T cells promote influenza-specific Tfh responses by controlling IL-2 availability. *Nat. Commun.* (2014) doi:10.1038/ncomms4495.
308. Sage, P. T. & Sharpe, A. H. The multifaceted functions of follicular regulatory T cells. *Current Opinion in Immunology* vol. 67 68–74 (2020).
309. Laidlaw, B. J. *et al.* Interleukin-10 from CD4<sup>+</sup> follicular regulatory T cells promotes the germinal center response. *Sci. Immunol.* (2017) doi:10.1126/sciimmunol.aan4767.
310. Glatman Zaretsky, A. *et al.* T Regulatory Cells Support Plasma Cell Populations in the Bone Marrow. *Cell Rep.* **18**, 1906–1916 (2017).

311. Kennedy, M. K., Willis, C. R. & Armitage, R. J. Deciphering CD30 ligand biology and its role in humoral immunity. *Immunology* **118**, 143–152 (2006).
312. Seckinger, A. *et al.* Bone morphogenic protein 6: A member of a novel class of prognostic factors expressed by normal and malignant plasma cells inhibiting proliferation and angiogenesis. *Oncogene* **28**, 3866–3879 (2009).
313. Tubo, N. J. *et al.* Single naive CD4<sup>+</sup> T cells from a diverse repertoire produce different effector cell types during infection. *Cell* **153**, 785–796 (2013).
314. Li, J., Lu, E., Yi, T. & Cyster, J. G. EB12 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-quenching dendritic cells. *Nature* **533**, 110–114 (2016).

# **PUBLICATIONS**



## **Ageing of T-dependent B cell responses**

Fanny Martinez, **Julien Novarino**, José Enrique Mejía, Nicolas Fazilleau,  
Meryem Aloulou  
Immunology Letters, 2021

## **Ageing promotes early T follicular helper cell differentiation by modulating expression of RBPJ**

Louise M C Webb , Sigrid Fra-Bido , Silvia Innocentin , Louise S Matheson,  
Noudjoud Attaf, Alexandre Bignon, **Julien Novarino**, Nicolas Fazilleau,  
Michelle A Linterman  
Aging Cell, 2021

## **Evidence for tmTNF reverse signaling in vivo: Implications for an arginase-1-mediated therapeutic effect of TNF inhibitors during inflammation**

Diallo K, Simons N, Sayegh S, Baron M, Degboé Y, Boyer JF, Kruglov A,  
Nedospasov S, **Novarino J**, Aloulou M, Fazilleau N, Constantin A, Cantagrel A,  
Davignon JL, Rauwel B.  
iScience, 2021