

Université Paris Descartes

Ecole doctorale : BioSPC

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Discipline : **IMMUNOLOGIE**

Présentée par **Mélanie DURAND**

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Paris Descartes

**SPECIALISATION FONCTIONNELLE DES CELLULES MYELOIDES
MONONUCLEAIRES HUMAINES DANS L'INDUCTION DES
REPONSES T FOLLICULAIRE HELPER**

Thèse dirigée par :

Dr. Elodie SEGURA & Dr. Sebastian AMIGORENA

Soutenue publiquement le 29 novembre 2017 devant le jury composé de :

Dr Nathalie BENDRISS-VERMARE

Rapporteur

Dr Nicolas FAZILLEAU

Rapporteur

Dr Nathalie SCHMITT

Examineur

Dr Florence VELGE-ROUSSEL

Examineur

Dr Karin TARTE

Examineur

Dr Lionel POULIN

Examineur

Spécialisation fonctionnelle des cellules myéloïdes mononucléaires humaines dans l'induction des réponses T folliculaire helper

RESUME

Les cellules T folliculaires helper (Tfh) jouent un rôle central dans la mise en place de réponses humorales efficaces. En effet, les Tfh participent à la sélection des lymphocytes B permettant le développement de lymphocytes B mémoires et d'anticorps de haute affinité. Les Tfh représentent ainsi une cible prometteuse pour la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment pour augmenter l'efficacité de la vaccination. Ainsi, il apparaît crucial de mieux comprendre les étapes menant à leur développement, en particulier chez l'Homme.

L'initiation de la polarisation Tfh se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires et met en jeu les cellules myéloïdes mononucléaires (MMC). Les MMC présentes dans les organes lymphoïdes comprennent les macrophages résidents et trois sous populations de DC résidentes : les cDC1 (CD141⁺), les cDC2 (CD1c⁺) et les pDC. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle respectif des sous populations de MMC humaines dans l'induction de la polarisation Tfh. Ainsi, les travaux effectués au cours de ma thèse avaient pour objectifs dans un premier temps d'analyser la capacité des différentes populations de MMC à induire la polarisation Tfh, afin de mettre en évidence de potentielles spécialisations fonctionnelles. Dans un second temps, nous nous sommes concentrés sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction par les MMC de la polarisation Tfh.

Nous avons montré une spécialisation fonctionnelle des cDC2 et des macrophages des amygdales pour la polarisation Tfh. Toutefois, des différences ont été observées entre les cDC2 et macrophages, puisque les macrophages induisent la sécrétion par les lymphocytes T d'une grande quantité de CXCL13 par rapport au cDC2, qui sont plus efficaces pour induire la production d'IL21. Nous avons pu également montrer que les cDC2 et macrophages sécrétaient des cytokines précédemment identifiées comme ayant un rôle dans l'induction des Tfh telles que IL12p70, ActivinA et TGFβ. Afin de confirmer le rôle de ces cytokines dans la polarisation induite par les MMC d'amygdales, nous avons utilisé des anticorps bloquants dans nos expériences de polarisation T helper. Ainsi, nous avons confirmé le rôle de l'IL12p70, de l'Activin A et du TGFβ dans l'induction des Tfh humains. Nos résultats suggèrent également un rôle de l'Activin A et de TGFβ dans l'induction de la sécrétion de CXCL13, alors que l'IL12p70 serait impliqué dans l'induction de la sécrétion d'IL21. Nos résultats suggèrent aussi l'existence de deux sous populations de Tfh caractérisées soit par l'expression d'IL21 soit par l'expression de CXCL13.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse enrichissent ainsi les connaissances sur la spécialisation fonctionnelle des sous populations de DC et des macrophages humains, et apportent de nouveaux éléments pour la compréhension de la différenciation des Tfh humains.

Mots clés : Cellules dendritiques humaines, cDC2, Macrophages, Spécialisation fonctionnelle, T folliculaire helper.

Functional specialisation of human mononuclear myeloid cells for the induction of T follicular helper responses

ABSTRACT

T follicular helper cells (Tfh) play a key role in the establishment of efficient humoral responses. Indeed, Tfh are involved in B lymphocyte selection allowing the development of high affinity memory B cells and antibodies. Tfh are promising targets for new therapeutic strategies, especially to increase the effectiveness of vaccination. Thus, it is crucial to better understand the stages leading to their development, especially in human.

Initiation of Tfh polarisation occurs in secondary lymphoid organs and involves mononuclear myeloid cells (MMC). MMC from secondary lymphoid organs include resident macrophages and three subsets of resident Dendritic Cells (DC): cDC1 (CD141⁺), cDC2 (CD1c⁺) and pDC. We were particularly interested in human MMC subsets respective roles in Tfh polarisation induction. Thus, the work carried out during my thesis aimed first at analysing the ability of different populations of MMC to induce Tfh polarisation, in order to highlight potential functional specialisations. In a second step, we focused on the molecular mechanisms involved in Tfh polarisation induction by MMC.

We have shown a functional specialisation of cDC2 and tonsillar macrophages for Tfh polarisation. However, differences have been observed between cDC2 and macrophages, since macrophages induce secretion by T cells of a large amount of CXCL13 compared to cDC2, which are more effective in inducing IL21 production. We have also been able to show that cDC2 and macrophages secreted cytokines previously shown to play a role in Tfh induction such as IL12p70, ActivinA and TGF β . In order to confirm the role of these cytokines in Tfh polarisation induced by tonsil MMCs, we used blocking antibodies in our T helper polarisation experiments. Thereby, we confirmed the role of IL12p70, Activin A and TGF β in the induction of human Tfh. Our results also suggest a role for Activin A and TGF β in inducing secretion of CXCL13, whereas IL12p70 would be involved in the induction of IL21 secretion. Besides, our results suggest the existence of two Tfh subsets characterised by expression of either IL21 or CXCL13.

The work fulfilled during my thesis broadens the knowledge on the functional specialisation of human DC subsets and macrophages, and provides new insights into the differentiation of human Tfh.

Keywords: Human dendritic cells, cDC2, Macrophages, functional specialisation, T follicular helper.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer ces travaux. Je souhaite remercier chaleureusement le Dr Nathalie Bendriss-Vermare et le Dr Nicolas Fazilleau pour le temps précieux qu'ils ont bien voulu accorder à l'évaluation de ce manuscrit de thèse. Un grand merci aux Dr Nathalie Schmitt, Dr Florence Velge-Roussel, Dr Karin Tarte et Dr Lionel Poulin pour avoir accepté d'être examinateurs dans ce jury de thèse. Merci à vous tous de faire le déplacement à l'occasion de ma soutenance de thèse et d'enrichir de vos expertises la discussion autour de ce travail.

Je souhaite remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse Elodie et Sebastian. Merci infiniment de m'avoir accueillie au sein de cette équipe et de m'avoir donné l'opportunité d'enrichir mon parcours d'ingénieure en réalisant une thèse à vos côtés. Merci pour votre confiance, vos conseils et discussions. Elodie, je voudrais également te remercier pour ta patience, ta disponibilité et un grand merci pour la relecture de ce manuscrit.

Merci à l'ensemble des membres de l'Unité U932, pour toutes ces interactions enrichissantes que j'ai pu avoir avec vous tout au long de ces années. Merci aux chefs d'équipes de l'Unité pour vos remarques et conseils qui m'ont toujours beaucoup apporté. Un grand merci à Lucia pour nos discussions Tfh et ton regard critique et bienveillant sur mon projet. Je voudrais tout particulièrement remercier Paula et Vassilli qui ont initié la collaboration avec l'Hôpital Necker. Un grand merci à Carolina, Maximilien, Coline pour le temps qu'ils ont passé à organiser les diverses collaborations avec l'EFS.

Merci aux membres de la plateforme de cytométrie, Annick, Sophie et Zofia. Annick et Sophie merci beaucoup pour votre aide, d'être parfois venues plus tôt ou parties plus tard que prévu, pour la hotline « ARIA assistance téléphonique weekend et jour férié. Bonjour... » vous m'avez sortie de bien des galères, alors tout simplement merci.

Merci aux personnes de l'Hôpital Necker, et notamment Laurence et Delphine qui facilitent grandement les échanges d'informations et la récupération des échantillons.

Merci aux personnes ayant peuplé le deuxième étage du pavillon Pasteur, où l'ambiance a toujours été incroyable. Merci pour nos discussions scientifiques, nos discussions moins scientifiques, votre bonne humeur, votre bon humour, merci à Mario, Joao, Armelle, Joanna, Olivier J, Patrycja, Mercedes, Ulf, Derek, Thomas, Marine G, Marianne, Nina, Mélissa, Paul M, Lorenzo, Christel, Ella, Luigia, Angélique, Sophie, Andy, Stéphanie, Laurence, Adeline, Michael, Lorena, Andrés Z, Andrés A, Omar,

Léo, Tiphène, Tsing Lee, Mathilde, Olivier B, Cassandra, Elodie M, Claire, Clotilde...

Je voudrais plus particulièrement remercier mon équipe. Merci à tous pour votre soutien, vos remarques et commentaires. Merci à Joao pour tous tes conseils, tes encouragements et ta ... subtilité ;). Merci à Patrycja, Ulf, Derek, Thomas pour nos discussions et aussi pour avoir accepté mon humour de frenchie ;). Merci à Marianne et Nina pour nos pauses de décompression, votre aide dans la dernière ligne droite et votre bonne humeur. Merci aussi à Florence, Christel, Mengliang, Paul, Luigia, Andres A, Guadalupe, Antonela, Myriam, Alice et Tsing Lee, Adeline, Danielle, Sandrine.

Un grand merci à Mario, Joanna et Marine G, nous avons été thésards ensemble, nous avons galéré ensemble, nous avons réfléchi ensemble, nous avons relativisé ensemble, nous avons rigolé ensemble, nous avons décompressé ensemble, nous avons rallé ensemble... un grand merci pour nos discussions, vos encouragements, nos fous rires...

Parce que nos décisions sont influencées par nos expériences et nos rencontres, je ne peux pas écrire mes remerciements de thèse sans rendre hommage à Albert Barillée, réalisateur et scénariste de Il était une fois la vie, ou créateur de mon premier souvenir / émerveillement scientifique. Cette série a fortement participé à mon engouement pour les sciences, alors merci. Je voudrais également exprimer toute ma gratitude aux personnes qui en me faisant découvrir le monde de la recherche, m'ont fait profiter de leur passion, de leur curiosité et de leur motivation, si je soutiens ma thèse cette année c'est aussi grâce à vous, alors merci à la team Collège de France : Elisa, Sébastien, Marine, Isabelle, Karine, Nicolas, Ariane, Claudia, Raquel, Romain, Cathy et Nathan.

Au final une thèse c'est toujours compliqué, il y a des hauts, des bas, du découragement, de la persévérance, de l'euphorie, et à la fin on y arrive grâce à toutes ces personnes qui nous soutiennent : les amis, Caroline, Armelle, Marine B, Mélanie C, Slim, Isabelle, Elisa, Sébastien, Marine B ; les amis collègues, Mario, Joanna, Joao, Patrycja, Mercedes, Ulf, Marine G, Marianne, Nina ; les amis coloc (eux ils font aussi à manger ;) mais en échange ils subissent toutes sortes de docus), Mélissa, Claire, Damien et Arthur (même si c'était que deux semaines ;D) et enfin il y'a la famille...

...Merci à mes parents et grands-parents pour m'avoir toujours poussée à faire ce que j'aimais et pour leur soutien indéfectible de toutes les manières possibles. Merci à mon frère, Aurélien, merci pour ton soutien, nos discussions, nos psychanalyses ;), nos rigolades, tu es un exemple pour moi, alors merci.

TABLE DES MATIERES

ABBREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	2
INTRODUCTION	3
PARTIE I : Réponses immunitaires adaptatives	4
I. Les cellules dendritiques	5
A. Reconnaissance des pathogènes	5
B. Présentation antigénique	5
II. Les Lymphocytes T	6
A. Reconnaissance de l'antigène par le TCR et molécules de co-stimulation	7
B. Différenciation des lymphocytes T CD4 effecteurs	8
PARTIE II : Lymphocytes T folliculaires helper	10
I. Découverte des lymphocytes T folliculaires helper	10
A. Remise en cause de la dichotomie Th1/Th2	11
1. Paradigme Th1 / Th2	11
2. Identification des polarisation Treg et Th17 et des facteurs de transcription spécifiques des lignages T helper.	11
B. Nouveau lignage T folliculaire helper	12
1. Identification de CXCR5 chimioattractant 5 (CXCR5)	12
2. Profil transcriptionnel unique des Tfh	12
3. Facteur de transcription Tfh : B cell lymphoma 6 (Bcl6)	13
C. Phénotype des lymphocytes Tfh	13
II. Fonction des lymphocytes T folliculaires helper	13
A. Phase extra-folliculaire	14
1. Génération rapide de plasmocytes extra-folliculaires	15
2. Interaction stable et prolongée entre les Tfh et les lymphocytes B	15
B. Phase Folliculaire et phase GC	17
1. Sélection cyclique des cellules B de haute affinité par les Tfh	17
2. Rôle des facteurs sécrétés par les Tfh	20
a. CXCL13	20
b. IL4	20
c. IL21	20
III. Différenciation spatio-temporelle des lymphocytes T folliculaires helper	22
A. Régulation transcriptionnelle des Tfh	23
1. Migration cellulaire	23
2. Répression des voies de différenciation autre que Tfh	24
3. Fonction Tfh	24
B. Initiation de la différenciation Tfh par les DC dans la zone T	25
1. Signal TCR (Récepteur des Cellules T)	25
2. Signaux de co-stimulation	25
3. Cytokines	27
C. Différenciation Tfh à la bordure T:B	29

1. Migration à la bordure T:B	29
2. Différenciation Tfh à la bordure T:B	30
3. Finalisation de la différenciation Tfh par les lymphocytes B spectateurs	31
D. Maintenance des Tfh dans le centre germinatif	32
1. Migration des Tfh dans le follicule B	32
2. Maintenance de la différenciation Tfh	32
PARTIE III : Cellules myéloïdes mononucléaires humaines	34
I. Origines et différenciation des cellules myéloïdes mononucléaires humaines	34
A. Cellules dendritiques	35
1. Ontogénie	36
2. Facteurs de transcription impliqués dans le développement des sous-populations de DC	38
3. Rôle des cytokines dans le développement des sous-populations de DC	39
B. Monocytes	39
C. Macrophages résidents	40
II. Distribution des cellules myéloïdes mononucléaires dans les tissus	43
A. Sang	44
1. Sous-populations de DC circulantes	44
2. Monocytes circulants	45
B. Tissus périphériques	45
C. Organes lymphoïdes secondaires	46
III. Spécialisation Fonctionnelle	46
A. Reconnaissance des pathogènes	47
1. Récepteurs de reconnaissance aux pathogènes (PRR)	47
2. Maturation des DC	49
B. Réponse T CD8	50
1. Présentation croisée	50
2. Réponses T CD8	51
C. Réponses T CD4	52
1. Induction des réponses T helper 1	52
2. Induction des réponses T helper 2	53
3. Induction des réponses T helper 17	53
4. Induction des réponses T régulatrices	54
5. Induction des réponses T folliculaire helper	54
PARTIE IV : Objectifs	55
RESULTATS	56
ARTICLE	56
Summary	56
Introduction	57
Results	59
Discussion	74
Experimental procedures	76
Supplemental information	83
References.	89

RESULTATS COMPLEMENTAIRES	92
Test fonctionnel des Tfh : capacité à aider des cellules B	92
A. Introduction	92
B. Matériels & méthodes	92
1. Différenciation in vitro et purification des DC CD1a et DC CD14	92
2. Isolation des lymphocytes T CD4 naïfs et cellules B mémoires	92
3. Co-cultures	93
4. Analyses par cytométrie en flux	93
a. Polarisation T helper – phénotypage T _{DC}	93
b. Phénotype des lymphocytes B après co-culture avec les T _{DC} (B _{TDC})	93
C. Résultats	94
D. Conclusion	95
DISCUSSION	96
I. Critiques et limitations expérimentales	97
A. Echantillons humains	97
B. Limitations expérimentales	98
1. Digestion tissulaire, isolation et culture des sous-populations de MMC	98
2. Système allogénique de co-culture cellulaire entre MMC et lymphocytes T CD4 naïfs	100
3. Test fonctionnel des Tfh : capacité à aider des cellules B	100
4. Analyse Single cell RNA seq des lymphocytes T CD4 mémoires des amygdales pour l'identification de différentes populations de Tfh	101
II. Discussion et perspectives des résultats obtenus	102
A. Spécialisation fonctionnelle des cDC2 et macrophages pour la polarisation Tfh et mécanismes moléculaires mis en place.	102
1. Résumé des résultats obtenus	102
2. Spécialisation des cDC2 et macro pour la polarisation Tfh	103
3. Mécanismes moléculaires de l'induction de la polarisation Tfh par les cDC2 et macrophages Identification de deux sous populations distinctes de Tfh	105
B. Identification de deux sous populations distinctes de Tfh	106
1. Résumé des résultats obtenus	106
2. Relevance physiologique de l'existence de ces deux sous-populations de Tfh	107
III. Conclusion	109
BIBLIOGRAPHIE	110
ANNEXES	125

ABBREVIATIONS

ACVR	: Activin A Récepteur	IFN	: Interferon
ADN	: Acide Désoxyribo Nucléique	Ig	: Immunoglobulines
Ag	: Antigènes	IL	: Interleukine
AP1	: Activator Protein-1	LC	: Cellule de Langerhans
Ascl2	: Achaete-scute complex homolog 2	LZ	: Zone claire
Bcl6	: B cell lymphoma 6	M-CSF	: Monocyte-Colony Stimulating Factor
BCR	: Récepteur des Cellules B	MDA-5	: Melanoma Differentiation-Associated gene 5
BLC1	: B Lymphocyte Chimioattractant 1	MDP	: Monocytes DC Précurseur
BLR1	: Burkitt Lymphoma Recepteur 1	mig-MMC	: MMC migratoires
cDC	: DC conventionnelles	migcDC	: Population migratoire des cDC
CDP	: Précurseur Commun des DC	MLP	: Précurseur Lymphoïde Multipotent
Chip	: Combining chromatin immunoprecipitation	MMC	: Cellules myéloïdes mononucléaires
CLP	: Précurseur Lymphoïde Commun	moDC	: DC dérivées de monocytes
CLR	: Récepteur de type C-Lectine	moMAC	: Macrophages dérivés de monocytes
CMH	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité	MPP	: Précurseur Multipotent
cMoP	: Progéniteur commun des monocytes	MR	: Mannose récepteur
CMP	: Précurseur Myéloïde Commun	NK	: Natural Killer
CPA	: Cellules présentatrices d'antigène	NOD	: Nucleotide Oligomerization Domain
CSR	: Commutation de Classe (Class Switch Recombination)	PAMPs	: Motifs moléculaires associés aux pathogènes
CTL	: Cellule effectrice T CD8 cytotoxique	PD1	: Programmed cell death 1
CXCL13	: C-X-C ligand 13	pDC	: DC plasmacytoïdes
CXCR5	: CXC chimiokine Récepteur 5	PI3K	: Phosphoinositide 3-kinase
DAMPs	: Signaux de danger	PRR	: Récepteur de reconnaissance aux pathogènes
DC	: Cellules Dendritiques	RIG	: Retinoic acid-Inducible Gene
DRD1	: Dopamine Récepteur D1	RLR	: Récepteur de type RIG
DZ	: Zone sombre	RNA	: Acide ribonucléique
EBI2	: Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2	S1PR2	: Sphingosine-1-phosphate récepteur 2
ESC	: Cellule Souche Embryonnaire	SAP	: SLAM-Associated Protein
Flt3	: FMS-like tyrosine kinase 3	SCF	: Stem Cell Factor
Flt3-L	: Flt3 Ligand	SLAM	: Signaling Lymphocyte Activation Molecule
FT	: Facteurs de transcription	SLE	: Lupus érythémateux disséminé
GC	: Centre germinatif	STAT	: Signal Transducer and Activator of Transcription
GM-CSF	: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor	TCR	: Récepteur des cellules T
GM-CSF-R	: Récepteur au GM-CSF	Tfh	: Lymphocyte T folliculaire helper
GMDP	: Granulocytes Monocytes DC Précurseur	Tfr	: Lymphocyte T folliculaire régulateur
HIES	: Syndrome d'Hyper IgE	TGFR	: TGF Récepteur
HIGM	: Syndrome d'Hyper IgM	Th	: Lymphocyte T helper
HMS	: Hyper Mutation Somatique	TLR	: Récepteur de type Toll
HPV	: Human papilloma Virus	Treg	: Lymphocyte T régulateur
HSC	: Cellules Souches Hématopoïétiques		
ICOS	: Inducible T-cell COStimulator		

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION

Figure 1 :	Initiation des réponses immunitaires adaptatives	4
Figure 2 :	Différenciation et activation des lymphocytes T suivant leur localisation tissulaire	6
Figure 3 :	Différenciation des lymphocytes T CD8 effecteurs	8
Figure 4 :	Induction par les cellules dendritiques des différentes polarisations T CD4	9
Figure 5 :	Etapas de différenciation des lymphocytes B	14
Figure 6 :	Phase extra-folliculaire de la différenciation des lymphocytes B	16
Figure 7 :	Formation des centres germinatifs (GC)	17
Figure 8 :	Phase GC sélection cyclique des lymphocytes B	19
Figure 9 :	Phases de différenciation des lymphocytes T folliculaires helper	22
Figure 10 :	Initiation de la différenciation Tfh par les DC - Reconnaissance antigénique et molécules de co-stimulation	27
Figure 11 :	Initiation de la différenciation Tfh par les DC - Cytokines	29
Figure 12 :	Migration des pré-Tfh à la bordure T:B.	30
Figure 13 :	Maintenance des Tfh dans le GC	33
Figure 14 :	Ontogénie des sous-populations de DC humaines	37
Figure 15 :	Ontogénie alternative des sous-populations de DC humaines	38
Figure 16 :	Ontogénie des Monocytes et des cellules dérivées des Monocytes humaines	40
Figure 17 :	Ontogénie des Macrophages résidents humains	42
Figure 18 :	Distribution des MMC dans les tissus	43
Tableau 1 :	Expression de différents PRR selon les sous-populations de MMC	48

RESULTATS

Figure 1 :	Tonsil cDC2 and macrophages induce Tfh polarisation	59
Figure 2 :	Activation through TLR7/8 does not change the functional specialization for Tfh induction	62
Figure 3 :	Macrophages and Tfh cells are present in the same anatomical regions in the tonsil	64
Figure 4 :	cDC2 and macrophages are the most efficient secretors of Tfh-polarizing cytokines	66
Figure 5 :	Activin A and TGF β , but not IL12p70, are involved in inducing CXCL13-producing CD4 T cells	68
Figure 6 :	IL21 and CXCL13 are produced by distinct populations of Tfh cells	70
Figure 7 :	Distinct subpopulations of Tfh cells are present in vivo in tonsils	72
Figure S1 :	Phenotype of purified tonsil DC subsets and macrophages	83
Figure S2 :	Automated image analysis	84
Figure S3 :	Cytokine secretion profile after in vitro activation	85
Figure S4 :	Th17 polarisation assay with a cocktail of blocking antibodies	86
Figure S5 :	T cell polarisation assay with individual blocking antibodies	87
Figure S6 :	Intracellular cytokine stainings	88
Figure Résultats complémentaires :	Induction de lymphocytes Tfh fonctionnels par les DC CD1a dérivées <i>in vitro</i>	94

DISCUSSION

Figure 19 :	Spécialisation fonctionnelle des cDC2 et macrophages pour la polarisation Tfh	103
-------------	---	-----

INTRODUCTION

Cette introduction s'organise autour de trois parties principales. Dans une première partie générale, je vais revenir rapidement sur la mise en place des réponses immunes adaptatives et leur diversité, en présentant les différents acteurs cellulaires impliqués dans ce type de réponses tels que les cellules dendritiques et les lymphocytes T.

Dans un second temps, je m'intéresserai plus particulièrement à la réponse T folliculaire helper (Tfh). Nous reviendrons brièvement sur les événements qui ont mené à leur découverte avant de décrire plus précisément leurs fonctions ainsi que les étapes caractérisant leur différenciation.

La troisième et dernière partie présentera les différentes sous populations de MMC humaines de leur ontogénie à leur localisation tissulaire. J'aborderai ensuite le concept de spécialisation fonctionnelle et je vous présenterai les spécialisations fonctionnelles mise en évidence pour les différentes sous populations de MMC humaines.

PARTIE I : Réponses immunitaires adaptatives

La mise en place des réponses immunitaires adaptatives met en jeu différents types cellulaires : les cellules dendritiques et les lymphocytes. Les cellules dendritiques (DC), identifiées en 1973 par Ralph Steinman et Zanvil Cohn (Steinman and Cohn, 1973), sont spécialisées dans la reconnaissance des pathogènes et de leurs motifs moléculaires associés (PAMPs) ainsi que dans la présentation d'antigènes (Ag) via leurs molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Dans les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T naïfs sont activés et polarisés par les DC. Les DC présentent des complexes CMH-Ag induisant la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs mettant en place la réponse immune adaptative (Figure 1).

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 1 : Initiation des réponses immunitaires adaptatives.

Sur le site de l'infection, les DC immatures sont activées par des signaux de danger (DAMPs) et des PAMPs induisant leur migration jusqu'au tissu lymphoïde secondaire drainant via les vaisseaux lymphatiques afférents. Une fois dans le ganglion, les DC présentent les peptides antigéniques via leurs molécules de CMH de classe I et II aux lymphocytes T CD8 et T CD4 respectivement, activant ainsi des cellules T via leur TCR (Récepteur des cellules T). Les DC fournissent également des signaux de co-stimulation permettant la différenciation des lymphocytes en lymphocytes T effecteurs de la réponse immune adaptative. (deLuca and Gommerman, 2012)

I. Les cellules dendritiques

Les DC sont capables de reconnaître les pathogènes, de capturer des Ag provenant de ces pathogènes, de les dégrader et de les présenter sous forme de peptides antigéniques *via* les molécules de CMH de classe I et II (Granucci et al., 2005). Les DC peuvent ainsi amorcer efficacement l'activation et la polarisation des lymphocytes T naïfs, afin d'initier une réponse immunitaire adaptative.

A. Reconnaissance des pathogènes

Les DC expriment des molécules capables de reconnaître les propriétés moléculaires d'un pathogène : les récepteurs de reconnaissance aux pathogènes (PRR). Les PRR reconnaissent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), parmi eux les récepteurs de type Toll (TLR) ou encore de type NOD (Nucleotide Oligomerization Domain). L'activation de ces récepteurs induit la maturation des DC, entraînant la diminution de leur capacité de phagocytose/endocytose, l'augmentation de leur capacité migratoire vers les ganglions lymphatiques et l'augmentation d'expression des molécules de CMH et des molécules de co-stimulation, comme CD80, CD86 ou encore CD40, à leur surface (Banchereau et al., 2000)

B. Présentation antigénique

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'Ag professionnelles, elles apprêtent à leur membrane des antigènes endogènes ou exogènes, *via* les molécules de CMH-I et de CMH-II. Toutes les cellules nucléées de l'organisme présentent à leur surface des complexes CMH-I-Ag endogènes (Ag du soi). La présentation d'Ag endogènes sur les molécules de CMH-I est essentielle pour établir et maintenir la tolérance immunitaire. Les DC sont également capables de présenter des complexes CMH-I-Ag exogènes grâce au mécanisme de présentation croisée (Joffre et al., 2012). Les DC, mais aussi les macrophages et les lymphocytes B, apprêtent et présentent des Ag endogènes ou exogènes sur des molécules CMH-II, on parle alors de présentation directe (Jensen, 2007).

Le rôle des DC est de présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes T pour induire leur activation. On distingue deux types de lymphocytes T, chacun étant caractérisé par l'expression soit de CD4 (T CD4) soit de CD8 (T CD8). Ainsi, les molécules de CMH-I sont reconnues par les lymphocytes T CD8 alors que les molécules de CMH-II sont reconnues spécifiquement par les cellules T CD4.

II. Les Lymphocytes T

Les lymphocytes T se différencient à partir de précurseurs, les pré-thymocytes, présents dans la moelle osseuse. Ces derniers migrent, via la circulation sanguine, jusqu'au thymus, lieu de différenciation des lymphocytes T qui rejoignent ensuite les organes lymphoïdes secondaires, lieu d'activation et de polarisation des lymphocytes T (Figure 2). La polarisation des lymphocytes T se fait par l'intégration de différents signaux apportés par les DC et le microenvironnement. Le premier est la reconnaissance spécifique de l'Ag, par les récepteurs des cellules T (TCR), qui reconnaissent les peptides antigéniques présentés par les DC sur des molécules de CMH. Le second signal est amené par les molécules de co-stimulation qui vont stabiliser l'interaction entre les DC et les cellules T et promouvoir la survie et l'expansion des cellules T. Enfin, le dernier signal provient des cytokines sécrétées par les DC ou présentes dans l'environnement local, qui sont impliquées dans la polarisation des cellules T en différentes sous-populations de lymphocytes T effecteurs (Curtsinger and Mescher, 2010).

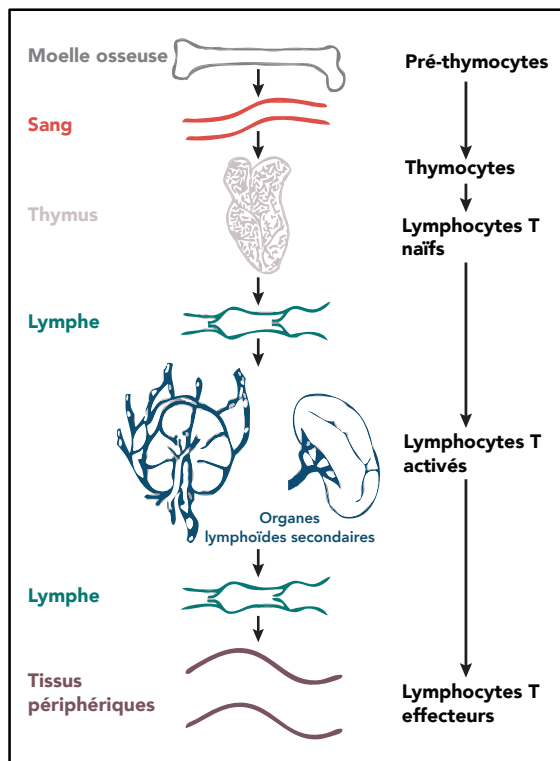


Figure 2 : Différenciation et activation des lymphocytes T suivant leur localisation tissulaire.

Les lymphocytes T proviennent de précurseurs de la moelle osseuse, les pré-thymocytes. Ces derniers rejoignent le thymus via la circulation sanguine et se différencient après différentes étapes de sélection en lymphocytes T naïfs. Après migration dans les organes lymphoïdes secondaires les lymphocytes T naïfs sont activés par les DC et deviennent des lymphocytes T effecteurs qui migrent dans les tissus périphériques.

A. Reconnaissance de l'antigène par le TCR et molécules de co-stimulation

L'initiation de la signalisation lymphocytaire T induite par la reconnaissance antigénique dépend du niveau d'affinité de l'Ag pour le TCR. Toutefois, l'activation du TCR ne suffit pas à induire une expansion clonale suffisante des lymphocytes T et nécessite la présence d'un second signal d'activation médié par les molécules de co-stimulation (Chen and Flies, 2013). La molécule de co-stimulation la mieux caractérisée est CD28 qui interagit avec les récepteurs CD80 et CD86 (ou molécules B7-1 et B7-2) qui sont entre autres exprimés par les DC matures. D'autres interactions T:DC participent à la différenciation des lymphocytes telles que les co-stimulations médiées par ICOS:ICOSL, CD40L:CD40, OX40:OX40L, LFA-1:ICAM-1 ou bien les interactions co-inhibitrices PD1:PDL1 et CTLA-4:CD80/86 (Chen and Flies, 2013). Dans un contexte inflammatoire, l'intégration de ces deux types de signaux (activation du TCR et signaux de co-stimulation) entraîne la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs, se traduisant par une augmentation de la survie cellulaire et de la prolifération des cellules T effectrices. C'est à un stade précoce de l'activation que le facteur de survie Interleukine-2 (IL2) sécrété par les lymphocytes joue un rôle dans leur survie et leur prolifération.

Les lymphocytes T CD8 se différencient en cellules effectrices T CD8 cytotoxiques (CTL). Les CTL sont des effecteurs de la réponse immunitaire cellulaire. Grâce à leur capacité de sécrétion de molécules cytotoxiques comme la perforine ou les granzymes, elles induisent la mort des cellules cibles (cellules infectées ou tumorales). Cependant, les T CD8 nécessitent des signaux de co-stimulation importants pour leur différenciation en CTL. En effet, comme les T CD8 entraînent une réponse cytotoxique qui est potentiellement dangereuse pour toutes cellules nucléées de l'organisme exprimant le complexe CMH-I-Ag, il est crucial de limiter l'activation des T CD8 afin d'éviter une réponse auto-immune de ces derniers endommageant les tissus. Ainsi, l'activation des T CD8 nécessite la collaboration des DC mais aussi des lymphocytes T CD4 (Figure 3). Les cellules T CD4 helper (Th) et les DC envoient ainsi des signaux cytokiniques et de co-stimulation via la signalisation CD40-CD40L induisant l'activation et la différenciation complète des T CD8 en CTL (Mescher et al., 2006).

Figure 3 : Différenciation des lymphocytes T CD8 effecteurs.

Les lymphocytes T CD4 activés interagissent avec les DC via les signalisations TCR-MHCII-Ag et CD40-CD40L induisant une augmentation de l'expression de complexes CMH et de molécules de co-stimulation à la surface des DC. Ainsi les DC peuvent recruter les lymphocytes T CD8 et induire des signaux de survie et de prolifération via la reconnaissance de l'antigène (MHCII-Ag-TCR), la sécrétion de cytokines et l'expression de molécules de co-stimulation. (Laidlaw et al., 2016)

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

B. Différenciation des lymphocytes T CD4 effecteurs

La différenciation des lymphocytes T CD4 est plus diversifiée que celle des cellules T CD8, et nécessite l'intervention d'un troisième type de signaux qui proviennent du micro-environnement et des DC. Ces signaux orientent et initient la différenciation des lymphocytes T CD4 en lymphocytes T helper effecteurs (Th) afin d'adapter la réponse immune au pathogène rencontré. Ils jouent un rôle crucial dans la modulation des réponses immunitaires contre divers pathogènes, en agissant sur d'autres cellules impliquées dans la réponse immune, tels que les T CD8 ou encore les lymphocytes B. Il existe un large éventail de populations T helper, les plus décrites sont les Th1, Th2, Th17, T régulateurs (Treg) et T folliculaires helper (Tfh) (Raphael et al., 2015; Zhu et al., 2010) (Figure 4).

Les cellules Th1 sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription Tbet et par la sécrétion d'IFN γ . Elles ont un rôle important dans l'élimination des pathogènes intracellulaires incluant les parasites, les bactéries et les virus. De par leur capacité à sécréter de l'IFN γ , elles sont capables d'augmenter l'activité phagocytaire des phagocytes mononucléaires comme les macrophages ou encore d'activer les cellules NK. Les Th1 sécrètent également de l'IL2, ce qui favorise la prolifération et l'activation des cellules T CD8 cytotoxiques mais aussi le développement de cellules T CD8 mémoires. Les lymphocytes Th2 sont importants dans la réponse immunitaire contre les parasites extracellulaires, et participent à l'initiation et le maintien de pathologies allergiques comme l'asthme. Les principales cytokines sécrétées par les cellules Th2 sont IL4, IL5 et IL13 et les lymphocytes Th2 sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription Gata3. La polarisation Th17 est associée à un profil pro-inflammatoire, les Th17 expriment ROR γ t et sécrètent de l'IL17. Ces cellules sont impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires telles que les macrophages et neutrophiles, sur le site de l'infection. Les Treg expriment le facteur de transcription Foxp3 et sécrètent les cytokines IL10, IL-35 et

TGF β . Ils sont impliqués dans la tolérance immunitaire et préviennent l'auto réactivité des lymphocytes T. Les lymphocytes T folliculaires helper ou Tfh, que je vais détailler dans la suite de cette introduction en termes de fonction et de différenciation, ont pour rôle de soutenir la réponse immunitaire humorale en aidant les lymphocytes B. Enfin, les Tfh régulateurs ou Tfr, présents au niveau des centres germinatifs des follicules B, ont également été décrits et contrôlent l'amplitude de la réponse humorale lors d'infections.

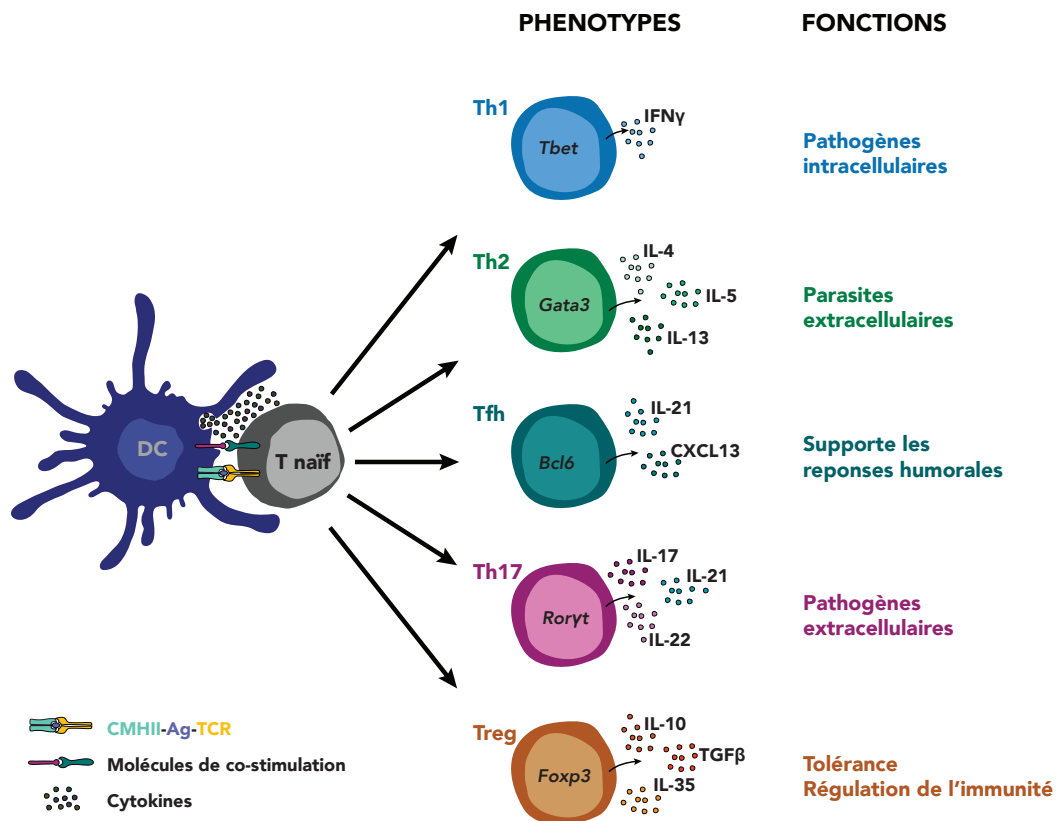


Figure 4 : Induction par les cellules dendritiques des différentes polarisations T CD4.

L'induction des polarisations T CD4 passe par l'intégration de trois types de signaux apportés par les DC : la reconnaissance spécifique de peptides antigéniques présentés sur les molécules de CMHII aux lymphocytes T CD4 naïfs via leur TCR, des molécules de co-stimulation et enfin des cytokines. L'ensemble de ces signaux permet la différenciation des T CD4 en différents T CD4 effecteurs. Les T CD4 effecteurs les plus caractérisés sont les Th1, Th2, Tfh, Th17 et Treg. Ils sont caractérisés par l'expression de facteurs de transcription spécifiques (T-bet, Gata3, Bcl6, Roryt et Foxp3 respectivement) et de profils de sécrétion cytokinique distincts qui traduisent des fonctions spécifiques de chaque sous-population de T helper.

PARTIE II : Lymphocytes T folliculaires helper

Les lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) jouent un rôle crucial dans l'établissement d'une réponse immunitaire humorale en contrôlant la formation des centres germinatifs (GC) mais aussi les réactions cellulaires qui s'y déroulent. Avant de rentrer plus en détail sur leur fonction et les mécanismes moléculaires mis en place pour promouvoir les réponses humorales, sur leur différenciation et leur régulation transcriptionnelle, revenons sur les événements qui ont mené à leur identification.

I. Découverte des lymphocytes T folliculaires helper

L'importance d'une interaction entre les lymphocytes T et B pour l'induction de réponses humorales est connue depuis les années 60 (Mitchison, 2004). En effet les travaux de Miller et Claman ont, en utilisant la technique de transfert adoptif, mis en évidence que ni les lymphocytes T ni les cellules B ne pouvaient à elles seules induire une production d'anticorps. Seul le transfert de ces deux populations ensemble transférait la capacité de production d'anticorps aux souris irradiées (Miller, 1965) (Claman et al., 1966). Mitchell et Miller ont ensuite montré que l'ablation du thymus n'entraînait pas de diminution du nombre de cellules, mais empêchait leur activation, mettant ainsi en évidence un rôle des lymphocytes T pour la fonction et non le développement des lymphocytes B. De plus, ils ont observé que les lymphocytes T devaient rentrer en contact avec l'antigène avant l'interaction avec les cellules B pour induire une réponse humorale (Mitchell and Miller, 1968) (Miller et al., 1971). La découverte du rôle du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T (Rosenthal and Shevach, 1973) a permis la mise en évidence d'une spécificité antigénique des lymphocytes (Lanzavecchia et al., 1982) (Lanzavecchia, 1985). Enfin, différentes sous-populations de lymphocytes T helper (Th1 et Th2) possédant différentes fonctions ont été mis en évidence (Mosmann et al., 1986), montrant la division du travail mise en place par l'organisme pour lutter efficacement contre une large variété de pathogènes.

A. Remise en cause de la dichotomie Th1/Th2

1. Paradigme Th1 / Th2

Deux grandes sous-populations de lymphocytes T helper ont été identifiées en 1986 par Mosmann et collègues : les Th1 et les Th2. En effet, ils ont analysé les caractéristiques de ces deux populations en déterminant pour chacune leur profil de sécrétion cytokinique (Mosmann et al., 1986). C'est la sécrétion d'IL4 par les lymphocytes Th2 qui a mené à la conclusion que les cellules Th2 étaient les cellules impliquées dans l'aide aux lymphocytes B. En effet, en 1982 l'IL4 était identifiée comme le premier facteur impliqué dans l'aide aux cellules B (Howard et al., 1982) et en 1987 Killar et collègues montraient dans une étude *in vivo* que les cellules ne sécrétant pas d'IL4 échouaient à apporter leur aide aux lymphocytes B (Killar et al., 1987). Ainsi, les Th2 sont apparus comme la sous-population de lymphocytes T CD4 impliquée dans la mise en place des réponses immunes humorales. En 1991, Kuhn et collègues remettaient en cause cette dichotomie Th1 / Th2. En effet, en utilisant des souris déficientes pour IL4, ils ont mis en évidence que l'absence d'IL4 n'entraînait pas de réduction significative des centres germinatifs (GC) ou la diminution de la sécrétion d'immunoglobulines (Ig) G totaux. Toutefois, la perte d'IL4 induisait une perte d'IgE et d'IgG1 montrant un rôle d'IL4 dans la commutation de classe des IgG1 et IgE mais pas dans l'induction de la réponse anticorps (Kuhn et al., 1991).

2. Identification des polarisations Treg et Th17 et des facteurs de transcription spécifiques des lignages T helper.

La mise en évidence des lignages T CD4 différents de Th1 et Th2 a définitivement remis en cause le paradigme Th1/Th2 et a permis d'appréhender un nouveau niveau de complexité dans la différenciation T helper. Ainsi, la découverte des T régulateurs (Treg) (Sakaguchi et al., 1995) et des Th17 (Aggarwal et al., 2003) couplée à l'identification des facteurs de transcriptions spécifiques des différents lignages T CD4 tel que T bet, Gata3, Foxp3 et Ror γ t pour les polarisations Th1, Th2, Treg et Th17 respectivement (Hori et al., 2003; Ivanov et al., 2006; Mullen et al., 2001; Yamashita et al., 2004), ont marqué un tournant dans la compréhension des réponses lymphocytaires T. En effet, l'expression de ces facteurs de transcription détermine la voie de différenciation T helper mettant en évidence un rôle central de ces facteurs de transcription dans le contrôle des différentes polarisations T helper.

B. Nouveau lignage T folliculaire helper

1. Identification de CXC chimiokine Récepteur 5 (CXCR5)

La première avancée majeure dans l'identification des T folliculaires helper (Tfh) a été l'identification du récepteur aux chimiokine C-X-C chimiokine récepteur 5 (CXCR5), aussi appelé Burkitt Lymphoma Récepteur 1 (BLR1). Dans cette étude réalisée avec des échantillons humains (sang et amygdale), il a été mis en évidence qu'en plus des lymphocytes B, une population de lymphocytes T CD4 présentant un phénotype d'effecteurs mémoires (CD45 RO⁺) exprimait CXCR5 (Forster et al., 1994). L'utilisation de souris transgéniques déficientes pour CXCR5 a ensuite permis d'identifier CXCR5 comme étant le récepteur aux chimiokines essentiel à la migration des cellules B et à la formation des follicules B (Förster et al., 1996). La découverte de C-X-C ligand 13 (CXCL13) ou B Lymphocyte Chimioattractant 1 (BLC1), ligand de CXCR5 a également représenté une avancée considérable pour la compréhension de la régulation de la localisation dans le follicule B des lymphocytes B et des Tfh (Ansel et al., 1999). Enfin, trois équipes ont mis en évidence la capacité unique des lymphocytes T CD4 CXCR5⁺, localisés dans les GC des follicules B, à promouvoir la production d'anticorps par les lymphocytes B, confirmant ainsi l'existence d'une sous-population de lymphocytes T spécialisée dans la mise en place des réponses humorales (Breitfeld et al., 2000; Kim et al., 2001; Schaerli et al., 2000).

2. Profil transcriptionnel unique des Tfh

En 2004 et 2005 différentes études ont montré une signature transcriptionnelle spécifique des cellules T CD4⁺ CXCR5⁺ chez l'Homme et la souris. Ainsi, Kim et collègues mettaient en évidence une expression augmentée de CXCL13 par les Tfh du GC humain, corrélée à leur capacité à sécréter CXCL13 après activation du TCR (Kim et al., 2004). Une seconde étude a permis de révéler un profil transcriptionnel distinct des Tfh par rapport aux cellules Th1 et Th2, apportant un nouvel élément en faveur de l'identification des Tfh comme un lignage T helper à part entière (Chtanova et al., 2004). Parmi les gènes surexprimés par les Tfh on retrouve les molécules impliquées dans la migration de ces cellules tel que CXCR5 et CXCL13 mais aussi les molécules de co-stimulation ICOS (Inducible T-cell COStimulator) et PD1 (Programmed cell death 1), la cytokine IL21 et enfin les facteurs de transcription Bcl6 (B cell lymphoma 6) et Ascl2 (Achaete-scute complex homolog 2) (Chtanova et al., 2004; Kim et al., 2004; Vinuesa et al., 2005). Par la suite, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle important de ces molécules dans le développement, la migration et les fonctions des Tfh que je détaillerai plus précisément dans cette introduction.

3. Facteur de transcription Tfh : B cell lymphoma 6 (Bcl6)

L'identification de Bcl6 comme facteur de transcription spécifique des Tfh par trois équipes différentes en 2009 a apporté la preuve d'un nouveau lignage T helper spécialisé dans l'aide aux lymphocytes B. En effet, les souris déficientes pour Bcl6 présentent une absence de Tfh et une absence de GC (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). De plus, la surexpression de Bcl6 dans les lymphocytes T CD4 entraîne une augmentation de l'expression de molécules spécifiques des Tfh telles que CXCR5, PD1 et ICOS (Kroenke et al., 2012; Yu et al., 2009). Il a également été mis en évidence par analyse Chip (Combining chromatin immunoprecipitation) que le facteur de transcription Bcl6 se lie aux promoteurs des facteurs de transcription Tbet et Ror γ t réprimant ainsi l'expression (Nurieva et al., 2009) et la production (Yu et al., 2009) d'IFN γ et d'IL17, et par conséquent les polarisation Th1 et Th17.

C. Phénotype des lymphocytes Tfh

L'identification des lymphocytes T folliculaires helper n'est pas conditionnée par l'expression d'un seul marqueur. En effet, seule l'expression d'une association de différents marqueurs peut définir un phénotype Tfh. Ainsi, les marqueurs utilisés pour leur identification *in vivo* ou *in vitro* sont l'expression de CXCR5, des molécules de co-stimulation PD1 et ICOS, la sécrétion de la cytokine IL21, de la chimiokine CXCL13 (chez l'Homme uniquement) et enfin l'expression du facteur de transcription spécifique de la polarisation Tfh : Bcl6. Les Tfh sont également caractérisés par la faible expression de CCR7. L'expression de ces marqueurs a un rôle important dans leur fonction d'aide aux lymphocytes B et la mise en place de réponses humores. Dans la partie suivante je vais développer le rôle des Tfh dans la promotion du développement et de la maturation des lymphocytes B.

II. Fonction des lymphocytes T folliculaires helper

La différenciation et la maturation des lymphocytes B sont directement liées à la différenciation des lymphocytes Tfh aussi bien au niveau spatial que temporel, ces deux axes de différenciation se déroulant en parallèle dans les ganglions lymphatiques. Ainsi, les Tfh ont pour fonction de fournir de l'aide aux lymphocytes B. Au niveau des ganglions, ils sont impliqués dans la formation et la maintenance des centres germinatifs (GC) des follicules B de par leur capacité à promouvoir la survie, la prolifération, la différenciation et la maturation des lymphocytes B (Crotty, 2011, 2015; Vinuesa et al., 2016). La mise en place de réponses humores passe par trois phases distinctes de différenciation et de

maturation des lymphocytes B déterminées par leur localisation dans les organes lymphoïdes secondaires (Figure 5) : La phase extra-folliculaire, la phase folliculaire et la phase localisée dans le GC (phase GC) (Qi, 2016; Qi et al., 2014). Il est important de noter que chacune de ces phases dépend de l'interaction avec les lymphocytes Tfh.

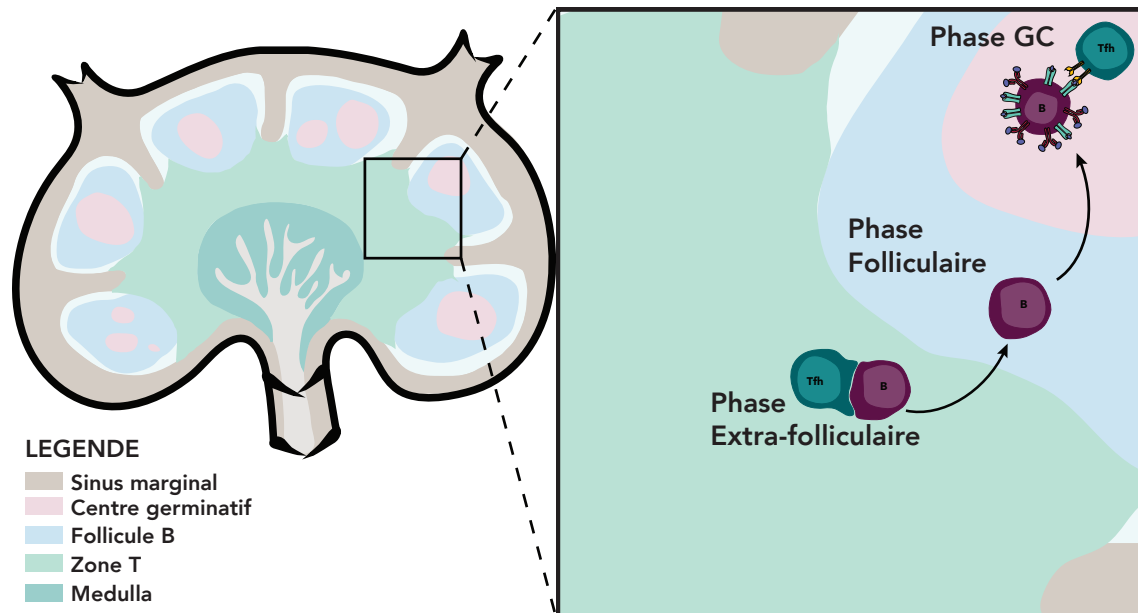


Figure 5 : Etapes de différenciation des lymphocytes B.

On distingue trois phases de différenciation des lymphocytes B. La phase extra-folliculaire localisée dans la zone T à la bordure T:B, où les Tfh interagissent avec les cellules B ayant capturé l'Ag. Cette phase est suivie de la phase folliculaire correspondant à la migration des lymphocytes B dans le follicule et la formation de GC. Enfin la phase GC correspond à la sélection cyclique de cellules B de haute affinité nécessitant le soutien de Tfh.

A. Phase extra-folliculaire

La phase extra-folliculaire est localisée à la bordure de la zone T et du follicule B des organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes B ayant reconnu l'antigène via leur récepteur spécifique le BCR (B Cell Receptor), présentent des peptides antigéniques sur des molécules de CMH II et augmentent l'expression de CCR7. Ainsi, l'expression de CCR7 leur permet de détecter le gradient de CCL21 (Ligand de CCR7) présent dans la zone T et de migrer en direction de la bordure T:B. C'est dans cette zone qu'a lieu la première interaction entre les lymphocytes T activés et les lymphocytes B sortant du follicule B (Garside et al., 1998). Cette phase est dépendante du contact cellule-cellule entre les lymphocytes T et B, ce contact est induit par la reconnaissance de l'antigène par les Tfh via un signal TCR-CMH-II, par l'intégration d'un signal de co-stimulation (CD40L-CD40) et par la mise en jeu de molécules d'adhésion (SAP (Signaling lymphocyte Activation molecules (SLAM)-associated Protein)) exprimés par les deux cellules.

1. Génération rapide de plasmocytes extra-folliculaires

Afin de répondre rapidement en cas d'infection, une première vague d'expansion de plasmocytes extra-folliculaires est initiée par l'interaction cellule T – cellule B et plus particulièrement par l'interaction CD40L-CD40. CD40L est exprimé par les lymphocytes T CD4 naïfs et effecteurs (Lesley et al., 2006; Smith et al., 2000) et joue un rôle important dans l'activation et la prolifération des lymphocytes B (Kehry, 1996). En effet, les souris déficientes pour CD40L perdent cette capacité d'induction rapide de plasmocytes extra-folliculaires (Cunningham et al., 2004). Il a également été proposé que l'IL4 et l'IL5 jouerait un rôle dans la différenciation de plasmocytes extra-folliculaires (Hasbold et al., 2004), contrairement à l'IL21 (Chan et al., 2009). Les plasmocytes extra-folliculaires sont caractérisés par la sécrétion d'IgM, témoignant d'une réponse humorale primaire.

2. Interaction stable et prolongée entre les Tfh et les lymphocytes B

L'initiation de la différenciation et de la maturation des lymphocytes B est également dépendante de la nature de l'interaction établie entre le lymphocyte T et le lymphocyte B. En effet, c'est dans la zone extra-folliculaire que se forment des conjugués stables et de longue durée entre les lymphocytes T et B après exposition à un antigène (Okada et al., 2005). La stabilité et la durée des conjugués sont dépendantes de la spécificité entre les cellules T et B pour l'antigène (Okada et al., 2005) mais aussi de l'expression de molécules d'adhésion tel que SAP (SLAM-Associated Protein) qui permettent de maintenir la synapse immunologique entre les lymphocytes T et B. Les lymphocytes B restent présents au niveau de la zone extra-folliculaire pendant un à deux jours et passent par de nombreuses interactions consécutives de 10 à 40 min avec les Tfh avant de rentrer dans une phase de prolifération. La perte d'expression de SAP chez la souris induit un défaut de prolifération des lymphocytes B, de formation des GC et de production d'anticorps (Cannons et al., 2006; Crotty et al., 2003). Les souris déficientes pour SAP perdent la capacité d'établir une interaction stable entre les cellules T CD4 et B, entraînant un défaut de recrutement des Tfh dans le GC et donc une incapacité à fournir de l'aide aux lymphocyte B (Cannons et al., 2010; Chen et al., 2008; Chu et al., 2014; Qi et al., 2008).

D'une manière intéressante, les patients atteints du syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (syndrome XLP), dû à des mutations du gène *Sh2d1a* codant pour la protéine SAP, présentent une perte drastique de GC et de lymphocytes B mémoires (Ma et al., 2006; Malbran et al., 2004) et une atteinte des fonctions T CD4 helper (Ma et al., 2005). Ces observations confirment le rôle central de SAP dans l'induction de réponses humorales (Ueno et al., 2015).

différenciation en plasmocytes. Si le rôle des cytokines IL4 et IL21 n'ont pas encore été complètement défini pour la différenciation des plasmocytes extra-folliculaires, l'IL4 participe à la survie des lymphocytes B. A l'issue de la phase extra-folliculaire, les lymphocytes B se différencient en plasmocytes extra-folliculaires ou poursuivent leur différenciation en réentrant dans le follicule B grâce à l'expression d'EBI2 qui leur permet d'être attirés vers la bordure T:B ou le ligand d'EBI2 est présent.  : gradient de 7α,25-dihydroxycholesterol (EBI2 ligand).

B. Phase Folliculaire et phase GC

Une fois dans le follicule, les cellules B expriment fortement Bcl6 et CXCR5 mais leur expression de EBI2 diminue leur permettant la migration et la relocalisation au centre du follicule où elles vont s'accumuler pour former un néo-GC (Vinuesa and Cyster, 2011). Les cellules B du GC expriment alors le Sphingosine-1-phosphate récepteur 2 (S1PR2) qui a pour rôle d'inhiber la migration des lymphocytes B afin d'induire leur confinement dans le GC, en inhibant leurs réponses aux chemoattractants folliculaires tel que CXCL13 (Green et al., 2011). (Figure7)

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 7 : Formation des centres germinatifs (GC).

Deux jours après le début d'une infection les Tfh et lymphocytes B activés interagissent de manière prolongée pendant la phase extra-folliculaire. A jour 3 certaines cellules B se différencient en plasmocytes extra-folliculaires et les Tfh migrent à l'intérieure du follicule B. Le 4ème jour les lymphocytes B activés migrent au centre du follicule caractérisé par la présence de FDC (DC folliculaires) et prolifèrent repoussant les cellules B folliculaires sur les bords afin de former le GC primitif. A jour 5 et 6 le GC se développe rapidement grâce à la prolifération rapide des lymphocytes B. A jour 7, un GC mature se forme avec l'apparition de la zone claire (Light Zone) où se trouve les FDC et les Tfh et de la zone sombre (Dark Zone) qui est une zone dense de cellules B. Adapté de (De Silva and Klein, 2015)

1. Sélection cyclique des cellules B de haute affinité par les Tfh

La fonction principale des GC est la production des lymphocytes B mémoires et des plasmocytes de haute affinité. Les GC sont composés de deux zones distinctes : la zone sombre (DZ) et la zone claire (LZ). L'expansion clonale des lymphocytes B est restreinte aux DZ, tout comme le phénomène d'hypermutation somatique. La sélection des lymphocytes B basée sur l'affinité antigénique est quant à elle localisée au niveau des LZ et nécessite l'interaction avec les Tfh du GC, également présents au niveau des LZ (Figure 8). Les Tfh évaluent le niveau de spécificité des peptides antigéniques présentés sur les molécules CMH-II des cellules B de la LZ et les orientent ou non vers un nouveau cycle de sélection au niveau de la DZ (Gitlin et al., 2014; Vitoria and Nussenzweig, 2012; Vitoria et al., 2010). Les mécanismes impliqués dans l'export des lymphocytes B positivement sélectionnés pour devenir des lymphocytes B mémoires ou des plasmocytes ne sont pas encore connus.

La sélection cyclique des cellules B de haute affinité est donc dépendante de l'interaction entre les Tfh et les lymphocytes B du GC. Contrairement aux interactions T-B localisées à la bordure de la zone T et du follicule B, les interactions dans le GC sont de très courte durée et extensives en termes de surface de contact (Liu et al., 2015; Shulman et al., 2014). Si ICOS n'est pas impliqué dans les interactions prolongées entre Tfh et cellules B de la zone extra-folliculaire (Chen et al., 2008), la stimulation d'ICOS est nécessaire aux interactions entre les Tfh et les cellules B du GC (Liu et al., 2015). Au niveau des Tfh la stimulation d'ICOS induit l'augmentation du flux calcique entraînant une translocation à la membrane plasmique de CD40L. L'augmentation du signal CD40L par les Tfh induit une augmentation d'expression d'ICOSL par les cellules B (Gitlin et al., 2014). Récemment, la dopamine, un neurotransmetteur, a été identifié comme étant sécrétée par les Tfh du centre germinatif chez l'homme. La sécrétion de dopamine par les Tfh, lors d'interactions antigènes spécifiques avec les lymphocytes B du GC, déclenche la translocation d'ICOSL intracellulaire à la surface des lymphocytes B. L'augmentation d'expression d'ICOSL à la membrane plasmique induit l'accumulation de CD40L et de vésicules de sécrétions (granules chromogranin⁺) à la synapse des Tfh accélérant ainsi le processus de sélection des lymphocytes B ainsi que leur survie (Papa et al., 2017). ICOS et CD40 représentent donc une boucle de rétro-control positif intercellulaire pour la sélection de lymphocytes B de haute affinité qui est accélérée par la sécrétion de dopamine par les Tfh. (Figure 8)

Chez l'Homme, la mutation d'ICOS (Warnatz et al., 2006) et celle de CD40 (Lougaris et al., 2005) induisent toutes deux une absence de lymphocytes B mémoires, et un défaut d'IgG totaux, traduisant un rôle clé de ces deux molécules dans les réponses humorales. Toutefois, seuls les patients possédant une mutation pour CD40 présentent un syndrome d'Hyper IgM (HIGM) témoignant d'un défaut de commutation isotypique aussi observé chez la souris (Kawabe et al., 1994).

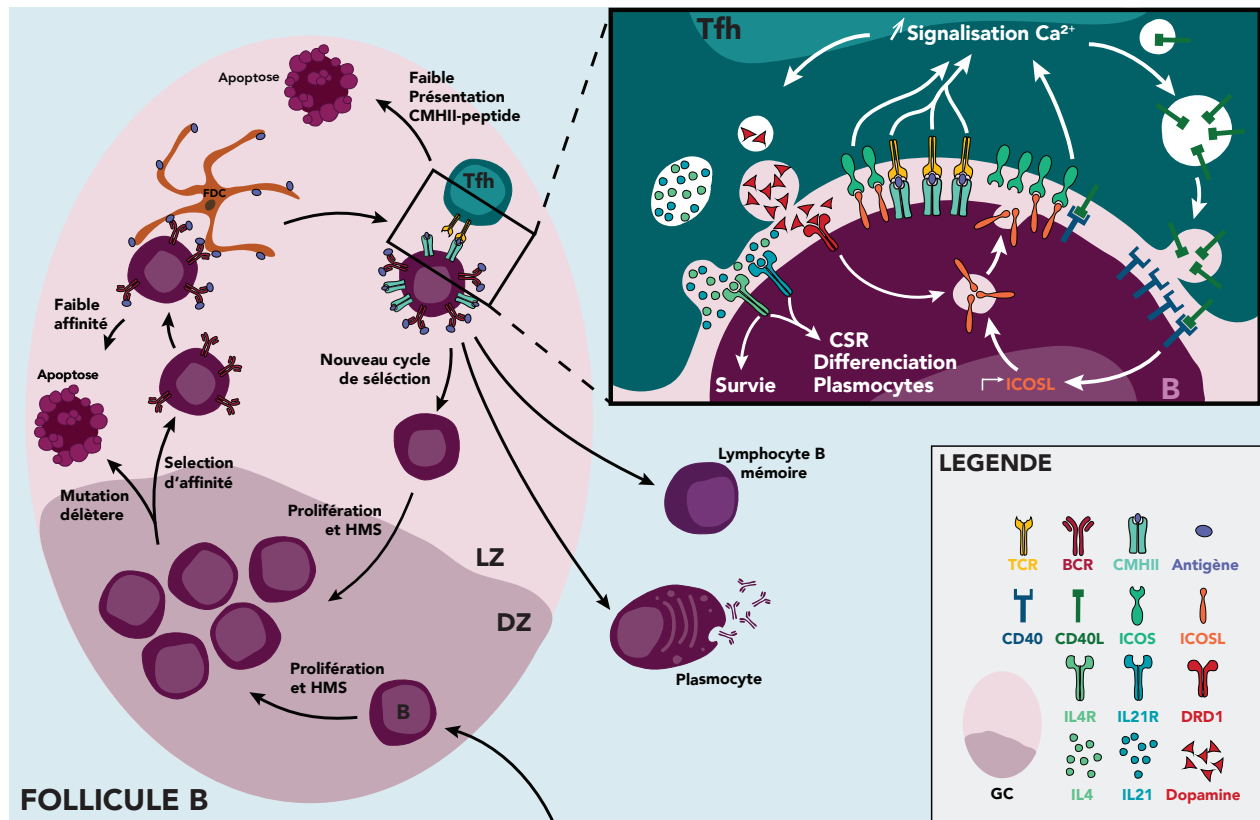


Figure 8 : Phase GC sélection cyclique des lymphocytes B.

Après activation dans la zone extra-folliculaire, les lymphocytes B migrent dans le follicule B jusqu'au GC. Une première étape consistant à l'acquisition de nouvelles mutations par les lymphocytes B et à leur prolifération se déroule dans la DZ. Les cellules B migrent ensuite au niveau de la LZ afin de subir deux types de sélection. Dans un premier temps, les lymphocytes B sont sélectionnés en fonction de leur niveau d'affinité pour l'antigène via l'interaction avec les FDC. La deuxième sélection nécessite la collaboration des Tfh, afin d'évaluer le niveau de présentation antigénique sur des molécules de CMHII des lymphocytes B. Différentes molécules participent à cette sélection (encadré). La liaison CMHII-Ag-TCR et ICOSL-ICOS induit l'augmentation de la signalisation calcium du Tfh qui induit la translocation à la membrane de CD40L intracellulaire et la sécrétion de cytokines (IL4, IL21) et de Dopamine. La liaison CD40L-CD40 provoque l'augmentation d'expression d'ICOSL par le lymphocyte B et l'activation du récepteur à la dopamine (DRD1) participe à la translocation à la membrane de ICOSL. Représentant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif. Les cytokines IL4 et IL21 participent à l'induction de commutations isotypiques (CSR), à la différenciation en plasmocytes des cellules B et à leur survie. Ainsi, après sélection par les Tfh les lymphocytes peuvent se différencier en B mémoires ou en plasmocytes ou repartir pour un cycle de sélection. GC : Centre Germinatif, DZ : Zone sombre, LZ : Zone claire, CMHII : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, Ag : Antigène, TCR : Récepteur des Cellules T, BCR : Récepteur des Cellules B, HMS : Hyper Mutation Somatique, CSR : Commutation de Classe (Class Switch Recombination), FDC : DC folliculaires, DRD1 : Dopamine Récepteur D1.

2. Rôle des facteurs sécrétés par les Tfh

a. CXCL13

Chez l'Homme, contrairement à la souris, les Tfh sécrètent CXCL13 (Kim et al., 2004; Rasheed et al., 2006), le ligand du récepteur CXCR5 exprimé par les Tfh et les lymphocytes B. La sécrétion de CXCL13 par les Tfh aurait pour rôle d'attirer les lymphocytes B (Kim et al., 2004) afin d'augmenter le recrutement des cellules B dans la LZ des GC. De manière intéressante, l'expression de CXCL13 dans les GC ectopiques est corrélée au développement de maladies auto-immunes tel que l'arthrite rhumatoïde (Rioja et al., 2008; Shi et al., 2001) ou le lupus érythémateux disséminé (SLE) (Henneken et al., 2005), suggérant un rôle de CXCL13 dans la formation des GC probablement grâce à sa capacité d'attraction des cellules B. Récemment, une étude a montré le lien entre le niveau de CXCL13 dans le sang et l'activité des GC après vaccination (Havenar-Daughton et al., 2016) suggérant l'importance de CXCL13 dans le développement de réponses humorales.

b. IL4

Les Tfh et notamment les Tfh localisés dans le GC produisent de l'IL4 (Fazilleau et al., 2009; Kim et al., 2001; King and Mohrs, 2009; Reinhardt et al., 2009; Yusuf et al., 2010). Contrairement aux T CD4 Th2, la régulation d'expression de l'IL4 sécrétée par les Tfh dépend de SAP et SLAM (Cannons et al., 2010; Yusuf et al., 2010). Plusieurs études ont montré que la production d'IL4 par les Tfh était nécessaire pour la survie des lymphocytes B (King and Mohrs, 2009) (Yusuf et al., 2010). En effet, l'activation du récepteur à l'IL4 induit l'expression de la molécule anti apoptotique Bcl-XL par les lymphocytes B. De plus, l'IL4 est impliquée dans l'augmentation de l'absorption et du métabolisme du glucose par les lymphocytes B, ce qui induirait également une meilleure survie et aurait un effet positif sur la prolifération des cellules B (Dufort et al., 2007). L'IL4 fait également parti des facteurs de commutation isotypique notamment pour les IgG1 et IgE (Reinhardt et al., 2009).

c. IL21

L'IL21 est exprimé par les Tfh (Chtanova et al., 2004; Rasheed et al., 2006; Yusuf et al., 2010), induit l'expression de Bcl6 dans les lymphocytes B (Linterman et al., 2010b; Ozaki et al., 2004) et entraîne la différenciation des plasmocytes (Bryant et al., 2007; Ettinger et al., 2005; Good et al., 2006; Kuchen et al., 2007; Ozaki et al., 2004). Les patients déficients pour IL21 ou IL21 récepteur (IL21R) présentent un défaut de prolifération des lymphocytes B et de commutation isotypique (Kotlarz et al.,

2014). Chez l'Homme, l'IL21 est un facteur impliqué dans la commutation isotypique des immunoglobulines et spécifiquement pour les IgG3, IgA et IgG1 (Avery et al., 2008; Pène et al., 2004). L'induction de la différenciation des cellules B naïves et des plasmocytes via l'intégration du signal IL21 est dépendante de STAT3 (Avery et al., 2010; Fornek et al., 2006). L'activation de STAT3 est responsable de l'induction de l'expression de Blimp1, le facteur de transcription spécifique des plasmocytes (Martins and Calame, 2008; Shapiro-Shelef et al., 2003). De plus la délétion de STAT3 réduit dramatiquement le nombre de B mémoires en réponse à l'IL21 *in vitro* (Avery et al., 2010). Ainsi, STAT3 joue un rôle central dans la génération de lymphocytes B mémoires et des plasmocytes (Avery et al., 2010; Speckmann et al., 2008). Les patients avec une mutation de STAT3 déclarent un Syndrome d'Hyper IgE (HIES) et la signalisation d'IL21 dans les cellules B est sévèrement réduite, confirmant ainsi son rôle dans le développement d'une réponse humorale de longue durée.

III. Différenciation spatio-temporelle des lymphocytes T folliculaires helper

La différenciation des Tfh est un processus complexe en plusieurs étapes, se déroulant sur plusieurs jours et à différentes localisations dans les organes lymphoïdes secondaires. Ce processus se divise en 3 étapes successives : 1- l'initiation de l'activation des lymphocytes T CD4 naïfs par les cellules dendritiques (DC) dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires ; 2- la migration et l'interaction avec des lymphocytes B à la bordure de la zone T et du follicule B ; 3- la maintenance des Tfh localisés dans les GC (Figure 9). Tout au long de ces étapes de différenciation, des facteurs de transcription rentrent en jeu pour réguler la dynamique d'induction des lymphocytes Tfh.

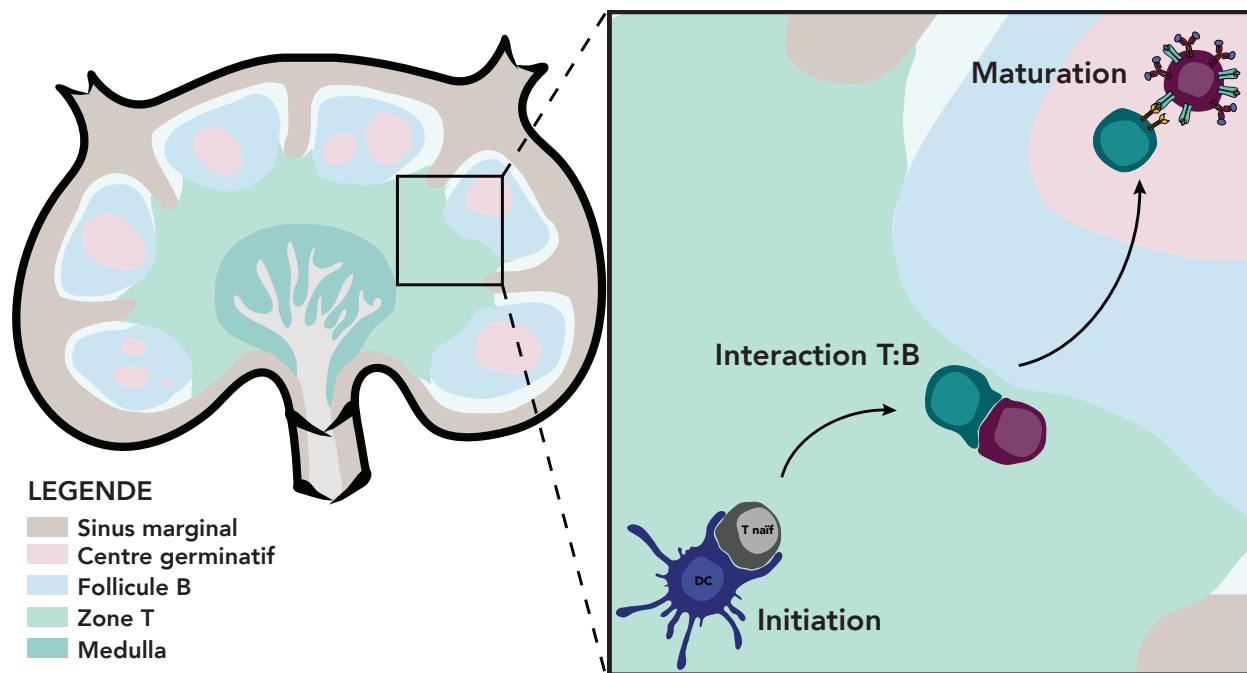


Figure 9 : Phases de différenciation des lymphocytes T folliculaires helper.

On distingue trois phases de différenciation des lymphocytes Tfh. La phase d'initiation localisée dans la zone T mettant en jeu les lymphocytes T CD4 naïfs et les DC. Cette phase est suivie de la phase d'interaction T:B à la bordure de la zone T et du follicule B permettant la différenciation complète des Tfh. Enfin la phase de maintenance de la différenciation Tfh est localisée dans le GC (Centre Germinatif).

A. Régulation transcriptionnelle des Tfh

Les différents lignages T CD4 sont définis par l'expression de facteurs de transcription spécifiques (FT), ainsi les FT T-bet, Gata3, Ror γ t, Foxp3 et Bcl6 définissent respectivement les lignages Th1, Th2, Th17, Treg et Tfh. Toutefois, cette simplification ne reflète pas la complexité des nombreuses différenciations T helper, ni la plasticité cellulaire des lymphocytes T CD4 (Crotty, 2017; O'Shea and Paul, 2010; Zhu, 2017). Ainsi, l'expression de plusieurs FT pour l'initiation des programmes de différenciation T helper et notamment Tfh apparait essentielle. En effet, le processus complexe de différenciation des T CD4 en Tfh met en jeu différents régulateurs transcriptionnels à différentes étapes. Parmi les facteurs de transcription impliqués dans le développement des Tfh Bcl6, Ascl2 et Maf jouent un rôle majeur et coopèrent au cours du processus de différenciation.

Le répresseur transcriptionnel Bcl6 a été identifié comme le FT essentiel à la différenciation des Tfh et à la mise en place d'une réponse immunitaire humorale (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). L'activation des lymphocytes T CD4 par les DC via la molécule de co-stimulation CD28 entrainerait l'expression précoce de Bcl6 (Weber et al., 2015). Plusieurs études ont analysé la dynamique d'expression de Bcl6 au cours de la différenciation Tfh permettant de mettre en évidence différentes vagues d'expression. En effet, une première vague d'expression de Bcl6 a lieu dès les premières divisions cellulaires (Baumjohann et al., 2011), puis l'augmentation de son expression devient graduelle jusqu'à la maturation des Tfh dans le GC, où l'expression de Bcl6 est la plus forte (Liu X 2012).

Les mécanismes mis en place pour le contrôle de la différenciation Tfh par Bcl6 ne sont que partiellement connus. Bcl6 se lie à l'ADN afin de réprimer l'expression des gènes cibles et participe au contrôle d'au moins 3 grandes catégories de gènes : la migration cellulaire, la répression des voies de différenciation autres que Tfh et la fonction des Tfh (Crotty, 2014).

1. Migration cellulaire

Les Tfh sont capables de migrer de la zone T jusqu'au GC grâce notamment à l'augmentation d'expression de CXCR5 et la diminution d'expression simultanée de CCR7 et d'EBI2, ce qui nécessite une régulation efficace des gènes impliqués dans la migration cellulaire. Les premières études ont montré que Bcl6 était nécessaire et suffisant pour induire l'expression de CXCR5 (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). L'expression de Bcl6 induirait d'une manière indirecte l'expression de CXCR5 (Kroenke et al., 2012). En effet, Bcl6 participe à la répression d'expression de EBI2, CCR7, CCR6, S1PR1 et PSGL1, qui sont impliqués dans le contrôle de la migration des lymphocytes et

notamment de leur localisation au niveau de la zone T des organes lymphoïdes secondaires (Hatzl et al., 2015; Kroenke et al., 2012). Cependant l'expression de CXCR5 nécessite la participation d'autres FT comme Ascl2 et Maf. En effet, la surexpression de Maf entraîne une augmentation de l'expression de CXCR5 suggérant un rôle de Maf dans la régulation de l'expression de CXCR5 (Kroenke et al., 2012). Ascl2, quant à lui, participe à l'induction de l'expression précoce de CXCR5 et à la diminution d'expression de CCR7 par les Tfh (Liu et al., 2014). Il a été proposé que Ascl2 permettrait d'initier l'expression de CXCR5 alors que Bcl6 participerait à son maintien (Crotty, 2014; Liu et al., 2014; Liu et al., 2012).

2. Répression des voies de différenciation autre que Tfh

La différenciation Tfh est basée sur l'inactivation des autres voies/programmes de différenciation T helper. En effet, Bcl6, par inhibition de l'expression de Blimp1, induit la diminution d'expression des gènes impliqués notamment dans les voies de différenciation Th1, Th2, Th17. Bcl6 se lie directement à différents promoteurs des gènes impliqués dans les polarisations Th1, Th2 et Th17, tel que T-bet, Gata3 et Ror γ t bloquant ainsi ces voies de différenciation T helper afin de privilégier la polarisation Tfh (Hatzl et al., 2015; Johnston et al., 2009; Kusam et al., 2003; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009).

3. Fonction Tfh

La fonction d'aide aux lymphocytes B des Tfh passe par deux types de signaux : des molécules impliquées dans l'interaction T-B comme SAP, ICOS ou encore CD40L et des facteurs solubles comme IL4, IL21 et CXCL13. La régulation de ces signaux passe par la collaboration de deux FT Bcl6 et Maf. En effet, Bcl6 induit l'expression de SAP, CD40L, PD1, ICOS et CXCL13, mais n'a pas d'impact sur l'expression des facteurs solubles IL4 et IL21 (Kroenke et al., 2012). A l'inverse, Maf régule l'expression des cytokines capables de promouvoir la prolifération et différenciation des cellules B comme IL4 et IL21 (Bauquet et al., 2009; Kroenke et al., 2012; Sahoo et al., 2015). De manière intéressante, à la fois Bcl6 et Maf induisent l'expression de PD1 et ICOS (Kroenke et al., 2012) montrant une probable coopération de ces deux FT pour l'orchestration de l'expression de gènes menant à la différenciation Tfh.

B. Initiation de la différenciation Tfh par les DC dans la zone T

L'activation des T CD4 naïfs par les DC passe par l'intégration de différents signaux tels que la reconnaissance de l'antigène, l'expression de molécules de co-stimulation et le profil de sécrétion de cytokines.

1. Signal TCR (Récepteur des Cellules T)

Les lymphocytes T CD4 reconnaissent l'antigène via la liaison de leur TCR au CMHII-peptide présenté par les DC. Trois phases d'interaction entre les DC et les lymphocytes T ont été décrites pour l'induction de la stimulation des cellules T dans les organes lymphoïdes secondaires. La première phase est une succession de courtes interactions qui induit l'augmentation d'expression de marqueurs d'activation (CD44, CD69 et CD25) et une diminution de la motilité des lymphocytes. Ensuite, des interactions prolongées et stables se forment pendant plusieurs heures (12h) induisant la production de cytokines. Enfin, les lymphocytes rentrent dans une phase de forte motilité et de rapide prolifération (Benvenuti et al., 2003; Celli et al., 2007; Hugues et al., 2006; Mempel et al., 2004).

L'augmentation de la durée d'interaction entre les DC et les lymphocytes T CD4 a été associée à une augmentation de l'induction des Tfh (Benson et al., 2015). De plus, la haute affinité du TCR induirait préférentiellement la différenciation Tfh des lymphocytes T CD4 (Fazilleau et al., 2009). Ainsi, la forte affinité du TCR pour l'antigène présenté par les DC pourrait jouer un rôle dans l'induction des interactions prolongées entre DC et T CD4. Ces interactions de longue durée permettraient une meilleure intégration des signaux de co-stimulation et cytokiniques conduisant à la différenciation préférentielle des Tfh (Figure10).

2. Signaux de co-stimulation

Comme pour la différenciation des autres effecteurs T CD4, la capacité des T CD4 naïfs à se différencier en Tfh nécessite des signaux de co-stimulation, en plus de la stimulation du TCR par un antigène spécifique. Différentes molécules de co-stimulation rentreraient en jeu notamment CD28, ICOS et OX40 (Figure 10).

Les souris déficientes pour CD28 présentent un défaut de prolifération et d'activation des lymphocytes T effecteurs et notamment un blocage complet de la polarisation Tfh (Ferguson et al., 1996; Walker et al., 1999). De plus, l'activation de CD28 via CD80/CD86 exprimé par les DC induit l'expression de Bcl6 (Weber et al., 2015). Dans une étude récente l'expression de CD80/CD86 par les DC a été identifiée comme étant cruciale pour la prolifération clonale des lymphocytes T ainsi que pour

la différenciation des lymphocytes Tfh (Watanabe et al., 2017). A l'inverse, l'expression de CD40 par les DC n'apparaît pas nécessaire à l'induction de la polarisation Tfh (Watanabe et al., 2017)

ICOS jouerait également un rôle crucial dans l'initiation de la polarisation Tfh. En effet les souris déficientes pour ICOS présentent une réduction sévère du nombre de lymphocytes Tfh après immunisation (Choi et al., 2011). Toutefois, le rôle d'ICOS/ICOSL dans l'initiation de la polarisation Tfh par les DC reste controversé. En effet, ICOS jouerait un rôle non pas à l'étape d'initiation, mais pour la maintenance de la polarisation des Tfh lors des interactions avec les lymphocytes B (Weber et al., 2015). Chez l'Homme, l'absence d'ICOS ne semble pas affecter l'homéostasie des lymphocytes T, à part une baisse de production d'IL10. Par contre, les patients déficients pour ICOS présentent une absence de lymphocytes B mémoires, un défaut d'IgG totaux et un défaut de réaction du centre germinatif (Warnatz et al., 2006), suggérant un rôle d'ICOS dans la phase de maintenance de la différenciation Tfh et non dans l'initiation.

Les molécules de co-stimulation OX40 et OX40L ont été proposées comme étant impliquées dans la différenciation Tfh. En effet, la stimulation via OX40 entraîne l'expression de CXCR5 par les T CD4 (Flynn et al., 1998). De plus la surexpression d'OX40L par les DC induit une accumulation de lymphocytes T CD4 dans les follicules B (Brockner et al., 1999). Cette capacité d'induction de migration des cellules T CD4 dans les follicules B est compromise dans les souris déficientes pour OX40L (Fillatreau and Gray, 2003). Enfin, chez l'Homme, les patients souffrant de Lupus érythémateux disséminé (SLE) présentent une augmentation de l'activité des Tfh liée à un effet délétère. Ces patients présentent également une augmentation de l'expression d'OX40L par les cellules CD11c⁺. De plus, *in vitro*, OX40L induit la différenciation des lymphocytes Tfh (Jacquemin et al., 2015).

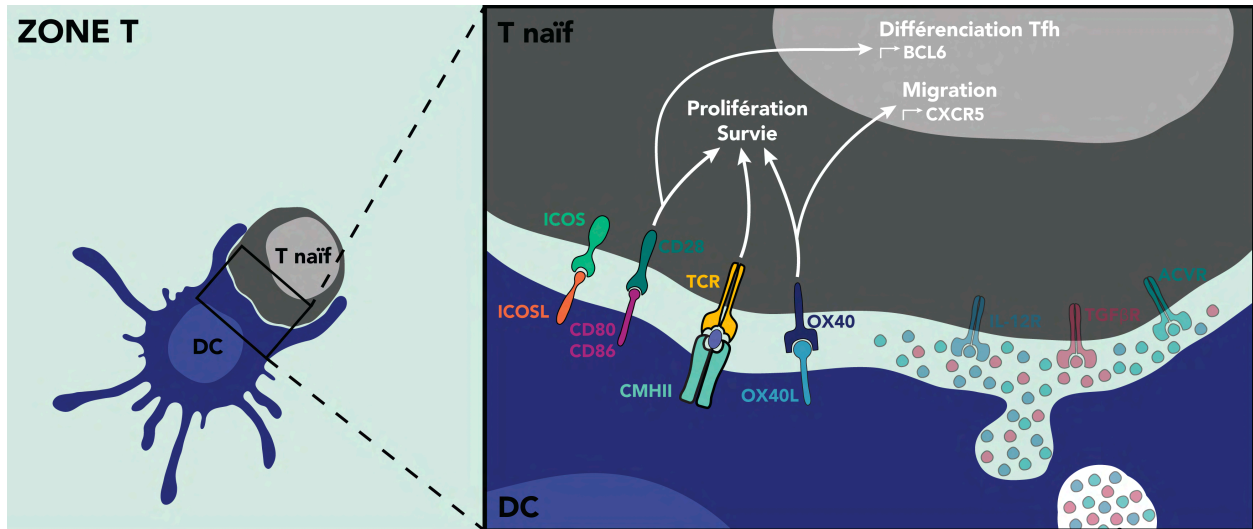


Figure 10 : Initiation de la différenciation Tfh par les DC - Reconnaissance antigénique et molécules de co-stimulation.

La reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T naïfs ainsi que l'activation de molécules de co-stimulation telles que CD28 ou OX40 induit la prolifération et la survie des lymphocytes T. L'activation de CD28 et d'OX40 par les DC participe également à l'induction d'expression de gènes comme CXCR5 ou BCL6 spécifiquement exprimés par les Tfh.

3. Cytokines

La différenciation des Tfh est induite par une combinaison de cytokines et non par une cytokine spécifique. Au cours de ces 10 dernières années, différentes études ont été menées pour identifier les cytokines impliquées dans la polarisation Tfh, chez l'Homme et la souris, permettant ainsi de mettre en évidence des disparités entre ces deux espèces.

Chez la souris, l'IL6 et l'IL21 jouent un rôle central dans la différenciation Tfh. L'IL6 est impliquée dans l'induction de lymphocytes T CD4 produisant de l'IL21 (Dienz et al., 2009; Suto et al., 2008). Les souris déficientes pour l'IL6 présentent une diminution et un retard de différenciation des Tfh. En effet, l'IL6 induit l'expression de Bcl6 via STAT1 et diminue l'expression d'IL1Rα via STAT3 (Choi et al., 2013). Les souris déficientes pour l'IL21 présentent également une diminution du nombre de Tfh (Nurieva et al., 2008). Il a également été montré que la perte d'expression à la fois d'IL6 et d'IL21 induisait une diminution incomplète de la différenciation Tfh via la diminution de l'expression de Bcl6, suggérant le rôle d'autres cytokines dans la polarisation Tfh (Eto et al., 2011).

Chez l'Homme, l'IL12, l'IL23, le TGFβ et l'Activin A ont été identifiés comme étant impliqués dans l'induction de la polarisation Tfh (Figure 11). L'IL12 induit l'expression de CXCR5, PD1, ICOS, IL21 et Bcl6 par les T CD4 activés, via STAT4 (Ma et al., 2009; Schmitt et al., 2009). Les patients déficients pour le récepteur de l'IL12 et de l'IL23, IL12 récepteur β1 (IL12R β1) présentent une diminution du

nombre de Tfh et de lymphocytes B mémoires circulants, une diminution d'expression de CXCR5 et une altération de la formation des centres germinatifs (Schmitt et al., 2013), démontrant un rôle de l'IL12 dans la différenciation Tfh. De manière intéressante, le TGF β en combinaison avec l'IL12 ou IL23 induit des signaux additionnels *via* STAT3 et STAT4 entraînant une augmentation de l'expression de CXCR5, ICOS, IL21 et Bcl6, et une diminution de l'expression de Blimp1 par rapport à l'IL12 et l'IL23 seuls (Schmitt et al., 2014). Une étude a récemment mis en évidence le rôle de l'Activin A dans l'induction de la différenciation Tfh. En effet, l'Activin A induit l'augmentation d'expression PD1, CXCR5 et CXCL13 (Locci et al., 2016). Une synergie entre l'activité pro-Tfh de l'Activin A et de l'IL12 a également été observée. A l'inverse, la combinaison de l'Activin A et de TGF β n'a pas d'impact sur l'induction de la différenciation Tfh par rapport à l'Activin A ou le TGF β seuls (Locci et al., 2016).

Chez la souris, le rôle de TGF β dans la polarisation Tfh a également été analysé et reste controversé. En effet, différentes études ont pu mettre en évidence un effet suppressif de TGF β pour l'expression d'IL21, ICOS et Bcl6 (Nurieva et al., 2008; Nurieva et al., 2009; Schmitt et al., 2014; Suto et al., 2008). Toutefois, une étude récente a montré dans un contexte d'infection par le virus de la grippe la contribution de TGF β dans l'induction de lymphocytes Tfh, *via* la suppression de l'expression de l'IL1 récepteur α (IL1R α) (Marshall et al., 2015). En effet, l'activation de l'axe IL2-STAT5 induit une inhibition de la génération de lymphocytes Tfh en entraînant l'expression de Blimp1 et l'inhibition de l'expression de Bcl6 (Ballesteros-Tato et al., 2012; Johnston et al., 2012; Oestreich et al., 2012).

Les DC ont été proposées comme source de ces cytokines impliquées dans la différenciation Tfh. En effet, le rôle des DC dans la sécrétion de l'IL12 a été mis en évidence grâce à l'utilisation d'anticorps bloquants dans des co-cultures de DC et de T CD4 (Schmitt et al., 2009). Pour le TGF β et l'Activin A, la co-localisation des DC (CD11c⁺) et des immuno-marquages du TGF β (Schmitt et al., 2013) et de l'Activin A (Locci et al., 2016) sur des coupes d'amygdales suggère un rôle des DC dans la production de ces deux cytokines.

Ainsi, dans la zone T, les DC jouent un rôle clé dans l'initiation de la polarisation Tfh de par leur capacité de présentation de l'antigène sur des molécules de CMH-II, d'expression de molécules de co-stimulation et de sécrétion de facteurs cytokiniques primordiaux pour l'initiation des Tfh. Toutefois, si l'initiation de la différenciation des Tfh dépend des DC, les Tfh nouvellement polarisés (Pré-Tfh) nécessitent l'interaction avec d'autres cellules présentatrices d'Ag, les lymphocytes B pour compléter leur différenciation (Goenka et al., 2011).

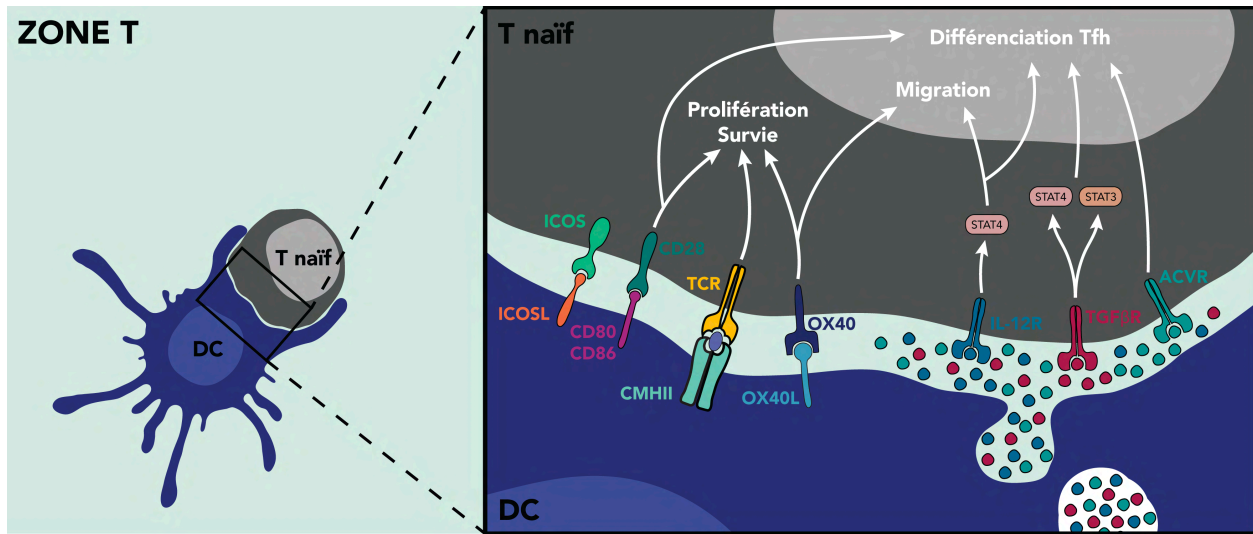


Figure 11 : Initiation de la différenciation Tfh par les DC - Cytokines.

Les DC induisent la différenciation des Tfh via la présentation d'Ag, l'expression de molécules de co-stimulation mais aussi la sécrétion de cytokines. En effet, la sécrétion d'IL12p70 ●, de TGFβ ● et d'Activin A ● participe à l'induction de l'expression de gènes exprimés par les Tfh. IL12R : IL12 Récepteur, TGFβR : TGFβ Récepteur, ACVR : Activin A Récepteur, STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription.

C. Différenciation Tfh à la bordure T:B

1. Migration à la bordure T:B

Après l'initiation de la polarisation Tfh par les DC, les pré-Tfh rentrent dans une phase de prolifération. Ils sont également caractérisés par l'expression des facteurs de transcription *Ascl2* et *Bcl6*, des molécules de co-stimulation ICOS et PD1, et des molécules chimiotactiques CXCR5 et EBI2. Ces deux dernières jouent un rôle crucial dans la capacité migratoire des Tfh vers la bordure de la zone T et du follicule B des organes lymphoïdes secondaires (Ansel et al., 1999; Li et al., 2016; Suan et al., 2015). En effet, au niveau de la bordure T:B se trouve le ligand principal d'EBI2, 7 α ,25-dihydroxycholesterol (Cyster et al., 2014) conduisant les pré-Tfh à migrer préférentiellement dans cette zone. Ainsi, c'est à la bordure T:B que les pré-Tfh peuvent rentrer en contact avec les lymphocytes B ayant rencontré l'antigène, afin de compléter leur différenciation (Figure 12).

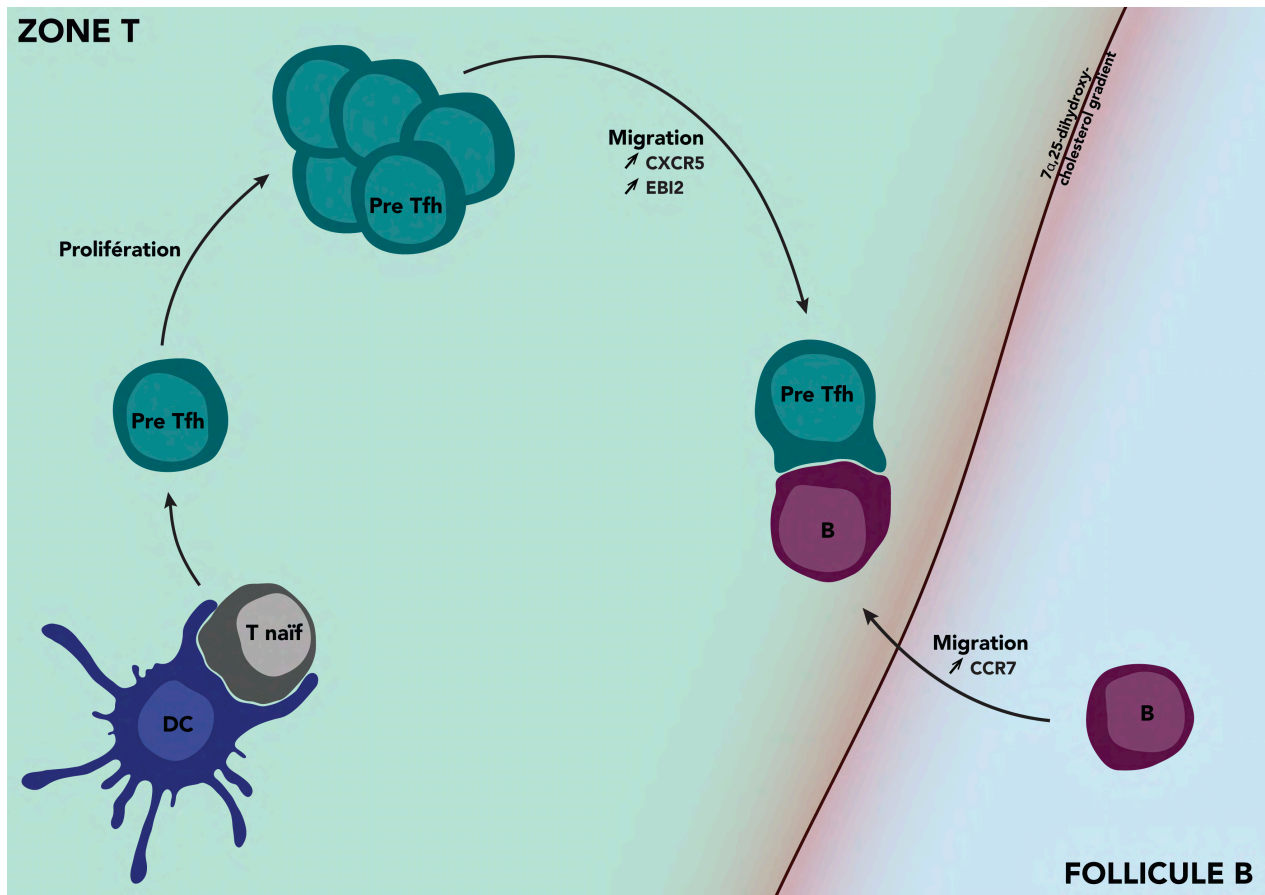


Figure 12 : Migration des pré-Tfh à la bordure T:B.

Après initiation de la polarisation Tfh, les lymphocytes pré-Tfh prolifèrent et expriment les molécules chimiotactiques CXCR5 et EBI2. Ces molécules et notamment EBI2 permettent aux pré-Tfh de suivre le gradient du ligand d'EBI2 (7 α ,25-dihydroxycholesterol) présent à la bordure T:B. Ainsi, les pré-Tfh migrent à la bordure T:B afin d'interagir avec les lymphocytes B sortant du follicule B.  : gradient de 7 α ,25-dihydroxy-cholesterol (EBI2 ligand).

2. Différenciation Tfh à la bordure T:B

Bien que l'engagement/l'initiation des T CD4 dans la voie de différenciation Tfh soit indépendante d'un signal spécifique dérivé des lymphocytes B, les cellules B jouent un rôle crucial dans la différenciation des pré-Tfh en Tfh ou GC Tfh. En effet, à la différence des autres sous-populations de T helper, le développement et la maintenance de la différenciation Tfh nécessitent une stimulation antigénique continue. Ainsi, les lymphocytes B sont les cellules présentatrices d'antigène (CPA) les plus abondantes au niveau de la bordure T:B, représentant ainsi la source principale de CPA permettant cette présentation continue d'Ag aux pré-Tfh (Deenick et al., 2010; Deenick et al., 2011; Goenka et al., 2011; Haynes et al., 2007).

Comme je l'ai décrit précédemment (cf : Partie II.II.A.2), à cette étape l'interaction prolongée entre les pré-Tfh et les lymphocytes B est dépendante de SAP, et est cruciale pour l'induction des

réponses humores, aussi bien pour la différenciation et la maturation des lymphocytes B que pour la différenciation complète des Tfh. En effet, les lymphocytes B activés, en plus de la présentation antigénique, apportent des signaux de co-stimulation tel que CD80, CD86, CD40 et ICOSL permettant aux pré-Tfh de maintenir leur état activé et permettre la poursuite de la différenciation Tfh (Good-Jacobson et al., 2012; Linterman et al., 2014; Salek-Ardakani et al., 2011; Weber et al., 2015).

Toutefois, il a récemment été montré chez la souris qu'en l'absence d'expression de CD80/CD86 par les cellules B la différenciation et la prolifération des lymphocytes Tfh n'étaient pas affectées (Watanabe et al., 2017). Cette même étude a révélé un rôle crucial de l'expression de CD40 par les lymphocytes B pour l'activation et le développement des Tfh. Cependant l'effet direct de la signalisation via CD40L sur la différenciation Tfh des pré-Tfh n'est pas claire. En effet, une voie indirecte via des molécules sécrétées ou exprimées à la membrane par les lymphocytes B après activation de CD40 pourrait être impliquée. ICOSL, dont l'expression est induite par la signalisation CD40L par les lymphocytes B (cf Partie : II.II.B.1), pourrait être impliqué.

3. Finalisation de la différenciation Tfh par les lymphocytes B spectateurs

Les lymphocytes B ne possédant pas de spécificité antigénique commune avec les Tfh aussi appelé cellules B spectatrices, sont majoritairement présents au niveau de la bordure T:B et jouent un rôle important dans la finalisation de la différenciation Tfh, dans leur motilité et leur recrutement au niveau du follicule B. Ce rôle est médié par l'engagement intense d'ICOS exprimé par les lymphocytes T activés (Hutloff et al., 1999), et nécessaire au développement des réponses humores (Dong et al., 2001). Il est important de noter que l'engagement d'ICOS par les lymphocytes B spectateurs est différent de la fonction de co-stimulation d'ICOS par les DC ou les cellules B possédant une spécificité antigénique. En effet, l'activation d'ICOS par ICOSL, exprimé par les lymphocytes B spectateurs, est médiée par la signalisation Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Gigoux et al., 2009; Kopf et al., 2000; Xu et al., 2013) qui entraîne l'inhibition de l'expression de CCR7, PSGL1 et S1PR1 qui sont responsables de la rétention des cellules au niveau de la zone T. L'engagement d'ICOS entraîne également une protection post-transcriptionnelle de Bcl6 empêchant sa dégradation et participant au maintien de la polarisation Tfh (Leavenworth et al., 2015).

D. Maintenance des Tfh dans le centre germinatif

1. Migration des Tfh dans le follicule B

A cette étape, les Tfh expriment fortement CXCR5, augmentant leur sensibilité à la chimiokine CXCL13 présente dans le follicule B, leur permettant de migrer vers le follicule B. Toutefois, l'expression de CXCR5 doit être couplée à une diminution d'expression de CCR7 pour permettre la migration vers le follicule B (Hardtke et al., 2005; Haynes et al., 2007). La forte expression de Bcl6 va ainsi permettre la répression directe de l'expression de CCR7 et EBI2 (Hatzi et al., 2015). De plus, la répression de l'expression de Blimp1 par Bcl6 induit d'une manière indirecte l'augmentation d'expression de CXCR5 (Liu et al., 2012).

La diminution d'expression d'EBI2 est également importante pour la migration des cellules CXCR5⁺ dans le follicule, puisque son expression entraîne la relocalisation des cellules au niveau de la bordure T:B (Cyster et al., 2014). La diminution d'expression d'EBI2 couplée à l'augmentation d'expression de S1PR2, fortement exprimé par les GC Tfh, permet la rétention des Tfh au niveau du GC (Moriyama et al., 2014).

2. Maintenance de la différenciation Tfh

Les Tfh présents dans le follicule B et le GC expriment des niveaux élevés de Bcl6, CXCR5, PD1, ICOS et SAP (Haynes et al., 2007; Yusuf et al., 2010). De plus, les GC Tfh intègrent des signaux provenant de séries d'interactions Ag-spécifiques avec des lymphocytes B entraînant la synthèse répétée de facteurs aidant la maturation des cellules B. La succession de contacts de courte durée entre les cellules T et B permet une forte compétition entre les lymphocytes B pour obtenir l'aide des Tfh, menant à la sélection des lymphocytes B de haute affinité.

La répétition de ces contacts entre GC Tfh et cellules B induit une exposition constante des GC Tfh aux antigènes, et donc une signalisation du TCR constante. Pourtant, les GC Tfh doivent conserver leur capacité à distinguer le nombre de complexe MHCII-peptide que présentent les lymphocytes B pour permettre leur sélection, sans répondre à la stimulation TCR et donc sans induire de prolifération. Pour cela les GC Tfh expriment de très hauts niveaux du récepteur PD1 permettant l'inhibition de la prolifération des GC Tfh en limitant la signalisation TCR. L'expression de PD1 est contrôlée par l'Activator Protein-1 (AP1) (Xiao et al., 2012), qui est-elle même activée en réponse à la signalisation du TCR (Crotty, 2014) (Figure 13).

La plupart des gènes codant pour les facteurs synthétisés par les Tfh comme CD40L, IL21 ou IL4 sont liés à AP1, qui induit ainsi leur expression (Qi, 2016). De manière intéressante, Bcl6 se lie à la plupart des motifs liés par AP1 (Hatzi et al., 2015), suggérant une interaction/collaboration de Bcl6 et AP1 pour la régulation transcriptionnelle de certains facteurs produits par les GC Tfh.

La co-stimulation via ICOS a également un rôle dans le maintien de la polarisation Tfh pour les GC Tfh. En effet, comme décrit précédemment (Partie : II.III.C.3), la signalisation ICOS permet la rétention/localisation des Tfh dans le follicule B et favorise l'expression de Bcl6. En effet, le blocage de la signalisation ICOS dans un GC déjà établi induit une diminution de la réponse humorale (Weber et al., 2015).

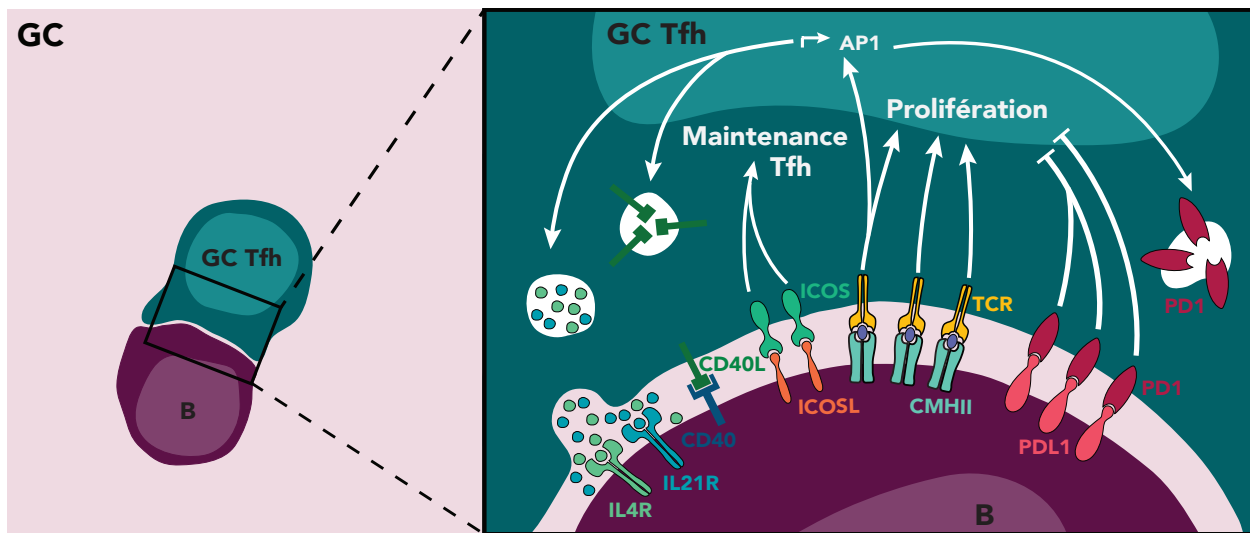


Figure 13 : Maintenance des Tfh dans le GC.

La polarisation Tfh est maintenue dans le GC par l'activation d'ICOS ainsi que par la forte activation du TCR qui entraîne l'expression de AP1 qui participe à l'induction de la production d'IL4 (●), d'IL21 (●) et de CD40L mais aussi de PD1. En effet, la forte expression de PD1 permet de contrer l'induction de la prolifération par les activations successives des TCR.

PARTIE III : Cellules myéloïdes mononucléaires humaines

Les cellules myéloïdes mononucléaires (MMC) ou phagocytes mononucléaires comprennent les monocytes, les macrophages et les DC. Les MMC ont un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité tissulaire pendant le développement et la réparation après un traumatisme, mais aussi dans l'initiation et la résolution de réponses immunes innées et adaptatives. En effet, grâce à leur faculté de détection des pathogènes et de leurs molécules associées, elles représentent un lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative de par leur capacité de présentation antigénique. La maintenance des monocytes, macrophages et DC implique de multiples voies d'ontogénie et d'homéostasie qui sont souvent remises en cause par la communauté scientifique. Toutefois, les progrès dans la caractérisation des différentes populations ont permis une meilleure compréhension des MMC et notamment de leurs origines.

Il me paraît important de vous présenter tout d'abord les différentes populations de MMC et leurs sous-populations à travers leur ontogénie. En effet, une meilleure compréhension des spécialisations fonctionnelles des MMC nécessite la prise en compte de leur origine, mais aussi de leur localisation tissulaire et de leur état d'activation, ce que j'aborderai dans les parties suivantes.

I. Origines et différenciation des cellules myéloïdes mononucléaires humaines

Bien que les monocytes aient une fonction distincte de celle des cellules phagocytaires mononucléaires, ils ont été longtemps considérés comme les précurseurs définitifs des macrophages et des DC. Cette hypothèse était soutenue par leur capacité à se différencier *in vitro* en présence de diverses cytokines. Les macrophages quant à eux possèdent de larges compartiments vacuolaires et sont spécialisés dans la clairance des cellules apoptotiques, des débris cellulaires ou encore des pathogènes. Enfin, les DC sont spécialisées dans la présentation de peptides antigéniques sur les molécules de CMH et dans l'activation des lymphocytes T. Elles présentent une morphologie particulière en « dendrites ». Récemment, les origines des différentes populations de MMC ont été redéfinies. Ainsi, les monocytes et les DC émergent de précurseurs distincts présents dans la moelle osseuse, alors que les macrophages ont une origine embryonnaire.

Des études réalisées sur des patients présentant des syndromes d'immunodéficience ont permis d'identifier un rôle crucial des facteurs de transcription GATA2 et IRF8 dans le développement des DC et des monocytes à des étapes précoces de différenciation. En effet, la mutation de GATA2 induit en plus de l'absence de cellules B et NK (Natural Killer) une perte totale des DC et monocytes du sang et

des tissus (Bigley and Collin, 2011). La mutation autosomale et récessive d'IRF8 quant à elle induit une perte totale des DC circulantes et une diminution des monocytes circulants (Hambleton et al., 2011). Dans les deux cas les macrophages ne sont pas affectés supportant ainsi leur origine embryonnaire.

A. Cellules dendritiques

Les DC sont hétérogènes et peuvent être classées en fonction de leur localisation anatomique, de leur origine et de leur fonction. En effet, les DC émergent de précurseurs hématopoïétiques puis sortent de la moelle osseuse pour rejoindre le compartiment sanguin puis les tissus périphériques et lymphoïdes. On distingue deux catégories de DC : les DC résidentes et les DC migratoires. Les DC résidentes sont localisées au niveau des organes lymphoïdes où elles capturent les antigènes présents dans le sang et la lymphe afin de les présenter aux lymphocytes T au niveau de la zone T. Les DC migratoires sont quant à elles localisées dans les tissus périphériques non lymphoïdes. Après capture d'antigènes et activation, elles migrent jusqu'aux organes lymphoïdes drainants via les vaisseaux lymphatiques pour présenter les antigènes dérivés des tissus périphériques aux lymphocytes T.

Les DC peuvent être divisées en deux catégories principales : les DC plasmacytoïdes ou pDC (CD123⁺CD303⁺) et les DC conventionnelles cDC. Les cDC sont-elles même divisées en deux populations distinctes : les cDC1 (BDCA3/CD141⁺ DC) et cDC2 (BDCA1/CD1c⁺ DC) (Guilliams et al., 2014a). Ces dix dernières années, des études comparatives combinant analyses phénotypiques et transcriptomiques des différentes sous-populations de DC chez l'Homme et la souris ont permis d'identifier des homologues entre les deux espèces. Ces analyses ont permis d'aligner les différentes sous-populations de DC humaines et murines : les pDC, les CD141/BDCA3 DC (cDC1) et les CD1c/BDCA1 DC (cDC2) humaines correspondent respectivement aux pDC, CD8 DC (cDC1) et CD11b DC (cDC2) murines (Haniffa et al., 2012; Robbins et al., 2008; Watchmaker et al., 2014).

Récemment, une étude transcriptomique comparative des différentes sous-populations de DC humaines provenant de tissus différents (sang, rate, thymus, peau et poumons) a montré que les DC résidentes des organes lympho-hématopoïétiques tel que la rate, le thymus et le sang, sont fortement définies par leur ontogénie et non par les signaux provenant du microenvironnement. Les différentes sous-populations de DC des tissus périphériques quant à elles montrent un programme transcriptionnel influencé par des signaux dérivés de leur tissu d'origine. Toutefois, le programme transcriptionnel des sous-populations de DC reste majoritairement dicté par l'ontogénie quel que soit leur tissu d'origine (Heidkamp et al., 2016b; Miller et al., 2012a).

1. Ontogénie

Les DC humaines émergent des précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse qui participent au renouvellement constant des DC dans l'organisme. Plusieurs observations ont mené à l'hypothèse de cette origine hématopoïétique des DC. En effet, l'analyse hématologique réalisée chez des patients leucémiques a mis en évidence une corrélation entre un faible nombre de DC et la perte de progéniteurs hématopoïétiques précoces CD34⁺CD38⁻ de la moelle osseuse (Mohty et al., 2002). Enfin, l'analyse du renouvellement des DC dermales après transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques, chez des patients ayant subi au préalable une thérapie immunosuppressive, a montré que très rapidement les DC dermales du receveur étaient remplacées par celles du donneur (Haniffa et al., 2009).

Chez la souris, plusieurs études ont identifié dans la moelle osseuse le progéniteur commun des DC ou CDP (Naik et al., 2007; Onai et al., 2007). Son équivalent humain a été mis en évidence récemment dans la moelle osseuse (Lee et al., 2015). En effet, les CDP se différencient ensuite soit en pDC soit en pré-cDC qui donneront ensuite les cDC1 et cDC2. Les pré-cDC ont été identifiés dans le sang, la moelle osseuse et les amygdales par l'expression de récepteurs impliqués dans la différenciation des DC chez la souris incluant CD117 (ckit), CD116 (GMCSF), CD135 (Flt3) et CD123 (IL-3R) (Breton et al., 2015).

Contrairement à la souris, chez l'Homme les DC sont présentes dans le sang. Il a été proposé que ces DC du sang et notamment les cDC ne seraient pas complètement différenciées. En effet, une proportion importante des cDC1 et cDC2 du sang ont gardé la capacité de prolifération contrairement aux pDC et aux cDC des organes lymphoïdes (Segura et al., 2012a). De plus, une plasticité des cDC2 du sang a été mise en évidence, puisqu'en présence de TSLP et de TGFβ les cDC2 du sang se différencient en cellules de Langerhans (Martínez-Cingolani et al., 2014; Milne et al., 2015).

Récemment, l'existence des précurseurs des cDC1 et cDC2 (pré-cDC1 et pré-cDC2) a été proposée, notamment dans une étude utilisant le séquençage d'ARN à l'échelle unicellulaire (single cell RNAseq) (Breton et al., 2016; See et al., 2017). En effet, l'analyse transcriptomique a permis d'identifier les pré-cDC CD123^{hi} CADM1⁻ CD1c⁻ du sang qui ne sont pas encore engagées dans une voie de différenciation vers les lignages cDC1 ou cDC2 (CD45RA⁺ CD123^{low} CADM1⁺ et CD45RA⁺ CD123^{low} CD1c⁺ respectivement) (See et al., 2017). Toutefois cette découverte est controversée puisqu'en utilisant la même technique le groupe de Hacohen n'a retrouvé qu'une seule population de précurseurs CD100⁺ CD34^{int} (Villani et al., 2017a).

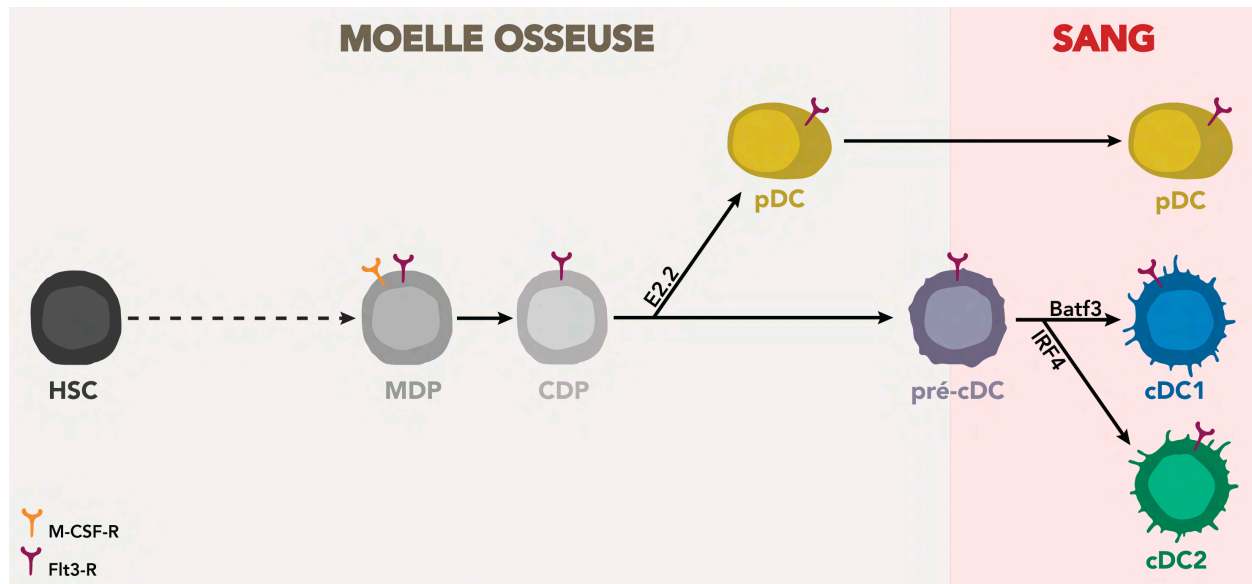


Figure 14 : Ontogénie des sous-populations de DC humaines.

Les DC humaines émergent des précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse. Les DC dérivent d'un progéniteur commun le CDP. La différenciation de ce dernier à partir de MDP dépend de l'activation du récepteur Flt3 par son ligand (Flt3L). Les CDP quant à eux, se différencient soit en pDC grâce à l'expression du facteur de transcription E2.2, soit en pré-cDC. Les pré-cDC sont présents à la fois dans la moelle osseuse et dans le sang. La différenciation des cDC1 et cDC2 à partir des pré-cDC est induite par l'expression des facteurs de transcription Batf3 et IRF4 respectivement. Ainsi on retrouve dans le sang les trois sous-populations de DC résidentes : les pDC, les cDC1 et les cDC2. HSC : Cellules Souche Hématopoïétiques, MDP : Monocytes DC Précurseur, CDP : Précurseur Commun des DC.

Un modèle alternatif d'ontogénie des DC a été proposé. En effet, une seconde voie de différenciation des pDC et cDC serait impliquée mettant en jeu un précurseur hématopoïétique précoce MLP (progéniteur lymphoïde multipotent) en amont de GMDP (Figure 15) (Doulatov et al., 2010; Helft et al., 2017). De plus, chez les patients présentant une mutation de GATA2 qui présentent une perte de DC, de monocytes, de lymphocytes B et de cellules NK (Natural Killer), une atteinte des progéniteurs hématopoïétiques a été observée et notamment une diminution des GMDP et l'absence de MLP suggérant que les DC dérivent soit des GMDP, soit des MLP, soit des deux voies (Bigley and Collin, 2011).

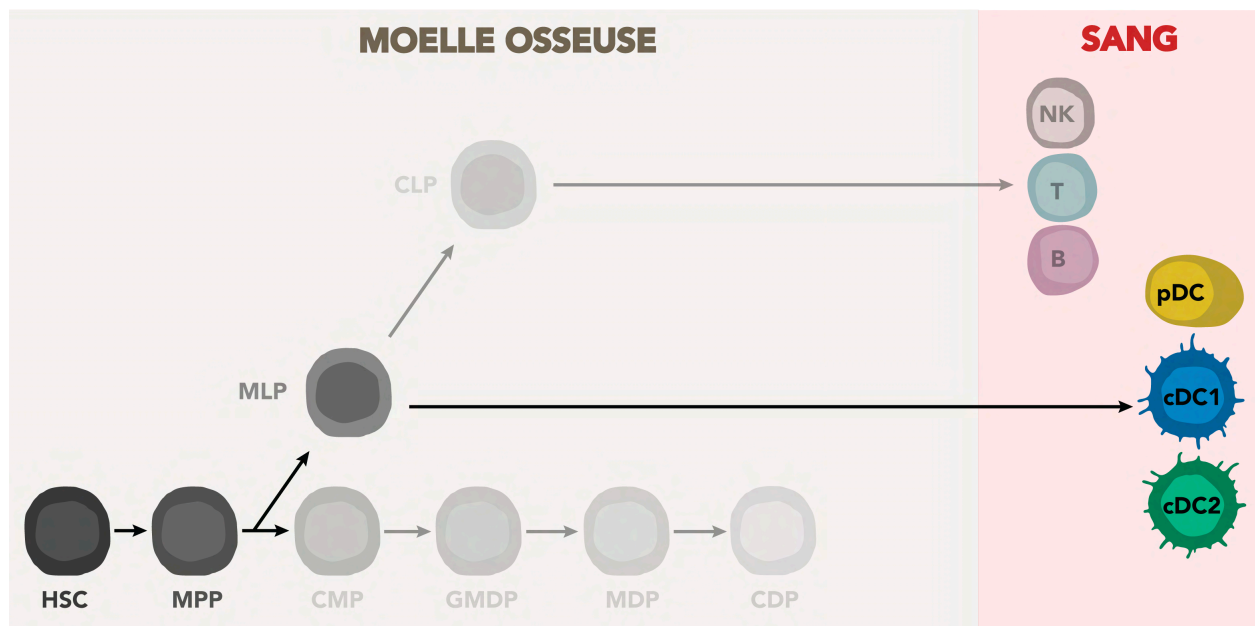


Figure 15 : Ontogénèse alternative des sous-populations de DC humaines.

Dans ce modèle alternatif, les trois sous-populations de DC résidentes seraient dérivées de progéniteurs communs aux cellules lymphoïde (NK, lymphocytes T et B). HSC : Cellules Souche Hématopoïétiques, MPP : Précurseur Multipotent, MLP : Précurseur Lymphoïde Multipotent, CLP : Précurseur Lymphoïde Commun, CMP : Précurseur Myéloïde Commun, GMDP : Granulocytes Monocytes DC Précurseur, MDP : Monocytes DC Précurseur, CDP : Précurseur Commun des DC.

2. Facteurs de transcription impliqués dans le développement des sous-populations de DC

Chez la souris, le développement des cDC1 nécessite le facteur de transcription Batf3. En effet, les souris déficientes pour Batf3 présentent une perte sélective des CD8 DC (Edelson et al., 2010; Hildner et al., 2008). Chez l'Homme, la perte d'expression de Batf3 des cellules CD34⁺ (HSC) empêche leur différenciation *in vitro* en cDC1 (Poulin et al., 2012). Toutefois, la perte des cDC1 n'a pas été observée *in vivo* par transfert de HSC CD34⁺Batf3^{-/-} humaines dans des souris humanisées (Poulin et al., 2012). Ceci pourrait être dû à un système de compensation des autres membres de la famille Batf comme observé chez la souris (Tussiwand et al., 2012). Un rôle d'IRF4 dans le développement des cDC2 a été observé chez la souris et chez l'Homme (Schlitzer et al., 2013b; Watchmaker et al., 2014). Toutefois, chez la souris un rôle de IRF4 dans la migration des cDC2 jusqu'au ganglion lymphatique a été mis en évidence, remettant en cause le rôle d'IRF4 dans le développement des cDC2 (Bajaña et al., 2012). Ceci reste à être confirmé chez la souris et chez l'Homme. Enfin, le facteur de transcription E2.2 intervient dans le développement et les fonctions des pDC chez la souris et l'Homme. En effet, chez l'Homme la perte d'expression d'E2.2 induit un défaut d'expression de marqueurs spécifiques des pDC

tel que BDCA2/CD303 et altère leur capacité à sécréter de l'IFN α après activation (Cisse et al., 2008). De plus, la balance d'expression entre Id2 et E2.2 apparaît crucial pour le développement des cDC et pDC respectivement (Nagasawa et al., 2008).

3. Rôle des cytokines dans le développement des sous-populations de DC

Les cDCs et pDC expriment Flt3 (FMS-like tyrosine kinase 3) et GM-CSF-R (Récepteur au GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)) (Haniffa et al., 2012; Poulin et al., 2010). L'utilisation des cytokines Flt3-L (Flt3 Ligand) et GM-CSF sont couramment utilisés *in vitro* pour la différenciation de DC à partir de progéniteurs humains (Balan et al., 2014; Breton et al., 2015; Breton et al., 2016; Lee et al., 2015). De plus, l'administration de Flt3-L à des volontaires sains induit une augmentation du nombre de pré-cDC, cDC1, cDC2 et pDC du sang suggérant un rôle direct de Flt3L dans l'ontogénie des DC (Breton et al., 2015; Breton et al., 2016). Le GM-CSF quant à lui aurait un rôle dans l'homéostasie et la survie des DC (Greter et al., 2012).

L'accès aux échantillons humains étant la plupart du temps limité, des modèles de DC dérivées *in vitro* ont été mis au point. La majorité des modèles de différenciation de DC *in vitro* se fait à partir de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ et de différentes combinaisons de cytokines en fonction des DC souhaitées. La culture de progéniteurs CD34⁺ en présence de GMCSF et TNF α induit la différenciation de LC « like » et de DC dermale « like » (Caux et al., 1992). La différenciation *in vitro* de CD34⁺ HSC en pDC « like », cDC1 « like », cDC2 « like » nécessite la présence de Flt3L et de thrombopoïétine (Chen et al., 2004; Poulin et al., 2010). Récemment, la génération de cDC1 « like » à partir de CD34⁺ HSC a été décrite et nécessite la culture des cellules CD34⁺ en présence de Flt3L, SCF (Stem Cell Factor), GM-CSF et IL4 (Balan and Dalod, 2016).

B. Monocytes

Les monocytes sont majoritairement présents dans la moelle osseuse, le sang et la rate. Ils représentent une population hétérogène et plastique et possèdent également un large éventail de fonctions au cours de l'inflammation, dépendant des signaux perçus dans le microenvironnement.

Les monocytes émergent de précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse. Le précurseur spécifique des monocytes a été mis en évidence récemment chez l'Homme et appelé progéniteur commun des monocytes ou cMoP. Ce dernier dérive du progéniteur MDP (Précurseur des monocytes et DC) et n'est présent que dans la moelle osseuse, sa différenciation en monocytes est contrôlé par le récepteur au M-CSF (Monocyte-Colony Stimulating Factor) (Lee et al., 2015). Une fois différenciés, les

monocytes passent dans le sang où ils sont caractérisés, chez l'Homme, par l'expression de CD14, puis migrent vers les tissus. Une fraction des monocytes CD14⁺ se différencie en monocytes CD16⁺ (Patel et al., 2017a). En cas d'inflammation les monocytes sont recrutés dans les tissus et se différencient en DC ou macrophages dérivés de monocytes (moDC ou moMAC respectivement) participant ainsi au renouvellement cellulaire du tissu. La différenciation des moDC et moMAC est contrôlée par les facteurs de transcriptions IRF4 et MAFB respectivement (Goudot et al., 2017).

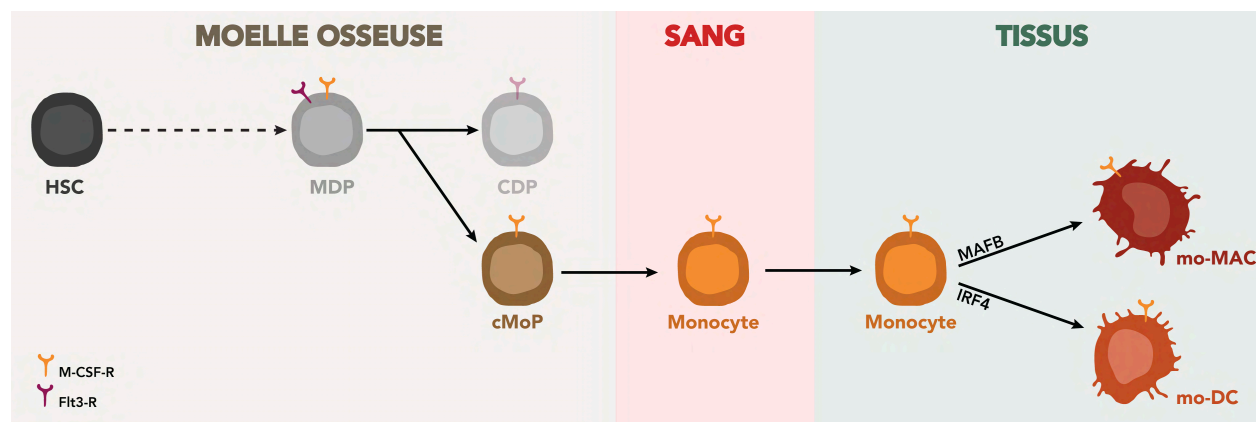


Figure 16 : Ontogénie des Monocytes et des cellules dérivées des Monocytes humaines.

Les Monocytes humains émergent des précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse. Les monocytes dérivent d'un progéniteur commun avec les DC, le MDP. En présence de MCSF, les MDP se différencient en cMoP, puis en Monocytes. Les Monocytes sont présents dans la moelle osseuse et dans le sang. Une fois dans les tissus les Monocytes se différencient en moMAC ou moDC grâce à l'expression des facteurs de transcriptions MAFB et IRF4 respectivement. HSC : Cellules Souche Hématopoïétiques, MDP : Monocytes DC Précurseur, CDP :Précurseur Commun des DC, cMoP : Progéniteur Commun des Monocytes.

C. Macrophages résidents

Les macrophages résidents des tissus ont pour fonction de maintenir l'homéostasie tissulaire en éliminant les débris cellulaires et en participant au remodelage tissulaire. Ils présentent également des spécialisations fonctionnelles liées à leur localisation tissulaire et comprennent entre autres les ostéoclastes (os), les cellules de Kupffer (foie), les macrophages alvéolaires (poumons), la microglie (cerveau) ou encore les macrophages sous capsulaires (ganglions lymphatiques).

Chez la souris adulte, les macrophages tissulaires résidents proviennent de cellules souches embryonnaires. Les macrophages dérivés de ces précurseurs embryonnaires colonisent la plupart des tissus avant l'émergence de l'hématopoïèse définitive, dérivée des cellules souches hématopoïétiques (HSC) (Ginhoux et al., 2010; Gomez Perdiguero et al., 2015; Hoeffel et al., 2015; Kierdorf et al., 2013; Schulz et al., 2012; Sheng et al., 2015), à l'exception de la peau, de l'intestin et d'une partie des macrophages présent dans le tissu cardiaque (Bain et al., 2014; Tamoutounour et al., 2013) (Epelman et

al., 2014). Ils ont la capacité de s'auto renouveler tout au long de la vie avec une faible contribution des monocytes circulants (Hashimoto et al., 2013; Yona et al., 2013).

Chez l'Homme, l'origine embryonnaire des macrophages résidents et leur capacité d'auto-renouvellement est soutenue par différentes observations. En effet, après thérapie immunosuppressive précédant la transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques, il a été observé que les macrophages de la peau, contrairement aux DC dermales qui sont rapidement déplétées, restent présents au moins plusieurs mois après la transplantation (Haniffa et al., 2009). De plus, pendant une transplantation de moelle osseuse le taux de remplacement des DC dermales et des macrophages est différent suggérant l'existence de lignages cellulaires différents (Haniffa et al., 2009). Les patients possédant des mutations des facteurs de transcription GATA2 ou IRF8, ne présentent pas de défaut du nombre de macrophages résidents ou des cellules de Langerhans (LC) de la peau, suggérant un développement indépendant des monocytes circulants (Bigley et al., 2011; Hambleton et al., 2011). Ces observations suggèrent également une origine distincte des cellules de Langerhans par rapport aux sous-populations de cDC et pDC humaines. De plus, dix ans après une greffe de la main les LC du donneur sont toujours présents dans le tissu témoignant d'une capacité d'autorenouvellement des LC (Kanitakis et al., 2011; Kanitakis et al., 2004). Ces observations suggèrent que les LC seraient des macrophages résidents spécifiques de la peau, mais ceci reste à être confirmé.

Chez l'homme, les connaissances du développement et de l'ontogénie embryonnaire des macrophages tissulaires résidents sont très limitées en raison de la difficulté d'obtention d'embryons humains à des étapes précoces de développement. Toutefois, des modèles de différenciation *in vitro* ont permis d'identifier les facteurs de transcriptions impliqués ou non dans la différenciation des macrophages (Karlsson et al., 2008; van Wilgenburg et al., 2013). Ainsi la différenciation des macrophages est dépendante de RUNX1 et de SPI1 mais indépendante de MYB (Buchrieser et al., 2017). Ces observations rejoignent les études réalisées chez la souris montrant un développement indépendant de MYB des macrophages à partir de progéniteurs embryonnaires provenant du sac vitellin (Gomez Perdiguero et al., 2015).

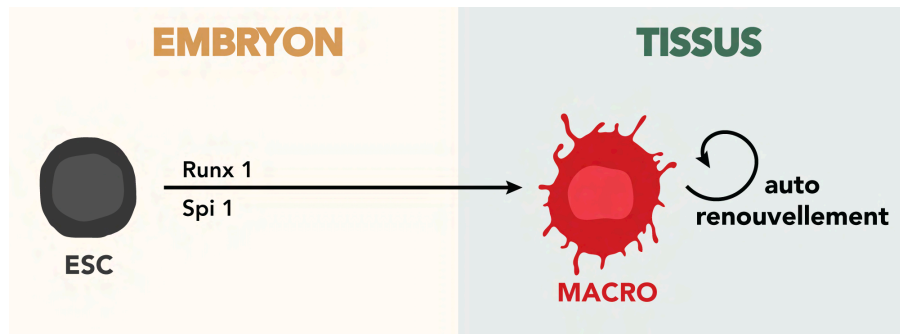


Figure 17 : Ontogénie des Macrophages résidents humains.

Les Macrophages résidents humains émergent de précurseurs embryonnaires dans le sac vitellin. Les facteurs de transcription Runx1 et Spi1 sont impliqués dans cette différenciation à partir des ESC. Au cours de l'embryogenèse précoce les Macrophages rejoignent les tissus où ils acquièrent la capacité d'autorenouvellement. ESC : Cellule Souche Embryonnaire.

L'ontogénie des MMC est un domaine en constante évolution dûe à une meilleure caractérisation progressive des différentes populations. En effet, les études de ces dernières années ont permis une meilleure caractérisation des MMC avec notamment une redéfinition de certaines populations qui se sont avérées ne pas être des DC. Ainsi, l'analyse transcriptomique des DC CD103-Sirpα⁺ de l'intestin a permis de mettre en évidence un profil d'expression de gènes consistant avec celui des moDC et non des DC. De plus, en condition inflammatoire, leur nombre est augmenté ce qui est cohérent avec leur nouvelle définition de moDC, décrites pour être recrutées au cours d'une inflammation (Watchmaker et al., 2014). Les CD14 DC dermales (CD14⁺ CD1c⁻) et pulmonaires ont également été redéfinies. En effet, différentes études ont montré qu'elles présentaient un phénotype intermédiaire de marqueurs caractéristiques des macrophages et des DC, leur analyse transcriptomique a montré un lien étroit avec les monocytes et macrophages résidents (Haniffa et al., 2012; Schlitzer et al., 2013b). L'étude de l'ontogénie permet de plus en plus de redéfinir précisément l'origine des différentes populations de MMC, mais tout n'est pas encore complètement connu, des études complémentaires sont donc nécessaires.

II. Distribution des cellules myéloïdes mononucléaires dans les tissus

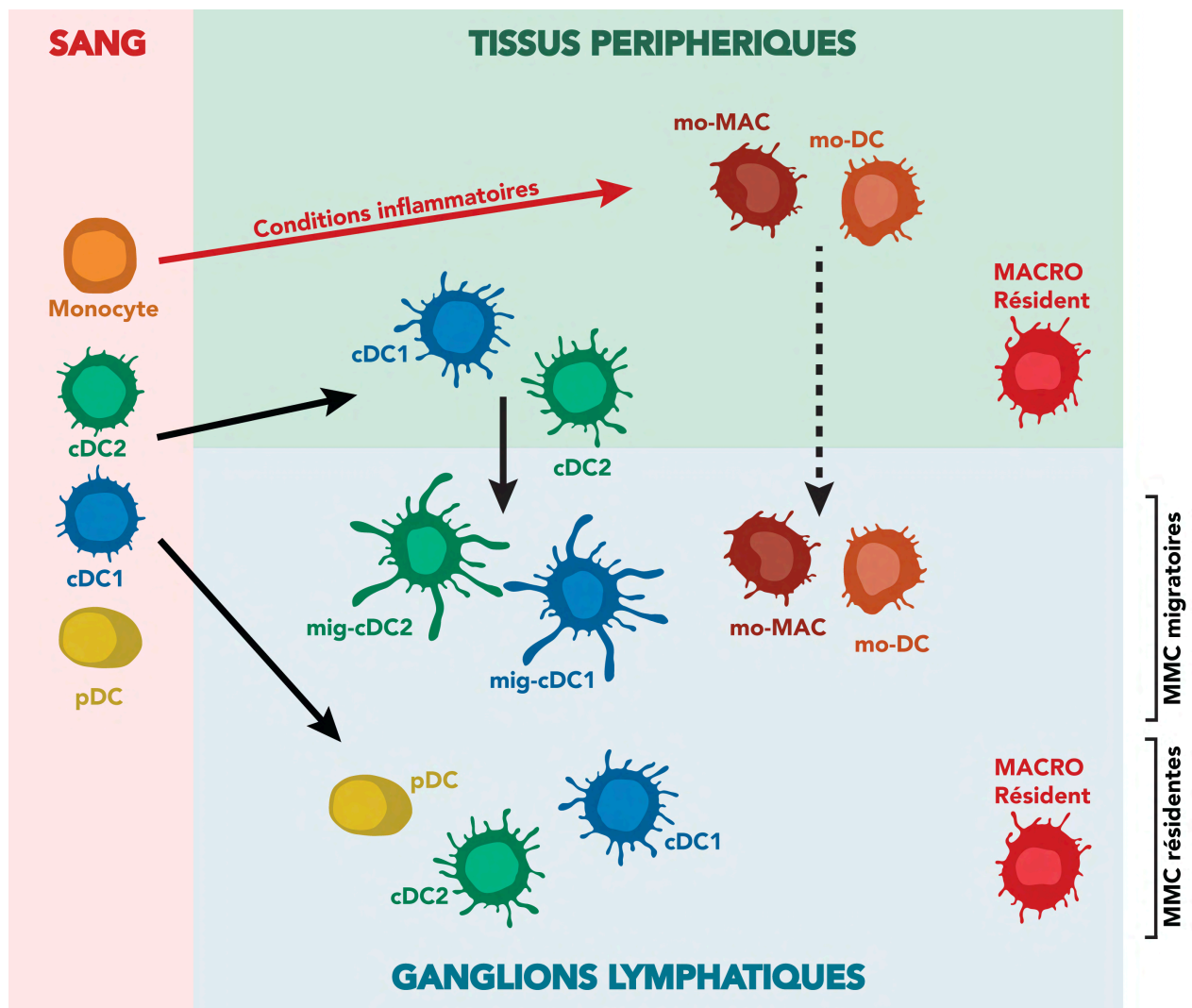


Figure 18 : Distribution des MMC dans les tissus.

Trois sous populations de DC résidentes sont présentes dans le sang et les ganglions, les cDC1, cDC2 et pDC. Les cDC1 et cDC2 sont également présentes dans les tissus. Une fois activées, elles migrent dans les ganglions lymphatiques pour former la population migratoire des cDC (migcDC). Les monocytes circulants migrent dans les tissus périphériques en condition inflammatoire et se différencient en moMAC et moDC. Enfin des macrophages résidents sont présents dans les ganglions lymphatiques et les tissus (.....>: capacité migratoire controversée).

A. Sang

Après leur différenciation, les DC et les monocytes sont présents dans le sang permettant le renouvellement de ces cellules dans les organes périphériques et constituent un stock de MMC qui peut rapidement être déployé afin de réagir le plus rapidement possible en cas de besoin (traumatisme/infection...).

1. Sous-populations de DC circulantes

Trois sous-populations de DC sont présentes dans le sang : les pDC et les deux sous-populations de cDCs, les cDC1 et les cDC2. Les pDC et cDC2 sont présentes dans les mêmes proportions (environ 45% des DC totales), alors que les cDC1 ne représentent que 5 à 10% des DC totales (MacDonald et al., 2002). Différents marqueurs sont utilisés pour les caractériser, les trois sous-populations expriment HLA-DR et CD11c (expression faible de CD11c pour les pDC). Les pDC sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD123/IL-3R, CD303/BDCA2 et CD304/BDCA4. Les cDC2 expriment CD1c/BDCA1 alors que les cDC1 expriment CD141/BDCA3, CLEC9a et XCR1 (Boltjes and Van Wijk, 2014; Dzionek et al., 2000; Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

Récemment, la présence de ces trois sous-populations de DC dans le sang a été remise en cause par une étude « single cell RNAseq » sur les différentes sous-populations de DC. En effet, dans cette étude les cDC2 apparaissent être une population hétérogène que l'on peut diviser en deux sous-populations de cDC2 (Villani et al., 2017a). Une autre étude récente a rapporté la présence de deux sous-populations de cDC2 caractérisée par l'expression de CD5. Ainsi, les cDC2 CD5^{hi} seraient caractérisées par l'expression d'IRF4 alors que les cDC2 CD5^{lo} exprimeraient une signature spécifique des monocytes et notamment le facteur de transcription MAFB (Yin et al., 2017). La corrélation entre les deux études n'a pas été réalisée, il serait donc intéressant de déterminer s'il s'agit des mêmes sous-populations dans les deux études et de confirmer cette hétérogénéité des cDC2. Une nouvelle sous-population de DC nommée AS DC a également été mise en évidence par « single cell RNAseq ». Les AS DC représentent une population rare de DC circulantes, expriment AXL et SIGLEC6 et induisent la prolifération de lymphocytes T dans un modèle de co-culture allogénique (Villani et al., 2017a).

2. Monocytes circulants

Les monocytes circulants sont hétérogènes, trois sous-populations ont été identifiées par l'analyse de l'expression des marqueurs de surfaces CD14 et CD16 : les monocytes classiques majoritaires dans le sang (CD14⁺⁺CD16⁻) représentant 87% des monocytes circulants, les monocytes non classiques (CD14⁺CD16⁺⁺) et enfin les monocytes intermédiaires (CD14⁺⁺CD16⁺) (Boltjes and Van Wijk, 2014; Patel et al., 2017a). Récemment, une étude chez l'Homme a analysé la durée de vie des monocytes circulants, mettant ainsi en évidence que la population majoritaire, les monocytes classiques, circulent dans le sang pendant un jour avant de s'extravaser ou de mourir. Les monocytes non classiques se différencient des monocytes classiques avec un stade intermédiaire : les monocytes intermédiaires. Les monocytes non classiques ont une durée de vie plus longue de 4 à 7 jours respectivement (Patel et al., 2017a). Enfin, l'étude transcriptomique par « single-cell-RNAseq » des différentes populations de MMC du sang a suggéré la redéfinition des différentes sous-populations de monocytes du sang. En effet, quatre sous-populations ont été mises en évidence dont deux correspondant aux monocytes classiques et non classiques, et deux nouvelles sous-populations, ces résultats sont à confirmer par une analyse phénotypique (Villani et al., 2017a).

B. Tissus périphériques

Les MMC des tissus périphériques ont été peu caractérisées à l'exception de quelques organes comme la peau, où l'on retrouve cinq sous-populations: les cellules de Langerhans (LC) (CD1a⁺ Langerine/CD207⁺), les cDC1 (CD141⁺ CLEC9a⁺ XCR1⁺ et CADM1⁺), les cDC2 (CD1c⁺ CD1a⁺), les CD14 DC (CD14⁺ CD1c⁺) et les CD14 moMAC (CD14⁺ CD1c⁻) (Haniffa et al., 2012; Klechevsky et al., 2008; McGovern et al., 2014).

Les sous-populations cDC1 et cDC2 ont également été retrouvées au niveau du foie (Guilliams et al., 2016; Haniffa et al., 2012) et des poumons (Guilliams et al., 2016; Haniffa et al., 2012; Patel et al., 2017b; Yu et al., 2013). Dans les poumons, les CD14 DC (CD14⁺ CD1c⁺) ont été décrites ainsi qu'une rare population de pDC (CD123⁺) (Patel et al., 2017b). Trois sous-populations de MMC sont présentes au niveau de la muqueuse vaginale : les LC, les cDC2 et les CD14 DC (CD14⁺ CD1c⁺) (Duluc et al., 2013). Enfin, deux sous-populations de DC sont présentes au niveau de l'intestin les cDC1 (CD103⁺ Sirpα⁻ CLEC9a⁺ CADM1⁺ XCR1⁺) et les cDC2 (CD103⁺ Sirpα⁻ CCR7^{hi} CD11b⁺).

Dans un contexte inflammatoire, les cellules dérivées de monocytes sont retrouvées dans les tissus, ainsi les moDC et moMAC ont été identifiés dans le cas d'inflammation de l'intestin (Grimm et al.,

1995; Kamada et al., 2008), de la peau (Jenner et al., 2014) (Wollenberg et al., 1996; Zaba et al., 2009), des voies respiratoires (Eguíluz-Gracia et al., 2016), d'arthrite rhumatoïde et d'ascites tumorales (Segura et al., 2013b).

C. Organes lymphoïdes secondaires

On distingue deux types d'organes lymphoïdes, les organes lymphoïdes non drainants et drainants. Les sous-populations de MMC résidentes (DC et macrophages résidents) sont présentes dans les organes lymphoïdes non drainants (les amygdales, le thymus et la rate). Les organes lymphoïdes drainants (ganglions lymphatiques) sont plus complexes puisqu'ils contiennent à la fois des MMC résidentes et migratoires, qu'il est parfois compliqué de caractériser (Segura et al., 2013a; Segura et al., 2012a).

Les trois sous-populations de DC résidentes sont présentes dans les organes lymphoïdes non drainants et drainants : les pDC et les deux sous-populations de cDC: cDC1 (CD141⁺) et cDC2 (CD1c⁺) (Guilliams et al., 2016; Jongbloed et al., 2010; Lindstedt et al., 2005; McIlroy et al., 2001; Segura et al., 2012a; Velásquez-Lopera et al., 2008)). Récemment, les AS DC (AXL⁺ SIGLEC6⁺) présentes dans le sang ont également été identifiées dans les amygdales (Villani et al., 2017a).

Dans les organes lymphoïdes drainants, en plus des MMC résidents, sont présentes les MMC migratoires (mig-MMC) provenant des tissus périphériques. On retrouve quatre sous-populations de mig-DC dans les ganglions lymphatiques drainants : les LC (tissus périphériques : peau et muqueuses), mig-cDC1 (CD141⁺), les mig-cDC2 (CD1c⁺ CD1a⁺) et les mig CD14 DC/moMAC (CD206⁺ DC) (Segura et al., 2012a) (Granot et al., 2017). Les mig-cDC2 des ganglions drainants représentent la sous-population de DC mature la plus fréquente dans les ganglions lymphatiques. De plus, il a été mis en évidence que les cDC2 des ganglions provenant des muqueuses expriment des marqueurs témoignant de leur origine tissulaire (Granot et al., 2017). Les macrophages résidents sont également présents dans les organes lymphoïdes secondaires.

III. Spécialisation Fonctionnelle

Le concept de spécialisation fonctionnelle est au centre de l'organisation du système de défense de l'organisme. En effet, le système immunitaire doit être capable de détecter et d'intégrer une grande variété de stimuli aussi bien exogènes qu'endogènes, et de répondre de manière appropriée dans le but de maintenir l'intégrité et l'homéostasie cellulaire et tissulaire d'un organisme. De plus, la variété des

réponses possibles est tout aussi importante que la variété des stimuli reçus, nécessitant le développement d'une organisation basée sur la spécialisation fonctionnelle des différents acteurs cellulaires du système immunitaire. Ainsi, différentes populations cellulaires présentent des capacités de détection de stimuli et d'induction de réponses différentes.

Il existe des capacités dites acquises dépendantes du microenvironnement et/ou des stimuli détectés. Ainsi, les macrophages résidents des tissus se différencient à partir de précurseurs embryonnaires puis colonisent les tissus (cf : Partie III-I-C), où ils acquièrent des spécialisations fonctionnelles spécifiques du tissu (Amit et al., 2016). A titre d'exemple, les macrophages sous capsulaires présents dans les ganglions lymphatiques ont un rôle crucial dans la mise en place de réponses humorales. En effet, ils participent à l'élimination des particules virales présentes dans la lymphe et capturent ainsi des antigènes qu'ils présentent aux lymphocytes B pour promouvoir les réponses anticorps (Davies et al., 2013; Murray and Wynn, 2011). Ainsi, cette spécialisation fonctionnelle est induite par leur localisation tissulaire et les besoins particuliers du tissu et est donc restreinte aux ganglions lymphatiques.

Par opposition aux capacités acquises, certaines spécialisations fonctionnelles sont déterminées très tôt au cours de l'ontogénie des populations cellulaires, on parlera alors de capacités intrinsèques. Par exemple, les sous-populations de DC présentent des capacités de détection de stimuli variées de par l'expression différentielle de récepteurs de reconnaissance aux pathogènes (PRR) définie par le programme transcriptomique intrinsèque à chaque sous-population.

Ainsi, dans ce chapitre je vais aborder dans un premier temps la spécialisation fonctionnelle des cellules présentatrices d'antigènes concernant la reconnaissance des pathogènes et dans un second temps la spécialisation des cellules myéloïdes mononucléaires pour l'induction des réponses T CD8 et T CD4.

A. Reconnaissance des pathogènes

1. Récepteurs de reconnaissance aux pathogènes (PRR)

Les différentes sous-populations de MMC n'expriment pas le même profil de PRR, ce qui participe à leur spécialisation fonctionnelle face à la reconnaissance de pathogènes (Tableau 1). Il existe une grande variété de PRR permettant ainsi la reconnaissance d'un large nombre de pathogènes. Les PRR reconnaissent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) et peuvent avoir une expression intracellulaire ou membranaire. Les PRR présentent une large diversité, on distingue les

récepteurs de type Toll (TLR), C-Lectine (CLR), RIG (Retinoic acid-Inducible Gene (RLR)) ainsi que les récepteurs NOD (Nucleotide Oligomerization Domain). Ainsi, les TLR membranaires reconnaissent les composants de la paroi des pathogènes (TLR1,2,4,5,6). Les CLR sont également membranaires et interagissent avec les glycolipides (DC SIGN, DEC205, Mannose récepteur (MR)). Les PRR intracellulaires reconnaissent les acides nucléiques viraux et bactériens tel que TLR3, TLR9 ou encore les RLR : RIG-1 et MDA-5 (Melanoma Differentiation-Associated gene 5). Enfin, les récepteurs NOD (Nucleotide Oligomerization Domain) reconnaissent les constituants des peptidoglycanes de la paroi bactérienne au niveau cytoplasmique (NOD1, NOD2 et IPAF) (Cerboni et al., 2013).

	PRR	Sang			Tissus périphériques				
		pDC	cDC1	cDC2	LC	cDC1	cDC2	CD14 DC	Macro
Toll like Récepteur (TLR)	TLR1	+	+	+	+			+	
	TLR2	-	-	+	+			+	- (alvéolaire)
	TLR3	-	+	-	+	+		-	
	TLR4	-	-	+	-			+	- (alvéolaire)
	TLR5	-	-	+	-			-	
	TLR6	+	+	+	+		+	+	
	TLR7	+	-	-	+			-	
	TLR8	-	+	+	+(muqueuse vaginale)		+	+	
	TLR9	+	-	-	-			-	+(alvéolaire)
	TLR10	+	+	-	-			-	
C-type lectine like Récepteur (CLR)	Clec4a/DCIR	+	+	+	+		+(intestin)	+	
	Clec6a/Dectin2	-	+	-					
	Clec7a/Dectin1	-	+	+	-		+	+	
	Clec9a/DNGR1	-	+	-		+(intestin)			
	Clec5F14/CD301	-	+	+					
	CD205/DEC 205	+	+	+				+	
	CD206/MR	-	-	+	-		+	+	+(LN)
	CD207/Langerine	-	-	-	+	-	+(intestin)	-	
	CD209/DC SIGN	-	-	-	-		+(intestin)	+	+(LN)
RIG like Récepteur (RLR)	CD280/MRC2	-	+	+					
	RIG-I				-		-	+	
	MDA-5				+		+	+	

Tableau1 : Expression de différents PRR selon les sous-populations de MMC.

Expression de PRR par les différentes sous-populations de MMC. + : exprimé, - : pas exprimé, case grise : inconnu. (Hémont et al., 2013; Lundberg et al., 2014) (Duluc et al., 2013; Fehres et al., 2015a; Jin et al., 2014; Jongbloed et al., 2010; Juarez et al., 2010; Klechevsky et al., 2009; Klechevsky et al., 2008; Lindstedt et al., 2005; Mittag et al., 2011a; Segura et al., 2012a; Watchmaker et al., 2014).

Différentes études ont montré des compétences différentielles des sous-populations de DC face à différents pathogènes. Ainsi, les LC de l'épiderme sont plus sensibles aux virus que les DC dermales (van der Aar et al., 2011). Les cDC2 du sang ont une capacité accrue pour répondre contre *Staphylococcus aureus* par rapport aux cDC1 (Jin et al., 2014). Enfin, les cDC présentent des différences de réponses après vaccination, par exemple les cDC2 du sang répondent fortement après vaccination contre HPV (Human papilloma Virus) contrairement aux cDC1 (Banchereau et al., 2014).

Les pDC ont un rôle important dans les réponses antivirales de par leur capacité à sécréter de grande quantité d'IFN de type I (IFN α) en réponse à des ligands de TLR7 et 9 (Cella et al., 2000; Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999). Les cDC1 sont également capables de sécréter de l'IFN α ainsi que de l'IFN β et de l'IFN λ après activation de TLR3 ou via le virus de l'hépatite C (Hémont et al., 2013; Meixlsperger et al., 2013; Nizzoli et al., 2013b; Yoshio et al., 2013; Zhang et al., 2013).

2. Maturation des DC

En présence d'un pathogène, ces « capteurs » sont activés et induisent une modification de l'état des DC qui passent de immatures à matures. L'activation des DC est accompagnée de changements phénotypiques, comme le remaniement du cytosquelette entraînant un changement morphologique de la cellule et l'augmentation de leur capacité migratoire. En effet, une fois activées les DC migrent vers les ganglions lymphatiques afin de présenter les antigènes capturés aux lymphocytes T et d'induire leur activation. Ainsi, les DC matures perdent leur capacité de phagocytose/endocytose et présentent une augmentation d'expression des molécules de CMH, des molécules de co-stimulation comme CD80, CD86 ou encore CD40, à leur surface et sécrètent des cytokines (Reis e Sousa, 2006).

Ces changements contribuent à l'induction d'une réponse immunitaire efficace via l'activation et la polarisation des cellules T naïves. En fonction des signaux de danger que reçoivent les DC, leur profil de sécrétion cytokinique peut être différent et de la même manière, des stimuli similaires peuvent induire une sécrétion de cytokines différente selon la sous-population de DC (Haniffa et al., 2012; Hémont et al., 2013; Nizzoli et al., 2016). La sécrétion de cytokines par les DC participe, avec la reconnaissance de l'antigène via les molécules de CMH et l'expression de molécules de co-stimulation, à la mise en place d'une réponse immune adaptative via l'activation des lymphocytes T.

B. Réponse T CD8

Au cours d'une infection, afin d'activer les lymphocytes T CD8 les DC doivent être capables de présenter des peptides dérivés de protéines exogènes, provenant du pathogène, sur des molécules de CMH-I. On parle de présentation croisée ou de « cross » présentation. Chez la souris les cDC1 ont été décrites comme les DC les plus compétentes pour la présentation croisée en absence d'inflammation (den Haan et al., 2000; Pooley et al., 2001; Schnorrer et al., 2006). Cependant, après activation des cDC via leurs récepteurs endocytiques comme DEC205, ou des pDC via leur TLR, toutes les sous-populations de DC présentent efficacement des peptides antigéniques sur des molécules de CMH-I (den Haan and Bevan, 2002; Desch et al., 2014; Kamphorst et al., 2010; Mouriès et al., 2008).

1. Présentation croisée

Chez l'Homme, les différentes populations de DC possèdent toutes la capacité intrinsèque de « cross » présenter des antigènes exogènes indépendamment de leur tissu d'origine. En effet, les différentes sous-populations de DC du sang ont toutes la capacité de « cross » présenter des antigènes une fois activées par un ligand de TLR (Mittag et al., 2011a; Nizzoli et al., 2013b) (Tel et al., 2013). Par ailleurs, lorsque l'antigène est délivré aux endosomes tardifs via DEC205 les cDC1 sont les DC les plus efficaces pour la présentation. Par contre, aucune différence n'est observée entre les deux sous-populations de cDC lorsque les antigènes sont délivrés aux endosomes précoces via CD40 (Cohn et al., 2013). Après capture d'antigène via CLEC12A toutes les sous-populations de DC du sang « cross » présentent efficacement aux lymphocytes T CD8 (Hutten et al., 2016). Les pDC du sang « cross » présentent des antigènes solubles, viraux ou encore associés à des cellules (Di Pucchio et al., 2008; Guillerme et al., 2013; Hoeffel et al., 2007; Lui et al., 2009; Mittag et al., 2011a; Tel et al., 2013). Enfin, les cDC1, cDC2 générées *in vitro* à partir de précurseurs hématopoïétiques CD34⁺ ont la capacité de « cross » présenter des antigènes de manière similaire.

Dans les organes lymphoïdes (rate, ganglions lymphatiques et amygdales), les différentes sous-populations de DC résidentes ont toutes la capacité intrinsèque de « cross » présenter des antigènes solubles (Mittag et al., 2011a; Nizzoli et al., 2013b; Segura et al., 2013a; Segura et al., 2012a). Toutefois, les cDC1 présentent une spécialisation concernant la cross présentation d'antigène nécrotique (Bachem et al., 2010; Chiang et al., 2016; Crozat et al., 2010; Jongbloed et al., 2010; Segura et al., 2013a; Segura et al., 2012a). Cette capacité supérieure à cross présenter des antigènes dérivés de cellules nécrotiques des cDC1 est dû à leur expression de CLEC9A. En effet, CLEC9A est un CLR (C-type Lectin Receptor)

impliqué dans la détection de cellules nécrotiques et les antigènes délivrés via des anticorps ciblant Clec9A sont présentés à la fois sur des molécules de CMH I et II aux lymphocytes T (Schreibelt et al., 2012). Enfin, les macrophages provenant d'amygdales ne sont pas capables de « cross » présenter les antigènes capturés (Segura et al., 2013a).

La capacité de cross présentation des sous-populations de DC provenant de tissus périphériques n'est pas complètement caractérisée, ce sont les DC provenant de la peau qui ont été le plus étudiées. Ainsi, les LC purifiées de la peau sont plus efficaces pour cross présenter que les cDC2 (Fehres et al., 2015b; Polak et al., 2012). Les LC sont également capables de cross présenter des antigènes délivrés via DCIR (Klechevsky et al., 2010). Les cDC1 ont été identifiées dans la peau et l'analyse de leur capacité à cross présenter a permis de mettre en évidence une meilleure efficacité des cDC1 par rapport aux cDC2 concernant la présentation croisée (Haniffa et al., 2012). Les cDC1 et cDC2 purifiées de poumons de souris humanisées n'ont montré aucune différence concernant leur capacité à cross présenter. En effet les deux sous-populations de cDC induisent l'expansion des lymphocytes T CD8 après activation avec le virus de la grippe (Yu et al., 2013).

2. Réponses T CD8

Si l'ensemble des sous-populations de DC possède la capacité de cross présenter, d'autres facteurs peuvent jouer un rôle dans l'initiation des réponses T CD8. Ainsi, l'analyse de la différenciation des lymphocytes T CD8 induite par les sous-populations de DC est nécessaire pour l'identification de leur potentielle spécialisation fonctionnelle pour les réponses T cytotoxiques. En effet, alors que les cDC1 et cDC2 du sang et des poumons montrent une capacité similaire pour la présentation croisée, il a été mis en évidence que seules les cDC2 sont capables d'induire des T CD8 CD103+ présentant des caractéristiques typiques de T CD8 présents dans les muqueuses (Yu et al., 2013). Il a également été montré dans cette étude que l'induction des T CD8 CD103+ par les cDC2 du sang et des poumons passait par leur capacité à sécréter du TGF β , mettant en avant le rôle crucial des facteurs sécrétés par les DC ou présents dans l'environnement pour l'induction des réponses T CD8. Les cDC2 du sang après activation montrent une spécialisation pour la sécrétion d'IL12p70 par rapport aux cDC1 et pDC. La sécrétion d'IL12p70 par les cDC2 a été corrélée à leur capacité à induire des lymphocytes T CD8 produisant les molécules cytotoxiques : granzymes B et K (Nizzoli et al., 2013b).

La cytokine IL15 participe également à l'induction des réponses T CD8 induites par les DC (Banchereau et al., 2012; Nizzoli et al., 2016). En effet, les LC de l'épiderme présentent une spécialisation pour l'induction des réponses T CD8 par rapport aux autres DC de la peau via leur

capacité à sécréter de l'IL15. L'utilisation d'anticorps bloquant anti IL15 dans les co-cultures de LC et T CD8 entraîne une diminution de la prolifération des T CD8 et de leur production d'IL2, d'IFN γ , et de granzymes A et B, mettant en évidence le rôle crucial de l'IL15 (Banchereau et al., 2012).

D'autres signaux apportés par les DC sont impliqués dans l'induction des réponses T CD8 et notamment la molécule de co-stimulation CD70. Son expression est induite par l'activation des LC avec du TNF α (Polak et al., 2012). La neutralisation de CD70 entraîne une diminution de l'induction des T CD8 effecteurs par les LC en diminuant la sécrétion d'IFN γ et de granzyme B notamment (Polak et al., 2012; van der Aar et al., 2011).

C. Réponses T CD4

Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) initient les réponses T CD4 ou T helper via leur capacité de présentation de peptides antigéniques sur des molécules de CMH-II et leur profil d'expression de molécules de co-stimulation et de sécrétion cytokinique. Ainsi, différentes sous-populations de CPA vont produire différents signaux en fonction de leurs caractéristiques intrinsèques mais aussi en fonction des stimuli qu'elles détectent dans le microenvironnement. Ces différences entre CPA entraînent des capacités d'induction de réponses T CD4 variées et spécifiques d'une sous-population donnée.

1. Induction des réponses T helper 1

Les trois sous-populations de DC résidentes du sang et des ganglions lymphatiques ont la capacité d'induction de lymphocytes T helper 1 (Th1) en condition basale (Joo et al., 2015; Segura et al., 2012a) ou après activation. En effet, les cDC2 du sang après stimulation avec *Mycobacterium tuberculosis* (Lozza et al., 2014) et les pDC après activation avec CD40L ou les virus de la grippe (Cella et al., 2000) et sendaï (Ito et al., 2004), entraînent la polarisation des lymphocytes T CD4 naïfs en Th1. Chez ces deux sous-populations, leur activation induit la sécrétion d'IL12p70 et pour les pDC la sécrétion d'IFN α , ces cytokines pourraient participer à leur capacité d'induction des Th1 (Cella et al., 2000; Ito et al., 2004; Lozza et al., 2014).

Au niveau des poumons, les cDC1, cDC2 et CD14 DC une fois activées avec le virus de la grippe (Yu et al., 2014a) ou *Aspergillus fumigatus* Hyphae (Schlitzer et al., 2013b) sont également capables d'induire la polarisation Th1. Les sous-populations cDC2, CD14 DC et LC de la peau (Fujita et al., 2009; Klechevsky et al., 2008) et des muqueuses vaginales (Duluc et al., 2013) possèdent toutes la capacité d'induction de lymphocytes Th1 produisant de l'IFN γ via l'expression de CD40L (Fujita et al., 2009).

Enfin, la polarisation de lymphocytes en Th1 par les moDC de l'intestin (Watchmaker et al., 2014) ainsi que par les moDC et moMAC dérivés *in vitro* à partir de monocytes du sang (Arnold et al., 2015) a également été mise en évidence.

2. Induction des réponses T helper 2

Jusqu'à présent, il n'a pas été mis en évidence de spécialisation fonctionnelle d'une sous-population de DC en particulier pour l'induction de la polarisation Th2. En effet, les cDC1 et cDC2 du sang et des ganglions lymphatiques ont la capacité d'initier la polarisation Th2 dans un modèle de co-culture allogénique (Segura et al., 2012a). L'activation des pDC du sang par l'IL3 ou via Dectin1 entraîne l'augmentation d'expression d'OX40L qui participe à l'induction de la polarisation Th2 par les pDC (Ito et al., 2004; Joo et al., 2015). Le rôle d'OX40L dans l'induction de la polarisation Th2 a été mis en évidence avec les cDC1 des poumons qui sont compétentes pour l'induction de cellules T CD4 produisant de l'IL4 et de l'IL13, deux cytokines Th2. Les LC de la peau ainsi que les LC et cDC2 des muqueuses vaginales ont toutes la capacité d'induire des lymphocytes Th2 produisant de l'IL 4, de l'IL5 et de l'IL13 (Duluc et al., 2013; Klechevsky et al., 2008).

3. Induction des réponses T helper 17

Les moDC provenant de liquides inflammatoires ou dérivées *in vitro* présentent une spécialisation fonctionnelle pour la polarisation Th17, contrairement aux cDC provenant des tissus où leur capacité d'induction de polarisation des Th17 semble dépendante du tissu d'origine. Les moDC et moMAC provenant d'ascites tumorales et de liquides synoviaux présentent une capacité d'induction des réponses Th17 différentes. En effet, seules les moDC induisent une polarisation Th17 des cellules T CD4 naïves et sécrètent de l'IL23 après activation, suggérant un rôle de cette cytokine dans l'initiation de la polarisation Th17 (Segura et al., 2013b). L'IL1 β a également été proposée comme étant impliquée dans l'induction des réponses Th17. L'activation avec du LPS des moDC et moMAC dérivés *in vitro* entraîne la sécrétion d'IL1 β et la polarisation de T CD4 en Th17 (Arnold et al., 2015).

Les cDC2 provenant des poumons sont plus compétentes pour l'induction de Th17 que les cDC1 après activation avec *Aspergillus fumigatus* Hyphae qui entraîne la sécrétion d'IL23 par les cDC2 (Schlitzer et al., 2013b). Les cDC2 de la lamina propria de l'intestin après activation avec un ligand de TLR7/8 produisent également de l'IL23, toutefois la capacité des cDC1 de l'intestin à sécréter de l'IL23 n'a pas été évaluée dans cette étude (Dillon et al., 2010). Enfin, les cDC1 et cDC2 de l'intestin semblent avoir toutes deux la capacité d'induction de la polarisation Th17 dans un modèle *in vitro* de polarisation

de lymphocytes T CD4 naïfs allogéniques (Watchmaker et al., 2014).

4. Induction des réponses T régulatrices

Différentes sous-populations de MMC ont montré un rôle d'un l'induction des réponses Treg. Ainsi, les pDC ont été localisées sur des coupes d'amygdales dans les zones T, en contact avec des cellules Foxp3⁺ suggérant un rôle des pDC pour la polarisation ou la maintenance des Treg (Palomares et al., 2012). De plus, dans cette même étude les pDC provenant d'amygdales induisent la polarisation de T CD4 régulateurs (CD25⁺ Foxp3⁺) *in vitro* (Palomares et al., 2012).

Plusieurs études ont montré un rôle des LC dans la polarisation Treg. En effet les LC de l'épiderme et de la muqueuse buccale induisent la polarisation de lymphocytes exprimant Foxp3, et CD25 (Allam et al., 2008; Seneschal et al., 2012; van der Aar et al., 2011). Les LC buccales et les CD14 DC du derme sécrètent de l'IL10 de manière constitutive, et possèdent la capacité d'induction de lymphocytes Treg (Allam et al., 2008; Chu et al., 2012). Les cDC2 du sang, et les moDC après activation avec *Escherichia coli* sécrètent également de l'IL10 et induisent la polarisation de lymphocytes Treg (Kassianos et al., 2012). La capacité de sécrétion d'IL10 par les cDC2 de l'intestin a également été observée (Dillon et al., 2010) et leur rôle dans l'induction des Treg mis en évidence (Watchmaker et al., 2014). Enfin, les moMAC dérivés *in vitro*, une fois activés avec de l'IL4, de l'IL10 et du TGFβ sont également capables de polariser des lymphocytes T CD4 en lymphocytes exprimant Foxp3 et CTLA. Ceci dépendrait de TGFβ, suggérant un rôle de TGFβ dans la l'induction de la polarisation Treg (Schmidt et al., 2016). Enfin, il a récemment été montré que les cDC2 et moDC des intestins exprimaient l'intégrine αβ8 impliquée dans l'activation du TGFβ latent, ce qui pourrait expliquer leur capacité supérieure pour l'induction de Treg par rapport aux cDC1 intestinales (Fenton et al., 2017a; Watchmaker et al., 2014).

5. Induction des réponses T folliculaires helper

Peu d'études ont analysé la capacité des différentes sous-populations de DC à induire la polarisation Tfh des lymphocytes T CD4 naïfs. Dans une étude réalisée à partir de DC provenant de la peau, seules les CD14 DC de la peau ont montré une capacité d'induction de cellules T CD4 sécrétant du CXCL13 et capable d'aider les lymphocytes B à produire des immunoglobulines (Klechevsky et al., 2008). De plus au niveau des ganglions lymphatiques, les CD206 DC qui représentent la population migratoire des CD14 DC présentes dans les tissus, possèdent également la capacité d'induction de lymphocytes T CD4 produisant du CXCL13 (Segura et al., 2012a)

PARTIE IV : Objectifs

Les Tfh jouent un rôle central dans la mise en place de réponses humores efficaces. En effet, nous avons vu au cours de cette introduction que les Tfh possédaient diverses fonctions impliquées dans l'aide aux lymphocytes B. Ainsi, les Tfh participent à l'induction des plasmocytes extra-folliculaires, à la formation des centres germinatifs mais aussi à la sélection cyclique des lymphocytes B permettant le développement de lymphocytes B mémoires et d'anticorps de haute affinité. Les Tfh représentent ainsi une cible prometteuse pour la mise en place de nouvelles stratégies de vaccination. Les Tfh, lorsqu'ils sont dysfonctionnels, peuvent également être impliqués dans diverses pathologies autoimmunes telles que le Lupus érythémateux disséminé (SLE) ou encore la dermatomyosite juvénile. Les Tfh représentent donc également des cibles thérapeutiques potentielles pour diminuer la formation d'auto-anticorps.

Ainsi, il apparaît crucial de mieux comprendre les étapes menant à leur développement, en particulier chez l'homme. En effet, nous avons vu que la différenciation des Tfh était un processus complexe qui passe par 3 étapes distinctes : 1- l'initiation de la polarisation Tfh par les DC dans la zone T ; 2- l'interaction avec les lymphocytes B à la bordure T:B ; 3- le maintien de la polarisation Tfh dans le GC. L'expertise du laboratoire nous a mené à nous intéresser plus particulièrement à l'étape d'initiation de la polarisation Tfh, mettant en jeu la participation des cellules dendritiques et plus largement des MMC.

Nous avons vu que les MMC comprennent les monocytes, les macrophages et les DC, populations composées elles-mêmes de différentes sous populations possédant des spécialisations fonctionnelles. Ainsi, nous avons voulu déterminer les capacités à induire la polarisation Tfh des différentes sous populations de MMC. Afin d'apporter des éléments de réponses nous avons utilisé les MMC provenant des amygdales. En effet, les amygdales représentent un tissu de choix pour l'analyse des réponses humores, du fait de la présence de larges GC induits par le contact constant avec des antigènes provenant des voies respiratoires supérieures. Les MMC présents dans les amygdales comprennent les macrophages résidents et trois sous populations de DC résidentes les cDC1, les cDC2 et les pDC.

Ainsi, les travaux effectués au cours de ma thèse avaient pour objectifs dans un premier temps d'analyser la capacité des différentes populations de MMC présentes dans les amygdales à induire la polarisation Tfh, afin de mettre en évidence de potentielles spécialisations fonctionnelles. Et dans un second temps, nous nous sommes concentrés sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction par les MMC de la polarisation Tfh.

RESULTATS

PARTIE I : Article

Differential polarisation to IL21- or CXCL13-producing T follicular helper cells by human CD1c⁺ dendritic cells and lymphoid organ macrophages

Mélanie Durand¹, Thomas Walter^{2,3}, Tiphène Pirnay¹, Paul Gueguen¹, Christel Goudot¹, Mylène Bohec⁴, Qing Chang⁵, Olga Ornatsky⁵, Tatiana Vassilevskaia⁵, Sylvain Baulande⁴, Sebastian Amigorena¹, Elodie Segura^{1*}.

Affiliations:

¹ Institut Curie, PSL Research University, INSERM, U932, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

² MINES ParisTech, PSL Research University, CBIO - Center for Computational Biology, 60 Boulevard Saint-Michel, 75006 Paris, France

³ Institut Curie, PSL Research University, INSERM, U900, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

⁴ Institut Curie, PSL Research University, NGS platform, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

⁵ Fluidigm Canada Inc., Markham, Ontario, L3R 4G5, Canada

Lead contact : Elodie Segura

*Correspondence to: elodie.segura@curie.fr

Summary

CD4⁺ T follicular helper (Tfh) cells are essential for inducing efficient humoral responses. T helper polarisation is orientated by dendritic cells (DC), which are composed of several subpopulations displaying specialized functions, in particular for antigen presentation and T cell activation. Whether human DC subsets display functional specialization for Tfh polarisation and what are the most critical DC-derived signals for human Tfh differentiation remains unclear. Here we found that only CD1c⁺ cDC2 and tonsil macrophages induce Tfh polarisation efficiently. We further demonstrated that human Tfh cells comprise two distinct populations producing either IL21 or CXCL13, with macrophages preferentially inducing the latter. Activin A and TGFβ, or IL12, were involved in the induction of CXCL13- or IL21-producing Tfh cells, respectively. By enabling a better understanding of human Tfh differentiation, our results should provide new opportunities for the therapeutic manipulation of Tfh cells.

Introduction

CD4⁺ T follicular helper (Tfh) cells are essential for inducing germinal center (GC) and plasma cell formation, and for supporting efficient humoral responses (Tangye et al., 2013). Tfh cells represent promising therapeutic targets for improving the efficacy of vaccines or for down-modulating production of auto-antibodies in autoimmune diseases, but this approach has been hindered by a limited understanding of Tfh differentiation process in humans. T helper cells differentiation in lymphoid organs is initiated by dendritic cells (DC) via antigen presentation and provision of polarising signals. Multiple molecules have been shown to be important for mouse Tfh polarisation, including IL6, IL21 and ICOS-ligand (Choi et al., 2011; Dienz et al., 2009; Suto et al., 2008). By contrast, different signals seem to be more relevant for inducing human Tfh differentiation, at least *in vitro*, namely IL12, OX40-ligand (OX40L), Activin A and TGFβ (Jacquemin et al., 2015; Locci et al., 2016; Pattarini et al., 2017b; Schmitt et al., 2014; Schmitt et al., 2009). Which lymphoid organ DC subsets are involved and what signals are the most critical for Tfh differentiation in humans remains unclear.

Tfh cells are characterized by their phenotype (CXCR5⁺ PD-1⁺ ICOS⁺), the expression of transcription factors Bcl6 and Ascl2, and their ability to provide help to B cells via the secretion of IL21 (Chtanova et al., 2004; Johnston et al., 2009; Liu et al., 2014). In addition, human Tfh secrete CXCL13, the ligand for CXCR5 (Kim et al., 2004). Mouse Tfh differentiation is a multi-step process (Crotty, 2014). Tfh polarisation is primed by DC in the T cell zone (Goenka et al., 2011), before migration of “maturing Tfh” cells towards the B-T border where they further interact with antigen-presenting B cells (Okada et al., 2005). Fully mature Tfh cells then enter the GC where they support B cell selection and proliferation, initially through IL21 production before switching to IL4 secretion (Weinstein et al., 2016). In addition to their role in Tfh priming, DC have been shown to support Tfh maturation in the outer T cell zone by sequestering IL2, a Tfh-inhibiting factor (Li et al., 2016).

DC are composed of distinct subsets that can be distinguished by their ontogeny: plasmacytoid DC (pDC), Batf3-dependent “classical” DC 1 (cDC1) and Batf3-independent “classical” DC 2 (cDC2) (Guilliams et al., 2014b). While a functional specialisation of DC subsets has been reported for inducing Th2 and Th17 cell differentiation (Schlitzer et al., 2013a; Yu et al., 2014b), whether such specialisation exists for Tfh cells remains unclear. Several studies have suggested that Tfh polarisation is a default process that does not depend on specific polarising signals, but rather on the strength of the interaction between the T cell receptor and the MHC:peptide complex presented by DC (Qi, 2016). Mouse skin-derived cDC1, but not cDC2, induce Tfh cells in skin-draining lymph nodes (Yao et al., 2015). cDC1 are

also efficient inducers of antibody responses when targeted for antigen delivery via Clec9a (Caminschi et al., 2008; Kato et al., 2015) or XCR1 (Gudjonsson et al., 2017), but not via CD205 (Shin et al., 2015). By contrast, cDC2 induce robust Tfh responses when targeted with anti-DCIR2 (Shin et al., 2015). In addition, in a model of alloimmunization, depletion of cDC2, but not of cDC1, abrogated humoral responses (Calabro et al., 2016). Finally, a preferential role for cDC2 has been demonstrated in favoring Tfh maturation in the outer T cell zone where only cDC2 are positioned (Li et al., 2016). In humans, some studies have concluded that skin CD14⁺ CD206⁺ DC are the most efficient skin-derived DC subset for Tfh polarisation (Klechevsky et al., 2008; Segura et al., 2012b), while another reports that Langerhans cells and dermal CD1a⁺ cDC2 are the best at inducing IL21 production by CD4 T cells (Penel-Sotirakis et al., 2012). The ability of lymphoid organ-resident DC subsets to induce Tfh cells is not known.

To determine which lymphoid organ antigen presenting cells are able to induce human Tfh polarisation, we analysed DC and macrophages directly purified from non-pathological tonsils. We found that only cDC2 and tonsil macrophages induce Tfh cells, and were the best producers of Tfh-polarising cytokines. We demonstrated that tonsil Tfh cells contain two functionally distinct populations, producing either IL21 or CXCL13. We further showed that Activin A and TGF β are involved in the induction of CXCL13-producing Tfh cells, and IL12 in the induction of IL21-producing Tfh cells. These results enable a better understanding of the mechanisms of Tfh differentiation in humans.

Results

Tonsil cDC2 and macrophages induce Tfh polarisation

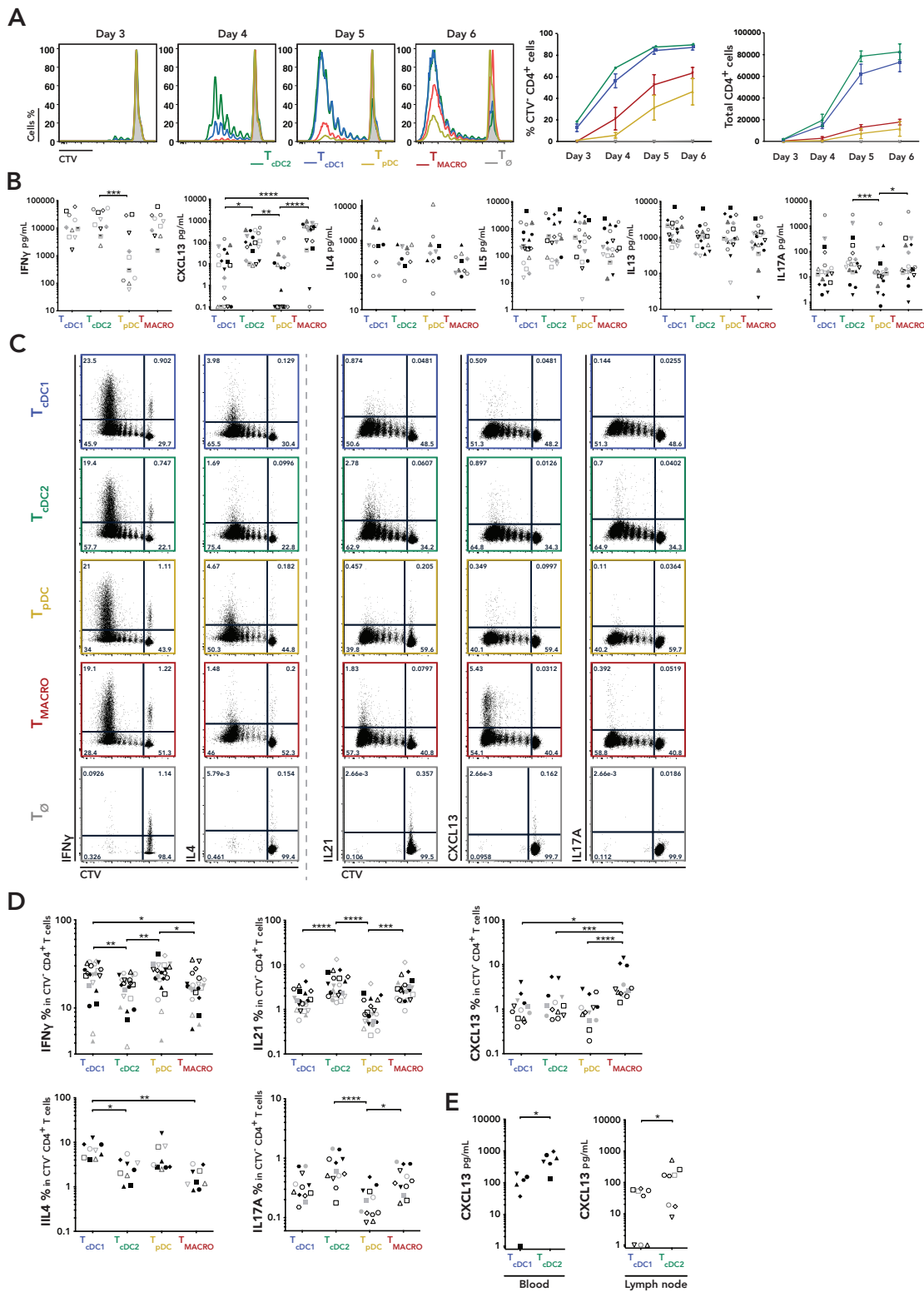


Figure 1. Tonsil cDC2 and macrophages induce Tfh polarisation.

(A-D) Purified human tonsil DC subsets and macrophages were co-cultured with allogeneic naïve CD4 T cells. T cells polarized with cDC1, cDC2, pDC or macrophages are termed T_{cDC1} , T_{cDC2} , T_{pDC} and T_{MACRO} respectively. (A) T cell proliferation was assessed by dilution of a proliferation dye (Cell Trace Violet, CTV). Histogram representative of 3 independent experiments. Graphs show mean $\pm$ SEM (n=3). (B) Cytokine secretion was analyzed by CBA or ELISA after 24h of restimulation with anti-CD3+CD28 beads. Each symbol represents an individual donor (n=10 for IFN γ and IL4, n=19 for CXCL13, IL5, IL13 and IL17A). Note that ELISA for CXCL13 has a detection limit of 30pg/mL. (C-D) Cytokine production was analyzed by intracellular FACS staining after 6h of restimulation with PMA and ionomycin in presence of Brefeldin A. (C) Representative staining, gated on live CD4 $^{+}$ T cells. $T_{\emptyset}$ corresponds to T cells cultured without antigen presenting cell. (D) Percentage of divided cells (CTV) producing IFN γ (n=22), IL4 (n=9), IL21(n=22), CXCL13 (n=13) and IL17A (n=12). (E) Purified cDC1 and cDC2 from blood or skin-draining lymph node were co-cultured with allogeneic naïve CD4 T cells for 6 days. CXCL13 secretion was measured in the supernatant after restimulation as in (B). (B,D-E) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ****p<0.0001, One way ANOVA Friedman test with a Dunn's multiple comparison test.

To address which antigen presenting cells induce Tfh polarisation, we analyzed the ability of DC and macrophages from human uninflamed tonsils to activate allogeneic naïve CD4 $^{+}$ T cell proliferation and polarisation. We isolated plasmacytoid dendritic cells (pDC), CD141/BDCA3 $^{+}$ DC (cDC1), CD1c/BDCA1 $^{+}$ DC (cDC2) and CD14 $^{+}$ macrophages (fig.S1A). Blood cDC2 were recently proposed to be composed of two subsets based on the differential expression of CD32B or CD163 and CD36, respectively (Villani et al., 2017b). We could not detect heterogeneous expression of CD163 in tonsil cDC2, suggesting that these are a homogenous DC population (fig.S1B). cDC1 and cDC2 were the most efficient for stimulating naïve CD4 $^{+}$ T cell proliferation (fig.1A). To determine T helper profiles induced by the different antigen presenting cells, we analyzed cytokine secretion in the supernatant at the end of the culture (fig.1B). cDC1, cDC2 and macrophages were able to induce interferon-gamma (IFN γ) secretion by T cells, indicative of Th1 polarisation, while only cDC2 and macrophages induced the secretion of CXCL13, a hallmark cytokine for human Tfh (Kim et al., 2004). Of note, because macrophages are poor stimulators of naïve CD4 $^{+}$ T cell proliferation, these results suggest that macrophage-activated Tfh cells secrete particularly high levels of CXCL13. All subsets induced some IL4, IL5 and IL13 secretion (indicative of Th2 polarisation), while IL17A secretion was low. To confirm these results, we analysed cytokine production in CD4 $^{+}$ T cells by intracellular staining (fig.1C-D). We found that cDC1 and pDC induced the highest proportion of IFN γ -producing cells among CD4 $^{+}$ T cells that had proliferated, while cDC2 and macrophages induced the highest proportion of IL21-producing CD4 $^{+}$ T cells. Detection of intracellular CXCL13 was low, but macrophages were the most efficient inducers of CXCL13-producing CD4 $^{+}$ T cells in this assay. These results indicate that cDC2 and macrophages are the most efficient for inducing Tfh

polarisation in CD4⁺ T cells that have been activated.

To address whether cDC2 specialisation for Tfh induction was specific of tonsil DC, we compared Tfh polarisation by cDC1 and cDC2 isolated from the blood of healthy donors and from uninvaded lymph nodes from breast cancer patients (fig.1E). We found that cDC2 were again the most efficient for inducing CXCL13-producing CD4⁺ T cells. These results suggest that specialisation for Tfh polarisation is an intrinsic property of the human cDC2 lineage.

Activation by pathogen-derived products does not change the functional specialisation for Tfh induction

Tfh induction

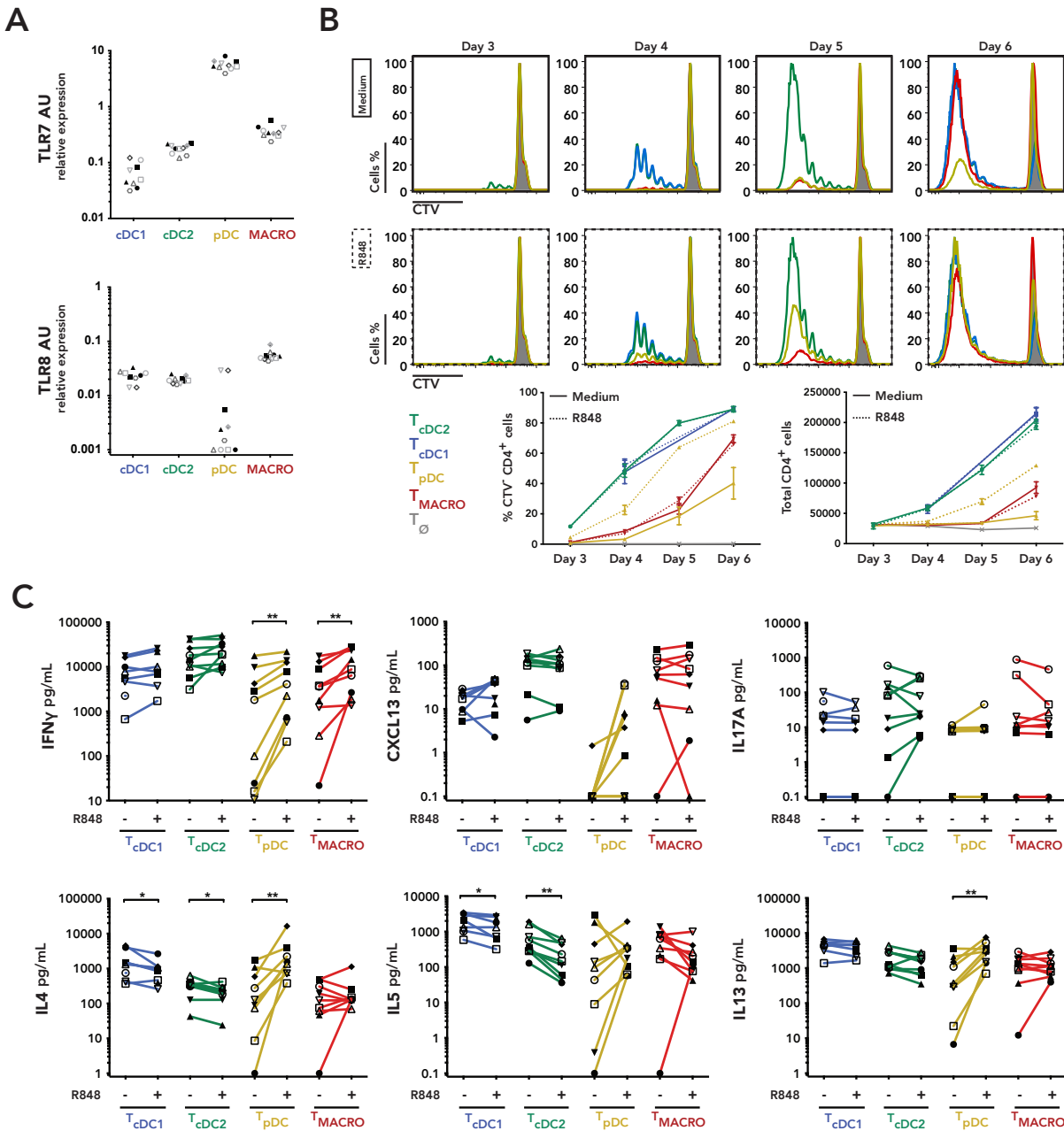


Figure 2. Activation through TLR7/8 does not change the functional specialization for Tfh induction.

(A) Relative expression of TLR7 and TLR8 mRNA compared to housekeeping genes in purified DC subsets and macrophages. (B-C) Purified human tonsil DC subsets and macrophages were pre-activated for 3h with or without R848 (TLR7/8 ligand). After washing, activated DC or macrophages were co-cultured with allogeneic naïve CD4 T cells for 6 days. (B) T cell proliferation was assessed by dilution of a proliferation dye (Cell Trace Violet, CTV). Histogram representative of 3 independent experiments. Graphs show mean $\pm$ SEM (n=3). (C) Cytokine secretion was analyzed by CBA or ELISA after 24h of restimulation with anti-CD3+CD28 beads. Note that ELISA for CXCL13 has a detection limit of 30pg/mL. Each symbol represents an individual donor (n=9). *p<0.05 and **p<0.01, Wilcoxon test.

DC properties can be modified upon exposure to pathogen-derived products. To address whether differential capacity for Tfh induction was conserved after activation, we performed the same experiment with tonsil DC and macrophages that had been pre-activated during 3 hours with R848, a ligand for TLR7 and TLR8. pDC express TLR7, while cDC1, cDC2 and macrophages express TLR8 (fig.2A). Exposure to R848 did not modify the ability of cDC1 and cDC2 to induce naïve CD4⁺ T cell proliferation, while activated pDC became more efficient (fig.2B). R848-exposed macrophages remained poor stimulators of naïve CD4⁺ T cell proliferation. When analysing cytokine secretion in the supernatant, we found that activation by R848 increased IFN γ secretion by CD4⁺ T cells cultured with pDC or macrophages, while the effect on Th2 cytokine secretion was dependent on the DC type (fig.2C). However, there was no impact on CXCL13 secretion, cDC2 and macrophages remaining the most efficient inducers of Tfh cells even after activation. These results confirm that cDC2 and tonsil macrophages are specialised for Tfh polarisation.

Tonsil macrophages are localised in close proximity to Tfh cells

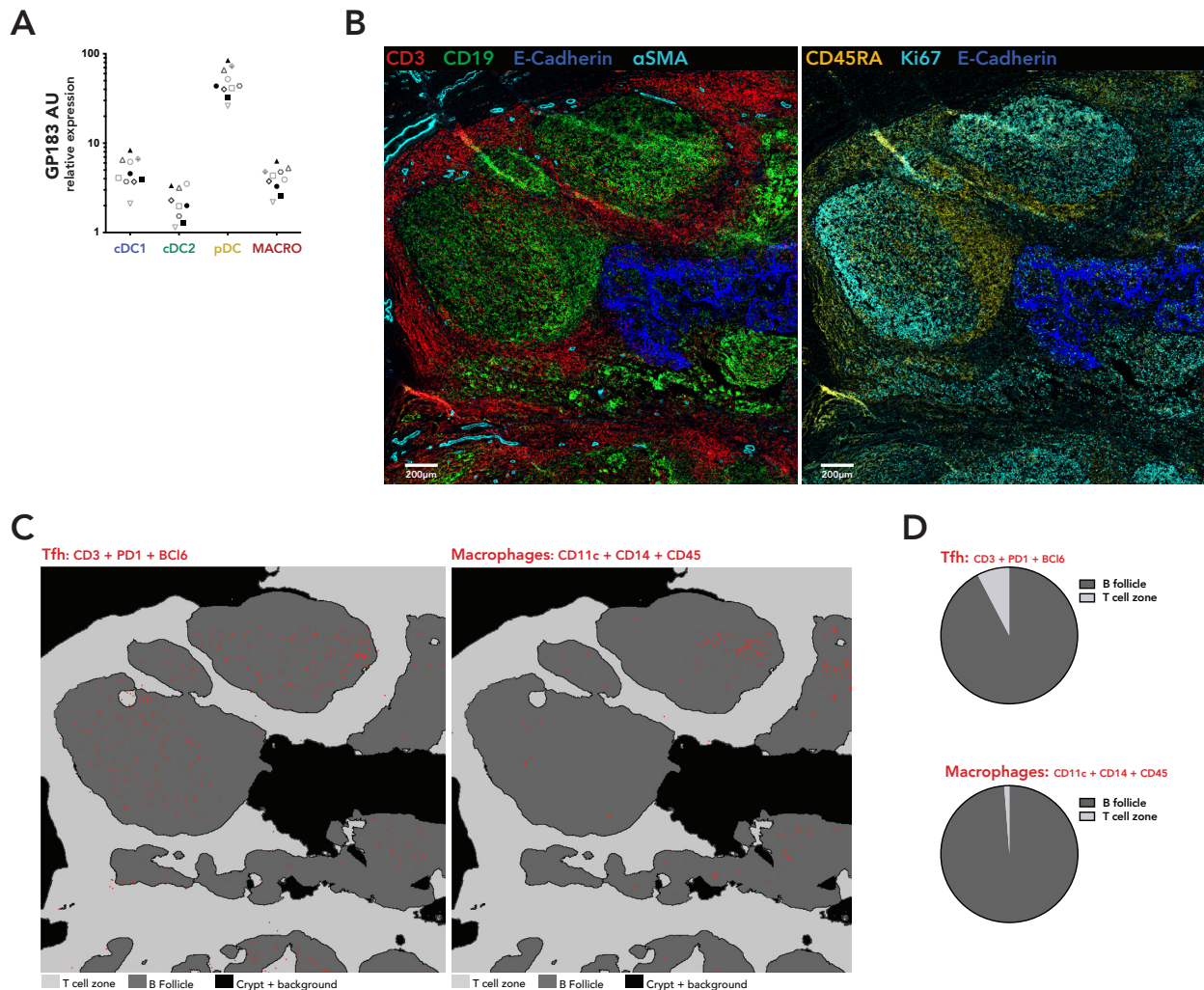


Figure 3. Macrophages and Tfh cells are present in the same anatomical regions in the tonsil.

(A) GPR183 mRNA expression in purified human tonsil DC subsets and macrophages was measured directly after cell sorting (n=10). Each symbol represents an individual donor. (B) Tonsil sections were stained for indicated markers and analysed by imaging mass cytometry. CD3 red, CD19 green, E-cadherin blue, α-SMA cyan; CD45RA yellow, E-cadherin blue and Ki67 cyan. (C-D) Localisation of Tfh cells (identified by combined staining for CD3, PD1 and BCL6) and macrophages (identified by combined staining for CD11c, CD14, CD45) relative to T cell zone, B cell follicle and crypt region. (C) Topographic representation. (D) Proportion of Tfh cells (503 cells identified) and macrophages (241 cells identified) in the different regions.

To address the physiological relevance of our findings, we sought to examine the *in situ* localisation of antigen presenting cells in tonsils, relative to the T cell zone, the B cell zone and Tfh cells. The chemoattractant receptor EBI2/GPR183 controls activated CD4⁺ T cells and cDC2 positioning at the B-T zone border in mouse lymphoid organs (Gatto et al., 2013; Li et al., 2016; Yi and Cyster, 2013). To determine whether tonsil DC subsets and macrophages displayed differential

expression of EBI2/GPR183, we analysed mRNA expression (fig.3A). pDC had the highest expression of GPR183, while cDC1, cDC2 and macrophages had comparable low expression. We conclude that EBI2 differential expression is not conserved between mouse and human resident DC subsets.

To analyse cell localisation, we performed imaging on tonsil sections. Because the identification of each population of interest requires a combination of markers, we turned to a technique enabling simultaneous detection of multiple antibodies: imaging mass cytometry (Chang et al., 2017; Giesen et al., 2014). Tonsil architecture was consistent with previous observations, with large B cell follicles separated by inter-follicular T cell zones (fig.3B). The GC was identified by CD19 and CD45RA, with Ki67 staining indicating the dark zone of GC where B cells proliferate (fig.3B). Tonsil crypts could be detected with E-cadherin and blood vessels with α -Smooth Muscle Actin staining (fig.3B). To localise Tfh cells, we used a combination of CD3, PD-1 and Bcl6 positive staining. To localise cDC1 and cDC2, we sought to combine CD11c and CD370/Clec9A and CD11c and CD1c, respectively. However, we were not able to unambiguously identify DC subsets in this assay due to poor staining for Clec9A and CD1c. By contrast, we detected a large number of macrophages using CD11c, CD45 and CD14 combination. To compare macrophage and Tfh localisation within the tonsil in a unbiased way, we performed automated image analysis (fig.S2). First, we performed image segmentation in order to find B and T cell zones in the image. We then detected individual cells from the DNA signal and found populations of interest by analyzing the joint expression signal in each individual cell. We then performed statistical analysis of cell localisation relative to the B cell zone, the T cell zone and the crypt/background region (fig.3C). We found that Tfh cells were present mainly in the B cell regions, as expected (fig.3D). The majority of macrophages were also found in the same anatomical regions (fig.3D), indicating that macrophages and Tfh cells are localised in situ in close proximity in the GC, where CXCL13 is mainly produced.

cDC2 and macrophages are the most efficient producers of Tfh-polarizing cytokines

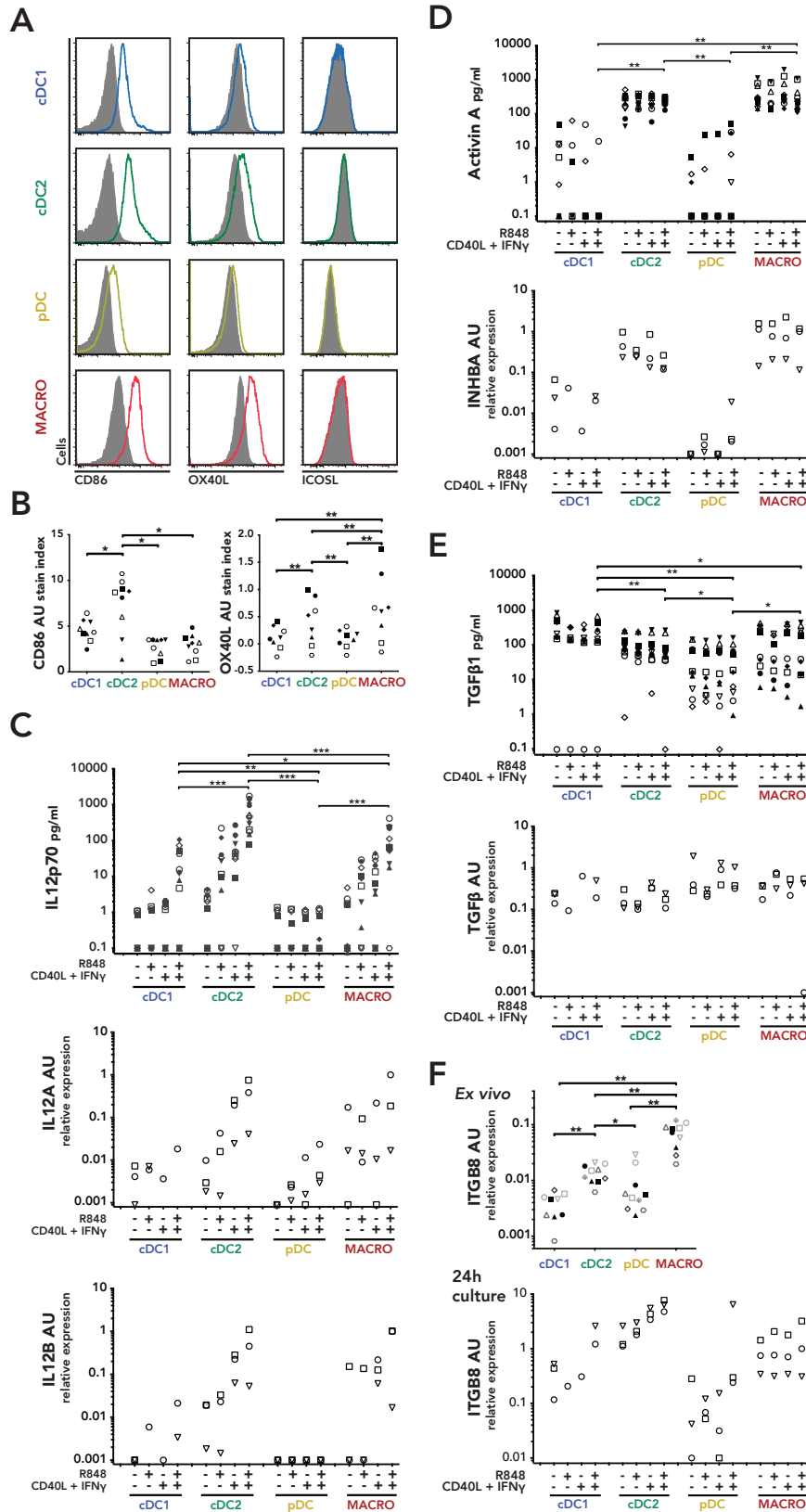
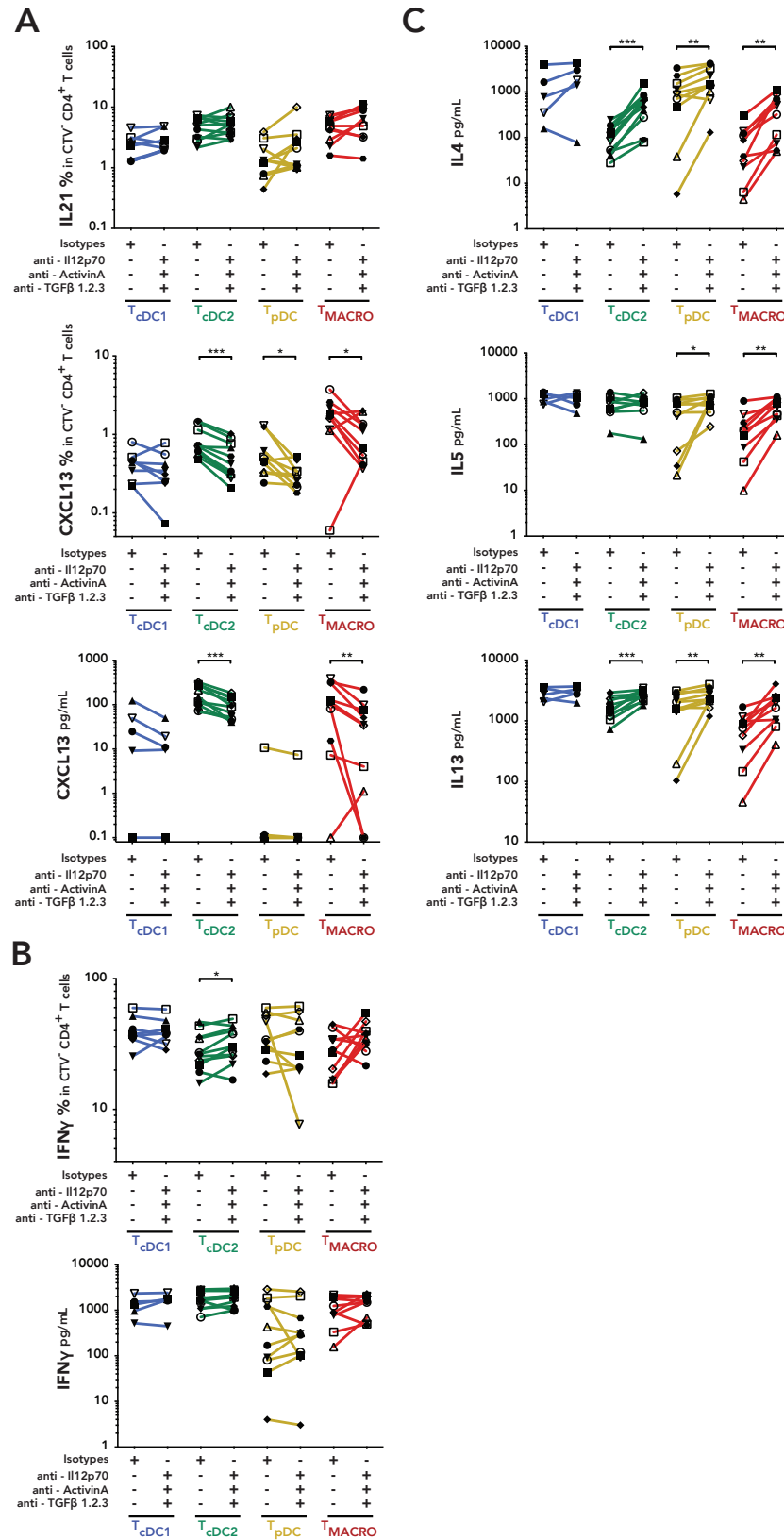


Figure 4. cDC2 and macrophages are the most efficient secretors of Tfh-polarizing cytokines.

(A-B) Tonsil DC and macrophages were stained ex vivo for CD86, OX40L and ICOSL or corresponding isotype. (A) Representative results. Filled grey histograms represent isotype control staining. (B) Stain Index quantification for CD86 and OX40L. Each symbol represents an individual donor (n=8). *p<0.05 and **p<0.01, Wilcoxon test. (C-E) Purified DC and macrophages were activated for 24h with or without R848, CD40L and IFN γ . Cytokine secretion was analyzed by CBA (IL12p70) or ELISA (Activin A and TGF β), and mRNA relative expression by RT-qPCR. (C) n=12 for IL12p70 secretion and n=3 for mRNA expression of IL12A and IL12B. (D) n=10 for Activin A and n=3 for mRNA expression of INHBA. (E) n=10 for TGF β 1 secretion and n=3 for mRNA expression of TGF β . (F) ITGB8 mRNA expression was measured directly after cell sorting (ex vivo, n=10) and after 24h of culture with or without R848, CD40L and IFN γ (n=3). Each symbol represents an individual donor.

To understand the molecular mechanisms involved in Tfh polarisation by cDC2 and macrophages, we analysed the expression of several molecules reported to be important for human Tfh polarisation. We first compared the surface expression of co-stimulatory molecules CD86, OX40L and ICOSL (fig.3A-B). cDC2 had the highest expression of CD86, and cDC2 and macrophages had the highest expression of OX40L. We could not detect ICOSL expression in this assay. To assess the ability of DC and macrophages to produce cytokines, we stimulated them *ex vivo* with R848, or a combination of CD40L and IFN γ to mimic T cell encounter, or all three stimuli at the same time. cDC2 and macrophages were the most potent producers of IL12 upon stimulation, both at the protein and mRNA levels (fig.3C). cDC2 and macrophages were also the best producers of IL6 and IL1 β , while pDC were the most efficient for secreting IFN α , and cDC1 for CXCL9 (fig.S2). By contrast, all DC subsets could secrete CXCL10 to a similar extent (fig.S2). Only cDC2 and macrophages secreted Activin A and produced INHBA mRNA transcript (coding for Activin A), even without stimulation (fig.3D). Finally, to analyse the production of TGF β , we first measured the expression of total TGF β (both latent and active forms) in the supernatant. We found that all populations could produce TGF β 1 (fig.3E) and TGF β 2 (fig.S2B), while TGF β 3 was undetectable in this assay. We then analysed the expression of integrin β 8, which cleaves TGF β precursor to release the active form (Fenton et al., 2017b; Travis et al., 2007). Only cDC2 and macrophages expressed integrin β 8, regardless of activation (fig.3F). Collectively, these results indicate that cDC2 and macrophages are the most efficient producers of Tfh-polarising signals.

cDC2 and macrophages induce Tfh polarisation through a combination of cytokines



IL12, Activin A and TGF β have been identified as important for Tfh polarisation based mainly on *in vitro* assays (Locci et al., 2016; Schmitt et al., 2014; Schmitt et al., 2009). To address whether these cytokines are involved in Tfh polarisation induced by tonsil cDC2 and macrophages, we analyzed T helper polarisation in the presence of a cocktail of blocking antibodies for IL12, Activin A and TGF β (fig.4). We did not observe any impact of these blocking antibodies on the production of IL21, while anti-IL12, anti-Activin A and anti-TGF β significantly decreased the production of CXCL13 by CD4 $^{+}$ T cells cultured with cDC2 or macrophages (fig.4A). Blocking antibodies had a minimal effect on the production of IFN γ (fig.4B) or IL17A (fig.S3), while increasing secretion of Th2 cytokines except for CD4 $^{+}$ T cells cultured with cDC1 (fig.4C). When we blocked cytokines individually, we found that blocking IL12 alone slightly decreased the production of IL21, but did not impact that of CXCL13 (fig.S4A). In addition, blocking Activin A or TGF β alone decreased CXCL13 secretion by CD4 $^{+}$ T cells incubated with cDC2, but only TGF β blockade had an impact for T cells incubated with macrophages (fig.S4B-C). Collectively, these results suggest the existence of two different mechanisms leading to the induction of IL21 or CXCL13 production by Tfh cells, Activin A and TGF β being involved only in the latter.

Tonsil Tfh cells contain distinct populations of IL21-producing and CXCL13-producing cells

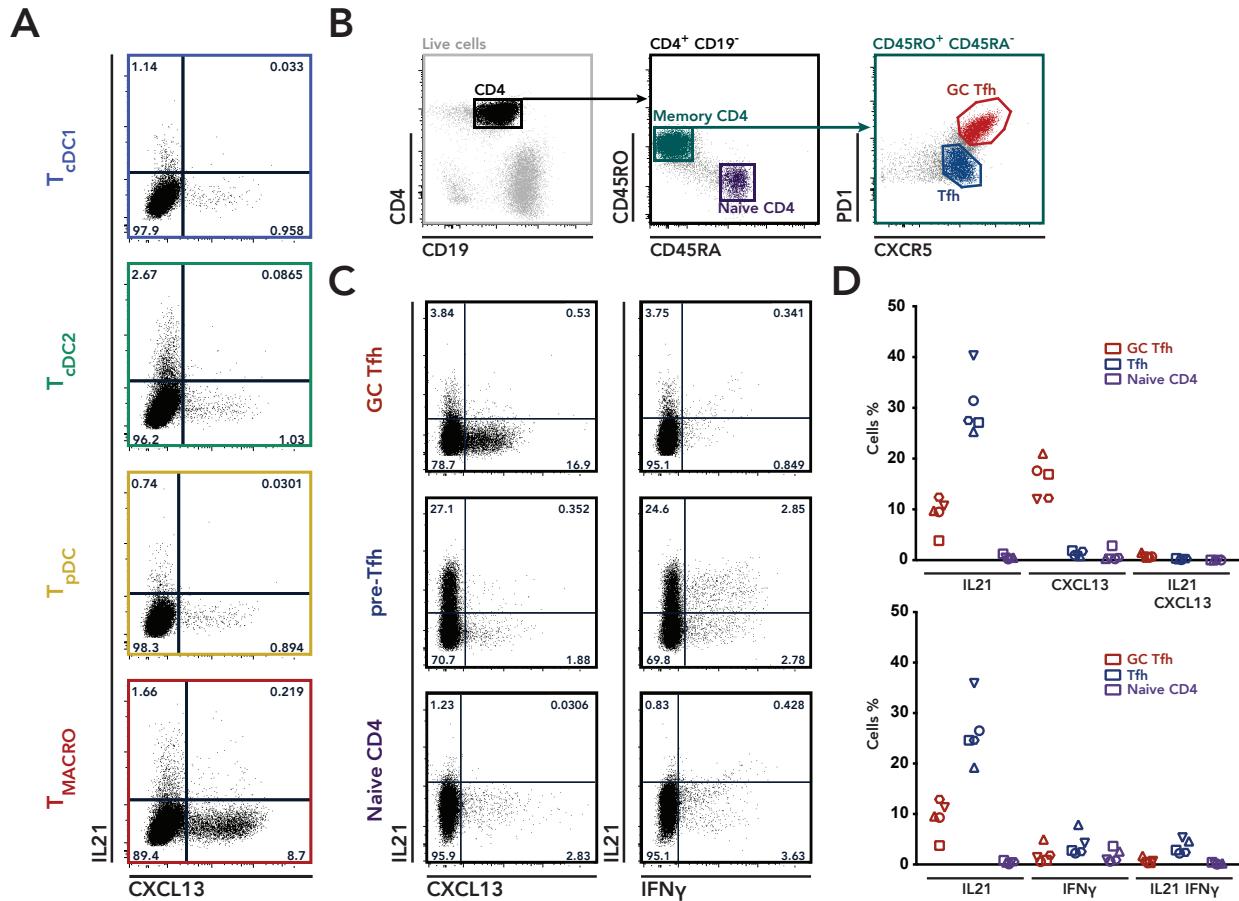


Figure 6. IL21 and CXCL13 are produced by distinct populations of Tfh cells.

(A) Purified human tonsil DC subsets and macrophages were co-cultured with allogeneic naïve CD4 T cells. Cytokine production was analysed by intracellular FACS staining after 6h of restimulation with PMA and ionomycin in presence of Brefeldin A. Representative results, gated on live CTV- cells (n=13). (B-D) CD4 T cells isolated from tonsil. (B) Gating strategy for isolating CD4 T cells. Naïve CD4 T cells were CD4⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻, GC Tfh cells CD4⁺ CD45RO⁺ PD1^{hi} CXCR5^{hi} and extra-follicular Tfh cells CD4⁺ CD45RO⁺ PD1^{int} CXCR5^{int}. (C-D) Cytokine production was analysed by intracellular FACS staining after 6h of restimulation with PMA and ionomycin in presence of Brefeldin A. (C) Representative results (n=5). (D) Percentage of cells expressing IL21, CXCL13, IFNγ or double positive. Each symbol represents an individual donor.

To address whether IL21 and CXCL13 are produced by the same CD4⁺ T cells in our polarisation assay, we analysed co-expression of these molecules by intracellular staining (fig.5A and fig.S5A). IL21 and CXCL13 were expressed by distinct populations.

To assess the presence of distinct IL21-producing and CXCL13-producing Tfh cells *in vivo*, we analysed cytokine production in tonsil CD4⁺ T cells by intracellular staining (fig.5B-D). We divided Tfh cells into extra-follicular Tfh cells (CXCR5^{int} PD1^{low}) and GC Tfh cells (CXCR5^{high} PD1^{high}), and also included naïve CD4⁺ T cells for comparison (fig.5B). GC Tfh cells produced either CXCL13 (for a large proportion

of cells) or IL21 (for a minority of cells), while a large proportion of CXCR5^{int} PD1^{low} Tfh cells produced IL21, with virtually no population producing CXCL13 (fig.5C-D). A small proportion of the IL21-producing cells also produced IFN γ but not IL17A (fig.5C-D and fig.S5B). As a control, very few naïve CD4⁺ T cells produced either cytokine. These results show that human Tfh cells contain distinct populations producing either IL21 or CXCL13.

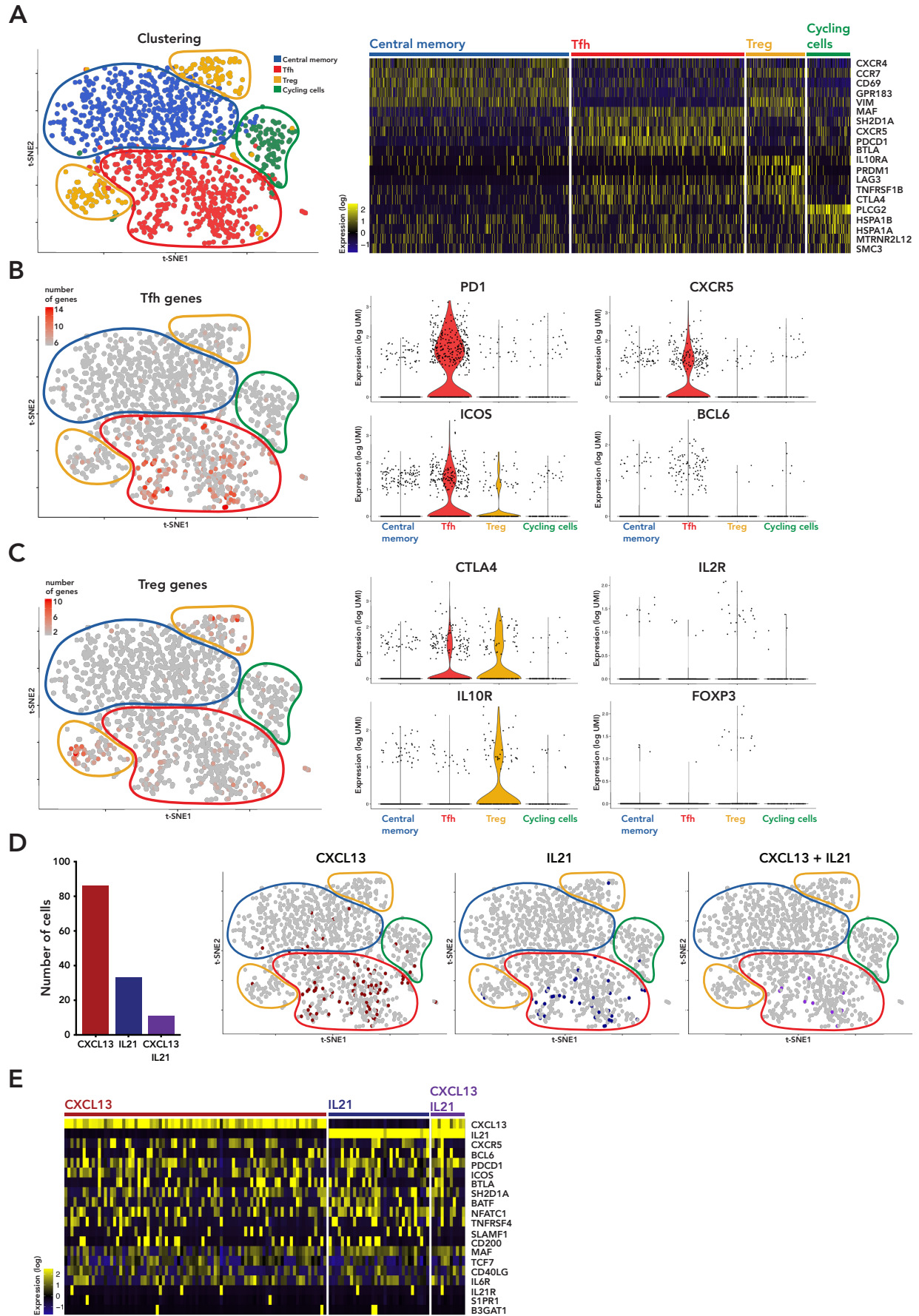


Figure 7. Distinct subpopulations of Tfh cells are present *in vivo* in tonsils.

Tonsil memory CD4⁺ T cells were purified and analyzed by single-cell RNA-seq using a Drop-seq approach. Unbiased clustering was performed using a graph-based approach. Each dot represents an individual cell. (A) t-SNE analysis of individual cells. Clusters were determined based on the 50 most differentially expressed genes, and were identified as central memory CD4⁺ T cells (blue), cycling cells (green), Tfh cells (Red) and Treg (Yellow). Heat map of scaled expression (log values of UMI) for selected genes (ordered manually). (B-C) For each cell, the number of detected genes characteristic of Tfh (B) or Treg (C) is shown. Violin plot representation of the expression of selected genes characteristic of Tfh (B) or Treg (C). (D) Number and t-SNE representation of cells showing expression of CXCL13, IL21 or both. Grey dots represent absence of expression. (E) Heat map of scaled expression (log values of UMI) of Tfh specific genes (ordered manually) for the individual cells showing expression of CXCL13, IL21 or both.

Finally, to address the heterogeneity of tonsil Tfh cells in an unsupervised way, we generated single-cell transcriptomes of CD4⁺ CD45RA⁻ CD45RO⁺ T cells using a droplet-based method enabling 3' mRNA counting (Zheng et al., 2017a). We clustered cells using a graph-based approach with the Seurat package, which combines dimensionality reduction and graph-based partitioning algorithms for unsupervised clustering (Satija et al., 2015). For visualization of the cell clusters, we used t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) (van der Maaten, 2013). This analysis grouped cells into 4 clusters (fig.7A). We identified these clusters as central memory CD4⁺ T cells, Tfh cells, Treg and cells in cell cycle, because genes characteristic of these populations were among the most differentially expressed genes when comparing each cluster versus all others (fig.7A). We sought to confirm cluster identity by analysing the expression of additional signature genes for Treg or Tfh cells (table S1), based on previously published gene signatures (Chtanova et al., 2004; Pattarini et al., 2017b; Spensieri et al., 2016; Wing et al., 2017). Cells expressing a high number of Tfh genes were detected exclusively in the Tfh cluster, which displayed the highest proportion of cells expressing PD1, CXCR5, ICOS or BCL6 (fig.7B). The majority of cells expressing a high number of Treg genes were found in the Treg cluster, with the highest proportion of cells expressing CTLA4, IL2R, IL10R or FOXP3 (fig.7C). To determine the existence of distinct populations of IL21- or CXCL13-expressing Tfh cells, we assessed the expression of IL21 and CXCL13. Individual cells expressing either gene were found in majority in the Tfh cluster, and only a minor proportion expressed both (fig.7D). The expression of other genes characteristic of Tfh cells was not different between the IL21⁺, CXCL13⁺ or double positive cells (fig.7E), suggesting that these subpopulations of Tfh cells were different essentially at the functional level.

Discussion

In this work, we have analyzed the ability of human lymphoid organ-resident DC and macrophages to polarize Tfh cells. We demonstrated that only cDC2 and macrophages are able to induce Tfh polarisation. Further, we found that tonsil macrophages are located close to Tfh cells in situ, supporting the physiological relevance of our findings. We evidenced that human Tfh cells comprise two populations of IL21- or CXCL13-producing subsets, and that macrophages are more efficient inducers of the later. Our results showed that Activin A and TGF β were involved in the induction of CXCL13-producing Tfh cells, while IL12 was most likely involved in the induction of IL21-producing Tfh cells.

The existence of two subsets of Tfh cells is consistent with previous work describing two pools of spatially segregated Tfh cells in mouse lymph nodes (Suan et al., 2015) and in human tonsils (Bentebibel et al., 2011b). In the mouse, follicular mantle and GC Tfh cell populations can be distinguished during a primary response to a foreign antigen, and display distinct gene signatures with GC Tfh cells expressing higher levels of IL21 (Suan et al., 2015). This is in line with a previous study using a IL21 reporter mouse model and showing that IL21 production by CD4 T cells is restricted to GC CXCR5^{high} Tfh cells (Luthje et al., 2012b). By contrast, in human tonsils, CXCR5^{low} Tfh cells, that are located outside the GC, produce high levels of IL21 and low levels of CXCL13 compared to GC CXCR5^{high} Tfh cells at the protein (our results) and the mRNA levels (Bentebibel et al., 2011b). These IL21-producing Tfh cells were proposed to be specialized for helping naïve and memory B cells, while GC Tfh cells would be involved in helping GC B cells (Bentebibel et al., 2011b). Given that Tfh cells differentiate gradually while moving towards the GC (Crotty, 2014), an alternative hypothesis would be that IL21- and CXCL13-producing human Tfh cells represent two distinct stages of differentiation, and that the same Tfh cells can convert from one phenotype to another as they mature and migrate towards the GC. These results challenge the idea that a key function of Tfh cells is to produce IL21 in the GC for B cell proliferation, survival and class switching (Linterman et al., 2010a; See et al., 2017; Zotos et al., 2010). In humans, Tfh cell-produced IL21 may be more important during the extra-follicular phase of B cells responses or for Tfh cell generation.

A wealth of studies has shown that DC subsets possess differential functional abilities, in particular for antigen presentation and T cell polarisation. We showed that among human resident DC subsets, cDC2 are the most efficient for secreting IL12 and Activin A, and for inducing Tfh polarisation. Regardless of their tissue localisation, DC from a given lineage share a core transcriptional program that is likely key to their functional abilities (Heidkamp et al., 2016a; Miller et al., 2012b). We would therefore predict that the functional specialisation of tonsil cDC2 for Tfh induction will be a feature shared with all

human cDC2. This idea is supported by our finding that blood and lymph node cDC2 are more efficient at inducing CXCL13 production than cDC1, and by reports of cDC2 being the best producers of IL12 among blood and spleen DC subsets (Mittag et al., 2011b; Nizzoli et al., 2013a). However, previous work has shown that the skin equivalent of cDC2, dermal CD1a⁺ CD1c⁺ DC, are poor inducers of Tfh cells compared to skin CD14⁺ DC (Klechevsky et al., 2008; Segura et al., 2012b). These results are actually consistent with the findings reported here, because in these previous studies only CXCL13 secretion was assessed. In addition, human skin cDC2 induce IL21-producing CD4 T cells (Penel-Sotirakis et al., 2012) and are able to produce IL12 *in situ* (Yawalkar et al., 2009). Therefore, we conclude that human cDC2, both resident and migratory, are specialized for inducing IL21-producing Tfh cells. *In vivo* targeted delivery to DC of vaccine antigens or modulating agents has become the subject of intense investigation. Our results suggest that cDC2 should be preferentially targeted for vaccine delivery when aiming for efficient Tfh responses.

The cytokine requirements for human Tfh induction have been mostly studied by *in vitro* stimulation of CD4 T cells with purified cytokines or using *in vitro*-derived model DC. In this setting, IL12, Activin A and TGF β were proposed to be involved in human Tfh polarisation (Locci et al., 2016; Schmitt et al., 2014; Schmitt et al., 2009). However, these studies did not distinguish induction of IL21 versus CXCL13 production. Our results indicate that IL12, Activin A and TGF β are relevant signals for Tfh polarisation mediated by lymphoid-organ resident DC and macrophages, and show that IL12 is involved in the induction of IL21-producing Tfh cells, while Activin A and TGF β are involved in the induction of CXCL13-producing Tfh cells. These results are consistent with the findings that both Activin A and IL12 are required for the induction of a “complete” Tfh gene signature, in particular IL21 production (Locci et al., 2016). Whether Activin A and TGF β are redundant and which cytokine is the most important *in vivo* remains unclear. We showed that both cDC2 and tonsil macrophages secrete high amounts of Activin A without the need for *ex vivo* restimulation, in contrast to blood cDC2 (Robson et al., 2008) and monocytes (Locci et al., 2016). We also found that both cDC2 and tonsil macrophages express high levels of integrin β 8, suggesting that both populations would be able to provide biologically active TGF β to T cells upon interaction.

Accumulating evidence indicate that dysregulated Tfh responses are involved in the physiopathology of autoimmune diseases such as lupus, type 1 diabetes or rheumatoid arthritis, and molecules inhibiting Tfh function or differentiation are tested in clinical trials (Ueno, 2016; Ueno et al., 2015). By contrast, robust Tfh responses are essential for the development of protective antibodies in

response to vaccines (Crotty, 2014). Tfh cells therefore represent a promising target for modulating antibody responses for the treatment of autoimmune disorders or the enhancement of vaccine efficacy. By enabling a better understanding of human Tfh differentiation, our results should provide new opportunities for the therapeutic manipulation of Tfh cells.

Experimental procedures

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Human Samples.

Tonsils from healthy patients undergoing tonsillectomy were obtained from Hôpital Necker (Paris, France) and uninvaded lymph nodes from breast cancer patients were obtained from Hôpital de l'Institut Curie (Paris, France) in accordance with hospital ethical guidelines. Buffy coats from healthy donors were obtained from Etablissement Français du Sang (Paris, France) in accordance with INSERM ethical guidelines. According to French Public Health Law (art L 1121-1-1, art L 1121-1-2), written consent and IRB approval are not required for human non-interventional studies.

METHOD DETAILS

Tonsil DC and macrophage isolation

Tonsil samples were digested as described previously (Durand et al. Methods Mol Biol. 2016 (Annexe 1)). In brief, tonsil DC subsets and macrophages were selected by density gradient, enriched by negative selection and isolated by cell sorting on a FACS Aria instrument (BD Biosciences).

Blood naïve CD4 T cell isolation

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were prepared by blood centrifugation on a Ficoll gradient (Lymphoprep, Greiner Bio-One). Naïve CD4 T cells were isolated by negative selection using the Human Naïve CD4⁺ T Cell Isolation Kit according to the manufacturer's instructions (Stem Cell). Cell purity (defined as CD4⁺ CD45^{RA}⁺ CD45^{RO}⁻) was evaluated after each naïve CD4 T cell isolation by flow cytometry on a Macsquant analyzer (Miltenyi Biotec), only cells with a purity higher to 95% were used.

T helper cell polarization

Antigen presenting cells (20 000 cells) were cultured with naïve CD4 T cells (50 000 cells) for 5 or 6 days in X-Vivo medium supplemented with 10% FCS. To analyze T cell

polarisation, cells were washed and incubated with anti-CD3+CD28 beads (Thermo Fisher Scientific) for 24 h in X-VIVO 15 serum free medium (Lonza). Supernatants were collected, and cytokine secretion was assessed by Cytometric Bead Array for IFN γ IL4, IL5, IL13 and IL17A (BD) or ELISA for CXCL13 (R&D-Bio-technie). To analyze T cell proliferation, naïve CD4 T cells were stained with CTV (Cell Trace Violet, ThermoFisher) prior to culture. For proliferation kinetics, the cells were harvested at day 3, 4, 5 and 6, stained for CD4 and viability (Live/dead eFluor 780, Thermo Fisher Scientific) and analysed on a FACS Verse instrument (BD Bioscience). In some experiments, DC and macrophages were pre-activated with R848 during for 3h in Yssel medium with 1 μ g/ml of R848 (InvivoGen) at 37°C, then washed prior the coculture with T cells. For blocking experiments with antibodies against IL12p70, Activin A and TGF β 1,2,3 (R&D-Bio-technie), two doses of 20 μ g/ml of each antibody or isotype control (mouse IgG1) were added to the coculture: one at the beginning of the culture and the second 24h later.

Intracellular cytokine staining

To assess the expression of intracellular cytokines, T cells were stimulated with PMA (50ng/ml) and ionomycin (1 μ g/ml) for 6h in presence of BFA (4 μ g/ml) for 6h (all from Sigma). After stimulation, cells were stained for surface CD4 for 30min at 4°C, washed and stained with Live/dead eFluor780 (Thermo Fisher Scientific) for 20min at 4°C. Then the cells were fixed and permeabilized (Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set, eBioscience) and stained for intracellular proteins (either IFN γ , CXCL13, IL21, IL17A or IFN γ , IL21 and IL4) at room temperature for 45 min in a buffer containing 2% of normal mouse serum. The samples were acquired on a FACS Verse instrument (BD Biosciences).

Cytokine secretion

Sorted antigen presenting cells were cultured for 24h in Yssel medium in the presence or absence of R848 (1 μ g/ml, InvivoGen), dimerized CD40-Ligand (2,5 μ g/ml, Enzo life Science) and recombinant human IFN γ 1b (0,25 μ g/ml, Miltenyi biotec). Supernatants were collected and cytokine secretion was assessed by Cytometric Bead Array for IFN α , IL1 β , IL6, IL12p70, CXCL9 and CXCL10 (BD Biosciences) or ELISA for Activin A (R&D-Bio-technie) and TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 (MSD).

Costimulatory molecules expression

Enriched antigen presenting cells were stained with antibodies recognizing either OX40L (Ansell), ICOSL (R&D-Bio-technie) or CD86 (R&D-Bio-technie), or isotype control, and HLA-DR, CD14 (eBiosciences), CD11c, CD1c, CD304 (Biolegend) and CD141 (Miltenyi biotec). Samples were acquired on a FACS

Verse instrument (BD Biosciences). Stain index was calculated to quantify the level of expression as follows: $\text{Stain index} = (\text{MFI}_{\text{sample}} - \text{MFI}_{\text{isotype}}) / (2 \times \text{SD}_{\text{isotype}})$.

RT-qPCR

Cells were lysed in RLT buffer (QIAGEN) after sorting (*ex vivo*) and/or after 15h of *in vitro* activation. The RNA extraction was performed with the RNeasy micro kit (QIAGEN) according to manufacturer's instructions. Reverse Transcription was performed on total RNA using superscript II polymerase (Invitrogen) with random hexamers and oligo dT and dNTPs (Promega). Transcript quantification was done by real time PCR on a 480 LightCycler instrument (Roche) using a master mix (Eurogentec), and the following TaqMan Assays (Life Technologies): TLR7 (Hs00152971_m1), (TLR8) Hs00152972_m1), ITGB8 (Hs00174456_m1), INHBA (Hs01081598_m1), IL12A (Hs01073447_m1), IL12B (Hs01011518_m1), TGFB1 (Hs00998133_m1). The second derivative maximum method was used to get the Crossing points (Cp) from each analyte. The relative expression of transcripts was quantified by comparison to the mean of the two housekeeping genes: HPRT1 (Hs02800695_m1) and GAPDH (Hs99999905_m1).

Tonsil Tfh analysis

To analyze tonsil CD4 T cells, we used mechanical disruption by first cutting the tissue samples with a scalpel into small pieces, and then dissociating into single cells using gentleMACS technology (C tube and gentleMACS, Miltenyi biotec), followed by a Ficoll gradient centrifugation (Lymphoprep, Greiner Bio-one). Tonsil CD4 T cells were enriched using CD4 T cell isolation kit (Miltenyi biotec), then naïve CD4 T cells, GC Tfh and Tfh were sorted using CD4, CD19, CD45RO, CXCR5 and PD1 markers on a FACS Aria instrument (BD Biosciences). To analyze the capacity of the different tonsillar CD4 T cells to produce cytokines, an intracellular cytokine assay was performed.

Imaging Mass Cytometry

Tonsils were embedded in optimal cutting temperature (OCT) compound, snap frozen, and sectioned on a microtome-cryostat (section thickness 5 μm). Sections were stored at -80°C . Before use, slides were warmed up to -20°C during 1 hour and equilibrated to room temperature for 10 min. Slides were fixed in 4% formaldehyde for 30 min, then rinsed three times in PBS thoroughly to remove the tissue-freezing matrix. Tissue sections were blocked with 3% Bovine Serum Albumin (Rockland) in PBS for 45 min at room temperature. We used two metal-conjugated antibody cocktails against: 1) alphaSMA-141Pr (clone IA4), CD8a-146Nd (clone RPA-T8), CD20-147Sm (clone H1), CD278/ICOS-148Nd (clone C398.4A), MUC-

1-150Nd (clone MAB6298), CD185/CXCR5-151Eu (clone MM0225-8C17), CD1c/BDCA1-152Sm (clone AD5-8E7), CD44-153Eu (clone 691534), CD45-154Sm (clone MEM-28), CD279/PD1-155Gd (clone EH12.2H7), CD4-156Gd (clone EPR6855), CD14-156GD (clone HCD14), CXCL13-157Gd (polyclonal), CD324/E-Cadherin-158Gd (clone 24 E10), CD11c-159Tb (clone Bu15), CD370/Clec9A-161Dy (clone 8F9), Foxp3-162Dy (clone 259/C7), Bcl6-163Dy (clone K112-91), ARG-1-164Dy (clone ARG1/1125), CD127-165Ho (polyclonal), Bcl2-166Er (clone 124), CD206-168Er (clone 15-2), IL21-169Tm (clone 3A3-N2), CD3-170Er clone UCHT1), CD68-171Yb (clone Y1/82a), CD59-173Yb (clone P2A2), Histone3-176Yb (clone D1H2), DNA intercalator-191/193Ir ; 2) alphaSMA-141Pr (clone IA4), CD8a-146Nd (clone RPA-T8), CD303/BDCA2-147Sm (clone 201A), CD123-148Nd (clone 45016), CD1c/BDCA1-152Sm (clone AD5-8E7), CD44-153Eu (clone 691534), CD45-154Sm (clone MEM-28), CD45RA-155Gd (clone HI100), CD14-156Gd (clone HCD14), CXCL13-157Gd (polyclonal), CD324/E-Cadherin-158Gd (clone 24 E10), CD11c-159Tb (clone Bu15), CTLA4-161Dy (clone OT1G10), Foxp3-162Dy (clone 259/C7), Bcl6-163Dy (clone K112-91), IL21-164Dy (polyclonal), Bcl2-166Er (clone 124), CD206-168Er (clone 15-2), Ki67-168Er (clone B56), CD19-169Tm (clone HIB19), CD3-170Er clone UCHT1), CD185/CXCR5-171Yb (clone 51505), collagen14-173Yb (polyclonal), CD279/PD1-175Lu (clone EH12.2H7), HistoneH3-176Yb (clone D1H2), DNA-191/193Ir (all antibodies were from Fluidigm). Tissue sections were incubated with the antibody cocktail overnight at 4°C in a humidified chamber, then washed several times in 0.1% Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific) in PBS. Slides were rinsed in PBS and stained with DNA intercalator-Ir (Fluidigm, 1:2000 dilution) for 30 min at room temperature. Slides were washed in distilled deionized water and air-dried for approximately 30 min. Slides were inserted into the Hyperion™ Imaging System (Fluidigm) for data acquisition (Chang et al., 2017).

Analysis of Imaging Mass Cytometry data

First, images were segmented by pixel classification into 3 regions: B cell zone, T cell zone and background/crypt. For this, we used the open-source software Ilastik (Sommer et al., 2011): we manually annotated pixels inside each of the 3 regions, and the software then learned to perform segmentation in the entire image. Second, we detected individual nuclei from the DNA staining with in-house developed software. After removal of salt and pepper noise and normalization of the image, we applied a LoG filter (sigma=0.004) thereby enhancing spot like features, which appear as local minima. We then applied the h-minima transform (Soille, 2003) to detect local minima with a reasonable local contrast (h=0.001), thereby avoiding oversegmentation into nuclei fragments. The cellular region is calculated by applying the watershed transformation to the distance map of the segmentation background, and by further

restricting the cellular regions by a circle of a defined radius ($r=8$ pixels) around each selected local minimum in order to avoid oversized cells in regions of low density. From this, we could now measure the intensity in each channel, and thus a proxy of the expression level of the protein in each individual cell. Due to varying subcellular localization of the proteins and important experimental variation of the channels, it was not possible to define automatic thresholds. We therefore built single cell galleries allowing us to manually define individual thresholds for each channel by considering the distribution and intensity of the signal. In order to check the validity of the manual definition, we calculated the p-value of this detection as the probability of detecting as many cells under the assumption of independence of the channel signals. This provided us with coordinates for each population studied (macrophages, Tfh) and their distance distribution to the border of the corresponding regions. All scripts were written in Python, and made use of the open-source library scikit-image (van der Walt et al., 2014).

Single cell RNA-seq library preparation.

Cellular suspension (3500 cells) was loaded on a 10X Chromium instrument (10X Genomics) according to manufacturer's protocol based on the 10X GEMCode proprietary technology. Single-cell RNA-Seq libraries were prepared using Chromium Single Cell 3' v2 Reagent Kit (10X Genomics) according to manufacturer's protocol. Briefly, the initial step consisted in performing an emulsion where individual cells were isolated into droplets together with gel beads coated with unique primers bearing 10X cell barcodes, UMI (unique molecular identifiers) and poly(dT) sequences. Reverse transcription reactions were engaged to generate barcoded full-length cDNA followed by the disruption of emulsions using the recovery agent and cDNA clean up with DynaBeads MyOne Silane Beads (Thermo Fisher Scientific). Bulk cDNA was amplified using a GeneAmp PCR System 9700 with 96-Well Gold Sample Block Module (Applied Biosystems) (98 °C for 3 min; cycled 14 ×: 98 °C for 15 s, 67 °C for 20 s, and 72 °C for 1 min; 72 °C for 1 min; held at 4 °C). Amplified cDNA product was cleaned up with the SPRI select Reagent Kit (Beckman Coulter). Indexed sequencing libraries were constructed using the reagents from the Chromium Single Cell 3' v2 Reagent Kit, following these steps: (1) fragmentation, end repair and A-tailing; (2) size selection with SPRI select; (3) adaptor ligation; (4) post ligation cleanup with SPRI select; (5) sample index PCR and cleanup with SPRI select beads. Library quantification and quality assessment was performed using Qubit fluorometric assay (Invitrogen) with dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit and Bioanalyzer Agilent 2100 using a High Sensitivity DNA chip (Agilent Genomics). Indexed libraries were equimolarly pooled and sequenced on an Illumina HiSeq2500 using paired-end 26x98bp as

sequencing mode. Using a full Rapid flow cell, a coverage around 100M reads per sample were obtained corresponding to 100,000 reads/cell.

Single-cell RNA-seq data analysis.

Single-cell expression was analyzed using the Cell Ranger Single Cell Software Suite (v1.3.1) to perform quality control, sample de-multiplexing, barcode processing, and single-cell 3' gene counting (Zheng et al., 2017a). Sequencing reads were aligned to the UCSC hg38 transcriptome using the Cell Ranger suite with default parameters. A total of 1240 single cells were analyzed. Mean raw reads per cell were 93,428. Further analysis was performed in R (v3.3) using the Seurat package (v2.0.1) (Satija et al., 2015). The gene-cell-barcode matrix of the samples was log-transformed and filtered based on the number of genes detected per cell (any cell with less than 400 genes or more than 3000 genes per cell was filtered out). Regression in gene expression was performed based on the number of unique molecular identifiers (UMI) and the percentage of mitochondrial genes. Only genes detected in at least 3 cells were included. Cells were then scaled to a total of 1e4 molecules. Any cell with more than 30% of mitochondrial UMI counts was filtered out. Altogether, 1227 cells were kept for statistical analysis. To reduce data dimensionality, 2764 variable genes were selected based on their expression and dispersion (expression cut-off = 0, and dispersion cut-off = 0.5). PCA was run on the normalized gene-barcode matrix. Barnes-hut approximation to t-SNE (van der Maaten, 2013) was then performed on the first 15 principal components to visualize cells in a two-dimensional space. The first 15 principal components were used for the t-SNE projection and clustering analysis using the Elbow Plot approach. Clusters were identified using the "Find_Clusters" function in Seurat with a resolution parameter of 0.6. This graph-based clustering method relies on a clustering algorithm based on shared nearest neighbor (SNN) modularity optimization. Unique cluster-specific genes were identified by running the Seurat « Find_All_Markers » function using default parameters. Heatmaps and violin plots were plotted using Seurat.

Software and Statistical analysis

Flow cytometry data were analyzed using FlowJo software (Tree Star).

Statistical analyses were performed using the Prism software v7 (GraphPad). Paired Wilcoxon were applied in all analysis to compare two groups, except for Figure 1B and 1D where one way anova Friedman test with a Dunn's multiple comparison test were applied. Significance was retained for $p < 0,05$.

Author contributions:

MD, CG, SA and ES designed experiments. MD, TP, MB, QC, OO and ES performed experiments. MD, WT, PG, CG and ES analyzed the data and prepared the figures. SB provided expertise on sequencing. QC, TV and OO provided expertise on imaging mass cytometry. MD and ES wrote the manuscript, with input from all authors. ES supervised the project.

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM, Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-LABX-0043, ANR-CHIN-0002 and ANR-10-IDEX-0001-02 PSL), Institut Curie (CIC IGR-Curie 1428), the European Research Council (2013-AdG N° 340046 DCBIOX) (SA), La Ligue Nationale contre le Cancer (EL2014.LNCC/SA) (SA), Fondation ARC pour la recherche contre le cancer (ES). MD is supported by a PhD scholarship from Université Paris Descartes (Paris V).

High-throughput sequencing performed by the ICGex NGS platform of the Institut Curie was supported by grants ANR-10-EQPX-03 (Equipex) and ANR-10-INBS-09-08 (France Génomique Consortium), by Cancéropôle Ile-de-France, by SESAME program from Région Ile-de-France and by SiRIC-Curie program (SiRIC Grant «INCa-DGOS- 4654»).

The authors wish to thank the Flow Cytometry Platform of Institut Curie for cell sorting.

Supplemental information

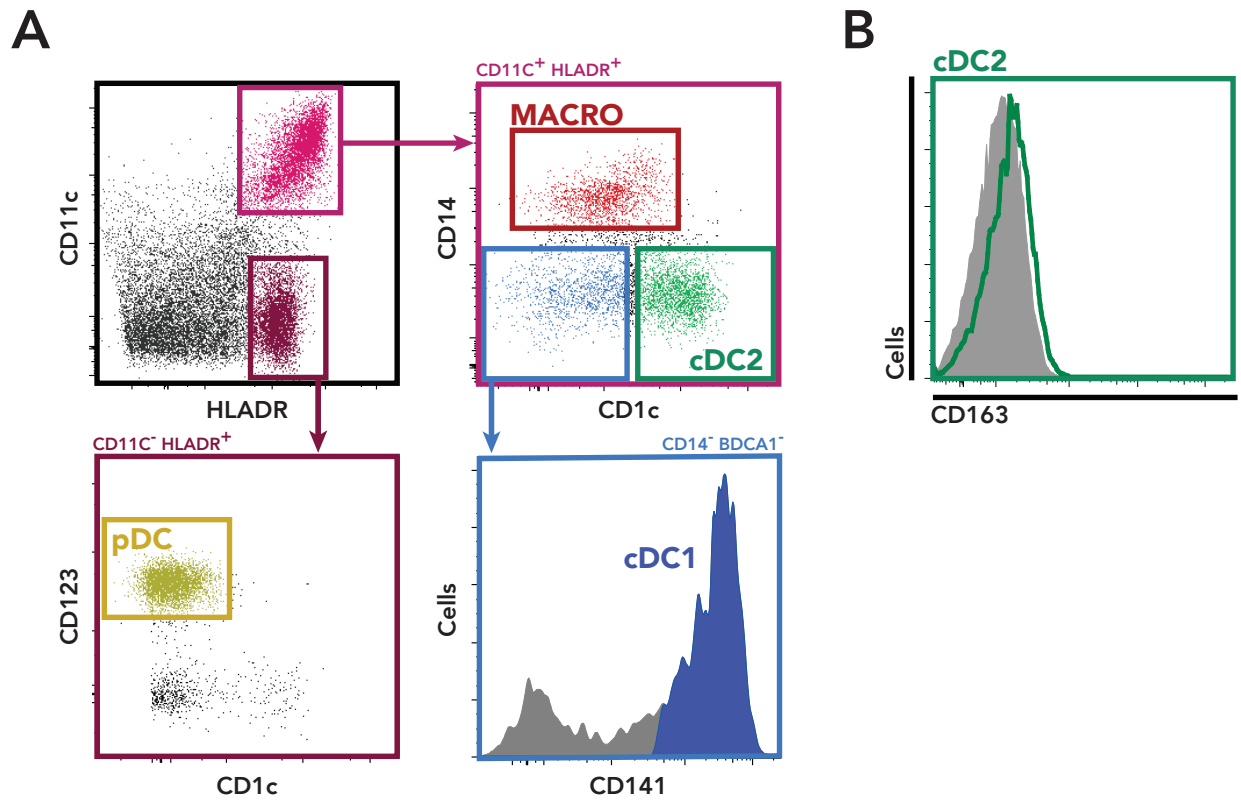


Figure S1 related to figure 1. Phenotype of purified tonsil DC subsets and macrophages.

After mechanical disruption and enzymatic digestion of the tissue, tonsil DC subsets and macrophages were isolated by light density selection, enriched by negative selection and purified by cell sorting. (A) Gating strategy for cell sorting. pDC were CD11c⁻ HLADR⁺ CD1c⁻ CD123⁺. Macrophages and cDC were positive for CD11c and HLADR. cDC1 were CD14⁻ CD1c⁻ CD141⁺. cDC2 were CD14⁺ CD1c⁺. Macrophages (MACRO) were CD14⁺ CD1c⁻. (B) Cells were stained for CD163 or isotype control (grey shaded histogram). Representative result, gated on cDC2 (n=3).

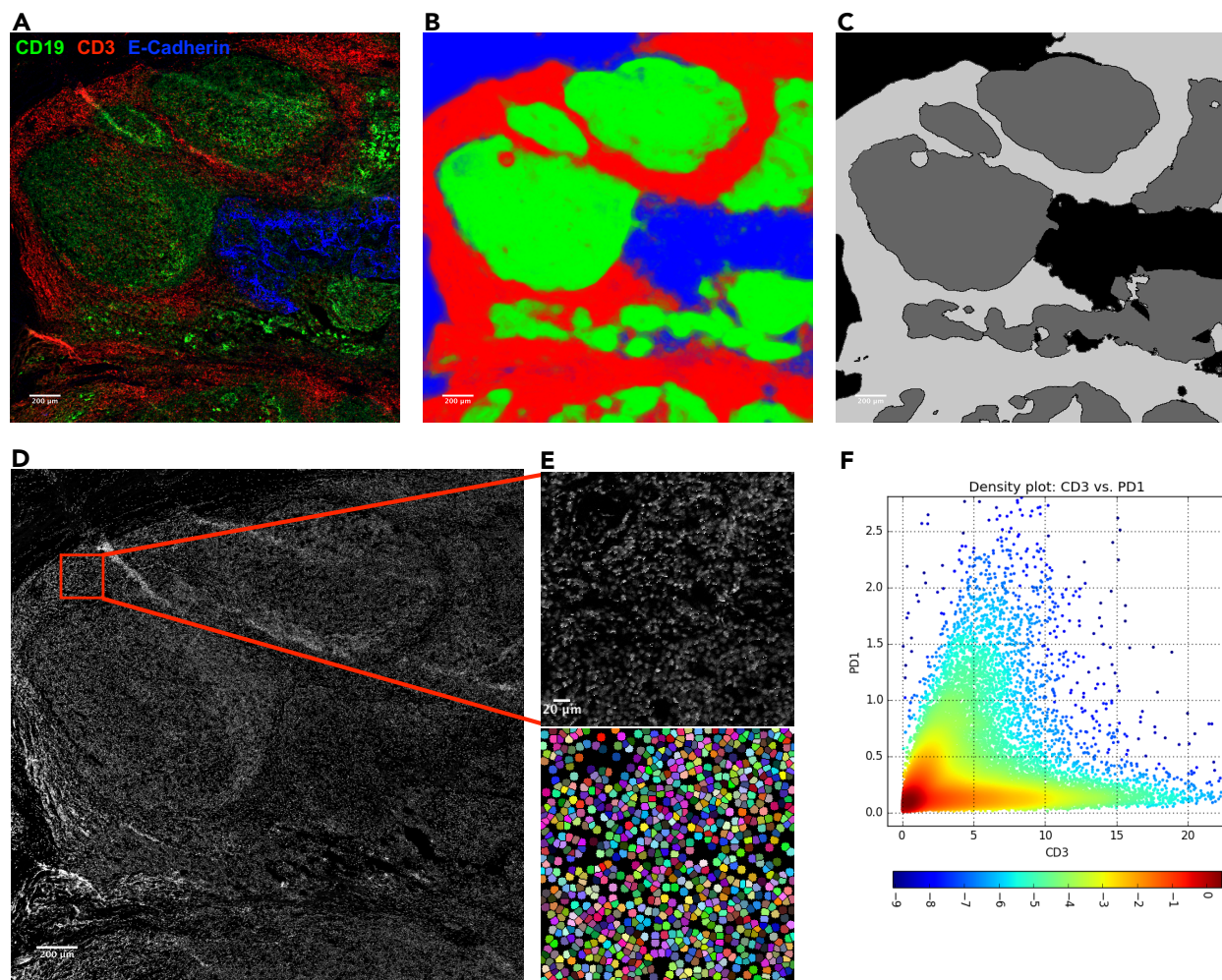


Figure S2 related to figure 3. Automated image analysis.

(A) Input image for pixel classification: CD3 in red, CD19 in green, E-cadherin in blue. (B) Posterior probability of the Random Forest trained by the Ilastik Software. (C) Segmentation result: crypt/background (black), T cell zone (white), B cell zone (grey). (D) DNA intercalor staining. (E) Zoom-in of DNA staining (top) and result of the Watershed algorithm (bottom). (F) Scatter density plot of the joint density distributions between two markers (CD3, PD1).

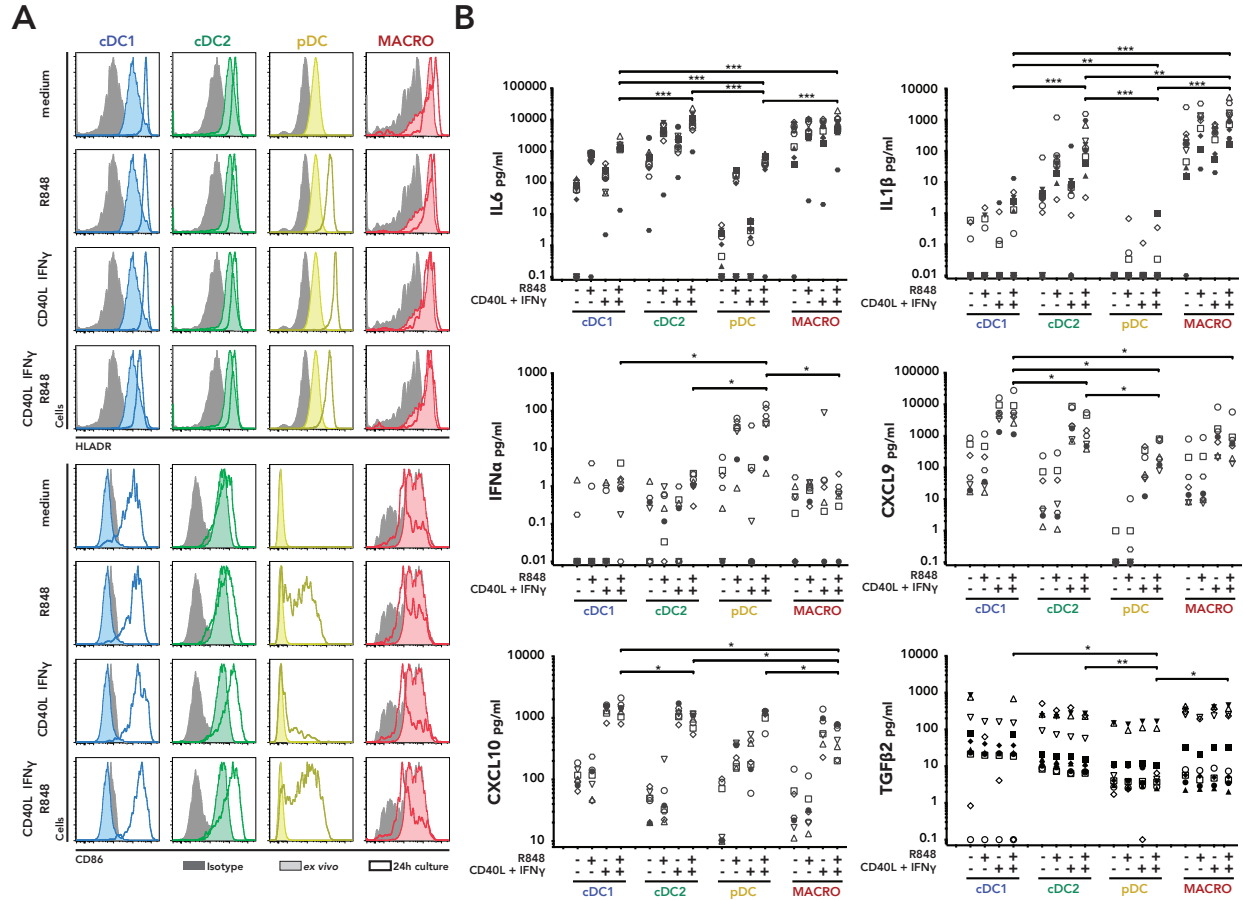


Figure S3 related to figure 4. Cytokine secretion profile after *in vitro* activation.

(A-B) Purified DC and macrophages were activated for 24h with or without R848, CD40L and IFN γ . (A) Activation markers CD86 and HLADR expression were analysed by FACS staining after cell sorting (*ex vivo*) and after 24h activation (24h culture). Cytokine secretion was analysed by CBA. n=10 for TGF β 2, n=12 for IL6, IL1 β , IFN α , CXCL10 and CXCL9. Each symbol represents an individual donor. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001, Wilcoxon test.

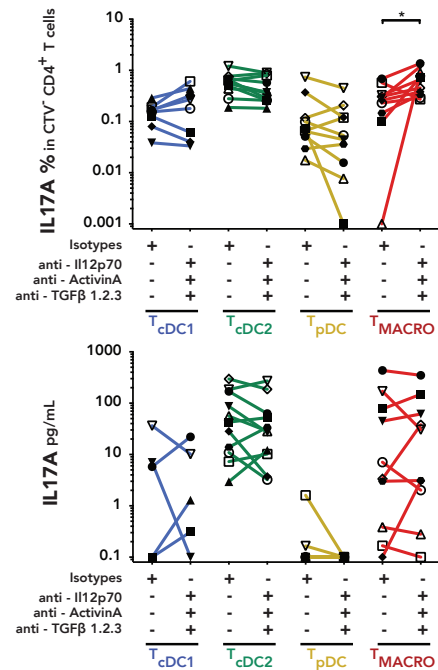


Figure S4 related to figure 5. Th17 polarisation assay with a cocktail of blocking antibodies.

Purified DC subsets and macrophages were co-cultured with naïve CD4 T cells in presence of a cocktail of blocking antibodies against IL12p70, Actin A and TGFβ1,2,3 or isotypes controls. IL17A production was analyzed by intracellular FACS staining after 6h of restimulation with PMA and ionomycin in presence of Brefeldin A. IL17A secretion was analyzed by CBA after 24h of restimulation with anti-CD3+CD28 beads. Each symbol represents an individual donor. *p<0.05, Wilcoxon test.

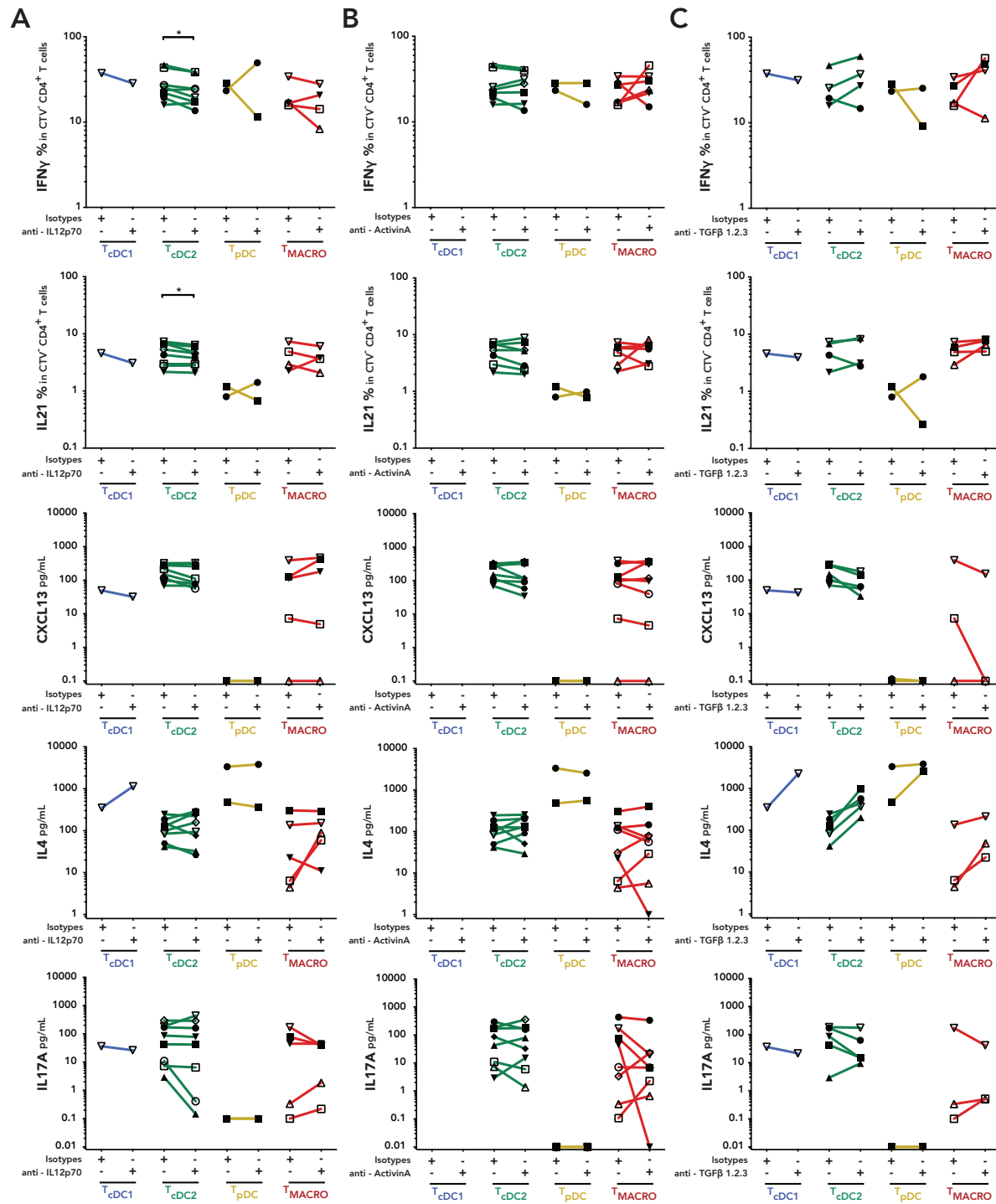


Figure S5 related to figure 5. T cell polarisation assay with individual blocking antibodies.

(A-C) Purified DC subsets and macrophages were co-cultured with naïve CD4 T cells in presence of blocking antibodies against IL12p70 (A), Activin A (B) or TGF β 1,2,3 (C), or isotypes controls. IFN γ and IL21 production was analyzed by intracellular FACS staining after 6h of restimulation with PMA and ionomycin in presence of Brefeldin A. CXCL13, IL4 and IL17A secretion was assessed by CBA (IL4, IL17A) or ELISA (CXCL13) after 24h of restimulation with anti-CD3+CD28 beads. Each symbol represents an individual donor. *p<0.05, **p<0.01, Wilcoxon test.

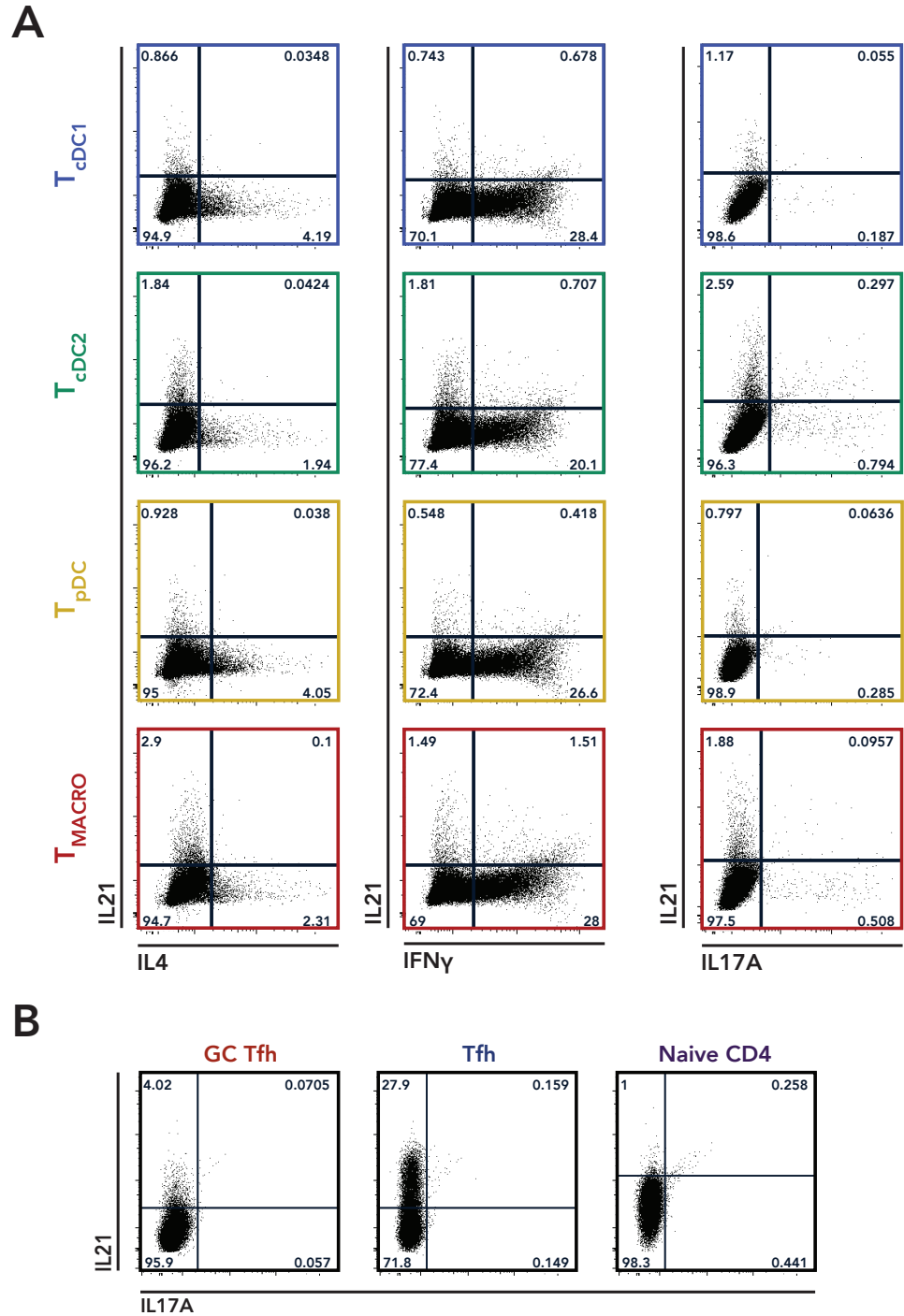


Figure S6 related to figure 6. Intracellular cytokine stainings.

(A) Purified human tonsil DC subsets and macrophages were co-cultured with allogeneic naïve CD4 T cells. Cytokine production were analyzed by intracellular FACS staining after 6h of restimulation with PMA and ionomycin in presence of Brefeldin A. Representative results, gated on live CTV⁻ cells (n=13). (B) CD4 T cells isolated from tonsil. Naïve CD4 T cells were CD4⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻, GC Tfh cells CD4⁺ CD45RO⁺ PD1^{hi} CXCR5^{hi} and extra-follicular Tfh cells CD4⁺ CD45RO⁺ PD1^{int} CXCR5^{int}. Cytokine production was analyzed by intracellular FACS staining after 6h of restimulation with PMA and ionomycin in presence of Brefeldin A. Representative results (n=5).

References

- Bentebibel, S.E., Schmitt, N., Banchereau, J., and Ueno, H. (2011). Human tonsil B-cell lymphoma 6 (BCL6)-expressing CD4⁺ T-cell subset specialized for B-cell help outside germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E488-497.
- Calabro, S., Gallman, A., Gowthaman, U., Liu, D., Chen, P., Liu, J., Krishnaswamy, J.K., Nascimento, M.S., Xu, L., Patel, S.R., et al. (2016). Bridging channel dendritic cells induce immunity to transfused red blood cells. *J Exp Med* 213, 887-896.
- Caminschi, I., Proietto, A.I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Shin Teh, J., Lo, J.C., Rizzitelli, A., Wu, L., Vremec, D., van Dommelen, S.L., et al. (2008). The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* 112, 3264-3273.
- Chang, Q., Ornatsky, O.I., Siddiqui, I., Loboda, A., Baranov, V.I., and Hedley, D.W. (2017). Imaging Mass Cytometry. *Cytometry A* 91, 160-169.
- Choi, Youn S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, Tania C., Johnston, Robert J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6. *Immunity* 34, 932-946.
- Chtanova, T., Tangye, S.G., Newton, R., Frank, N., Hodge, M.R., Rolph, M.S., and Mackay, C.R. (2004). T Follicular Helper Cells Express a Distinctive Transcriptional Profile, Reflecting Their Role as Non-Th1/Th2 Effector Cells That Provide Help for B Cells. *The Journal of Immunology* 173, 68-78.
- Crotty, S. (2014). T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity* 41, 529-542.
- Dienz, O., Eaton, S.M., Bond, J.P., Neveu, W., Moquin, D., Noubade, R., Briso, E.M., Charland, C., Leonard, W.J., Ciliberto, G., et al. (2009). The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4⁺ T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 206, 69-78.
- Fenton, T.M., Kelly, A., Shuttleworth, E.E., Smedley, C., Atakilit, A., Powrie, F., Campbell, S., Nishimura, S.L., Sheppard, D., Levison, S., et al. (2017). Inflammatory cues enhance TGFβ activation by distinct subsets of human intestinal dendritic cells via integrin αvβ8. *Mucosal Immunol* 10, 624-634.
- Gatto, D., Wood, K., Caminschi, I., Murphy-Durland, D., Schofield, P., Christ, D., Karupiah, G., and Brink, R. (2013). The chemotactic receptor EBI2 regulates the homeostasis, localization and immunological function of splenic dendritic cells. *Nat Immunol* 14, 446-453.
- Giesen, C., Wang, H.A., Schapiro, D., Zivanovic, N., Jacobs, A., Hattendorf, B., Schuffler, P.J., Grolimund, D., Buhmann, J.M., Brandt, S., et al. (2014). Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods* 11, 417-422.
- Goenka, R., Barnett, L.G., Silver, J.S., O'Neill, P.J., Hunter, C.A., Cancro, M.P., and Laufer, T.M. (2011). Cutting Edge: Dendritic Cell-Restricted Antigen Presentation Initiates the Follicular Helper T Cell Program but Cannot Complete Ultimate Effector Differentiation. *The Journal of Immunology* 187, 1091-1095.
- Gudjonsson, A., Lysen, A., Balan, S., Sundvold-Gjerstad, V., Arnold-Schrauf, C., Richter, L., Baekkevold, E.S., Dalod, M., Bogen, B., and Fossum, E. (2017). Targeting Influenza Virus Hemagglutinin to Xcr1⁺ Dendritic Cells in the Absence of Receptor-Mediated Endocytosis Enhances Protective Antibody Responses. *J Immunol* 198, 2785-2795.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14, 571-578.
- Heidkamp, G.F., Sander, J., Lehmann, C.H.K., Heger, L., Eissing, N., Baranska, A., Luhr, J.J., Hoffmann, A., Reimer, K.C., Lux, A., et al. (2016). Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue microenvironment. *Sci Immunol* 1.
- Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, Emily S., Dumortier, H., et al. (2015). OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* 42, 1159-1170.
- Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science* 325, 1006-1010.
- Kato, Y., Zaid, A., Davey, G.M., Mueller, S.N., Nutt, S.L., Zotos, D., Tarlinton, D.M., Shortman, K., Lahoud, M.H., Heath, W.R., and Caminschi, I. (2015). Targeting Antigen to Clec9A Primes Follicular Th Cell Memory Responses Capable of Robust Recall. *J Immunol* 195, 1006-1014.
- Kim, C.H., Lim, H.W., Kim, J.R., Rott, L., Hillsamer, P., and Butcher, E.C. (2004). Unique gene expression program of human germinal center T helper cells. *Blood* 104, 1952-1960.
- Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A.K., et al. (2008). Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14⁺ dermal dendritic cells. *Immunity* 29, 497-510.
- Li, J., Lu, E., Yi, T., and Cyster, J.G. (2016). EBI2 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-quenching dendritic cells. *Nature* 533, 110-114.
- Linterman, M.A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R.R., Srivastava, M., Hogan, J.J., Verma, N.K., Smyth, M.J., Rigby, R.J., and Vinuesa, C.G. (2010). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med* 207, 353-363.
- Liu, X., Chen, X., Zhong, B., Wang, A., Wang, X., Chu, F., Nurieva, R.I., Yan, X., Chen, P., van der Flier, L.G., et al. (2014).

- Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. *Nature* 507, 513-518.
- Locci, M., Wu, J.E., Arumemi, F., Mikulski, Z., Dahlberg, C., Miller, A.T., and Crotty, S. (2016). Activin A programs the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol* 17, 976-984.
- Lu, P., Shih, C., and Qi, H. (2017). Ephrin B1-mediated repulsion and signaling control germinal center T cell territoriality and function. *Science* 356.
- Luthje, K., Kallies, A., Shimohakamada, Y., Belz, G.T., Light, A., Tarlinton, D.M., and Nutt, S.L. (2012). The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. *Nat Immunol* 13, 491-498.
- Miller, J.C., Brown, B.D., Shay, T., Gautier, E.L., Jojic, V., Cohain, A., Pandey, G., Leboeuf, M., Elpek, K.G., Helft, J., et al. (2012). Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13, 888-899.
- Mittag, D., Proietto, A.I., Loudovaris, T., Mannering, S.I., Vremec, D., Shortman, K., Wu, L., and Harrison, L.C. (2011). Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *J Immunol* 186, 6207-6217.
- Nizzoli, G., Krietsch, J., Weick, A., Steinfelder, S., Facciotti, F., Gruarin, P., Bianco, A., Steckel, B., Moro, M., Crosti, M., et al. (2013). Human CD1c⁺ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* 122, 932-942.
- Okada, T., Miller, M.J., Parker, I., Krummel, M.F., Neighbors, M., Hartley, S.B., O'Garra, A., Cahalan, M.D., and Cyster, J.G. (2005). Antigen-Engaged B Cells Undergo Chemotaxis toward the T Zone and Form Motile Conjugates with Helper T Cells. *PLOS Biology* 3, e150.
- Pattarini, L., Trichot, C., Bogiatzi, S., Grandclaude, M., Meller, S., Keuylian, Z., Durand, M., Volpe, E., Madonna, S., Cavani, A., et al. (2017). TSLP-activated dendritic cells induce human T follicular helper cell differentiation through OX40-ligand. *J Exp Med* 214, 1529-1546.
- Penel-Sotirakis, K., Simonazzi, E., Peguet-Navarro, J., and Rozieres, A. (2012). Differential capacity of human skin dendritic cells to polarize CD4⁺ T cells into IL-17, IL-21 and IL-22 producing cells. *PLoS One* 7, e45680.
- Qi, H. (2016). T follicular helper cells in space-time. *Nat Rev Immunol* 16, 612-625.
- Robson, N.C., Phillips, D.J., McAlpine, T., Shin, A., Svobodova, S., Toy, T., Pillay, V., Kirkpatrick, N., Zanker, D., Wilson, K., et al. (2008). Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. *Blood* 111, 2733-2743.
- Satija, R., Farrell, J.A., Gennert, D., Schier, A.F., and Regev, A. (2015). Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol* 33, 495-502.
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., et al. (2013). IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* 38, 970-983.
- Schmitt, N., Liu, Y., Bentebibel, S.-E., Munagala, I., Bourdery, L., Venuprasad, K., Banchereau, J., and Ueno, H. (2014). The cytokine TGF- β co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol* 15, 856-865.
- Schmitt, N., Morita, R., Bourdery, L., Bentebibel, S.E., Zurawski, S.M., Banchereau, J., and Ueno, H. (2009). Human Dendritic Cells Induce the Differentiation of Interleukin-21-Producing T Follicular Helper-like Cells through Interleukin-12. *Immunity* 31, 158-169.
- Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 209, 653-660.
- Shin, C., Han, J.A., Koh, H., Choi, B., Cho, Y., Jeong, H., Ra, J.S., Sung, P.S., Shin, E.C., Ryu, S., and Do, Y. (2015). CD8 α (-) Dendritic Cells Induce Antigen-Specific T Follicular Helper Cells Generating Efficient Humoral Immune Responses. *Cell Rep* 11, 1929-1940.
- Soille, P. (2003). *Morphological Image Analysis: Principles and Applications* (2nd ed).
- Sommer, C., Straehle, C., Kothe, U., and Hamprecht, F.A. (2011). Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit. . IEEE international symposium on biomedical imaging: from nano to macro (ISBI), 230-233.
- Spensieri, F., Siena, E., Borgogni, E., Zedda, L., Cantisani, R., Chiappini, N., Schiavetti, F., Rosa, D., Castellino, F., Montomoli, E., et al. (2016). Early Rise of Blood T Follicular Helper Cell Subsets and Baseline Immunity as Predictors of Persisting Late Functional Antibody Responses to Vaccination in Humans. *PLoS One* 11, e0157066.
- Suan, D., Nguyen, A., Moran, I., Bourne, K., Hermes, J., Arshi, M., Hampton, H., Tomura, M., Miwa, Y., Kelleher, A., et al. (2015). T Follicular Helper Cells Have Distinct Modes of Migration and Molecular Signatures in Naive and Memory Immune Responses. *Immunity* 42, 704-718.
- Suto, A., Kashiwakuma, D., Kagami, S.-i., Hirose, K., Watanabe, N., Yokote, K., Saito, Y., Nakayama, T., Grusby, M.J., Iwamoto, I., and Nakajima, H. (2008). Development and characterization of IL-21-producing CD4⁺ T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 205, 1369-1379.
- Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., and Deenick, E.K. (2013). The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol* 13, 412-426.
- Travis, M.A., Reizis, B., Melton, A.C., Masteller, E., Tang, Q., Proctor, J.M., Wang, Y., Bernstein, X., Huang, X., Reichardt, L.F., et al. (2007). Loss of integrin α (v) β 8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* 449, 361-365.
- Ueno, H. (2016). T follicular helper cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 43, 24-31.

- Ueno, H., Banchereau, J., and Vinuesa, C.G. (2015). Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nature immunology* 16, 142-152.
- van der Maaten, L. (2013). Barnes-Hut-SNE. *Proceedings of the International Conference on Learning Representations*.
- van der Walt, S., Schonberger, J.L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J.D., Yager, N., Gouillart, E., Yu, T., and scikit-image, c. (2014). scikit-image: image processing in Python. *PeerJ* 2, e453.
- Villani, A.C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., et al. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 356.
- Weinstein, J.S., Herman, E.I., Lainez, B., Licona-Limon, P., Esplugues, E., Flavell, R., and Craft, J. (2016). TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat Immunol* 17, 1197-1205.
- Wing, J.B., Kitagawa, Y., Locci, M., Hume, H., Tay, C., Morita, T., Kidani, Y., Matsuda, K., Inoue, T., Kurosaki, T., et al. (2017). A distinct subpopulation of CD25⁺ T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E6400-E6409.
- Yao, C., Zurawski, S.M., Jarrett, E.S., Chicoine, B., Crabtree, J., Peterson, E.J., Zurawski, G., Kaplan, D.H., and Igyarto, B.Z. (2015). Skin dendritic cells induce follicular helper T cells and protective humoral immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 136, 1387-1397 e1381-1387.
- Yawalkar, N., Tschanner, G.G., Hunger, R.E., and Hassan, A.S. (2009). Increased expression of IL-12p70 and IL-23 by multiple dendritic cell and macrophage subsets in plaque psoriasis. *J Dermatol Sci* 54, 99-105.
- Yi, T., and Cyster, J.G. (2013). EBI2-mediated bridging channel positioning supports splenic dendritic cell homeostasis and particulate antigen capture. *Elife* 2, e00757.
- Yu, C.I., Becker, C., Metang, P., Marches, F., Wang, Y., Toshiyuki, H., Banchereau, J., Merad, M., and Palucka, A.K. (2014). Human CD141⁺ dendritic cells induce CD4⁺ T cells to produce type 2 cytokines. *J Immunol* 193, 4335-4343.
- Zheng, G.X., Terry, J.M., Belgrader, P., Ryvkin, P., Bent, Z.W., Wilson, R., Ziraldo, S.B., Wheeler, T.D., McDermott, G.P., Zhu, J., et al. (2017). Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat Commun* 8, 14049.
- Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.M., Smyth, M.J., et al. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med* 207, 365-378.

PARTIE II : Résultats complémentaires

Test fonctionnel des Tfh : capacité à aider des cellules B

A. Introduction

Afin d'évaluer la capacité des T_{DC2} et T_{MACRO} à induire une réponse anticorps efficace, nous avons utilisé et adapté un protocole de double co-culture (1^{ere} co-culture de DC :T et 2nd co-culture de T_{DC}:B mémoires). Cependant nous n'avons pas pu obtenir de résultats reproductibles avec les différentes MMC provenant d'amygdales, ce qui ne nous a pas permis de déterminer la capacité des T_{DC2} et T_{MACRO} à apporter leur aide aux lymphocytes B mémoires. Il me semble toutefois important de vous présenter le modèle expérimental mis en place, à travers notre expérience « pilote » utilisant des populations de DC générées *in vitro* : DC CD1a et les DC CD14 dérivées de cellules CD34⁺ sanguines.

B. Matériels & méthodes

1. Différenciation *in vitro* et purification des DC CD1a et DC CD14

Les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) ont été préparées par centrifugation du sang sur gradient de densité (Ficoll Lymphoprep, Greiner Bio-One). Les cellules CD34⁺ ont ensuite été sélectionnées par sélection magnétique négative (CD34 MicroBead Kit, Miltenyi Biotec) et mises en culture pendant 9 à 10 jours dans du milieu Yssel complété avec 10% de Sérum de veau fœtal (SVF) en présence de GMCSF (50 ng/mL - Ab Cys), TNF α (10 ng/mL - Biotechne) et Flt3L (100 ng/mL - Biotechne). Les sous populations de DC (DC CD1a et DC CD14) ont ensuite été purifiées par tri cellulaire (FACS Aria instrument – BD Biosciences) après marquage pour CD1a (clone : HI149 - Biolegend) et CD14 (clone : 61D3 - eBioscience).

2. Isolation des lymphocytes T CD4 naïfs et cellules B mémoires

Les cellules T CD4 naïves ont été isolées par sélection négative (Human Naïve CD4⁺ T Cell Isolation Kit – Stem Cell). La pureté des cellules a été évaluée par cytométrie de flux (Macsqant analyzer - Miltenyi Biotec) et est définie ainsi : CD4⁺ CD45 RA⁺ CD45 RO⁻. Seul les cellules présentant une pureté supérieure ou égale à 95% ont été utilisées.

La purification des lymphocytes B mémoires a été réalisée en deux étapes, une première étape d'enrichissement sur colonne magnétique des lymphocytes B totaux à partir de PBMC (Human B Cell Isolation Kit II – Miltenyi Biotec) et une seconde étape de tri cellulaire des cellules CD19⁺ IgD⁻ CD27⁺

(FACS Aria instrument – BD Biosciences).

3. Co-cultures

Les DC dérivées *in vitro* purifiées (10 000 cellules) ont été mises en co-culture avec des lymphocytes T CD4 naïfs allogéniques (50 000 cellules) pendant 6 jours dans du milieu Yssel complémenté avec 10% de SVF. Après 6 jours de co-culture, les cellules T CD4 polarisées par les différentes sous populations de DC dérivées *in vitro* (T_{CD1a} et T_{CD14}) ont été comptées et placées en co-culture avec des lymphocytes B mémoires autologues des T CD4 (20 000 T_{DC} + 40 000 B) pendant 8 ou 12 jours dans du milieu Yssel 10% SVF en présence de 31 pg/mL de super-antigène SEB (Staphylococcal Enterotoxin B).

4. Analyses par cytométrie en flux

a. Polarisation T helper – phénotypage T_{DC}

Afin d'analyser la prolifération des lymphocytes T, les T CD4 naïfs ont été marqués avec le marqueur CTV (Cell Trace Violet) avant le début de la co-culture DC : T. Nous avons analysé par marquage intracellulaire la production des cytokines IFN γ , CXCL13, IL21 et IL17A. Ainsi, après 6 jours de co-culture les cellules ont été activées avec de la PMA (50ng/ml-Sigma) et ionomycin (1 μ g/ml-Sigma) 6h en présence de Brefeldin A (4 μ g/ml-Sigma). Après activation, les cellules ont été marquées pour CD4 et avec un marqueur de viabilité « Live/dead eFluor780 » (Thermo Fisher Scientific). Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées (Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set, eBioscience) et marquées pour les protéines intracellulaires (IFN γ , CXCL13, IL21, IL17A) à température ambiante pendant 45 min dans un tampon contenant 2% de sérum de souris. L'acquisition des échantillons a été réalisée sur un FACS Verse instrument (BD Biosciences).

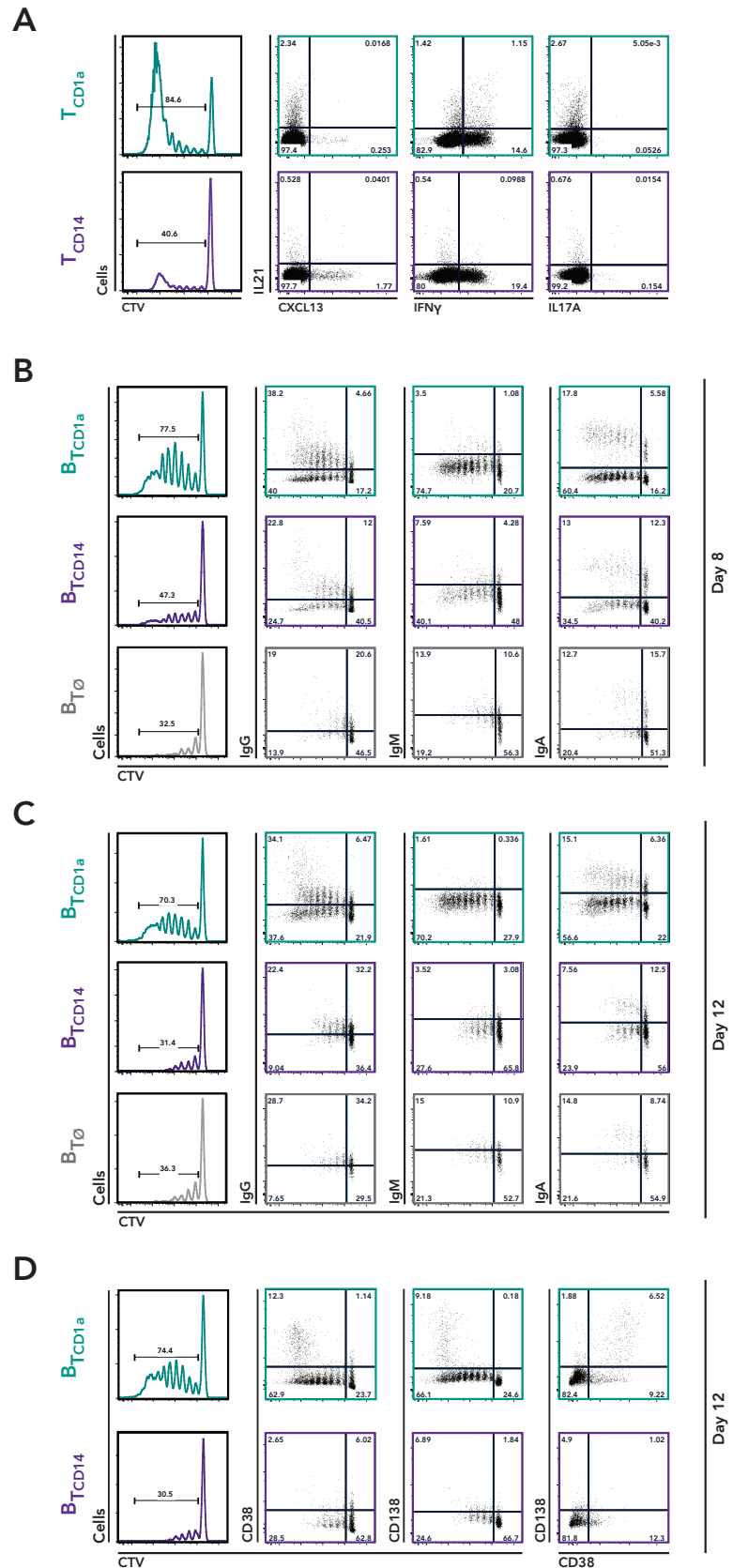
b. Phénotype des lymphocytes B après co-culture avec les T_{DC} (B_{TDC})

Grâce au marquage des lymphocytes B mémoires avec du CTV avant la co-culture T_{DC}:B, nous avons analysé la prolifération des lymphocytes B après 8 et 12 jours. L'expression totale (surface + intracellulaire) des Immunoglobulines par les cellules B a également été analysée. Ainsi, après 8 et 12 jours de co-culture les cellules B ont été marquées pour CD19 et avec un marqueur de viabilité « Live/dead eFluor780 » (Thermo Fisher Scientific), fixées, perméabilisées et marquées pour les IgA, IgM et IgGs totaux. L'analyse de l'activation et de la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes a été obtenue par marquages pour la molécule d'activation CD38 et le marqueur de plasmocytes CD138. L'acquisition des échantillons a été réalisée sur un FACS Verse instrument (BD Biosciences).

C. Résultats

Figure Résultats Complémentaires : Induction de lymphocytes Tfh fonctionnels par les DC CD1a dérivées *in vitro*.

(A-D) Les DC CD1a et CD14 ont été différenciées *in vitro* à partir de cellules CD34⁺ isolées du sang. Après tri cellulaire, les DC ont été mises en culture avec des lymphocytes T CD4 naïfs allo-géniques. (A) Après 6 jours de co-culture, la prolifération et la production des cytokines IL21, CXCL13, IFN γ et IL17A a été analysée après restimulation des T polarisés avec PMA ionomycine en présence de Brefeldin A. (B-D) Après 6 jours de co-culture DC:T, les lymphocytes T polarisés ont été mis en co-culture avec des lymphocytes B mémoires (IgD⁻CD27⁺) autologues en présence de SEB. (B-C) La prolifération des lymphocytes B et la production d'immunoglobulines (IgG, IgM et IgA) ont été analysés par cytométrie en flux après 8 (B) et 12 jours (C) de co-culture. (D) L'activation (marquage CD38) et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes (marquage CD138) ont été analysé par cytométrie en flux après 12 jours de co-culture.



Les DC CD1a dérivées *in vitro* induisent la polarisation de Tfh fonctionnels.

Afin de déterminer la capacité des DC CD1a et des DC CD14 dérivées *in vitro* à polariser des lymphocytes T CD4 naïfs allogéniques, nous avons analysé par cytométrie en flux la prolifération et la production des cytokines T helper par les T_{CD1a} et T_{CD14} après 6 jours de co-culture. Les DC CD1a induisent une meilleure prolifération des T CD4 naïfs que les DC CD14 (**Figure Résultats Complémentaires A**). Les deux populations de DC induisent des lymphocytes présentant une polarisation Th1 avec la production d'IFN γ . Pour les cytokines Tfh, les DC CD1a induisent la production d'IL-21 alors que les DC CD14 induisent la production de CXCL13 (**Figure Résultats Complémentaires A**).

Afin de déterminer la capacité de ces cellules T à aider les lymphocytes B, nous avons analysé la prolifération des lymphocytes B et leur production d'immunoglobulines (Ig) après 8 et 12 jours de co-culture T_{DC} : B. Ainsi nous avons observé une meilleure prolifération des lymphocytes B en présence de T_{CD1a} (B_{TCD1a}) qu'en présence de T_{CD14} (B_{TCD14}) après 8 et 12 jours de co-culture (**Figure Résultats Complémentaires B-C**). L'analyse de la production d'Ig a révélé une production d'IgG et d'IgA supérieure pour les lymphocytes B_{TCD1a} par rapport aux B_{TCD14} après 8 et 12 jours de co-cultures. Enfin, aucune production d'IgM n'a été observée (**Figure Résultats Complémentaires B-C**).

En plus de la prolifération et production d'Ig, nous avons également analysé l'expression par les lymphocytes B de marqueurs d'activation (CD38) et de différenciation en plasmocytes (CD138) après 12 jours de co-culture. Seuls les T_{CD1a} induisent un phénotype de plasmocytes activés (CD38⁺ CD138⁺) (**Figure Résultats Complémentaires D**).

D. Conclusion

Cette expérience a montré que les DC CD1a induisent des Tfh produisant IL-21 alors que les DC CD14 induisent des Tfh produisant CXCL13. Ce résultat est un élément complémentaire soutenant l'hypothèse de l'existence de deux sous populations de Tfh. Enfin, nos résultats montrent que les T_{CD1a} sont plus efficaces pour l'induction de la prolifération des lymphocytes B, la production d'Ig et la différenciation en plasmocytes. Ainsi nos résultats suggèrent un rôle important d'IL21 dans la physiologie du développement de réponses anticorps par les lymphocytes B alors que CXCL13 ne semble pas être impliqué, ce qui est en désaccord avec les données de la littérature (Klechevsky et al., 2008), je discuterai ce point plus amplement dans la discussion.

DISCUSSION

Tout au long de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'induction de la polarisation Tfh et aux mécanismes moléculaires mis en place. L'expertise du laboratoire nous a naturellement menés à nous concentrer sur la compréhension du rôle des sous-populations de MMC dans l'initiation de la polarisation Tfh. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle des sous-populations de DC résidentes et des macrophages présents dans les amygdales. En effet, les amygdales représentent un tissu de choix pour l'étude de la polarisation Tfh. Il s'agit d'un organe lymphoïde secondaire en contact constant avec des antigènes provenant des voies respiratoires supérieures, et qui en conséquence est caractérisé par la présence de larges GC. De plus, les amygdales sont des organes lymphoïdes non drainants, qui ne possèdent pas de vaisseaux lymphatiques afférents et donc ne contiennent pas de populations migratoires de MMC. Cette caractéristique permet de simplifier notre modèle expérimental notamment pour l'isolation des différentes populations de DC et macrophages résidents.

Nous avons ainsi mis en place différents modèles expérimentaux permettant l'analyse des spécialisations fonctionnelles des différentes sous populations de DC et des macrophages pour les réponses T CD4. Nos résultats ont mis en évidence une spécialisation fonctionnelle des cDC2 et des macrophages pour l'induction de la polarisation Tfh. L'étude des mécanismes impliqués dans cette spécialisation fonctionnelle nous a permis de confirmer le rôle des cytokines IL12p70, Activin A et TGF β qui avait été proposés comme impliqués dans la polarisation Tfh. Enfin, nous avons identifié deux sous-populations de lymphocytes Tfh caractérisées par la capacité de production d'IL21 pour l'une et de CXCL13 pour l'autre.

J'aimerais débiter cette discussion par la présentation des modèles expérimentaux utilisés dans notre étude ainsi que leurs limitations. Dans un deuxième temps, je discuterai plus particulièrement de nos résultats et des perspectives de ce projet.

I. Critiques et limitations expérimentales

A. Echantillons humains

Les études utilisant des échantillons humains présentent des limitations particulières qu'il est nécessaire d'identifier et de prendre en compte, tant dans la réalisation des expériences que dans leurs interprétations. En effet, les tissus humains sont souvent issus de patients présentant une pathologie, et subissant pour diverses raisons une opération chirurgicale. Ainsi, la pathologie du donneur peut avoir un impact sur les données expérimentales récoltées.

Dans notre étude, nous avons utilisé différents tissus comme sources de MMC. En effet, nous avons principalement utilisé des amygdales de donneurs souffrant d'apnée du sommeil due à une obstruction partielle des voies respiratoires en raison d'amygdales volumineuses, mais ne présentant aucun autre symptôme (ni infection, ni inflammation). L'analyse phénotypique des DC et macrophages purifiés de ces échantillons n'a pas montré d'état activé de ces cellules qui présentent un phénotype immature, confirmant ainsi l'absence d'inflammation des amygdales. Nous avons donc considéré ces échantillons comme sains. Des ganglions lymphatiques de patients souffrant d'un cancer du sein ont également été utilisés dans cette étude, seuls les ganglions non envahis considérés comme sains ont été inclus. Bien sûr, la présence de cellules tumorales dans l'organisme peut avoir un impact sur nos résultats, cependant nous avons choisi d'utiliser uniquement les ganglions non envahis ne présentant donc pas de perte d'intégrité tissulaire dû à l'envahissement par des cellules tumorales. Ainsi, nous limitons les effets des cellules tumorales et la variabilité inter-donneurs sur nos expériences. Il faut également prendre en compte qu'il est extrêmement compliqué d'obtenir des ganglions lymphatiques d'individus sains et que les échantillons de patients cancéreux représentent le meilleur compromis. Enfin, nous avons également isolé des DC et des lymphocytes provenant de sang de donneurs sains participant à un don de plaquettes.

Toutefois, malgré ces précautions, la variabilité des résultats entre les différents donneurs peut être importante puisqu'il nous est impossible de contrôler certains paramètres, comme par exemple ceux liés aux facteurs environnementaux. En effet, les donneurs sont exposés en permanence à des facteurs pouvant initier des réponses immunitaires (infections, vaccinations ect...) et l'accumulation de ces différentes réponses immunitaires module la capacité de réponse du système immunitaire. Ainsi, les capacités de défense de l'organisme varient d'un individu à l'autre puisqu'elles sont influencées par l'historique des réactions immunitaires déjà mises en place (Brodin and Davis, 2017). Les origines ethniques et sociales peuvent également contribuer à ces variations interdonneur. En effet, l'analyse du

profil transcriptomique de cellules immunitaires de donneurs provenant de différentes origines ethniques a montré que 22% des variations globales observées entre les différents individus pouvaient être attribuées aux facteurs héréditaires (Brodin and Davis, 2017; De Jager et al., 2015). Enfin, l'âge est également un paramètre de variation important entre donneur puisque les jeunes enfants et les personnes âgées présentent une sensibilité plus élevée aux infections (Simon et al., 2015).

Notre collaboration avec l'hôpital Necker pour l'obtention des échantillons d'amygdales est basée sur le don anonyme des échantillons, il nous est donc impossible de prendre en compte ces paramètres dans notre étude. Afin de renforcer la validité de nos conclusions et tests statistiques, nous avons choisi d'incorporer un grand nombre de donneurs dans notre étude, ainsi nos expériences comprennent au minimum huit à dix donneurs différents et au maximum 22 donneurs.

B. Limitations expérimentales

D'autres limitations, plus expérimentales cette fois, rentrent en jeu dans les études avec des échantillons humains et plus précisément avec des cellules primaires humaines. Il me semble important de mentionner ici que les DC et macrophages représentent des populations cellulaires rares. Ce nombre limité de cellules a le plus souvent été la contrainte principale de nos expériences.

Toutes les expériences réalisées dans ce projet sont des expériences *ex vivo* et sont par définition des modèles simplifiés de processus biologiques complexes. Ainsi, nous avons utilisé différents modèles expérimentaux afin d'étudier les deux grands axes de notre étude qui sont l'analyse de la capacité des différentes sous populations de cellules dendritiques et des macrophages à induire une polarisation Tfh et l'identification des mécanismes impliqués. Chaque modèle présentant ses limitations propres, je vais rapidement les aborder dans ce chapitre ce qui permettra je l'espère une meilleure appréhension de nos résultats.

1. Digestion tissulaire, isolation et culture des sous-populations de MMC

Les DC et les macrophages représentent des populations rares et leur isolation à partir d'amygdales passe par une étape de digestion mécanique et enzymatique, de centrifugation sur gradient de densité, d'un enrichissement négatif sur colonnes magnétiques et d'un tri cellulaire (Annexe 1). Toutes ces étapes représentent un processus lent et difficile qui peut avoir des conséquences fonctionnelles sur les cellules isolées, notamment en termes d'activation et d'acquisition d'un phénotype mature. Dans notre étude, afin de limiter cette induction d'activation, toutes les étapes sont réalisées à 4°C à l'exception de la digestion et de la centrifugation sur gradient de densité qui sont réalisées à

température ambiante. Après isolation, l'analyse phénotypique de l'expression ex vivo de CD86 par les sous populations de MMC a montré un profil immature de toutes les sous-populations avec toutefois une activation légèrement plus importante pour les cDC2 (Figure 3 A-B), ce qui est cohérent avec les résultats précédemment publiés dans l'équipe (Segura et al., 2013a) et chez la souris (Wilson et al., 2003). De manière intéressante, nous avons pu mettre en évidence une activation spontanée des cDC et des macrophages après 24h de culture sans stimulus d'activation (Figure Supplémentaire 3A) ce qui est cohérent avec des travaux réalisés avec des cellules murines provenant de la rate (Vremec et al., 2010). Différents paramètres peuvent participer à cette maturation « spontanée ». En effet, comme cité précédemment, le processus de purification des MMC est long et fastidieux. L'étape de digestion mécanique et enzymatique correspond à la dissociation forcée des cellules entre elles ce qui peut provoquer un « stress » des cellules provoquant la libération de divers facteurs dans le milieu. La présence de nombreux débris cellulaires peut également participer à l'induction de la maturation des MMC. Les étapes de purifications peuvent également influencer la maturation des cellules, puisqu'au cours de l'enrichissement les cellules traversent un champ magnétique et subissent ensuite un tri cellulaire par cytométrie en flux. Ces deux techniques induisent donc un nouveau stress mécanique. Enfin, la mise en culture des cellules représente une étape à risque de l'induction de l'activation puisque les cellules en suspension sont déposées sur un support en plastique pouvant lui-même apporter des éléments activateurs.

Toutefois, il a été proposé que la maturation des DC passait par différents stades, le stade final correspondant à la sécrétion de cytokines par les DC (Reis e Sousa, 2006). Dans nos expériences, l'analyse de la sécrétion de cytokines après 24h de culture en présence ou non de stimuli montre que l'activation spontanée des MMC observée n'induit pas de sécrétion de cytokines à l'exception de l'Activin A et du TGF β (Figure 3). Ces éléments montrent que les étapes de digestions et de purifications des MMC d'amygdales participent à l'acquisition d'un phénotype d'activation incomplet des cellules en culture mais qui apparaît comme insuffisant pour expliquer à lui seul l'induction des réponses T CD4 observées.

2. Système allogénique de co-culture cellulaire entre MMC et lymphocytes T CD4 naïfs

Ce modèle est basé sur une réaction allogénique entre les DC ou macrophages d'un donneur et les lymphocytes T CD4 naïfs d'un autre donneur. L'amplitude de la réaction allogénique est dépendante du « mismatch » entre donneurs, ce qui explique les variations d'activation et de prolifération des lymphocytes T CD4 que l'on peut observer avec ce type de modèle expérimental. Dans notre premier test, afin d'évaluer les polarisations T helper globales, nous avons analysé la sécrétion des cytokines T helper indépendamment de la prolifération et donc du nombre de cellules T CD4 présentes dans les différentes conditions. Nous avons pu mettre en évidence qu'à l'exception de la sécrétion de CXCL13 induite uniquement par les cDC2 et les macrophages, la sécrétion des autres cytokines ne présentait pas de différence majeure entre les différentes conditions (Figure 1B). Cependant nous avons observé dans nos expériences une variabilité de prolifération entre donneurs due à des réactions allogéniques variables d'un donneur à l'autre. Nous avons également observé que les cDC1 et cDC2 induisaient une plus forte prolifération des T CD4 naïfs que les pDC et macrophages (Figure 1A). Afin de s'affranchir de la variabilité d'induction de la prolifération des lymphocytes T, nous avons choisi d'analyser la production des différentes cytokines en fonction de la prolifération des lymphocytes T CD4 naïfs. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que même si les pDC induisent peu de prolifération des T CD4, les cellules ayant proliféré présentent majoritairement une polarisation Th1 avec production d'IFN γ , alors que l'analyse globale de la sécrétion montrait une capacité inférieure des pDC pour l'induction de la polarisation Th1. A l'inverse, les macrophages induisent la sécrétion d'une grande quantité de CXCL13 mais une faible prolifération des lymphocytes T CD4. (Figure 1BCD).

3. Test fonctionnel des Tfh : capacité à aider des cellules B

Nos résultats ont montré une spécialisation fonctionnelle des cDC2 et macrophages pour l'induction de lymphocytes T présentant un phénotype Tfh (production d'IL21 et sécrétion de CXCL13). Afin de confirmer cette spécialisation, nous avons voulu utiliser un test fonctionnel consistant à analyser la capacité des T CD4 polarisées par les différentes sous populations de MMC à induire l'activation de lymphocytes B et la production d'anticorps par ces derniers.

Nous avons dans un premier temps adapté à notre système d'étude un protocole publié (Klechevsky et al., 2008) caractérisé par deux co-cultures successives, la première correspondant à l'induction de la polarisation T helper par les DC et la seconde à la co-culture des T polarisés par les différentes DC (T_{DC}) et de lymphocytes B autologues. Afin de pouvoir comparer nos résultats avec ceux

déjà publiés nous avons utilisé des DC dérivées *in vitro* à partir de précurseurs CD34⁺ circulants (CD1a DC et CD14 DC). Dans l'étude originelle seule la sécrétion d'immunoglobulines était analysée, nous avons voulu compléter cette analyse par une analyse de la prolifération des lymphocytes B et de l'expression de marqueurs d'activation (CD38) et de différenciation en plasmocytes (CD138). Nous avons également analysé la production d'immunoglobulines (IgG totaux, IgA et IgM) (Résultats complémentaire 1).

Nous avons observé des résultats contradictoires par rapport à l'étude réalisée précédemment, probablement dû à la complexité du modèle expérimental, puisque nous n'avons pas reproduit les résultats publiés (Klechevsky et al., 2008). En effet dans cette étude, les CD14 DC provenant de la peau ou dérivés *in vitro* présentent une spécialisation pour la polarisation Tfh par rapport aux CD1a DC. Cette spécialisation fonctionnelle a été déterminée par l'analyse de la sécrétion de CXCL13 par les T_{CD14} et par leur capacité à induire la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B après co-culture. Dans notre étude, les CD14 DC générées *in vitro* induisent également des lymphocytes T CD4 produisant du CXCL13, toutefois les T_{CD1a} produisent de l'IL21 ce qui n'est pas le cas des T_{CD14}. Enfin, nous avons observé une capacité supérieure des lymphocytes T_{CD1a} à induire la prolifération et la maturation des lymphocytes B mémoires, ainsi que la production d'anticorps, contrairement à ce qui a été précédemment décrit. Toutefois, il est important de noter que contrairement à l'étude originelle qui avait utilisé des lymphocytes B naïfs pré-activés (Klechevsky et al., 2008), nous avons utilisés des lymphocytes B mémoires (IgD⁻ CD27⁺), ce qui pourrait expliquer les différences.

Lorsque nous avons utilisé ce modèle expérimental avec des T CD4 polarisés par les différentes MMC d'amygdales, nous avons obtenus des résultats très variables d'un donneur à l'autre, rendant nos données difficilement interprétables. Ainsi, nous avons conclu que la complexité expérimentale de ce modèle consistant à la mise en place de deux co-cultures successives induit une trop forte variabilité pour être utilisé avec nos cellules d'intérêt. Une alternative à ce modèle pourrait être l'utilisation de souris humanisées, ce qui nous permettrait d'évaluer *in vivo* les capacités des différentes sous populations de DC à induire une réponse anticorps et validerait nos observations réalisées *ex vivo*.

4. Analyse Single cell RNA seq des lymphocytes T CD4 mémoires des amygdales pour l'identification de différentes populations de Tfh

Nous avons émis l'hypothèse, à partir de notre analyse des cytokines produites par les GC Tfh et pré-Tfh, que ces deux populations possédaient différentes capacités concernant la production d'IL21 et de CXCL13. En effet les GC Tfh (CXCR5^{hi} PD1^{hi}) produisent majoritairement du CXCL13 mais peu ou pas

d'IL21. De plus, les cellules T produisant CXCL13 et IL21 représentent deux populations distinctes. Enfin, les pré-Tfh (CXCR5^{lo} PD1^{lo}) ne présentent aucune production de CXCL13 mais une forte expression d'IL21.

Afin d'analyser l'hétérogénéité des Tfh et de déterminer s'il existe véritablement deux populations distinctes, nous avons réalisé une analyse Single cell RNAseq à partir des lymphocytes T CD4 mémoires d'amygdale. La technologie utilisée est basée sur l'utilisation d'un système micro-fluidique de séquençage d'ARNm de cellule unique capturée dans une goutte (drop seq) (Zheng et al., 2017b). Cette technologie possède des limites, notamment à cause d'effets stochastiques de capture et/ou de dégradation de l'ARNm qui induisent une récupération partielle des ARNm d'une cellule, ainsi seul les ARNm les plus abondants sont séquencés. Pour contrer ces effets, il est nécessaire d'inclure suffisamment de cellules dans l'analyse afin d'extraire des informations fiables. Dans notre étude, environ 1200 cellules ont été incluses. Ainsi, une première analyse nous a permis d'identifier 4 « clusters » dont l'un présentant une signature Tfh. Toutefois, l'analyse des populations exprimant CXCL13 et IL21 ne permet pas de tirer des conclusions concernant leur identité en tant que populations distinctes, ceci étant dû à un nombre trop faible de cellules.

II. Discussion et perspectives des résultats obtenus

A. Spécialisation fonctionnelle des cDC2 et macrophages pour la polarisation Tfh et mécanismes moléculaires mis en place.

1. Résumé des résultats obtenus

Nous avons montré une spécialisation fonctionnelle des cDC2 et des macrophages des amygdales pour la polarisation Tfh. Toutefois, des différences ont été observées entre les cDC2 et macrophages puisque les macrophages induisent la sécrétion par les lymphocytes T d'une grande quantité de CXCL13 par rapport au cDC2, qui sont plus efficaces pour induire la sécrétion d'IL21. Nous avons pu également montrer que les cDC2 et macrophages sécrétaient des cytokines précédemment identifiées comme ayant un rôle dans l'induction des Tfh tel que IL12p70, ActivinA et TGFβ (Locci et al., 2016; Ma et al., 2009; Schmitt et al., 2014; Schmitt et al., 2009). Afin de confirmer le rôle de ces cytokines dans la polarisation induite par les MMC d'amygdales, nous avons utilisé des anticorps bloquants dans nos expériences de polarisation T helper. Ainsi nous avons confirmé le rôle de l'IL12p70, de l'Activin A et du TGFβ dans l'induction des Tfh humains. Nos résultats suggèrent également un rôle

de l'Activin A et de TGF β dans l'induction de la sécrétion de CXCL13 alors que l'IL12p70 serait impliquée dans l'induction de la sécrétion d'IL21.

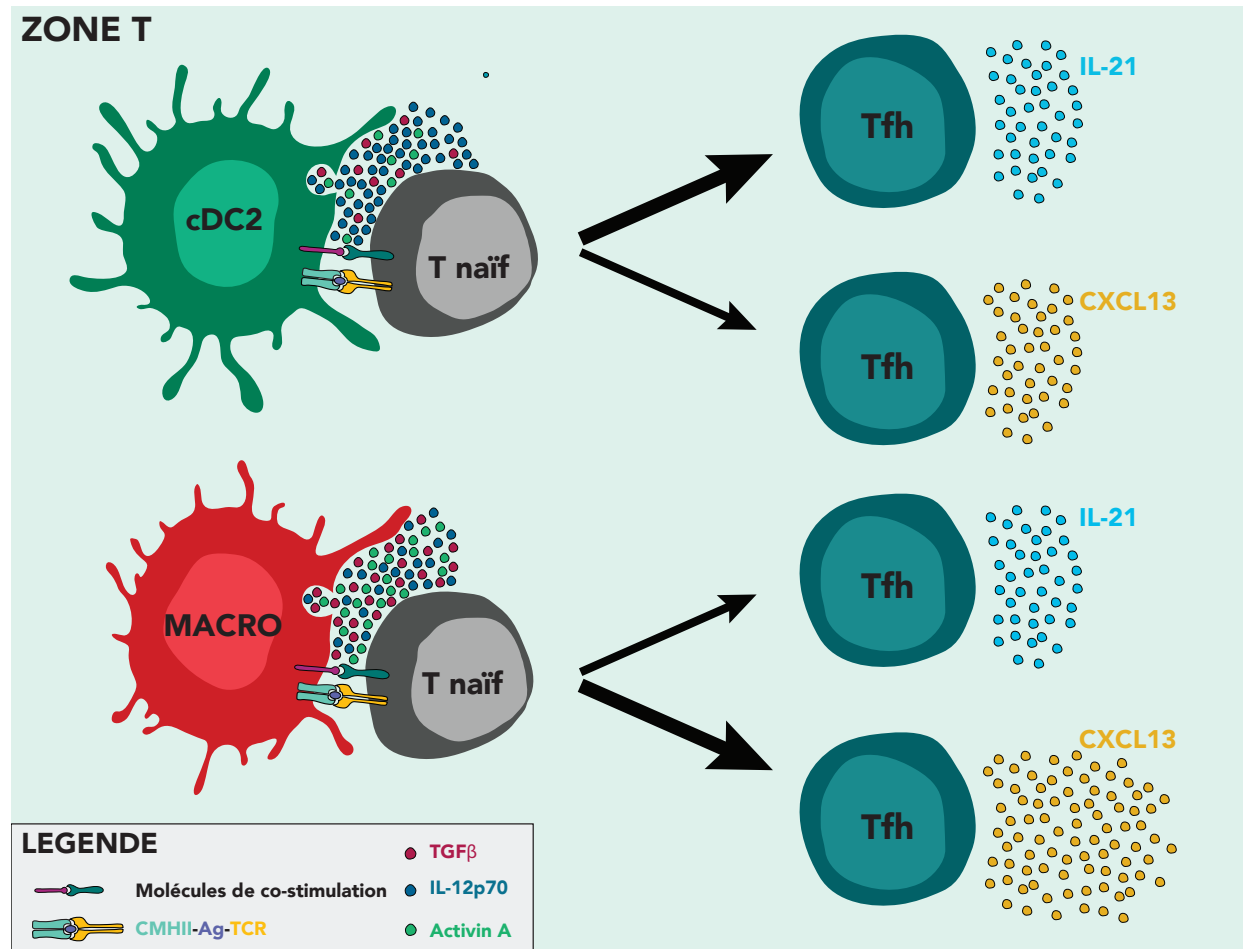


Figure 19 : Spécialisation fonctionnelle des cDC2 et macrophages pour la polarisation Tfh.

Les cDC2 et macrophages résidents des amygdales sécrètent IL12p70, ActivinA et TGF β , cytokines impliquées dans la polarisation Tfh. Toutefois les cDC2 sont plus compétentes pour la sécrétion d'IL12p70 que les macrophages et induisent majoritairement la polarisation de Tfh sécrétant IL21 alors que les macrophages induisent préférentiellement des Tfh sécrétant CXCL13.

2. Spécialisation des cDC2 et macro pour la polarisation Tfh

Nous avons montré dans notre étude que les cDC2 provenant d'amygdales possédaient une spécialisation fonctionnelle pour l'induction de Tfh produisant IL21. Nous avons également montré que les cDC2 d'amygdales sécrétaient, après stimulation, de l'IL12p70 contrairement aux cDC1 et pDC. Ce résultat est cohérent avec de précédentes études montrant une capacité supérieure des cDC2 pour la sécrétion d'IL12p70 après activation avec différents stimuli (Hémont et al., 2013; Mittag et al., 2011a; Nizzoli et al., 2013b). Les cDC2 ont également la capacité de sécréter de l'Activin A et du TGF β , indépendamment de leur activation. Les différentes sous populations de DC ont une capacité similaire

de sécrétion du TGF β . Par contre, seules les cDC2 expriment l'intégrine $\alpha\beta 8$ qui participe à l'activation du TGF β latent (Wipff and Hinz, 2008), ce qui est cohérent avec une étude récente montrant que les cDC2 de l'intestin, mais pas les cDC1, expriment l'intégrine $\alpha\beta 8$ et induisent l'activation du TGF β (Fenton et al., 2017a).

L'analyse transcriptomique des sous populations de DC provenant de plusieurs tissus a montré un profil transcriptomique majoritairement influencé par l'ontogénie des différentes sous populations de DC, et non par le microenvironnement (Heidkamp et al., 2016b; Miller et al., 2012a). Ceci suggère que la spécialisation fonctionnelle des cDC2 pour la polarisation Tfh serait partagée par les cDC2 d'autres tissus. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons analysé la capacité des cDC2 et cDC1 provenant du sang et des ganglions lymphatiques à induire une polarisation Tfh. Nous avons pu observer, qu'indépendamment de leur tissu d'origine, les cDC2 sont les DC résidentes les plus compétentes pour l'induction de lymphocytes T sécrétant CXCL13. Une étude récente a également montré que les cDC2 du sang, après activation, était plus compétentes pour l'induction de lymphocytes sécrétant IL21 que les cDC1 (Pattarini et al., 2017a). Ceci suggère que la spécialisation des cDC2 pour l'induction de la polarisation Tfh serait commune à toutes les cDC2, indépendamment de leur localisation. Cependant, il a été précédemment montré que les cDC2 provenant de la peau étaient moins compétentes que les CD14 DC pour l'induction de cellules T sécrétant CXCL13 et pour l'induction d'une production d'anticorps par les lymphocytes B (Klechevsky et al., 2008). Ainsi, la spécialisation fonctionnelle des cDC2 pour la polarisation Tfh doit être confirmée avec des DC provenant d'autres tissus.

Les macrophages résidents de l'amygdale quant à eux induisent la polarisation des lymphocytes T sécrétant CXCL13. Les macrophages sont capables de sécréter de l'IL12p70 après activation, mais moins efficacement que les cDC2. Ils sécrètent également de l'ActivinA, du TGF β et expriment l'intégrine $\alpha\beta 8$, ce qui suggère qu'ils possèdent la capacité d'activation du TGF β latent. Par opposition aux DC, les macrophages résidents ont une origine embryonnaire et possèdent la capacité d'autorenouveau, il a été proposé que leurs fonctions étaient fortement liées à leur tissu d'origine (Gosselin et al., 2014; Lavin et al., 2014; Okabe and Medzhitov, 2014). Or, les amygdales ont un rôle clé dans l'établissement de réponses humores. En effet, l'exposition constante aux antigènes des voies respiratoires induit la formation de large GC. Ainsi, la spécialisation fonctionnelle des macrophages pour la polarisation Tfh et leur capacité à induire la prolifération des lymphocytes T et la sécrétion de grande quantité de CXCL13 par les cellules T, pourraient être dépendantes de leur tissu d'origine, ici les

amygdales. Il serait intéressant de confirmer ceci en analysant la capacité d'induction des réponses T CD4 avec des macrophages résidents provenant d'autres tissus.

3. Mécanismes moléculaires de l'induction de la polarisation Tfh par les cDC2 et macrophages

La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de la polarisation des Tfh représente un défi de taille pour la compréhension du développement des Tfh. Différentes cytokines ont été proposées comme étant importantes pour la polarisation des Tfh humains (IL12p70, Activin A, TGF β). Par l'utilisation d'anticorps bloquants, nous avons confirmé le rôle de ces cytokines dans l'induction de la polarisation Tfh. Ainsi, l'IL12p70 aurait un rôle dans l'induction de la sécrétion d'IL21, alors que l'Activin A et le TGF β induiraient la sécrétion de CXCL13. Toutefois, dans nos expériences de neutralisation des cytokines, nous n'avons pas obtenu l'inhibition totale de la polarisation Tfh. Ceci suggère une implication d'autres cytokines ou de molécules de co-stimulations dans l'induction de la polarisation Tfh.

Les molécules de co-stimulation ICOS (Choi et al., 2011) et OX40L (Brockner et al., 1999; Flynn et al., 1998) ont été proposées comme jouant un rôle dans l'induction des Tfh. Au cours de notre étude, nous avons analysé l'expression des molécules de co-stimulation ICOSL et OX40L par les DC et macrophages *ex vivo*. Nous avons ainsi pu observer qu'ICOSL n'était exprimé par aucune des populations de MMC de l'amygdale, suggérant ainsi une absence de rôle d'ICOSL dans la polarisation Tfh que nous observons avec les cDC2 et macrophages. Il a été proposé que la signalisation ICOS/ICOSL aurait un rôle dans la migration des Tfh vers le follicule B et dans le maintien de la polarisation Tfh par les GC Tfh. En effet, l'activation d'ICOS permettrait la rétention des Tfh dans le GC et favoriserait l'expression de Bcl6 (Hutloff, 2015; Weber et al., 2015). Ainsi, nos résultats suggèrent que la signalisation ICOS/ICOSL ne serait pas impliqué dans les étapes précoces de différenciation des Tfh.

A l'inverse, les cDC2 et macrophages d'amygdales expriment OX40L *ex vivo*, contrairement aux cDC1 et pDC. Ainsi, il serait intéressant d'analyser le rôle d'OX40L dans l'induction de la polarisation Tfh. En effet, différentes études à partir de cellules humaines ont montré un rôle d'OX40L dans l'induction des Tfh. Ainsi, les cDC du sang activées par TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) induisent la différenciation des T CD4 en Tfh via OX40L (Pattarini et al., 2017a). De plus, chez des patients souffrant de Lupus érythémateux disséminé (SLE), la signalisation OX40/OX40L induit la polarisation des Tfh (Jacquemin et al., 2015). Afin de mettre en évidence le rôle du complexe de co-stimulation OX40L-OX40 dans la polarisation Tfh, nous souhaiterions inhiber l'expression d'OX40 dans les lymphocytes T

CD4 naïfs en utilisant des shRNA. En effet, il n'existe pas d'anticorps bloquant efficace dirigé contre OX40L, et l'inhibition de l'expression de cette molécule dans les MMC via l'utilisation de shRNA n'est pas envisageable à cause d'un nombre trop faible de cellules. Ainsi, ce modèle de délétion OX40 nous permettrait de tester le rôle du signal OX40/OX40L dans l'induction de la polarisation Tfh. Il serait également intéressant de bloquer à la fois le signal OX40/OX40L et les cytokines IL12p70, Activin A et TGF β , afin de neutraliser l'ensemble de ces facteurs et d'évaluer l'impact sur l'induction de la polarisation Tfh.

B. Identification de deux sous populations distinctes de Tfh

1. Résumé des résultats obtenus

Dans notre étude, nous avons montré, via l'analyse de la sécrétion de CXCL13 et de la production d'IL21, que les cDC2 et macrophages induisaient la polarisation Tfh des lymphocytes T CD4 naïfs. Cependant, nous avons également observé que les cellules produisant IL21 étaient distinctes des cellules produisant CXCL13. Nous avons donc émis l'hypothèse que les Tfh comprenaient deux sous populations distinctes. Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé la capacité des Tfh directement purifiés d'amygdales à produire IL21 et CXCL13 par FACS intracellulaire. Nous avons pu mettre en évidence que les GC Tfh (CXCR5^{hi} PD1^{hi}) de l'amygdale produisaient majoritairement CXCL13, par opposition aux pré-Tfh (CXCR5^{lo} PD1^{lo}) qui eux ne produisent pas de CXCL13 mais produisent de larges quantités d'IL21. Dans les deux cas, aucune cellule n'a montré de co-expression de CXCL13 et IL21, ce qui est cohérent avec l'hypothèse de la présence de deux sous-populations de Tfh.

L'existence de ces deux sous-populations de Tfh est soutenue par deux études montrant deux populations de Tfh localisées pour l'une au niveau des GC et pour la seconde à la bordure T:B chez la souris (Suan et al., 2015) et chez l'Homme (Bentebibel et al., 2011a). De plus, l'analyse transcriptionnelle de l'expression de CXCL13 et IL21 par les GC Tfh et les pré-Tfh d'amygdales a également montré une expression différentielle de ces deux cytokines, ce qui est cohérent avec nos observations (Bentebibel et al., 2011a).

Afin de mieux définir ces deux sous populations de Tfh humains, nous avons choisi une approche par « Single cell RNAseq » sur la population de lymphocytes T CD4 mémoires (CD45RO⁺) de l'amygdale. Malgré les limitations techniques auxquelles nous avons dû faire face (cf I.B.4), notre analyse montre que les populations exprimant CXCL13 et IL21 sont présentes dans un même « cluster », identifié par l'analyse bio-informatique et défini par une signature Tfh. Malgré un faible nombre de cellules exprimant CXCL13 et/ou IL21, nous avons pu observer une population minime de cellules

exprimant à la fois CXCL13 et IL21 (11 cellules) par rapport aux cellules exprimant uniquement CXCL13 (86 cellules) ou IL21 (33 cellules). Ces premiers résultats suggèrent effectivement la présence de deux populations distinctes. Toutefois, notre analyse nécessite confirmation avec l'inclusion d'un plus grand nombre de cellules pour contourner les limites expérimentales de cette technique.

2. Relevance physiologique de l'existence de ces deux sous-populations de Tfh.

Ces deux populations de Tfh permettraient, par leurs rôles différents mais complémentaires, de mettre en place une réponse humorale efficace avec l'induction de lymphocytes B de haute affinité.

A la bordure T:B, les pré Tfh induisent l'activation de lymphocytes B naïfs qui se différencient en plasmocytes extracellulaires ou poursuivent leur différenciation en réentrant dans le follicules B et subissent différentes étapes de sélection. Chez l'Homme, les pré-Tfh CXCR5^{lo} PD1^{lo} produisent de larges quantités d'IL21 (Figure 5) suggérant ainsi un rôle important d'IL21 dans la phase extrafolliculaire de différenciation des cellules B. Chez l'Homme, les mutations induisant la perte de fonction de l'IL21 ou de l'IL21 récepteur (IL21R) n'induisent pas de perte totale de lymphocytes B mémoires, mais seulement une diminution. Ceci qui est cohérent avec un rôle de l'IL21 dans la phase d'initiation de l'activation des lymphocytes B localisée à l'extérieur du follicule B (Ma et al., 2015). Toutefois, une diminution drastique de commutation isotypique est observée chez ces patients déficients pour l'IL21 ou l'IL21R, ce qui met en évidence un rôle qualitatif de l'IL21 pour la différenciation des lymphocytes B dans le GC (Ma et al., 2015).

Les GC Tfh expriment fortement CXCR5 et PD1 et produisent la chimiokine CXCL13, mais peu d'IL21 (Figure 5). Cette observation apparaît contradictoire par rapport au rôle qualitatif de l'IL21 dans le GC. Toutefois, si l'on se replace dans le contexte tissulaire et fonctionnel des GC Tfh, ces observations pourrait prendre sens. En effet, les GC Tfh ont pour fonction d'apporter de l'aide aux lymphocytes B de manière sélective, par conséquent la production et la sécrétion massive de facteurs impliqués dans l'aide aux lymphocytes B comme l'IL21 ne seraient pas avantageux physiologiquement. Ainsi, une sécrétion de ces facteurs qualitative et concentrée à la synapse apparaît plus appropriée pour la mise en place d'une sélection efficace des lymphocytes B par les GC Tfh. Pour le moment, très peu d'éléments existent pour valider cette hypothèse.

Toutefois, une étude récente analysant les sites de fixations à l'ADN de Bcl6 dans les GC Tfh des amygdales nous apporte quelques éléments de réflexion (Hatzi et al., 2015). L'une des observations

particulièrement intéressantes de cette étude est la capacité de Bcl6 à se lier à AP1 (Activator Protein 1). L'expression de AP1 est induite par l'activation du TCR. Or, dans le GC, les Tfh sont constamment sollicités via l'activation de leur TCR, induisant l'expression de AP1 probablement de manière continue. Dans les GC Tfh, AP1 est impliqué dans la synthèse des facteurs d'aide aux lymphocytes B comme IL21, IL4 ou encore CD40L. Bcl6 et AP1 co-localisent au niveau de promoteurs et « d'enhancers » que Bcl6 réprime dans les Tfh, suggérant que Bcl6 contrôle l'activité de AP1 pour limiter la transcription des gènes induits par AP1. Enfin, cette étude montre que, dans les GC Tfh, Bcl6 se lie au locus du gène IL21. Tous ces éléments nous permettent d'émettre l'hypothèse que Bcl6 limite la sécrétion des facteurs comme IL21 dans les GC Tfh, ce qui expliquerait pourquoi nous détectons une faible production d'IL21 par les GC Tfh. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions analyser la production d'IL21 par les GC Tfh après co-culture avec des lymphocytes B purifiés des amygdales. L'imagerie est également envisageable pour analyser plus précisément la synapse immunologique. En effet, l'utilisation d'un microscope TIRF (Total internal Reflection fluorescence) nous permettrait d'analyser la sécrétion éventuelle d'IL21 à l'échelle de la synapse immunologique. Ceci nous permettrait de déterminer si la sécrétion d'IL21 par les GC Tfh est ciblée et localisée à la synapse immunologique.

Contrairement à l'IL21, la sécrétion de CXCL13 par les GC Tfh semble constitutive. En effet, nous avons pu observer que même en l'absence d'activation, les GC Tfh produisaient du CXCL13 en grande quantité. Cette sécrétion constitutive de CXCL13 par les GC Tfh suggère un rôle chimioattractant. En effet, CXCL13 est le ligand de CXCR5 qui est fortement exprimé par les Tfh et les lymphocytes B, et a un rôle dans la migration des lymphocytes B et dans la formation des GC (Ansel et al., 1999; Förster et al., 1996). Ainsi, en sécrétant CXCL13 les GC Tfh participeraient à la migration des lymphocytes B, nouvellement activés par les pré-Tfh, dans le follicule et plus particulièrement dans le GC. De plus, il a été proposé que l'une des première phase de la formation des GC était la migration des Tfh de la bordure T:B jusqu'au centre des follicule B (De Silva and Klein, 2015). On pourrait ainsi imaginer que l'arrivée des Tfh avant les lymphocytes B dans le follicule B permette d'augmenter la concentration de CXCL13 dans le microenvironnement, afin de favoriser le retour des lymphocytes B au centre des follicules B et amorcer ainsi la formation des GC.

Cette hypothèse d'un rôle des Tfh dans l'initiation de la formation des GC serait en accord avec l'hypothèse que les deux populations de Tfh, de la bordure T:B et du GC, correspondraient à deux stades de différenciation des Tfh. En effet, les futurs GC Tfh ne migrent au centre du follicule B qu'après interaction avec les lymphocytes B à la bordure T:B (Kerfoot et al., 2011). Cependant, les études sur la

dynamique de migration des lymphocytes B et des Tfh au cours d'une réponse immune ont été réalisées chez la souris, or les Tfh murins et humains comportent des différences non négligeables. En effet, l'initiation de la polarisation des Tfh murins par les DC serait induit par la sécrétion d'IL6 et d'IL21 (Choi et al., 2013; Nurieva et al., 2008). En revanche, chez l'Homme, l'IL6 ne jouerait pas de rôle dans l'initiation de la polarisation (Schmitt et al., 2014) et l'IL21 pourrait être impliqué mais de façon restreinte, tout comme l'IL13 (Schmitt et al., 2013). Enfin, les GC Tfh murins, à l'inverse des GC Tfh humains, ne sécrètent pas de CXCL13 mais sécrètent de large quantité d'IL21 (Luthje et al., 2012a; Suan et al., 2015). Ainsi, les Tfh murins et humains présentent des différences physiologiques importantes ne permettant pas toujours de transposer les avancées d'une espèce à l'autre.

III. Conclusion

Les Tfh jouent un rôle essentiel dans la mise en place de réponses immunes humores. En effet, ils participent à la formation des centres germinatifs, au développement d'anticorps et de lymphocytes B mémoires de haute affinité. Les Tfh ont un rôle central dans la mise en place de réponses immunes protectives contre divers pathogènes et représentent donc des cibles de choix pour le développement de nouvelles stratégies vaccinales. Les Tfh sont aussi impliqués dans diverses pathologies et plus particulièrement dans des maladies autoimmunes. Ainsi, comprendre les mécanismes biologiques du développement, de la maturation et des fonctions des Tfh humains apparaît crucial pour l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étape d'initiation du développement des Tfh. Nous avons pu identifier un rôle clé des cDC2 et macrophages résidents de l'amygdale pour l'induction de la polarisation Tfh, à travers leur capacité à sécréter les cytokines IL12p70, Activin A et TGF β . Nos résultats suggèrent également l'existence de deux sous populations de Tfh caractérisées soit par l'expression d'IL21 soit par l'expression de CXCL13. Ainsi nous avons apporté de nouveaux éléments pour la compréhension de l'initiation de la différenciation des Tfh humains.

BIBLIOGRAPHIE

- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 Promotes a Distinct CD4 T Cell Activation State Characterized by the Production of Interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry* 278, 1910-1914.
- Allam, J.-P., Peng, W.-M., Appel, T., Wenghoefer, M., Niederhagen, B., Bieber, T., Bergé, S., and Novak, N. (2008). Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121, 368-374.e361.
- Amit, I., Winter, D.R., and Jung, S. (2016). The role of the local environment and epigenetics in shaping macrophage identity and their effect on tissue homeostasis. *Nat Immunol* 17, 18-25.
- Ansel, K.M., McHeyzer-Williams, L.J., Ngo, V.N., McHeyzer-Williams, M.G., and Cyster, J.G. (1999). In Vivo-Activated Cd4 T Cells Upregulate Cxc Chemokine Receptor 5 and Reprogram Their Response to Lymphoid Chemokines. *The Journal of Experimental Medicine* 190, 1123-1134.
- Arnold, C.E., Gordon, P., Barker, R.N., and Wilson, H.M. (2015). The activation status of human macrophages presenting antigen determines the efficiency of Th17 responses. *Immunobiology* 220, 10-19.
- Avery, D.T., Bryant, V.L., Ma, C.S., de Waal Malefyt, R., and Tangye, S.G. (2008). IL-21-Induced Isotype Switching to IgG and IgA by Human Naive B Cells Is Differentially Regulated by IL-4. *The Journal of Immunology* 181, 1767-1779.
- Avery, D.T., Deenick, E.K., Ma, C.S., Suryani, S., Simpson, N., Chew, G.Y., Chan, T.D., Palendira, U., Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., et al. (2010). B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 155-171.
- Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., et al. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 1273.
- Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Gomez Perdiguero, E., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol* 15, 929-937.
- Bajaña, S., Roach, K., Turner, S., Paul, J., and Kovats, S. (2012). IRF4 Promotes Cutaneous Dendritic Cell Migration to Lymph Nodes during Homeostasis and Inflammation. *The Journal of Immunology* 189, 3368.
- Balan, S., and Dalod, M. (2016). In Vitro Generation of Human XCR1⁺ Dendritic Cells from CD34⁺ Hematopoietic Progenitors. In *Dendritic Cell Protocols*, E. Segura, and N. Onai, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 19-37.
- Balan, S., Ollion, V., Colletti, N., Chelbi, R., Montanana-Sanchis, F., Liu, H., Vu Manh, T.-P., Sanchez, C., Savoret, J., Perrot, I., et al. (2014). Human XCR1⁺ Dendritic Cells Derived In Vitro from CD34⁺ Progenitors Closely Resemble Blood Dendritic Cells, Including Their Adjuvant Responsiveness, Contrary to Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 193, 1622.
- Ballesteros-Tato, A., León, B., Graf, Beth A., Moquin, A., Adams, Pamela S., Lund, Frances E., and Randall, Troy D. (2012). Interleukin-2 Inhibits Germinal Center Formation by Limiting T Follicular Helper Cell Differentiation. *Immunity* 36, 847-856.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* 18, 767-811.
- Banchereau, J., Thompson-Snipes, L., Zurawski, S., Blanck, J.-P., Cao, Y., Clayton, S., Gorvel, J.-P., Zurawski, G., and Klechevsky, E. (2012). The differential production of cytokines by human Langerhans cells and dermal CD14⁺ DCs controls CTL priming. *Blood* 119, 5742.
- Banchereau, R., Baldwin, N., Cepika, A.-M., Athale, S., Xue, Y., Yu, C.I., Metang, P., Cheruku, A., Berthier, I., Gayet, I., et al. (2014). Transcriptional specialization of human dendritic cell subsets in response to microbial vaccines. *Nature Communications* 5, 5283.
- Baumjohann, D., Okada, T., and Ansel, K.M. (2011). Cutting Edge: Distinct Waves of BCL6 Expression during T Follicular Helper Cell Development. *The Journal of Immunology* 187, 2089-2092.
- Bauquet, A.T., Jin, H., Paterson, A.M., Mitsdoerffer, M., Ho, I.C., Sharpe, A.H., and Kuchroo, V.K. (2009). Costimulatory molecule ICOS plays a critical role in the development of T(H)-17 and follicular T-helper cells by regulating c-Maf expression and IL-21 production. *Nature immunology* 10, 167-175.
- Benson, R.A., MacLeod, M.K.L., Hale, B.G., Patakas, A., Garside, P., and Brewer, J.M. (2015). Antigen presentation kinetics control T cell/dendritic cell interactions and follicular helper T cell generation in vivo. *eLife* 4, e06994.
- Bentebibel, S.-E., Schmitt, N., Banchereau, J., and Ueno, H. (2011a). Human tonsil B-cell lymphoma 6 (BCL6)-expressing CD4⁺ T-cell subset specialized for B-cell help outside germinal centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, E488-E497.
- Bentebibel, S.E., Schmitt, N., Banchereau, J., and Ueno, H. (2011b). Human tonsil B-cell lymphoma 6 (BCL6)-expressing CD4⁺ T-cell subset specialized for B-cell help outside germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E488-497.

- Benvenuti, F., Lagaudrière-Gesbert, C., Grandjean, I., Jancic, C., Hivroz, C., Trautmann, A., Lantz, O., and Amigorena, S. (2003). Dendritic Cell Maturation Controls Adhesion, Synapse Formation, and the Duration of the Interactions with Naive T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 172, 292.
- Bigley, V., and Collin, M. (2011). Dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency defines the lost lineages of a new &emGATA-2&em dependent myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 96, 1081.
- Bigley, V., Haniffa, M., Doulatov, S., Wang, X.-N., Dickinson, R., McGovern, N., Jardine, L., Pagan, S., Dimmick, I., Chua, I., et al. (2011). The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *The Journal of Experimental Medicine* 208, 227.
- Boltjes, A., and Van Wijk, F. (2014). Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation. *Frontiers in Immunology* 5, 131.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Förster, R. (2000). Follicular B Helper T Cells Express Cxc Chemokine Receptor 5, Localize to B Cell Follicles, and Support Immunoglobulin Production. *The Journal of Experimental Medicine* 192, 1545-1552.
- Breton, G., Lee, J., Zhou, Y.J., Schreiber, J.J., Keler, T., Puhr, S., Anandasabapathy, N., Schlesinger, S., Caskey, M., Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2015). Circulating precursors of human CD1c&sup&+&sup& and CD141&sup&+&sup& dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 212, 401.
- Breton, G., Zheng, S., Valieris, R., Tojal da Silva, I., Satija, R., and Nussenzweig, M.C. (2016). Human dendritic cells (DCs) are derived from distinct circulating precursors that are precommitted to become CD1c&sup&+&sup& or CD141&sup&+&sup& DCs. *The Journal of Experimental Medicine* 213, 2861.
- Brocker, T., Gulbranson-Judge, A., Flynn, S., Riedinger, M., Raykundalia, C., and Lane, P. (1999). CD4 T cell traffic control: in vivo evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles. *European Journal of Immunology* 29, 1610-1616.
- Brodin, P., and Davis, M.M. (2017). Human immune system variation. *Nat Rev Immunol* 17, 21-29.
- Bryant, V.L., Ma, C.S., Avery, D.T., Li, Y., Good, K.L., Corcoran, L.M., de Waal Malefyt, R., and Tangye, S.G. (2007). Cytokine-Mediated Regulation of Human B Cell Differentiation into Ig-Secreting Cells: Predominant Role of IL-21 Produced by CXCR5⁺ T Follicular Helper Cells. *The Journal of Immunology* 179, 8180-8190.
- Buchrieser, J., James, W., and Moore, M.D. (2017). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Macrophages Share Ontogeny with MYB-Independent Tissue-Resident Macrophages. *Stem Cell Reports* 8, 334-345.
- Calabro, S., Gallman, A., Gowthaman, U., Liu, D., Chen, P., Liu, J., Krishnaswamy, J.K., Nascimento, M.S., Xu, L., Patel, S.R., et al. (2016). Bridging channel dendritic cells induce immunity to transfused red blood cells. *J Exp Med* 213, 887-896.
- Caminschi, I., Proietto, A.I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Shin Teh, J., Lo, J.C., Rizzitelli, A., Wu, L., Vremec, D., van Dommelen, S.L., et al. (2008). The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* 112, 3264-3273.
- Cannons, J.L., Wu, J.Z., Gomez-Rodriguez, J., Zhang, J., Dong, B., Liu, Y., Shaw, S., Siminovitch, K.A., and Schwartzberg, P.L. (2010). Biochemical and Genetic Evidence for a SAP-PKC-θ Interaction Contributing to IL-4 Regulation. *The Journal of Immunology* 185, 2819-2827.
- Cannons, J.L., Yu, L.J., Jankovic, D., Crotty, S., Horai, R., Kirby, M., Anderson, S., Cheever, A.W., Sher, A., and Schwartzberg, P.L. (2006). SAP regulates T cell-mediated help for humoral immunity by a mechanism distinct from cytokine regulation. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 1551-1565.
- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1992). GM-CSF and TNF-[alpha] cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360, 258-261.
- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 1, 305-310.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5, 919-923.
- Celli, S., Lemaître, F., and Bousso, P. (2007). Real-Time Manipulation of T Cell-Dendritic Cell Interactions In Vivo Reveals the Importance of Prolonged Contacts for CD4+ T Cell Activation. *Immunity* 27, 625-634.
- Cerboni, S., Gentili, M., and Manel, N. (2013). Chapter Eight - Diversity of Pathogen Sensors in Dendritic Cells. In *Advances in Immunology*, K.M. Murphy, and M. Merad, eds. (Academic Press), pp. 211-237.
- Chan, T.D., Gatto, D., Wood, K., Camidge, T., Basten, A., and Brink, R. (2009). Antigen Affinity Controls Rapid T-Dependent Antibody Production by Driving the Expansion Rather than the Differentiation or Extrafollicular Migration of Early Plasmablasts. *The Journal of Immunology* 183, 3139.
- Chang, Q., Ornatsky, O.I., Siddiqui, I., Loboda, A., Baranov, V.I., and Hedley, D.W. (2017). Imaging Mass Cytometry. *Cytometry A* 91, 160-169.
- Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13, 227-242.
- Chen, Q., Cannons, J.L., Paton, J.C., Akiba, H., Schwartzberg, P.L., and Snapper, C.M. (2008). A Novel ICOS-Independent, but CD28- and SAP-Dependent, Pathway of T Cell-Dependent, Polysaccharide-Specific Humoral Immunity in Response to Intact Streptococcus pneumoniae versus Pneumococcal Conjugate Vaccine. *The Journal of Immunology* 181, 8258-8266.

- Chen, W., Antonenko, S., Sederstrom, J.M., Liang, X., Chan, A.S.H., Kanzler, H., Blom, B., Blazar, B.R., and Liu, Y.-J. (2004). Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* 103, 2547.
- Chiang, M.-C., Tullett, K.M., Lee, Y.S., Idris, A., Ding, Y., McDonald, K.J., Kassianos, A., Leal Rojas, I.M., Jeet, V., Lahoud, M.H., and Radford, K.J. (2016). Differential uptake and cross-presentation of soluble and necrotic cell antigen by human DC subsets. *European Journal of Immunology* 46, 329-339.
- Choi, Y.S., Eto, D., Yang, J.A., Lao, C., and Crotty, S. (2013). Cutting Edge: STAT1 Is Required for IL-6-Mediated Bcl6 Induction for Early Follicular Helper Cell Differentiation. *The Journal of Immunology* 190, 3049-3053.
- Choi, Youn S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, Tania C., Johnston, Robert J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6. *Immunity* 34, 932-946.
- Chtanova, T., Tangye, S.G., Newton, R., Frank, N., Hodge, M.R., Rolph, M.S., and Mackay, C.R. (2004). T Follicular Helper Cells Express a Distinctive Transcriptional Profile, Reflecting Their Role as Non-Th1/Th2 Effector Cells That Provide Help for B Cells. *The Journal of Immunology* 173, 68-78.
- Chu, C., Wang, Y., Zhang, X., Ni, X., Cao, J., Xu, W., Dong, Z., Yuan, P., Wei, W., Ma, Y., et al. (2014). SAP-Regulated T Cell-APC Adhesion and Ligation-Dependent and -Independent Ly108-CD3 ζ Interactions. *The Journal of Immunology* 193, 3860-3871.
- Chu, C.-C., Ali, N., Karagiannis, P., Di Meglio, P., Skowera, A., Napolitano, L., Barinaga, G., Grys, K., Sharif-Paghaleh, E., Karagiannis, S.N., et al. (2012). Resident CD141 (BDCA3)⁺⁺ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* 209, 935.
- Cisse, B., Caton, M.L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N.S., Kant, S.G., et al. (2008). Transcription Factor E2-2 Is an Essential and Specific Regulator of Plasmacytoid Dendritic Cell Development. *Cell* 135, 37-48.
- Claman, H.N., Chaperon, E.A., and Triplett, R.F. (1966). Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. *Proc Soc Exp Biol Med* 122, 1167-1171.
- Cohn, L., Chatterjee, B., Esselborn, F., Smed-Sørensen, A., Nakamura, N., Chalouni, C., Lee, B.-C., Vandlen, R., Keler, T., Lauer, P., et al. (2013). Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3⁺⁺ dendritic cells at cross presentation. *The Journal of Experimental Medicine* 210, 1049.
- Crotty, S. (2011). Follicular Helper CD4 T Cells (TFH). *Annual Review of Immunology* 29, 621-663.
- Crotty, S. (2014). T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity* 41, 529-542.
- Crotty, S. (2015). A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol* 15, 185-189.
- Crotty, S. (2017). Do Memory CD4 T Cells Keep Their Cell-Type Programming: Plasticity versus Fate Commitment?: Complexities of Interpretation due to the Heterogeneity of Memory CD4 T Cells, Including T Follicular Helper Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Crotty, S., Kersh, E.N., Cannons, J., Schwartzberg, P.L., and Ahmed, R. (2003). SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* 421, 282-287.
- Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.-A., Ventre, E., Vu Manh, T.-P., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., et al. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 α ⁺⁺ dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 1283.
- Cunningham, A.F., Serre, K., Mohr, E., Khan, M., and Toellner, K.-M. (2004). Loss of CD154 impairs the Th2 extrafollicular plasma cell response but not early T cell proliferation and interleukin-4 induction. *Immunology* 113, 187-193.
- Curtsinger, J.M., and Mescher, M.F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Current Opinion in Immunology* 22, 333-340.
- Cyster, J.G., Dang, E.V., Reboldi, A., and Yi, T. (2014). 25-Hydroxycholesterols in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 14, 731-743.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14, 986-995.
- De Jager, P.L., Hacohen, N., Mathis, D., Regev, A., Stranger, B.E., and Benoist, C. (2015). ImmVar project: Insights and design considerations for future studies of “healthy” immune variation. *Seminars in Immunology* 27, 51-57.
- De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* 15, 137-148.
- Deenick, E.K., Chan, A., Ma, C.S., Gatto, D., Schwartzberg, P.L., Brink, R., and Tangye, S.G. (2010). Follicular Helper T Cell Differentiation Requires Continuous Antigen Presentation that Is Independent of Unique B Cell Signaling. *Immunity* 33, 241-253.
- Deenick, E.K., Ma, C.S., Brink, R., and Tangye, S.G. (2011). Regulation of T follicular helper cell formation and function by antigen presenting cells. *Current Opinion in Immunology* 23, 111-118.
- deLuca, L.S., and Gommerman, J.L. (2012). Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. *Nat Rev Immunol* 12, 339-351.
- den Haan, J.M.M., and Bevan, M.J. (2002). Constitutive versus Activation-dependent Cross-Presentation of Immune Complexes by CD8⁺⁺ and CD8⁺⁻⁻ Dendritic Cells In Vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 196, 817.

- den Haan, J.M.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). $\text{CD8}^+\text{ but Not } \text{CD8}^-$ Dendritic Cells Cross-Prime Cytotoxic T Cells in Vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 192, 1685.
- Desch, A.N., Gibbings, S.L., Clambey, E.T., Janssen, W.J., Slansky, J.E., Kedl, R.M., Henson, P.M., and Jakubczik, C. (2014). Dendritic cell subsets require cis-activation for cytotoxic CD8 T-cell induction. *5*, 4674.
- Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sorensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., Xue, Y., Mellman, I., Banchereau, J., and Connolly, J.E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol* 9, 551-557.
- Dienz, O., Eaton, S.M., Bond, J.P., Neveu, W., Moquin, D., Noubade, R., Briso, E.M., Charland, C., Leonard, W.J., Ciliberto, G., et al. (2009). The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4^+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 206, 69-78.
- Dillon, S.M., Rogers, L.M., Howe, R., Hostetler, L.A., Buhrman, J., McCarter, M.D., and Wilson, C.C. (2010). Human Intestinal Lamina Propria CD1c^+ Dendritic Cells Display an Activated Phenotype at Steady State and Produce IL-23 in Response to TLR7/8 Stimulation. *The Journal of Immunology* 184, 6612.
- Dong, C., Juedes, A.E., Temann, U.-A., Shresta, S., Allison, J.P., Ruddle, N.H., and Flavell, R.A. (2001). ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409, 97-101.
- Doulatov, S., Notta, F., Eppert, K., Nguyen, L.T., Ohashi, P.S., and Dick, J.E. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol* 11, 585-593.
- Dufort, F.J., Bleiman, B.F., Gumina, M.R., Blair, D., Wagner, D.J., Roberts, M.F., Abu-Amer, Y., and Chiles, T.C. (2007). Cutting Edge: IL-4-Mediated Protection of Primary B Lymphocytes from Apoptosis via Stat6-Dependent Regulation of Glycolytic Metabolism. *The Journal of Immunology* 179, 4953-4957.
- Duluc, D., Gannevat, J., Anguiano, E., Zurawski, S., Carley, M., Boreham, M., Stecher, J., Dullaers, M., Banchereau, J., and Oh, S. (2013). Functional diversity of human vaginal APC subsets in directing T-cell responses. *Mucosal Immunol* 6, 626-638.
- Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cells in Human Peripheral Blood. *The Journal of Immunology* 165, 6037.
- Edelson, B.T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., et al. (2010). Peripheral CD103^+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to $\text{CD8}\alpha^+$ conventional dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 823.
- Eguíluz-Gracia, I., Bosco, A., Dollner, R., Melum, G.R., Lexberg, M.H., Jones, A.C., Dheyauldeen, S.A., Holt, P.G., Bækkevold, E.S., and Jahnsen, F.L. (2016). Rapid recruitment of CD14^+ monocytes in experimentally induced allergic rhinitis in human subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137, 1872-1881.e1812.
- Epelman, S., Lavine, Kory J., Beaudin, Anna E., Sojka, Dorothy K., Carrero, Javier A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, Emmanuel L., Ivanov, S., Satpathy, Ansuman T., et al. (2014). Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation. *Immunity* 40, 91-104.
- Eto, D., Lao, C., DiToro, D., Barnett, B., Escobar, T.C., Kageyama, R., Yusuf, I., and Crotty, S. (2011). IL-21 and IL-6 Are Critical for Different Aspects of B Cell Immunity and Redundantly Induce Optimal Follicular Helper CD4^+ T Cell (T_{fh}) Differentiation. *PLOS ONE* 6, e17739.
- Ettinger, R., Sims, G.P., Fairhurst, A.-M., Robbins, R., da Silva, Y.S., Spolski, R., Leonard, W.J., and Lipsky, P.E. (2005). IL-21 Induces Differentiation of Human Naive and Memory B Cells into Antibody-Secreting Plasma Cells. *The Journal of Immunology* 175, 7867-7879.
- Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J., Rosen, H., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat Immunol* 10, 375-384.
- Fehres, C.M., Bruijns, S.C.M., Sotthwes, B.N., Kalay, H., Schaffer, L., Head, S.R., de Gruijl, T.D., Garcia-Vallejo, J.J., and van Kooyk, Y. (2015a). Phenotypic and Functional Properties of Human Steady State CD14^+ and CD1a^+ Antigen Presenting Cells and Epidermal Langerhans Cells. *PLoS ONE* 10, e0143519.
- Fehres, C.M., Bruijns, S.C.M., Sotthwes, B.N., Kalay, H., Schaffer, L., Head, S.R., de Gruijl, T.D., Garcia-Vallejo, J.J., and van Kooyk, Y. (2015b). Phenotypic and Functional Properties of Human Steady State CD14^+ and CD1a^+ Antigen Presenting Cells and Epidermal Langerhans Cells. *PLOS ONE* 10, e0143519.
- Fenton, T.M., Kelly, A., Shuttleworth, E.E., Smedley, C., Atakilit, A., Powrie, F., Campbell, S., Nishimura, S.L., Sheppard, D., Levison, S., et al. (2017a). Inflammatory cues enhance TGF β activation by distinct subsets of human intestinal dendritic cells via integrin $\alpha\text{v}\beta 8$. *Mucosal Immunol* 10, 624-634.
- Fenton, T.M., Kelly, A., Shuttleworth, E.E., Smedley, C., Atakilit, A., Powrie, F., Campbell, S., Nishimura, S.L., Sheppard, D., Levison, S., et al. (2017b). Inflammatory cues enhance TGF β activation by distinct subsets of human intestinal dendritic cells via integrin $\alpha\text{v}\beta 8$. *Mucosal Immunol* 10, 624-634.
- Ferguson, S.E., Han, S., Kelsoe, G., and Thompson, C.B. (1996). CD28 is required for germinal center formation. *The Journal of Immunology* 156, 4576-4581.
- Fillatreau, S., and Gray, D. (2003). T Cell Accumulation in B Cell Follicles Is Regulated by Dendritic Cells and Is Independent of B Cell Activation. *The Journal of Experimental Medicine* 197, 195-206.

- Flynn, S., Toellner, K.-M., Raykundalia, C., Goodall, M., and Lane, P. (1998). CD4 T Cell Cytokine Differentiation: The B Cell Activation Molecule, OX40 Ligand, Instructs CD4 T Cells to Express Interleukin 4 and Upregulates Expression of the Chemokine Receptor, Blr-1. *The Journal of Experimental Medicine* 188, 297-304.
- Fornek, J.L., Tygrett, L.T., Waldschmidt, T.J., Poli, V., Rickert, R.C., and Kansas, G.S. (2006). Critical role for Stat3 in T-dependent terminal differentiation of IgG B cells. *Blood* 107, 1085-1091.
- Forster, R., Emrich, T., Kremmer, E., and Lipp, M. (1994). 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.
- Förster, R., Mattis, A.E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., and Lipp, M. (1996). A Putative Chemokine Receptor, BLR1, Directs B Cell Migration to Defined Lymphoid Organs and Specific Anatomic Compartments of the Spleen. *Cell* 87, 1037-1047.
- Fujita, H., Nograles, K.E., Kikuchi, T., Gonzalez, J., Carucci, J.A., and Krueger, J.G. (2009). Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 21795-21800.
- Garside, P., Ingulli, E., Merica, R.R., Johnson, J.G., Noelle, R.J., and Jenkins, M.K. (1998). Visualization of Specific B and T Lymphocyte Interactions in the Lymph Node. *Science* 281, 96.
- Gatto, D., Wood, K., Caminschi, I., Murphy-Durland, D., Schofield, P., Christ, D., Karupiah, G., and Brink, R. (2013). The chemotactic receptor EBI2 regulates the homeostasis, localization and immunological function of splenic dendritic cells. *Nat Immunol* 14, 446-453.
- Giesen, C., Wang, H.A., Schapiro, D., Zivanovic, N., Jacobs, A., Hattendorf, B., Schuffler, P.J., Grolimund, D., Buhmann, J.M., Brandt, S., et al. (2014). Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods* 11, 417-422.
- Gigoux, M., Shang, J., Pak, Y., Xu, M., Choe, J., Mak, T.W., and Suh, W.-K. (2009). Inducible costimulator promotes helper T-cell differentiation through phosphoinositide 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20371-20376.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 330, 841.
- Gitlin, A.D., Shulman, Z., and Nussenzweig, M.C. (2014). Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* 509, 637-640.
- Goenka, R., Barnett, L.G., Silver, J.S., O'Neill, P.J., Hunter, C.A., Cancro, M.P., and Laufer, T.M. (2011). Cutting Edge: Dendritic Cell-Restricted Antigen Presentation Initiates the Follicular Helper T Cell Program but Cannot Complete Ultimate Effector Differentiation. *The Journal of Immunology* 187, 1091-1095.
- Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., and Rodewald, H.-R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547-551.
- Good, K.L., Bryant, V.L., and Tangye, S.G. (2006). Kinetics of Human B Cell Behavior and Amplification of Proliferative Responses following Stimulation with IL-21. *The Journal of Immunology* 177, 5236-5247.
- Good-Jacobson, K.L., Song, E., Anderson, S., Sharpe, A.H., and Shlomchik, M.J. (2012). CD80 Expression on B Cells Regulates Murine T Follicular Helper Development, Germinal Center B Cell Survival, and Plasma Cell Generation. *The Journal of Immunology* 188, 4217-4225.
- Gosselin, D., Link, V.M., Romanoski, Casey E., Fonseca, Gregory J., Eichenfield, Dawn Z., Spann, Nathanael J., Stender, Joshua D., Chun, Hyun B., Garner, H., Geissmann, F., and Glass, Christopher K. (2014). Environment Drives Selection and Function of Enhancers Controlling Tissue-Specific Macrophage Identities. *Cell* 159, 1327-1340.
- Goudot, C., Coillard, A., Villani, A.-C., Gueguen, P., Cros, A., Sarkizova, S., Tang-Huau, T.-L., Bohec, M., Baulande, S., Hacohen, N., et al. (2017). Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity* 47, 582-596.e586.
- Granot, T., Senda, T., Carpenter, D.J., Matsuoka, N., Weiner, J., Gordon, C.L., Miron, M., Kumar, B.V., Griesemer, A., Ho, S.-H., et al. (2017). Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity* 46, 504-515.
- Granucci, F., Foti, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2005). Dendritic Cell Biology. In *Advances in Immunology* (Academic Press), pp. 193-233.
- Green, J.A., Suzuki, K., Cho, B., Willison, L.D., Palmer, D., Allen, C.D.C., Schmidt, T.H., Xu, Y., Proia, R.L., Coughlin, S.R., and Cyster, J.G. (2011). The sphingosine 1-phosphate receptor S1P2 maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nat Immunol* 12, 672-680.
- Greter, M., Helft, J., Chow, A., Hashimoto, D., Mortha, A., Agudo-Cantero, J., Bogunovic, M., Gautier, Emmanuel L., Miller, J., Leboeuf, M., et al. (2012). GM-CSF Controls Nonlymphoid Tissue Dendritic Cell Homeostasis but Is Dispensable for the Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity* 36, 1031-1046.
- Grimm, M.C., Pullman, W.E., Bennett, G.M., Sullivan, P.J., Pavli, P., and Doe, W.F. (1995). Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 10, 387-395.
- Gudjonsson, A., Lysen, A., Balan, S., Sundvold-Gjerstad, V., Arnold-Schrauf, C., Richter, L., Baekkevold, E.S., Dalod, M., Bogen, B., and Fossum, E. (2017). Targeting Influenza Virus Hemagglutinin to Xcr1+ Dendritic Cells in the Absence of Receptor-Mediated Endocytosis Enhances Protective Antibody Responses. *J Immunol* 198, 2785-2795.

- Guillerme, J.-B., Boisgerault, N., Roulois, D., Ménager, J., Combredet, C., Tangy, F., Fonteneau, J.-F., and Gregoire, M. (2013). Measles Virus Vaccine–Infected Tumor Cells Induce Tumor Antigen Cross-Presentation by Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Clinical Cancer Research* 19, 1147.
- Guilliams, M., Dutertre, C.-A., Scott, Charlotte L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Pijck, S., et al. (2016). Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity* 45, 669-684.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014a). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14, 571-578.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014b). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14, 571-578.
- Hambleton, S., Salem, S., Bustamante, J., Bigley, V., Boisson-Dupuis, S., Azevedo, J., Fortin, A., Haniffa, M., Ceron-Gutierrez, L., Bacon, C.M., et al. (2011). IRF8 Mutations and Human Dendritic-Cell Immunodeficiency. *New England Journal of Medicine* 365, 127-138.
- Haniffa, M., Ginhoux, F., Wang, X.-N., Bigley, V., Abel, M., Dimmick, I., Bullock, S., Grisotto, M., Booth, T., Taub, P., et al. (2009). Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *The Journal of Experimental Medicine* 206, 371.
- Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, Pavandip S., Wang, X.-N., Malinarich, F., Malleret, B., et al. (2012). Human Tissues Contain CD141hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103+ Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity* 37, 60-73.
- Hardtke, S., Ohl, L., and Förster, R. (2005). Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help. *Blood* 106, 1924-1931.
- Hasbold, J., Corcoran, L.M., Tarlinton, D.M., Tangye, S.G., and Hodgkin, P.D. (2004). Evidence from the generation of immunoglobulin G-secreting cells that stochastic mechanisms regulate lymphocyte differentiation. *Nat Immunol* 5, 55-63.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, Mary B., Leboeuf, M., Becker, Christian D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity* 38, 792-804.
- Hatzi, K., Nance, J.P., Kroenke, M.A., Bothwell, M., Haddad, E.K., Melnick, A., and Crotty, S. (2015). BCL6 orchestrates Tfh cell differentiation via multiple distinct mechanisms. *The Journal of Experimental Medicine* 212, 539-553.
- Havenar-Daughton, C., Lindqvist, M., Heit, A., Wu, J.E., Reiss, S.M., Kendric, K., Bélanger, S., Kasturi, S.P., Landais, E., Akondy, R.S., et al. (2016). CXCL13 is a plasma biomarker of germinal center activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 2702-2707.
- Haynes, N.M., Allen, C.D.C., Lesley, R., Ansel, K.M., Killeen, N., and Cyster, J.G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and Appearance of a Programmed Cell Death Gene-1^{High} Germinal Center-Associated Subpopulation. *The Journal of Immunology* 179, 5099-5108.
- Heidkamp, G.F., Sander, J., Lehmann, C.H.K., Heger, L., Eissing, N., Baranska, A., Luhr, J.J., Hoffmann, A., Reimer, K.C., Lux, A., et al. (2016a). Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue microenvironment. *Sci Immunol* 1.
- Heidkamp, G.F., Sander, J., Lehmann, C.H.K., Heger, L., Eissing, N., Baranska, A., Lühr, J.J., Hoffmann, A., Reimer, K.C., Lux, A., et al. (2016b). Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue microenvironment. *Science Immunology* 1.
- Helft, J., Anjos-Afonso, F., van der Veen, A.G., Chakravarty, P., Bonnet, D., and Reis e Sousa, C. (2017). Dendritic Cell Lineage Potential in Human Early Hematopoietic Progenitors. *Cell Reports* 20, 529-537.
- Hémont, C., Neel, A., Heslan, M., Braudeau, C., and Josien, R. (2013). Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *Journal of Leukocyte Biology* 93, 599-609.
- Henneken, M., Dörner, T., Burmester, G.-R., and Berek, C. (2005). Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* 7, R1001.
- Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8⁺ Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Science* 322, 1097.
- Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, Francisca F., See, P., Beaudin, Anna E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E.C., et al. (2015). C-Myb+ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 42, 665-678.
- Hoeffel, G., Ripoché, A.-C., Matheoud, D., Nascimbeni, M., Escriou, N., Lebon, P., Heshmati, F., Guillet, J.-G., Gannagé, M., Caillat-Zucman, S., et al. (2007). Antigen Crosspresentation by Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* 27, 481-492.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Howard, M., Farrar, J., Hilfiker, M., Johnson, B., Takatsu, K., Hamaoka, T., and Paul, W.E. (1982). Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *The Journal of Experimental Medicine* 155, 914-923.

- Hugues, S., Boissonnas, A., Amigorena, S., and Fetler, L. (2006). The dynamics of dendritic cell–T cell interactions in priming and tolerance. *Current Opinion in Immunology* 18, 491-495.
- Hutloff, A. (2015). Regulation of T follicular helper cells by ICOS. *Oncotarget* 6, 21785-21786.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczeck, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.
- Hutten, T.J.A., Thordardottir, S., Fredrix, H., Janssen, L., Woestenenk, R., Tel, J., Joosten, B., Cambi, A., Heemskerk, M.H.M., Franssen, G.M., et al. (2016). CLEC12A-Mediated Antigen Uptake and Cross-Presentation by Human Dendritic Cell Subsets Efficiently Boost Tumor-Reactive T Cell Responses. *The Journal of Immunology* 197, 2715.
- Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Hori, T., Ota, M., Nakamura, K., Takebayashi, M., Miyaji, M., Yoshimura, T., Inaba, K., and Fukuhara, S. (2004). Plasmacytoid Dendritic Cells Regulate Th Cell Responses through OX40 Ligand and Type I IFNs. *The Journal of Immunology* 172, 4253.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell* 126, 1121-1133.
- Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, Emily S., Dumortier, H., et al. (2015). OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* 42, 1159-1170.
- Jenner, W., Motwani, M., Veighey, K., Newson, J., Audzevich, T., Nicolaou, A., Murphy, S., MacAllister, R., and Gilroy, D.W. (2014). Characterisation of Leukocytes in a Human Skin Blister Model of Acute Inflammation and Resolution. *PLOS ONE* 9, e89375.
- Jensen, P.E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* 8, 1041-1048.
- Jin, J.-O., Zhang, W., Du, J.-y., and Yu, Q. (2014). BDCA1-Positive Dendritic Cells (DCs) Represent a Unique Human Myeloid DC Subset That Induces Innate and Adaptive Immune Responses to *Staphylococcus aureus* Infection. *Infection and Immunity* 82, 4466-4476.
- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 12, 557-569.
- Johnston, R.J., Choi, Y.S., Diamond, J.A., Yang, J.A., and Crotty, S. (2012). STAT5 is a potent negative regulator of T_H17 cell differentiation. *The Journal of Experimental Medicine* 209, 243-250.
- Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science* 325, 1006-1010.
- Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., et al. (2010). Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 1247.
- Joo, H., Upchurch, K., Zhang, W., Ni, L., Li, D., Xue, Y., Li, X.-H., Hori, T., Zurawski, S., Liu, Y.-J., et al. (2015). Opposing Roles of Dectin-1 Expressed on Human Plasmacytoid Dendritic Cells and Myeloid Dendritic Cells in Th2 Polarization. *The Journal of Immunology* 195, 1723.
- Juarez, E., Nuñez, C., Sada, E., Ellner, J.J., Schwander, S.K., and Torres, M. (2010). Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respiratory Research* 11, 2.
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M.T., Sugita, A., Koganei, K., et al. (2008). Unique CD14⁺ intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- γ axis. *The Journal of Clinical Investigation* 118, 2269-2280.
- Kamphorst, A.O., Guemnonprez, P., Dudziak, D., and Nussenzweig, M.C. (2010). Route of Antigen Uptake Differentially Impacts Presentation by Dendritic Cells and Activated Monocytes. *The Journal of Immunology* 185, 3426.
- Kanitakis, J., Morelon, E., Petruzzo, P., Badet, L., and Dubernard, J.-M. (2011). Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft. *Experimental Dermatology* 20, 145-146.
- Kanitakis, J., Petruzzo, P., and Dubernard, J.-M. (2004). Turnover of Epidermal Langerhans' Cells. *New England Journal of Medicine* 351, 2661-2662.
- Karlsson, K.R., Cowley, S., Martinez, F.O., Shaw, M., Minger, S.L., and James, W. (2008). Homogeneous monocytes and macrophages from human embryonic stem cells following coculture-free differentiation in M-CSF and IL-3. *Experimental Hematology* 36, 1167-1175.
- Kassianos, A.J., Hardy, M.Y., Ju, X., Vijayan, D., Ding, Y., Vulink, A.J.E., McDonald, K.J., Jongbloed, S.L., Wadley, R.B., Wells, C., et al. (2012). Human CD1c (BDCA-1)⁺ myeloid dendritic cells secrete IL-10 and display an immuno-regulatory phenotype and function in response to *Escherichia coli*. *European Journal of Immunology* 42, 1512-1522.
- Kato, Y., Zaid, A., Davey, G.M., Mueller, S.N., Nutt, S.L., Zotos, D., Tarlinton, D.M., Shortman, K., Lahoud, M.H., Heath, W.R., and Caminschi, I. (2015). Targeting Antigen to Clec9A Primes Follicular Th Cell Memory Responses Capable of Robust Recall. *J Immunol* 195, 1006-1014.
- Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Kikutani, H. (1994). The immune responses in CD40-deficient mice: Impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1, 167-178.
- Kehry, M.R. (1996). CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *The Journal of Immunology* 156, 2345-2348.

- Kelly, L.M., Pereira, J.P., Yi, T., Xu, Y., and Cyster, J.G. (2011). EB12 Guides Serial Movements of Activated B Cells and Ligand Activity Is Detectable in Lymphoid and Nonlymphoid Tissues. *The Journal of Immunology* 187, 3026-3032.
- Kerfoot, Steven M., Yaari, G., Patel, Jaymin R., Johnson, Kody L., Gonzalez, David G., Kleinstein, Steven H., and Haberman, Ann M. (2011). Germinal Center B Cell and T Follicular Helper Cell Development Initiates in the Interfollicular Zone. *Immunity* 34, 947-960.
- Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E.G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., Holscher, C., et al. (2013). Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* 16, 273-280.
- Killar, L., MacDonald, G., West, J., Woods, A., and Bottomly, K. (1987). Cloned, Ia-restricted T cells that do not produce interleukin 4(IL 4)/B cell stimulatory factor 1(BSF-1) fail to help antigen-specific B cells. *The Journal of Immunology* 138, 1674-1679.
- Kim, C.H., Lim, H.W., Kim, J.R., Rott, L., Hillsamer, P., and Butcher, E.C. (2004). Unique gene expression program of human germinal center T helper cells. *Blood* 104, 1952-1960.
- Kim, C.H., Rott, L.S., Clark-Lewis, I., Campbell, D.J., Wu, L., and Butcher, E.C. (2001). Subspecialization of Cxcr5⁺ T Cells. *B Helper Activity Is Focused in a Germinal Center-Localized Subset of Cxcr5⁺ T Cells* 193, 1373-1382.
- King, I.L., and Mohrs, M. (2009). IL-4-producing CD4⁺ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. *The Journal of Experimental Medicine* 206, 1001-1007.
- Klechevsky, E., Flamar, A.-L., Cao, Y., Blanck, J.-P., Liu, M., Bar, A., Agouna-Deciat, O., Klucar, P., Thompson-Snipes, L., Zurawski, S., et al. (2010). Cross-priming CD8⁺ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood* 116, 1685.
- Klechevsky, E., Liu, M., Morita, R., Banchereau, R., Thompson-Snipes, L., Palucka, A.K., Ueno, H., and Banchereau, J. (2009). Understanding human myeloid dendritic cell subsets for the rational design of novel vaccines. *Human Immunology* 70, 281-288.
- Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A.K., et al. (2008). Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14⁺ dermal dendritic cells. *Immunity* 29, 497-510.
- Kopf, M., Coyle, A.J., Schmitz, N., Barner, M., Oxenius, A., Gallimore, A., Gutierrez-Ramos, J.-C., and Bachmann, M.F. (2000). Inducible Costimulator Protein (Icos) Controls T Helper Cell Subset Polarization after Virus and Parasite Infection. *The Journal of Experimental Medicine* 192, 53-62.
- Kotlarz, D., Zietara, N., Milner, J.D., and Klein, C. (2014). Human IL-21 and IL-21R deficiencies: two novel entities of primary immunodeficiency. *Curr Opin Pediatr* 26, 704-712.
- Kroenke, M.A., Eto, D., Locci, M., Cho, M., Davidson, T., Haddad, E.K., and Crotty, S. (2012). Bcl6 and Maf Cooperate To Instruct Human Follicular Helper CD4 T Cell Differentiation. *The Journal of Immunology* 188, 3734-3744.
- Kuchen, S., Robbins, R., Sims, G.P., Sheng, C., Phillips, T.M., Lipsky, P.E., and Ettinger, R. (2007). Essential Role of IL-21 in B Cell Activation, Expansion, and Plasma Cell Generation during CD4⁺ T Cell-B Cell Collaboration. *The Journal of Immunology* 179, 5886-5896.
- Kuhn, R., Rajewsky, K., and Muller, W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 254, 707-710.
- Kusam, S., Toney, L.M., Sato, H., and Dent, A.L. (2003). Inhibition of Th2 Differentiation and GATA-3 Expression by BCL-6. *The Journal of Immunology* 170, 2435-2441.
- Laidlaw, B.J., Craft, J.E., and Kaech, S.M. (2016). The multifaceted role of CD4⁺ T cells in CD8⁺ T cell memory. *Nat Rev Immunol* 16, 102-111.
- Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 314, 537-539.
- Lanzavecchia, A., Ferrarini, M., and Celada, F. (1982). Human T cell lines with antigen specificity and helper activity. *European Journal of Immunology* 12, 468-474.
- Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., and Amit, I. (2014). Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell* 159, 1312-1326.
- Leavenworth, J.W., Verbinen, B., Yin, J., Huang, H., and Cantor, H. (2015). A p85[alpha]-osteopontin axis couples the receptor ICOS to sustained Bcl-6 expression by follicular helper and regulatory T cells. *Nat Immunol* 16, 96-106.
- Lee, J., Breton, G., Oliveira, T.Y.K., Zhou, Y.J., Aljoufi, A., Puhr, S., Cameron, M.J., Sékaly, R.-P., Nussenzweig, M.C., and Liu, K. (2015). Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine* 212, 385.
- Lesley, R., Kelly, L.M., Xu, Y., and Cyster, J.G. (2006). Naive CD4 T cells constitutively express CD40L and augment autoreactive B cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 10717-10722.
- Li, J., Lu, E., Yi, T., and Cyster, J.G. (2016). EB12 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-quenching dendritic cells. *Nature* 533, 110-114.
- Lindstedt, M., Lundberg, K., and Borrebaeck, C.A.K. (2005). Gene Family Clustering Identifies Functionally Associated Subsets of Human In Vivo Blood and Tonsillar Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 175, 4839.

- Linterman, M.A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R.R., Srivastava, M., Hogan, J.J., Verma, N.K., Smyth, M.J., Rigby, R.J., and Vinuesa, C.G. (2010a). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med* 207, 353-363.
- Linterman, M.A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R.R., Srivastava, M., Hogan, J.J., Verma, N.K., Smyth, M.J., Rigby, R.J., and Vinuesa, C.G. (2010b). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 353-363.
- Linterman, M.A., Denton, A.E., Divekar, D.P., Zvetkova, I., Kane, L., Ferreira, C., Veldhoen, M., Clare, S., Dougan, G., Espéli, M., and Smith, K.G.C. (2014). CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *eLife* 3, e03180.
- Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D., and Qi, H. (2015). T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature* 517, 214-218.
- Liu, X., Chen, X., Zhong, B., Wang, A., Wang, X., Chu, F., Nurieva, R.I., Yan, X., Chen, P., van der Flier, L.G., et al. (2014). Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. *Nature* 507, 513-518.
- Liu, X., Yan, X., Zhong, B., Nurieva, R.I., Wang, A., Wang, X., Martin-Orozco, N., Wang, Y., Chang, S.H., Esplugues, E., et al. (2012). Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 209, 1841-1852.
- Locci, M., Wu, J.E., Arumemi, F., Mikulski, Z., Dahlberg, C., Miller, A.T., and Crotty, S. (2016). Activin A programs the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol* 17, 976-984.
- Lougaris, V., Badolato, R., Ferrari, S., and Plebani, A. (2005). Hyper immunoglobulin M syndrome due to CD40 deficiency: clinical, molecular, and immunological features. *Immunological Reviews* 203, 48-66.
- Lozza, L., Farinacci, M., Bechtel, M., Stäber, M., Zedler, U., Baiocchi, A., del Nonno, F., and Kaufmann, S.H.E. (2014). Communication between Human Dendritic Cell Subsets in Tuberculosis: Requirements for Naive CD4+ T Cell Stimulation. *Frontiers in Immunology* 5, 324.
- Lui, G., Manches, O., Angel, J., Molens, J.-P., Chaperot, L., and Plumas, J. (2009). Plasmacytoid Dendritic Cells Capture and Cross-Present Viral Antigens from Influenza-Virus Exposed Cells. *PLOS ONE* 4, e7111.
- Lundberg, K., Rydnert, F., Greiff, L., and Lindstedt, M. (2014). Human blood dendritic cell subsets exhibit discriminative pattern recognition receptor profiles. *Immunology* 142, 279-288.
- Luthje, K., Kallies, A., Shimohakamada, Y., Belz, G.T., Light, A., Tarlinton, D.M., and Nutt, S.L. (2012a). The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. *Nat Immunol* 13, 491-498.
- Luthje, K., Kallies, A., Shimohakamada, Y., Belz, G.T., Light, A., Tarlinton, D.M., and Nutt, S.L. (2012b). The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. *Nat Immunol* 13, 491-498.
- Ma, C.S., Hare, N.J., Nichols, K.E., Dupré, L., Andolfi, G., Roncarolo, M.-G., Adelstein, S., Hodgkin, P.D., and Tangye, S.G. (2005). Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4+ T cells. *The Journal of Clinical Investigation* 115, 1049-1059.
- Ma, C.S., Pittaluga, S., Avery, D.T., Hare, N.J., Maric, I., Klion, A.D., Nichols, K.E., and Tangye, S.G. (2006). Selective generation of functional somatically mutated IgM+CD27+, but not Ig isotype-switched, memory B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *The Journal of Clinical Investigation* 116, 322-333.
- Ma, C.S., Suryani, S., Avery, D.T., Chan, A., Nanan, R., Santner-Nanan, B., Deenick, E.K., and Tangye, S.G. (2009). Early commitment of naive human CD4+ T cells to the T follicular helper (TFH) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol Cell Biol* 87, 590-600.
- Ma, C.S., Wong, N., Rao, G., Avery, D.T., Torpy, J., Hambridge, T., Bustamante, J., Okada, S., Stoddard, J.L., Deenick, E.K., et al. (2015). Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136, 993-1006.e1001.
- MacDonald, K.P.A., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., and Hart, D.N.J. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100, 4512.
- Malbran, A., Belmonte, L., Ruibal-Ares, B., Baré, P., Massud, I., Parodi, C., Felippo, M., Hodinka, R., Haines, K., Nichols, K.E., and de Bracco, M.M. (2004). Loss of circulating CD27⁺ memory B cells and CCR4⁺ T cells occurring in association with elevated EBV loads in XLP patients surviving primary EBV infection. *Blood* 103, 1625-1631.
- Marshall, H.D., Ray, J.P., Laidlaw, B.J., Zhang, N., Gawande, D., Staron, M.M., Craft, J., and Kaech, S.M. (2015). The transforming growth factor beta signaling pathway is critical for the formation of CD4 T follicular helper cells and isotype-switched antibody responses in the lung mucosa. *eLife* 4, e04851.
- Martínez-Cingolani, C., Grandclaude, M., Jeanmougin, M., Jouve, M., Zollinger, R., and Soumelis, V. (2014). Human blood BDCA-1 dendritic cells differentiate into Langerhans-like cells with thymic stromal lymphopoietin and TGF- β . *Blood* 124, 2411.
- Martins, G., and Calame, K. (2008). Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 26, 133-169.
- McGovern, N., Schlitzer, A., Gunawan, M., Jardine, L., Shin, A., Poyner, E., Green, K., Dickinson, R., Wang, X.-n., Low, D., et al. (2014). Human Dermal CD14+ Cells Are a Transient Population of Monocyte-Derived Macrophages. *Immunity* 41, 465-477.
- McIlroy, D., Troade, C., Grassi, F., Samri, A., Barrou, B., Autran, B., Debré, P., Feuillard, J., and Hosmalin, A. (2001). Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors. *Blood* 97, 3470.

- Meixlsperger, S., Leung, C.S., Rämer, P.C., Pack, M., Vanoaica, L.D., Breton, G., Pascolo, S., Salazar, A.M., Dzionek, A., Schmitz, J., et al. (2013). CD141⁺ dendritic cells produce prominent amounts of IFN- α after dsRNA recognition and can be targeted via DEC-205 in humanized mice. *Blood* 121, 5034.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159.
- Mescher, M.F., Curtsinger, J.M., Agarwal, P., Casey, K.A., Gerner, M., Hammerbeck, C.D., Popescu, F., and Xiao, Z. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8⁺ T cells. *Immunological Reviews* 211, 81-92.
- Miller, J.C., Brown, B.D., Shay, T., Gautier, E.L., Jojic, V., Cohain, A., Pandey, G., Leboeuf, M., Elpek, K.G., Helft, J., et al. (2012a). Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13, 888-899.
- Miller, J.C., Brown, B.D., Shay, T., Gautier, E.L., Jojic, V., Cohain, A., Pandey, G., Leboeuf, M., Elpek, K.G., Helft, J., et al. (2012b). Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13, 888-899.
- Miller, J.F. (1965). Effect of thymectomy in adult mice on immunological responsiveness. *Nature* 208, 1337-1338.
- Miller, J.F.A.P., Basten, A., Sprent, J., and Cheers, C. (1971). Interaction between lymphocytes in immune responses. *Cellular Immunology* 2, 469-495.
- Milne, P., Bigley, V., Gunawan, M., Haniffa, M., and Collin, M. (2015). CD1c⁺ blood dendritic cells have Langerhans cell potential. *Blood* 125, 470.
- Mitchell, G.F., and Miller, J.F.A.P. (1968). CELL TO CELL INTERACTION IN THE IMMUNE RESPONSE. *The Journal of Experimental Medicine* 128, 821.
- Mitchison, N.A. (2004). T-cell-B-cell cooperation. *Nat Rev Immunol* 4, 308-312.
- Mittag, D., Proietto, A.I., Loudovaris, T., Mannering, S.I., Vremec, D., Shortman, K., Wu, L., and Harrison, L.C. (2011a). Human Dendritic Cell Subsets from Spleen and Blood Are Similar in Phenotype and Function but Modified by Donor Health Status. *The Journal of Immunology* 186, 6207.
- Mittag, D., Proietto, A.I., Loudovaris, T., Mannering, S.I., Vremec, D., Shortman, K., Wu, L., and Harrison, L.C. (2011b). Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *J Immunol* 186, 6207-6217.
- Mohty, M., Isnardon, D., Vey, N., Brière, F., Blaise, D., Olive, D., and Gaugler, B. (2002). Low blood dendritic cells in chronic myeloid leukaemia patients correlates with loss of CD34⁺/CD38⁻ primitive haematopoietic progenitors. *British Journal of Haematology* 119, 115-118.
- Moriyama, S., Takahashi, N., Green, J.A., Hori, S., Kubo, M., Cyster, J.G., and Okada, T. (2014). Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers. *The Journal of Experimental Medicine* 211, 1297-1305.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* 136, 2348-2357.
- Mouriès, J., Moron, G., Schlecht, G., Escriou, N., Dadaglio, G., and Leclerc, C. (2008). Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* 112, 3713.
- Mullen, A.C., High, F.A., Hutchins, A.S., Lee, H.W., Villarino, A.V., Livingston, D.M., Kung, A.L., Cereb, N., Yao, T.-P., Yang, S.Y., and Reiner, S.L. (2001). Role of T-bet in Commitment of T_H1 Cells Before IL-12-Dependent Selection. *Science* 292, 1907-1910.
- Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11, 723-737.
- Nagasawa, M., Schmidlin, H., Hazekamp, M.G., Schotte, R., and Blom, B. (2008). Development of human plasmacytoid dendritic cells depends on the combined action of the basic helix-loop-helix factor E2-2 and the Ets factor Spi-B. *European Journal of Immunology* 38, 2389-2400.
- Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.-Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O'Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., et al. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 8, 1217-1226.
- Nizzoli, G., Krietsch, J., Weick, A., Steinfeld, S., Facciotti, F., Gruarin, P., Bianco, A., Steckel, B., Moro, M., Crosti, M., et al. (2013a). Human CD1c⁺ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* 122, 932-942.
- Nizzoli, G., Krietsch, J., Weick, A., Steinfeld, S., Facciotti, F., Gruarin, P., Bianco, A., Steckel, B., Moro, M., Crosti, M., et al. (2013b). Human CD1c⁺ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* 122, 932.
- Nizzoli, G., Larghi, P., Paroni, M., Crosti, M.C., Moro, M., Neddermann, P., Caprioli, F., Pagani, M., De Francesco, R., Abrignani, S., and Geginat, J. (2016). IL-10 promotes homeostatic proliferation of human CD8⁺ memory T cells and, when produced by CD1c⁺ DCs, shapes naive CD8⁺ T-cell priming. *European Journal of Immunology* 46, 1622-1632.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y.-h., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., and Dong, C. (2008). Generation of T Follicular Helper Cells Is Mediated by Interleukin-21 but Independent of T Helper 1, 2, or 17 Cell Lineages. *Immunity* 29, 138-149.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.-H., and Dong, C. (2009). Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. *Science* 325, 1001-1005.

- O'Shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4(+) T cells. *Science* (New York, N.Y.) 327, 1098-1102.
- Oestreich, K.J., Mohn, S.E., and Weinmann, A.S. (2012). Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile. *Nat Immunol* 13, 405-411.
- Okabe, Y., and Medzhitov, R. (2014). Tissue-Specific Signals Control Reversible Program of Localization and Functional Polarization of Macrophages. *Cell* 157, 832-844.
- Okada, T., Miller, M.J., Parker, I., Krummel, M.F., Neighbors, M., Hartley, S.B., O'Garra, A., Cahalan, M.D., and Cyster, J.G. (2005). Antigen-Engaged B Cells Undergo Chemotaxis toward the T Zone and Form Motile Conjugates with Helper T Cells. *PLOS Biology* 3, e150.
- Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 8, 1207-1216.
- Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.-P., Wang, G., Qi, C.-F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akilesh, S., Roopenian, D.C., et al. (2004). Regulation of B Cell Differentiation and Plasma Cell Generation by IL-21, a Novel Inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *The Journal of Immunology* 173, 5361-5371.
- Palomares, O., Rückert, B., Jartti, T., Küçüksezer, U.C., Puhakka, T., Gomez, E., Fahrner, H.B., Speiser, A., Jung, A., Kwok, W.W., et al. (2012). Induction and maintenance of allergen-specific FOXP3+ Treg cells in human tonsils as potential first-line organs of oral tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129, 510-520.e519.
- Papa, I., Saliba, D., Ponzoni, M., Bustamante, S., Canete, P.F., Gonzalez-Figueroa, P., McNamara, H.A., Valvo, S., Grimbaldston, M., Sweet, R.A., et al. (2017). TFH-derived dopamine accelerates productive synapses in germinal centres. *Nature* 547, 318-323.
- Patel, A.A., Zhang, Y., Fullerton, J.N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A.A., Bigley, V., Flavell, R.A., Gilroy, D.W., Asquith, B., et al. (2017a). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*.
- Patel, V.I., Booth, J.L., Duggan, E.S., Cate, S., White, V.L., Hutchings, D., Kovats, S., Burian, D.M., Dozmorov, M., and Metcalf, J.P. (2017b). Transcriptional Classification and Functional Characterization of Human Airway Macrophage and Dendritic Cell Subsets. *The Journal of Immunology* 198, 1183.
- Pattarini, L., Trichot, C., Bogiatzi, S., Grandclaudon, M., Meller, S., Keuylian, Z., Durand, M., Volpe, E., Madonna, S., Cavani, A., et al. (2017a). TSLP-activated dendritic cells induce human T follicular helper cell differentiation through OX40-ligand. *The Journal of Experimental Medicine* 214, 1529.
- Pattarini, L., Trichot, C., Bogiatzi, S., Grandclaudon, M., Meller, S., Keuylian, Z., Durand, M., Volpe, E., Madonna, S., Cavani, A., et al. (2017b). TSLP-activated dendritic cells induce human T follicular helper cell differentiation through OX40-ligand. *J Exp Med* 214, 1529-1546.
- Pène, J., Gauchat, J.-F., Lécart, S., Drouet, E., Guglielmi, P., Boulay, V., Delwail, A., Foster, D., Lecron, J.-C., and Yssel, H. (2004). Cutting Edge: IL-21 Is a Switch Factor for the Production of IgG_₁ and IgG_₃ by Human B Cells. *The Journal of Immunology* 172, 5154-5157.
- Penel-Sotirakis, K., Simonazzi, E., Peguet-Navarro, J., and Rozieres, A. (2012). Differential capacity of human skin dendritic cells to polarize CD4+ T cells into IL-17, IL-21 and IL-22 producing cells. *PLoS One* 7, e45680.
- Polak, M.E., Newell, L., Taraban, V.Y., Pickard, C., Healy, E., Friedmann, P.S., Al-Shamkhani, A., and Arden-Jones, M.R. (2012). CD70-CD27 Interaction Augments CD8+ T-Cell Activation by Human Epidermal Langerhans Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 132, 1636-1644.
- Pooley, J.L., Heath, W.R., and Shortman, K. (2001). Cutting Edge: Intravenous Soluble Antigen Is Presented to CD4 T Cells by CD8⁺-<sup>+</sup>-Dendritic Cells, but Cross-Presented to CD8 T Cells by CD8⁺-<sup>+</sup>-Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 166, 5327.
- Poulin, L.F., Rey, Y., Uronen-Hansson, H., Schraml, B.U., Sancho, D., Murphy, K.M., Håkansson, U.K., Ferreira Moita, L., Agace, W.W., Bonnet, D., and Reis e Sousa, C. (2012). DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Blood* 119, 6052.
- Poulin, L.F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J.-L., Keller, A.M., Joffre, O., Zelenay, S., Nye, E., et al. (2010). Characterization of human DNGR-1⁺-<sup>+</sup>-BDCA3⁺-<sup>+</sup>-leukocytes as putative equivalents of mouse CD8⁺-<sup>+</sup>-dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 1261.
- Qi, H. (2016). T follicular helper cells in space-time. *Nat Rev Immunol* 16, 612-625.
- Qi, H., Cannons, J.L., Klauschen, F., Schwartzberg, P.L., and Germain, R.N. (2008). SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 455, 764-769.
- Qi, H., Kastenmüller, W., and Germain, R.N. (2014). Spatiotemporal Basis of Innate and Adaptive Immunity in Secondary Lymphoid Tissue. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30, 141-167.
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T.N., and Forsthuber, T.G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 74, 5-17.
- Rasheed, A.U., Rahn, H.P., Sallusto, F., Lipp, M., and Muller, G. (2006). Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur J Immunol* 36, 1892-1903.

- Reif, K., Ekland, E.H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Forster, R., and Cyster, J.G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 416, 94-99.
- Reinhardt, R.L., Liang, H.-E., and Locksley, R.M. (2009). Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* 10, 385-393.
- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6, 476-483.
- Rioja, I., Hughes, F.J., Sharp, C.H., Warnock, L.C., Montgomery, D.S., Akil, M., Wilson, A.G., Binks, M.H., and Dickson, M.C. (2008). Potential novel biomarkers of disease activity in rheumatoid arthritis patients: CXCL13, CCL23, transforming growth factor α , tumor necrosis factor receptor superfamily member 9, and macrophage colony-stimulating factor. *Arthritis & Rheumatism* 58, 2257-2267.
- Robbins, S.H., Walzer, T., Demb  l  , D., Thibault, C., Defays, A., Bessou, G., Xu, H., Vivier, E., Sellars, M., Pierre, P., et al. (2008). Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biology* 9, R17.
- Robson, N.C., Phillips, D.J., McAlpine, T., Shin, A., Svobodova, S., Toy, T., Pillay, V., Kirkpatrick, N., Zanker, D., Wilson, K., et al. (2008). Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. *Blood* 111, 2733-2743.
- Rosenthal, A.S., and Shevach, E.M. (1973). FUNCTION OF MACROPHAGES IN ANTIGEN RECOGNITION BY GUINEA PIG T LYMPHOCYTES. I. REQUIREMENT FOR H
ISTOCOMPATIBLE M ACROPHAGES AND L
YMPHOCYTES 138, 1194-1212.
- Sahoo, A., Alekseev, A., Tanaka, K., Obertas, L., Lerman, B., Haymaker, C., Clise-Dwyer, K., McMurray, J.S., and Nurieva, R. (2015). Batf is important for IL-4 expression in T follicular helper cells. *Nature Communications* 6, 7997.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology* 155, 1151-1164.
- Salek-Ardakani, S., Choi, Y.S., Rafii-El-Idrissi Benhnia, M., Flynn, R., Arens, R., Shoenberger, S., Crotty, S., Croft, M., and Salek-Ardakani, S. (2011). B Cell-Specific Expression of B7-2 Is Required for Follicular Th Cell Function in Response to Vaccinia Virus. *The Journal of Immunology* 186, 5294-5303.
- Satija, R., Farrell, J.A., Gennert, D., Schier, A.F., and Regev, A. (2015). Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol* 33, 495-502.
- Schaerli, P., Willmann, K., Lang, A.B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). Cxc Chemokine Receptor 5 Expression Defines Follicular Homing T Cells with B Cell Helper Function. *The Journal of Experimental Medicine* 192, 1553-1562.
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., et al. (2013a). IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* 38, 970-983.
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, Adrian W.S., See, P., Shin, A., Wasan, Pavandip S., et al. (2013b). IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b⁺ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity* 38, 970-983.
- Schmidt, A., Zhang, X.-M., Joshi, R.N., Iqbal, S., Wahlund, C., Gabrielsson, S., Harris, R.A., and Tegner, J. (2016). Human macrophages induce CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells via binding and re-release of TGF- β . *Immunol Cell Biol* 94, 747-762.
- Schmitt, N., Bustamante, J., Bourdery, L., Bentebibel, S.E., Boisson-Dupuis, S., Hamlin, F., Tran, M.V., Blankenship, D., Pascual, V., Savino, D.A., et al. (2013). IL-12 receptor β 1 deficiency alters in vivo T follicular helper cell response in humans. *Blood* 121, 3375-3385.
- Schmitt, N., Liu, Y., Bentebibel, S.-E., Munagala, I., Bourdery, L., Venuprasad, K., Banchereau, J., and Ueno, H. (2014). The cytokine TGF- β co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol* 15, 856-865.
- Schmitt, N., Morita, R., Bourdery, L., Bentebibel, S.E., Zurawski, S.M., Banchereau, J., and Ueno, H. (2009). Human Dendritic Cells Induce the Differentiation of Interleukin-21-Producing T Follicular Helper-like Cells through Interleukin-12. *Immunity* 31, 158-169.
- Schnorrer, P., Behrens, G.M.N., Wilson, N.S., Pooley, J.L., Smith, C.M., El-Sukkari, D., Davey, G., Kupresanin, F., Li, M., Maraskovsky, E., et al. (2006). The dominant role of CD8⁺ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 10729-10734.
- Schreibelt, G., Klinkenberg, L.J.J., Cruz, L.J., Tacke, P.J., Tel, J., Kreutz, M., Adema, G.J., Brown, G.D., Figdor, C.G., and de Vries, I.J.M. (2012). The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3⁺ myeloid dendritic cells. *Blood* 119, 2284.
- Schulz, C., Perdiguero, E.G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. *Science* 336, 86.
- See, P., Dutertre, C.-A., Chen, J., G  nther, P., McGovern, N., Irac, S.E., Gunawan, M., Beyer, M., H  ndler, K., Duan, K., et al. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* 356.
- Segura, E., Durand, M., and Amigorena, S. (2013a). Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 210, 1035.

- Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiochia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2013b). Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity* 38, 336-348.
- Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.-H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2012a). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *The Journal of Experimental Medicine* 209, 653.
- Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.-H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2012b). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 209, 653-660.
- Seneschal, J., Clark, Rachael A., Gehad, A., Baecher-Allan, Clare M., and Kupper, Thomas S. (2012). Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells. *Immunity* 36, 873-884.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.-I., McHeyzer-Williams, L.J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M.G., and Calame, K. (2003). Blimp-1 Is Required for the Formation of Immunoglobulin Secreting Plasma Cells and Pre-Plasma Memory B Cells. *Immunity* 19, 607-620.
- Sheng, J., Ruedl, C., and Karjalainen, K. (2015). Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* 43, 382-393.
- Shi, K., Hayashida, K., Kaneko, M., Hashimoto, J., Tomita, T., Lipsky, P.E., Yoshikawa, H., and Ochi, T. (2001). Lymphoid Chemokine B Cell-Attracting Chemokine-1 (CXCL13) Is Expressed in Germinal Center of Ectopic Lymphoid Follicles Within the Synovium of Chronic Arthritis Patients. *The Journal of Immunology* 166, 650-655.
- Shin, C., Han, J.A., Koh, H., Choi, B., Cho, Y., Jeong, H., Ra, J.S., Sung, P.S., Shin, E.C., Ryu, S., and Do, Y. (2015). CD8 α (-) Dendritic Cells Induce Antigen-Specific T Follicular Helper Cells Generating Efficient Humoral Immune Responses. *Cell Rep* 11, 1929-1940.
- Shulman, Z., Gitlin, A.D., Weinstein, J.S., Lainez, B., Esplugues, E., Flavell, R.A., Craft, J.E., and Nussenzweig, M.C. (2014). Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science* 345, 1058-1062.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.-J. (1999). The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science* 284, 1835.
- Simon, A.K., Hollander, G.A., and McMichael, A. (2015). Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282.
- Smith, K.M., Pottage, L., Thomas, E.R., Leishman, A.J., Doig, T.N., Xu, D., Liew, F.Y., and Garside, P. (2000). Th1 and Th2 CD4⁺ T Cells Provide Help for B Cell Clonal Expansion and Antibody Synthesis in a Similar Manner In Vivo. *The Journal of Immunology* 165, 3136-3144.
- Soille, P. (2003). *Morphological Image Analysis: Principles and Applications* (2nd ed).
- Sommer, C., Straehle, C., Kothe, U., and Hamprecht, F.A. (2011). Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit. . *IEEE international symposium on biomedical imaging: from nano to macro (ISBI)*, 230-233.
- Speckmann, C., Enders, A., Woellner, C., Thiel, D., Rensing-Ehl, A., Schlesier, M., Rohr, J., Jakob, T., Oswald, E., Kopp, M.V., et al. (2008). Reduced memory B cells in patients with hyper IgE syndrome. *Clinical Immunology* 129, 448-454.
- Spensieri, F., Siena, E., Borgogni, E., Zedda, L., Cantisani, R., Chiappini, N., Schiavetti, F., Rosa, D., Castellino, F., Montomoli, E., et al. (2016). Early Rise of Blood T Follicular Helper Cell Subsets and Baseline Immunity as Predictors of Persisting Late Functional Antibody Responses to Vaccination in Humans. *PLoS One* 11, e0157066.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162.
- Suan, D., Nguyen, A., Moran, I., Bourne, K., Hermes, Jana R., Arshi, M., Hampton, Henry R., Tomura, M., Miwa, Y., Kelleher, Anthony D., et al. (2015). T Follicular Helper Cells Have Distinct Modes of Migration and Molecular Signatures in Naive and Memory Immune Responses. *Immunity* 42, 704-718.
- Suto, A., Kashiwakuma, D., Kagami, S.-i., Hirose, K., Watanabe, N., Yokote, K., Saito, Y., Nakayama, T., Grusby, M.J., Iwamoto, I., and Nakajima, H. (2008). Development and characterization of IL-21-producing CD4⁺ T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 205, 1369-1379.
- Tamoutounour, S., Guillemins, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., et al. (2013). Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity* 39, 925-938.
- Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., and Deenick, E.K. (2013). The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol* 13, 412-426.
- Tel, J., Sittig, S.P., Blom, R.A.M., Cruz, L.J., Schreiber, G., Figdor, C.G., and de Vries, I.J.M. (2013). Targeting Uptake Receptors on Human Plasmacytoid Dendritic Cells Triggers Antigen Cross-Presentation and Robust Type I IFN Secretion. *The Journal of Immunology* 191, 5005.
- Travis, M.A., Reizis, B., Melton, A.C., Masteller, E., Tang, Q., Proctor, J.M., Wang, Y., Bernstein, X., Huang, X., Reichardt, L.F., et al. (2007). Loss of integrin α (v) β 8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* 449, 361-365.
- Tussiwand, R., Lee, W.-L., Murphy, T.L., Mashayekhi, M., Kc, W., Albring, J.C., Satpathy, A.T., Rotondo, J.A., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., et al. (2012). Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature* 490, 502-507.
- Ueno, H. (2016). T follicular helper cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 43, 24-31.
- Ueno, H., Banchereau, J., and Vinuesa, C.G. (2015). Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nature immunology* 16, 142-152.

- van der Aar, A.M.G., de Groot, R., Sanchez-Hernandez, M., Taanman, E.W.M., van Lier, R.A.W., Teunissen, M.B.M., de Jong, E.C., and Kapsenberg, M.L. (2011). Cutting Edge: Virus Selectively Primes Human Langerhans Cells for CD70 Expression Promoting CD8⁺ T Cell Responses. *The Journal of Immunology* 187, 3488.
- van der Maaten, L. (2013). Barnes-Hut-SNE. *Proceedings of the International Conference on Learning Representations*.
- van der Walt, S., Schonberger, J.L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J.D., Yager, N., Gouillart, E., Yu, T., and scikit-image, c. (2014). scikit-image: image processing in Python. *PeerJ* 2, e453.
- van Wilgenburg, B., Browne, C., Vowles, J., and Cowley, S.A. (2013). Efficient, Long Term Production of Monocyte-Derived Macrophages from Human Pluripotent Stem Cells under Partly-Defined and Fully-Defined Conditions. *PLoS ONE* 8, e71098.
- Velásquez-Lopera, M.M., Correa, L.A., and García, L.F. (2008). Human spleen contains different subsets of dendritic cells and regulatory T lymphocytes. *Clinical and Experimental Immunology* 154, 107-114.
- Victoria, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal Centers. *Annual Review of Immunology* 30, 429-457.
- Victoria, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal Center Dynamics Revealed by Multiphoton Microscopy with a Photoactivatable Fluorescent Reporter. *Cell* 143, 592-605.
- Villani, A.-C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., et al. (2017a). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 356.
- Villani, A.C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., et al. (2017b). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 356.
- Vinuesa, C.G., Cook, M.C., Angelucci, C., Athanasopoulos, V., Rui, L., Hill, K.M., Yu, D., Domaschenz, H., Whittle, B., Lambe, T., et al. (2005). A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* 435, 452-458.
- Vinuesa, Carola G., and Cyster, Jason G. (2011). How T Cells Earn the Follicular Rite of Passage. *Immunity* 35, 671-680.
- Vinuesa, C.G., Linterman, M.A., Yu, D., and MacLennan, I.C.M. (2016). Follicular Helper T Cells. *Annual Review of Immunology* 34, 335-368.
- Vremec, D., O'Keeffe, M., Wilson, A., Ferrero, I., Koch, U., Radtke, F., Scott, B., Hertzog, P., Villadangos, J., and Shortman, K. (2010). Factors determining the spontaneous activation of splenic dendritic cells in culture. *Innate Immunity* 17, 338-352.
- Walker, L.S.K., Gulbranson-Judge, A., Flynn, S., Brouck, T., Raykundalia, C., Goodall, M., Förster, R., Lipp, M., and Lane, P. (1999). Compromised Ox40 Function in Cd28-Deficient Mice Is Linked with Failure to Develop Cxcr5 Chemokine Receptor 5-Positive Cd4 Cells and Germinal Centers. *The Journal of Experimental Medicine* 190, 1115-1122.
- Warnatz, K., Bossaller, L., Salzer, U., Skrabl-Baumgartner, A., Schwinger, W., van der Burg, M., van Dongen, J.J.M., Orlowska-Volk, M., Knoth, R., Durandy, A., et al. (2006). Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* 107, 3045-3052.
- Watanabe, M., Fujihara, C., Radtke, A.J., Chiang, Y.J., Bhatia, S., Germain, R.N., and Hodes, R.J. (2017). Co-stimulatory function in primary germinal center responses: CD40 and B7 are required on distinct antigen-presenting cells. *The Journal of Experimental Medicine*.
- Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., et al. (2014). Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat Immunol* 15, 98-108.
- Weber, J.P., Fuhrmann, F., Feist, R.K., Lahmann, A., Al Baz, M.S., Gentz, L.-J., Vu Van, D., Mages, H.W., Haftmann, C., Riedel, R., et al. (2015). ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2. *The Journal of Experimental Medicine* 212, 217-233.
- Weinstein, J.S., Herman, E.I., Lainez, B., Licona-Limon, P., Esplugues, E., Flavell, R., and Craft, J. (2016). TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat Immunol* 17, 1197-1205.
- Wilson, N.S., El-Sukkari, D., Belz, G.T., Smith, C.M., Steptoe, R.J., Heath, W.R., Shortman, K., and Villadangos, J.A. (2003). Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 102, 2187.
- Wing, J.B., Kitagawa, Y., Locci, M., Hume, H., Tay, C., Morita, T., Kidani, Y., Matsuda, K., Inoue, T., Kurosaki, T., et al. (2017). A distinct subpopulation of CD25⁺ T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E6400-E6409.
- Wipff, P.-J., and Hinz, B. (2008). Integrins and the activation of latent transforming growth factor β 1 – An intimate relationship. *European Journal of Cell Biology* 87, 601-615.
- Wollenberg, A., Kraft, S., Hanau, D., and Bieber, T. (1996). Immunomorphological and Ultrastructural Characterization of Langerhans Cells and a Novel, Inflammatory Dendritic Epidermal Cell (IDEC) Population in Lesional Skin of Atopic Eczema. *Journal of Investigative Dermatology* 106, 446-453.
- Xiao, G., Deng, A., Liu, H., Ge, G., and Liu, X. (2012). Activator protein 1 suppresses antitumor T-cell function via the induction of programmed death 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 15419-15424.
- Xu, H., Li, X., Liu, D., Li, J., Zhang, X., Chen, X., Hou, S., Peng, L., Xu, C., Liu, W., et al. (2013). Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* 496, 523-527.

- Yamashita, M., Ukai-Tadenuma, M., Miyamoto, T., Sugaya, K., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Kimura, M., Taniguchi, M., DeGregori, J., and Nakayama, T. (2004). Essential Role of GATA3 for the Maintenance of Type 2 Helper T (Th2) Cytokine Production and Chromatin Remodeling at the Th2 Cytokine Gene Loci. *Journal of Biological Chemistry* 279, 26983-26990.
- Yao, C., Zurawski, S.M., Jarrett, E.S., Chicoine, B., Crabtree, J., Peterson, E.J., Zurawski, G., Kaplan, D.H., and Igyarto, B.Z. (2015). Skin dendritic cells induce follicular helper T cells and protective humoral immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 136, 1387-1397 e1381-1387.
- Yawalkar, N., Tschamer, G.G., Hunger, R.E., and Hassan, A.S. (2009). Increased expression of IL-12p70 and IL-23 by multiple dendritic cell and macrophage subsets in plaque psoriasis. *J Dermatol Sci* 54, 99-105.
- Yi, T., and Cyster, J.G. (2013). EBI2-mediated bridging channel positioning supports splenic dendritic cell homeostasis and particulate antigen capture. *Elife* 2, e00757.
- Yin, X., Yu, H., Jin, X., Li, J., Guo, H., Shi, Q., Yin, Z., Xu, Y., Wang, X., Liu, R., et al. (2017). Human Blood CD1c⁺ Dendritic Cells Encompass CD5⁺ and CD5^{low} Subsets That Differ Significantly in Phenotype, Gene Expression, and Functions. *The Journal of Immunology* 198, 1553.
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guillemins, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* 38, 79-91.
- Yoshio, S., Kanto, T., Kuroda, S., Matsubara, T., Higashitani, K., Kakita, N., Ishida, H., Hiramatsu, N., Nagano, H., Sugiyama, M., et al. (2013). Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)⁺ dendritic cells are a potent producer of interferon- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 57, 1705-1715.
- Yu, C.I., Becker, C., Metang, P., Marches, F., Wang, Y., Toshiyuki, H., Banchereau, J., Merad, M., and Palucka, A.K. (2014a). Human CD141⁺ Dendritic Cells Induce CD4⁺ T Cells To Produce Type 2 Cytokines. *The Journal of Immunology* 193, 4335.
- Yu, C.I., Becker, C., Metang, P., Marches, F., Wang, Y., Toshiyuki, H., Banchereau, J., Merad, M., and Palucka, A.K. (2014b). Human CD141⁺ dendritic cells induce CD4⁺ T cells to produce type 2 cytokines. *J Immunol* 193, 4335-4343.
- Yu, Chun I., Becker, C., Wang, Y., Marches, F., Helft, J., Leboeuf, M., Anguiano, E., Pourpe, S., Goller, K., Pascual, V., et al. (2013). Human CD1c⁺ Dendritic Cells Drive the Differentiation of CD103⁺ CD8⁺ Mucosal Effector T Cells via the Cytokine TGF- β . *Immunity* 38, 818-830.
- Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., et al. (2009). The Transcriptional Repressor Bcl-6 Directs T Follicular Helper Cell Lineage Commitment. *Immunity* 31, 457-468.
- Yusuf, I., Kageyama, R., Monticelli, L., Johnston, R.J., DiToro, D., Hansen, K., Barnett, B., and Crotty, S. (2010). Germinal Center T Follicular Helper Cell IL-4 Production Is Dependent on Signaling Lymphocytic Activation Molecule Receptor (CD150). *The Journal of Immunology* 185, 190-202.
- Zaba, L.C., Fuentes-Duculan, J., Eungdamrong, N.J., Abello, M.V., Novitskaya, I., Pierson, K.C., Gonzalez, J., Krueger, J.G., and Lowes, M.A. (2009). Psoriasis Is Characterized by Accumulation of Immunostimulatory and Th1/Th17 Cell-Polarizing Myeloid Dendritic Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 129, 79-88.
- Zhang, S., Kodys, K., Li, K., and Szabo, G. (2013). Human Type 2 Myeloid Dendritic Cells Produce Interferon- λ and Amplify Interferon- α in Response to Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology* 144, 414-425.e417.
- Zheng, G.X., Terry, J.M., Belgrader, P., Ryvkin, P., Bent, Z.W., Wilson, R., Ziraldo, S.B., Wheeler, T.D., McDermott, G.P., Zhu, J., et al. (2017a). Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat Commun* 8, 14049.
- Zheng, G.X.Y., Terry, J.M., Belgrader, P., Ryvkin, P., Bent, Z.W., Wilson, R., Ziraldo, S.B., Wheeler, T.D., McDermott, G.P., Zhu, J., et al. (2017b). Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nature Communications* 8, 14049.
- Zhu, J. (2017). T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual Review of Immunology* 28, 445-489.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74.
- Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.M., Smyth, M.J., et al. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med* 207, 365-378.

Annexes