

# Table des matières

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Avant-Propos.....                                                                                         | 3  |
| Index des figures .....                                                                                   | 6  |
| Abréviations .....                                                                                        | 7  |
| Résumé de la thèse.....                                                                                   | 8  |
| Introduction .....                                                                                        | 10 |
| I. L'immunité humorale, objet du contrôle par les Tfr.....                                                | 11 |
| A. Principes de l'immunité humorale.....                                                                  | 11 |
| 1. Découverte.....                                                                                        | 11 |
| 2. Rôle des anticorps .....                                                                               | 12 |
| 3. L'immunité humorale, partie de l'immunité adaptative .....                                             | 13 |
| B. Les différentes phases de la réponse humorale initiale .....                                           | 15 |
| 1. Les prémices : une organisation spatiale.....                                                          | 16 |
| 2. La rencontre du pathogène et du lymphocyte B, et plus si affinité .....                                | 18 |
| 3. De la rencontre de l'antigène à la production d'anticorps, une séquence régulée.....                   | 20 |
| 4. Mutations hypersomatiques, commutation de classe, survie : les deux facettes du centre germinatif..... | 22 |
| 5. Le contact B – T et les trois signaux .....                                                            | 25 |
| C. Les T folliculaires <i>helpers</i> (Tfh) .....                                                         | 27 |
| 1. Découverte de l'implication des cellules T dans la réponse humorale....                                | 27 |
| 2. Découverte des Tfh en tant que sous-population .....                                                   | 27 |
| 3. Développement des Tfh.....                                                                             | 28 |
| 4. Molécules importantes dans la fonction des Tfh .....                                                   | 30 |
| 5. Fonctionnement du Tfh .....                                                                            | 33 |
| 6. Spécificité des Tfh .....                                                                              | 33 |
| II. Les Tfr, outil du contrôle.....                                                                       | 35 |
| A. Découverte des Tfr .....                                                                               | 35 |
| B. Origine et développement .....                                                                         | 37 |
| 1. La question de l'origine.....                                                                          | 37 |
| 2. Développement : phénomènes similaires aux Tfh .....                                                    | 38 |
| 3. Développement : Phénomènes propres aux Tfr .....                                                       | 39 |
| 4. Séquence temporelle différente .....                                                                   | 40 |
| C. Marqueurs et mécanismes d'action .....                                                                 | 41 |
| 1. Foxp3 : régulateurs avant tout.....                                                                    | 41 |
| 2. Blimp-1 .....                                                                                          | 42 |
| 3. PD-1 : une liaison dangereuse.....                                                                     | 43 |
| 4. CTLA-4 .....                                                                                           | 44 |
| 5. Autres effets des Tfr .....                                                                            | 44 |

|                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| D. Spécificité .....                                                                  | 46  |
| E. Controverse .....                                                                  | 47  |
| III. Implication de l'immunité humorale dans la physiopathologie et la thérapie ..... | 48  |
| A. Auto-immunité.....                                                                 | 48  |
| 1. Principes.....                                                                     | 48  |
| 2. Mécanismes et exemples .....                                                       | 49  |
| B. Cancer.....                                                                        | 51  |
| C. Immunodéficiences .....                                                            | 52  |
| 1. Primaires .....                                                                    | 52  |
| 2. Acquises.....                                                                      | 53  |
| D. Vaccination.....                                                                   | 54  |
| E. Greffes .....                                                                      | 55  |
| Objectifs poursuivis .....                                                            | 57  |
| Résultats.....                                                                        | 58  |
| Article 1 – Redéfinition et mode d'action des Tfr .....                               | 59  |
| Article 2 – Répertoire des Tfr.....                                                   | 86  |
| Discussion .....                                                                      | 121 |
| I - Origine et nature des Tfr .....                                                   | 122 |
| A. Tu es né Treg et tu redeviendras Treg, l'origine non assumée.....                  | 122 |
| 1. Origine régulatrice des Tfr – Phénotypique .....                                   | 122 |
| 2. Origine régulatrice des Tfr – Répertoire.....                                      | 123 |
| 3. Origine régulatrice des Tfr – Casus belli.....                                     | 124 |
| B. La voie folliculaire, famille d'adoption .....                                     | 124 |
| II – Mode d'action .....                                                              | 125 |
| A. Les Tfr contrôlent la production d'anticorps.....                                  | 125 |
| 1. Modèles murins.....                                                                | 125 |
| 2. Les trois grâces .....                                                             | 127 |
| B. Le mode d'action commun aux Treg .....                                             | 128 |
| C. Le mode d'action spécifique aux Tfr.....                                           | 129 |
| III – Perspectives : physiologie et thérapie .....                                    | 130 |
| A. Utilisation de la voie de l'IL-1.....                                              | 131 |
| B. Utilisation directe des Tfr .....                                                  | 132 |
| Références Bibliographiques.....                                                      | 135 |
| Annexes .....                                                                         | 151 |

## *Index des figures*

|                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1 : Structure des immunoglobulines .....                                    | 12  |
| Figure 2 : Cinétique de la réponse anticorps.....                                  | 14  |
| Figure 3 : Physiologie de la réponse humorale .....                                | 16  |
| Figure 4 : Schéma de coupe ganglionnaire .....                                     | 17  |
| Figure 5 : Compétitions dans le centre germinatif.....                             | 19  |
| Figure 6 : Chronologie de la formation des centres germinatifs .....               | 22  |
| Figure 7 : Dynamique du centre germinatif.....                                     | 23  |
| Figure 8 : Fonctions d'aide apportées par les Tfh aux B.....                       | 26  |
| Figure 9 : Signaux de différenciation des Tfh .....                                | 30  |
| Figure 10 : Différents modes d'action des Tfr .....                                | 46  |
| Figure 11 : Stratégies d'améliorations vaccinales basées sur les Tfh .....         | 55  |
| Figure 12 : Dichotomie des dialogues Treg/Teff et Tfr/Tfh.....                     | 61  |
| Figure 13 : Proximités respectives des Tfr avec les Tfh et les Treg.....           | 88  |
| Figure 14 : Régulation de l'activité folliculaire par l'IL-1 .....                 | 129 |
| Figure 15: Stratégies thérapeutiques actuelles et futures utilisant les Treg ..... | 132 |

## Abréviations

|          |                                                                      |
|----------|----------------------------------------------------------------------|
| Bcl      | <i>B-cell lymphoma protein</i>                                       |
| BCR      | <i>B-Cell Receptor</i> , récepteur de cellules B                     |
| CC(L/R)  | CC chimiokine (ligand/récepteur)                                     |
| CXC(L/R) | CXC chimiokine (ligand/récepteur)                                    |
| CCP      | <i>Cyclic Citrullinated Peptide</i>                                  |
| CD       | <i>Cluster</i> de Différenciation                                    |
| CFD      | Cellule Folliculaire Dendritique                                     |
| CMH      | Complexe Majeur d’Histocompatibilité                                 |
| CPA      | Cellule Présentatrice d’Antigènes                                    |
| CTLA-4   | <i>Cytotoxic-T Lymphocyte-associated Antigen-4</i>                   |
| Foxp3    | <i>Forkhead/winged-helix Protein 3</i>                               |
| ICOS     | <i>Inducible T-cell Costimulator</i>                                 |
| IFN-     | Interféron-                                                          |
| Ig       | Immunoglobuline                                                      |
| IL-      | Interleukine-                                                        |
| IPEX     | <i>Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked</i>   |
| J        | Jour                                                                 |
| KO       | <i>Knock-Out</i> pour déficient                                      |
| PD-1     | <i>Programmed cell Death 1</i>                                       |
| SAP      | <i>Signalling lymphocyte activation molecular Associated Protein</i> |
| Tfh      | <i>T-follicular helper cell</i>                                      |
| Tfr      | <i>T-follicular regulatory cell</i>                                  |
| TGF      | <i>Transforming Growth Factor</i>                                    |
| TNF      | <i>Tumor Necrosis Factor</i>                                         |
| Treg     | <i>Regulatory T cell</i>                                             |
| Teff     | <i>Effector T cell</i>                                               |
| T        | Lymphocyte T                                                         |
| TCR      | <i>T-Cell Receptor</i> , récepteur de cellules T                     |
| TLR      | <i>Toll-Like Receptor</i>                                            |

## *Résumé de la thèse*

La réponse immunitaire humorale désigne l'ensemble des processus menant à la production d'anticorps suite à une stimulation du système immunitaire. Les lymphocytes T folliculaires régulateurs (Tfr) forment une population essentielle dans le contrôle de l'immunité humorale. Dotés de fonctions régulatrices comme les lymphocytes T régulateurs conventionnels (Treg), les Tfr joueraient un rôle majeur dans les mécanismes de régulation de la production d'anticorps suite à une stimulation. Ils pourraient, par exemple, contrôler l'aide apportée par les lymphocytes T folliculaires *helpers* (Tfh) aux cellules B leur permettant de se différencier en plasmocytes producteurs d'anticorps dans une structure hautement spécialisée appelée centre germinatif (CG).

Suite au constat de la non-réponse des Tfr à l'interleukine (IL)-2, nous avons observé l'absence d'expression de la sous-unité du récepteur à l'IL-2 (CD25) sur ces cellules et ainsi donné de nouvelles bases à la caractérisation phénotypique des Tfr. Cette redéfinition restrictive de la population cellulaire a permis une description plus approfondie de ces cellules et la découverte d'un axe de régulation du CG dépendant de l'IL-1 $\beta$ .

La dualité de régulations observée entre d'une part l'axe Treg - lymphocytes T effecteurs contrôlé par l'IL-2 en dehors du CG et d'autre part l'axe Tfr - Tfh contrôlé par l'IL-1 $\beta$  dans le CG nous a amenés à nous poser la question de l'origine et de la spécificité des Tfr en partie élucidée par une analyse du répertoire de ces populations. Nous avons mis en évidence une similarité en matière de distribution et caractéristiques globales des répertoires des cellules folliculaires qu'elles soient régulatrices (Tfr) ou non (Tfh). Il est également apparu une proximité de spécificités entre le répertoire des Treg et des Tfr confortant l'hypothèse d'une origine commune de ces deux populations.

Ce travail de thèse a permis la découverte d'éléments importants de la biologie des Tfr, population impliquée dans le contrôle des régulations humorales. Il ouvre des perspectives relatives au contrôle de la production d'anticorps tant sa limitation - dans le contexte de maladies auto-immunes - que son exploitation dans le développement de stratégies vaccinales.

## *Abstract*

The immune humoral response offers the organism an efficient protection through the production of antibodies following an immune stimulation.

Follicular regulatory T cell (Tfr) is an essential subset in the control of humoral immunity. These cells share with conventional regulatory T (Treg) cells regulatory functions and should play a major role in the control of antibody production following stimulation. As T follicular helper (Tfh) cells help is essential in the differentiation of B cell into antibody-producing plasma cells, one of the possible mechanisms of Tfr's control could be the limitation of the Tfh cells' help to the B cells.

As a consequence of the non-response of Tfr cells to interleukin (IL)-2, we thoroughly revealed the CD25- phenotype of Tfr cells thus redefining the subset. This stringently-selected population allowed a fine-tuned characterization of Tfr cells and the discovery of an IL-1 $\beta$  axis regulating the germinal center responses.

The dual regulation of T cells in secondary lymphoid organs, one between Treg and Teff cells regulated by IL-2 outside germinal centers and the other between Tfh and Tfr cells regulated by IL-1 inside GCs brought us to question the origin and specificity of Tfr cells. We partially answered this with a high-resolution analysis of these populations' repertoires. We highlighted a similarity in the distributions and global characteristics of the follicular cells' repertoires regardless their regulatory (Tfr) or not (Tfh) phenotype. We also brought out the major sharing between Treg and Tfr repertoires underpinning the hypothesis of a common origin for these populations.

This work has disclosed important aspects of Tfr cells' biology, a fundamental subset in the control of humoral immune responses. It opens many perspectives including the control of antibody production, negatively in the context of autoimmune diseases or its positive exploitation to enhance vaccine efficacy.

# *Introduction*

Les lymphocytes T folliculaires régulateurs (Tfr) forment une sous-population de lymphocytes T de découverte récente. Depuis 2011, on dénombre une centaine de publications traitant de ces cellules auxquelles ont largement contribué quelques équipes dont nous mentionnerons la majorité des travaux ci-après. L'introduction de ce travail a pour but de replacer le lecteur dans un contexte propice à la bonne compréhension du monde dans lequel évoluent ces Tfr. L'immunité humorale fera ainsi l'objet d'une première partie puisqu'elle est la cible de la fonction régulatrice des Tfr (I), cellules qui intriguent tant leur éminent rôle contraste avec leur nombre restreint, décrites dans une seconde partie (II). Une dernière partie traitera de l'implication de l'immunité humorale en pathologie et en thérapie, autant de situations dans lesquelles l'impact ou l'utilisation des Tfr n'ont que peu (ou pas) été évaluée (III).

## *I. L'immunité humorale, objet du contrôle par les Tfr*

### *A. Principes de l'immunité humorale*

Le terme d'immunité humorale venait à l'origine du fait que l'on avait compris, dès la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, que les éléments (les anticorps en l'occurrence) responsables de la protection contre divers pathogènes étaient contenus dans les fluides corporels alors appelés humeurs. Depuis leur découverte (1), le rôle des anticorps a été précisé (2) et a permis de resituer l'immunité humorale au sein de l'immunité adaptative (3).

#### *1. Découverte*

La première découverte fondamentale du fonctionnement humoral de l'immunité est attribuée à Emil Von Behring et Kitasato Shibasaburo qui, en 1890, ont réalisé l'observation suivante : l'injection de sérum d'animaux immunisés avec du tétanos atténué permettait de protéger les animaux receveurs quand ils étaient par la suite infectés avec du tétanos pathogénique. C'était la première preuve d'une protection spécifique passant par le sérum. Il a également été noté que cette protection était efficace sur des animaux déjà malades.

Par la suite, le premier essai de sérothérapie a été conduit avec du sérum contre la diphtérie produit par administration du pathogène à des chevaux, et standardisé par Paul Ehrlich en 1893. Paul Ehrlich est en outre l'inventeur du terme anticorps. Ces travaux valurent à Von Behring de devenir le premier récipiendaire du Prix Nobel de physiologie et de médecine en 1901.



## 2. Rôle des anticorps

De nombreux rôles ont depuis été découverts et attribués aux anticorps (aussi appelés immunoglobulines (Ig)). Il est nécessaire – afin de comprendre lesdits rôles – de décrire la structure de ces molécules. Ces protéines, effectrices solubles de l'immunité humorale spécifique, comportent deux parties et sont formées de 4 chaînes polypeptidiques. Deux chaînes lourdes identiques et deux chaînes légères identiques. Les chaînes lourdes peuvent être de 5 types définissant les 5 classes d'immunoglobulines (IgD, IgM, IgA, IgE, IgG). Les chaînes légères peuvent être de deux types, lambda ou kappa. Une fois associées, les chaînes lourdes et légères présentent deux zones fonctionnelles comme présenté sur la Figure 1.

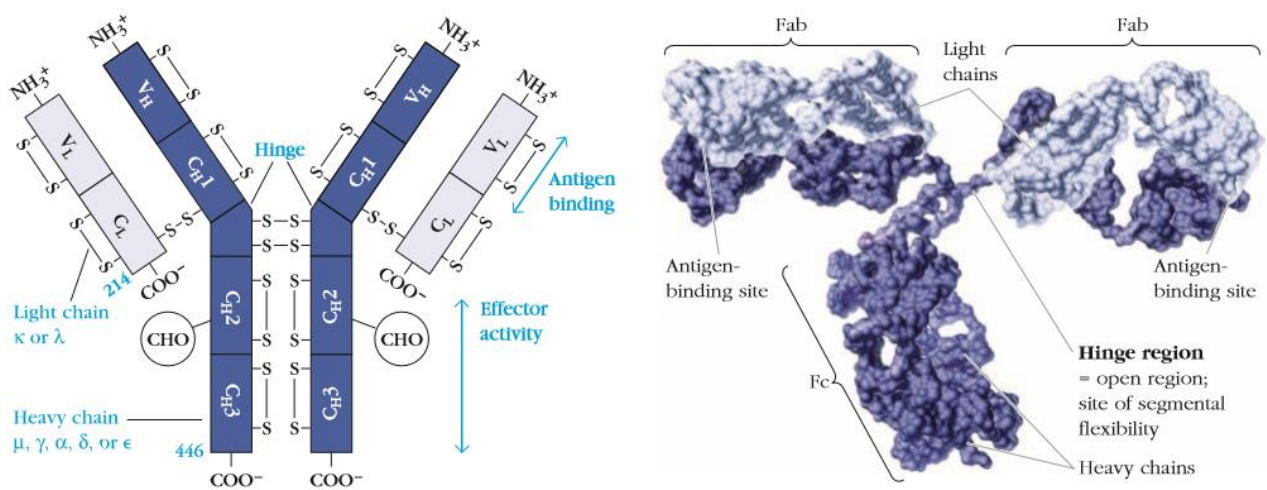


Figure 1 : Structure des immunoglobulines, Kuby, Immunology 7th edition

La partie Fab est formée de l'association entre chaîne lourde et chaîne légère. C'est la partie qui assure la fonction de reconnaissance spécifique de l'antigène, capable de reconnaître l'épitope (zone de l'antigène reconnue par l'anticorps) de façon native. Trois principales fonctions sont associées à cette partie Fab :

- la neutralisation des toxines (bactériennes notamment) ;
- l'inhibition de l'adhésion des bactéries aux surfaces cellulaires ;
- le blocage de l'infection par les virus (en général en bloquant la fixation du virus à son récepteur).

La diversité de la partie Fab est le produit de mécanismes de réarrangements somatiques entre différents gènes lors du développement lymphocytaire conduisant à une grande diversité de molécules capables de reconnaître une infinité d'antigènes (Alberts et al., 2002; Tonegawa, 1983).

La partie Fc, formée uniquement par les chaînes lourdes de l'immunoglobuline, donne la classe d'un anticorps aussi nommée isotype. Il existe ainsi 5 classes d'anticorps dont nous précisons ici pour certaines des fonctions effectrices. Citons par exemple et de manière non exhaustive les activités suivantes (Schroeder and Cavacini, 2010) :

- les **IgM**, premières produites et généralement associées aux Fab ayant le moins d'affinité pour l'antigène (les raisons sont expliquées plus bas), sont capables d'activer la voie classique du complément. Elles se regroupent en pentamères permettant d'augmenter l'avidité pour l'antigène reconnu (Ehrenstein and Notley, 2010; Schroeder and Cavacini, 2010) ;
- les **IgA** et leurs deux sous-classes assurent l'immunité des muqueuses (Schroeder and Cavacini, 2010). Dans la lumière du tube digestif par exemple, les IgA interagissent avec de nombreux antigènes intestinaux dont les aliments, le microbiote intestinal ou encore les antigènes du soi ;
- les **IgE** sont importantes pour la réponse contre les infections parasitaires en général, et les helminthes en particulier. Elles sont aussi responsables des allergies par la dégranulation des mastocytes en se fixant sur les récepteurs FcεR exprimés par les mastocytes, basophiles et éosinophiles notamment (Galli and Tsai, 2012) ;
- les **IgG** assurent quant à elles les fonctions de neutralisation (que ce soit des microorganismes ou les toxines), ainsi que la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), aidées en cela par les cellules Natural Killer (NK). C'est la classe d'anticorps prédominante du sérum et elle présente 4 sous-classes aux multiples rôles (Vidarsson et al., 2014) ;
- les **IgD** enfin ont une fonction pour l'instant non totalement élucidée (Edholm et al., 2011).

### *3. L'immunité humorale, partie de l'immunité adaptative*

Le système immunitaire des vertébrés est doté de deux types de réponses : la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. L'immunité humorale s'inscrit dans l'immunité adaptative définie par deux principales caractéristiques que sont la spécificité et la mémoire. En effet, la réponse adaptative implique un ensemble d'éléments moléculaires et cellulaires capable de reconnaître spécifiquement des antigènes (généralement protéiques mais aussi lipidiques ou polysaccharidiques) composant les pathogènes et de les éliminer activement tout en étant capable des

mêmes procédés plus rapidement et plus efficacement lors d'un nouveau contact. En effet, lors d'une nouvelle entrée d'un pathogène dans l'organisme et grâce à des phénomènes de mémoire, le système immunitaire est capable de produire des anticorps plus affins encore et plus rapidement que lors de la première rencontre avec ce pathogène et cela même des années plus tard (Figure 2). C'est d'ailleurs le principe de la vaccination qui consiste en une première présentation du pathogène au système immunitaire afin de préparer ce dernier à une nouvelle entrée (non contrôlée cette fois-ci) d'un pathogène.

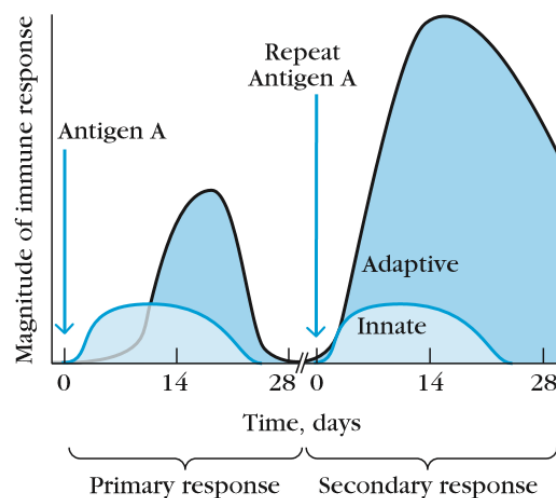


Figure 2 : Cinétique de la réponse anticorps, Kuby, Immunology 7th edition

L'immunité humorale fait intervenir deux types de cellules de l'immunité adaptative. Les **cellules B** sont originaires de la moelle osseuse et peuvent au cours de leur maturation se différencier en plasmocytes (Pieper et al., 2013). Ce sont ces plasmocytes qui produiront par la suite les anticorps, médiateurs de l'immunité humorale. Avant une éventuelle maturation en plasmocyte, le lymphocyte B porte à sa surface les anticorps qu'il est capable de générer. Ils forment le B-Cell Receptor (ou BCR) capable de reconnaître les antigènes de la même façon que l'anticorps et par conséquent d'activer la cellule qui les porte. Les lymphocytes B subissent une maturation en deux temps. Le premier dans la moelle osseuse pour générer des lymphocytes B naïfs. Le second dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS), après rencontre avec l'antigène. Ils peuvent alors augmenter leur affinité pour cet antigène (*via* des mutations aléatoires de leur récepteur) et proliférer de façon intense. Ils se dirigeront ensuite vers deux phénotypes possibles : les plasmocytes sécréteurs d'anticorps et les lymphocytes B mémoires capables de réagir plus rapidement lors d'un nouveau contact

avec le même antigène. Pour la plupart des mécanismes de la 2<sup>e</sup> partie de maturation, les lymphocytes B ont besoin de l'aide d'une population spécialisée de lymphocytes T. Les **cellules T** sont originaires du thymus (après une origine très précoce dans la moelle osseuse) (Santana and Esquivel-Guadarrama, 2006). Elles ne reconnaissent pas directement quant à elles les peptides dont elles sont spécifiques mais leur *T-Cell Receptor* (TCR) est spécifique du couple complexe majeur d'histocompatibilité - peptide (CMH-peptide) exprimé à la surface de cellules présentatrices d'antigène (CPA) (comme les cellules dendritiques ou bien les cellules B). Deux grandes catégories de cellules T co-existent à la sortie du thymus, les CD4<sup>+</sup> et les CD8<sup>+</sup>. Ce sont les cellules CD4<sup>+</sup> qui coopèrent avec les lymphocytes B et par cellules T nous considérerons par la suite les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Une fois sortie du thymus, la cellule T fonctionnelle est naïve et son phénotype ainsi que son spectre d'action vont se préciser en périphérie en fonction du contexte (notamment cytokinique) que la cellule va rencontrer. Les cellules T folliculaires *helper* (Tfh) sur lesquelles nous reviendrons sont des cellules spécialisées dans l'aide aux cellules B. Nous verrons plus tard dans cette introduction de quelle façon ces mécanismes de reconnaissance s'agencent entre eux pour produire une réponse humorale.

## B. Les différentes phases de la réponse humorale initiale

Ces phases vont être abordées chronologiquement mais peuvent être synthétisées par le schéma apporté en Figure 3.

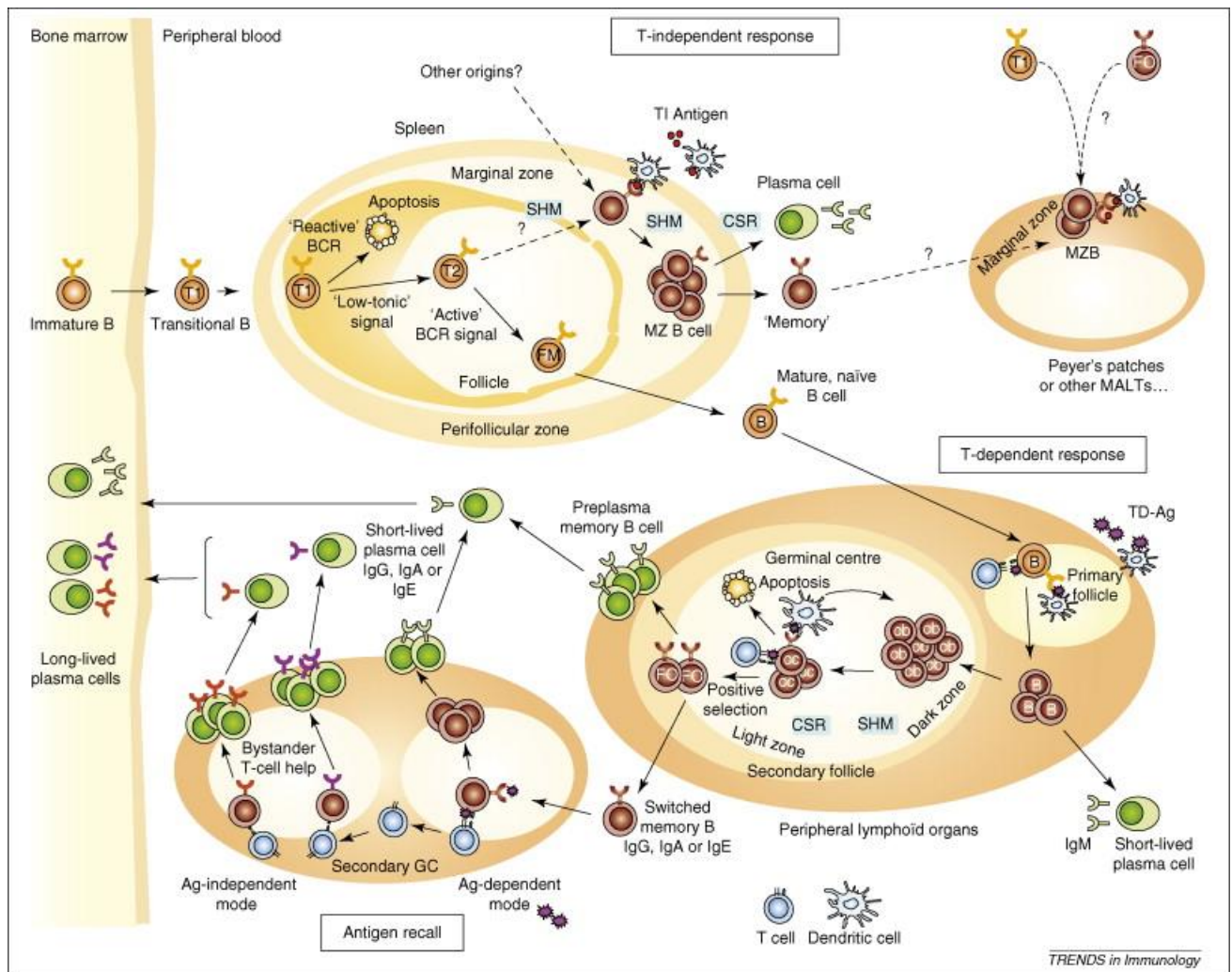


Figure 3 : Physiologie de la réponse humorale, d'après Roulland S., Trends in Immunol., 2008

### 1. Les prémices : une organisation spatiale

La réponse immunitaire a lieu dans des OLS (rate, ganglions lymphatiques et système immunitaire associé aux muqueuses notamment) organisés en différentes zones spécialisées dans la différenciation et maturation des acteurs de la réponse adaptative, les lymphocytes B et T. Dans chacune des zones, les cellules rencontrent des antigènes mais d'une façon différente. Comme nous l'avons vu, le lymphocyte B reconnaît directement l'antigène qui lui arrive soit par diffusion, soit présenté par d'autres types cellulaires présents dans la zone B de l'OLS (macrophages ou cellules folliculaires dendritiques (CFD) par exemple (Batista and Harwood, 2009)). Le lymphocyte T quant à lui reconnaît indirectement les peptides de l'antigène, antigène qui aura préalablement été endocyté par une cellule dendritique, découpé en peptides et présenté à la surface de ces dernières porté par une molécule de CMH.

La plupart des réponses humorales nécessitent la rencontre d'un lymphocyte B et d'un lymphocyte T de même spécificité pour une pleine efficacité (Crotty, 2015). Il existe

néanmoins certaines réponses dites T indépendantes (Lanzavecchia and Sallusto, 2007) pour lesquelles l'activation des cellules B et leur efficacité ne nécessite pas l'aide d'une cellule T. Il en est ainsi des réactions immunitaires contre les antigènes de nature non protéique par exemple.

Il faut toutefois remarquer que la probabilité de rencontre d'un lymphocyte B (estimée chez les B naïfs à 1/10 000 à 1/1 000 000) et d'un T naïf (estimée chez les T naïfs de 1/10 000 à 1/100 000 000) spécifiques du même antigène est très faible sans aide extérieure. L'organisation anatomique du système immunitaire résout ce problème en centralisant dans les OLS les antigènes captés par les CPA et en permettant aux cellules B et T de patrouiller constamment dans l'organisme à la rencontre de ces CPA. Les cellules B se trouvent dans des follicules, dans le cortex externe des ganglions et les cellules T dans le paracortex, entre ces follicules. Dans la rate, on trouve une compartimentation similaire avec à nouveau zones B et zones T séparées mais ayant une frontière commune. Un schéma de coupe ganglionnaire est présenté sur la Figure 4.

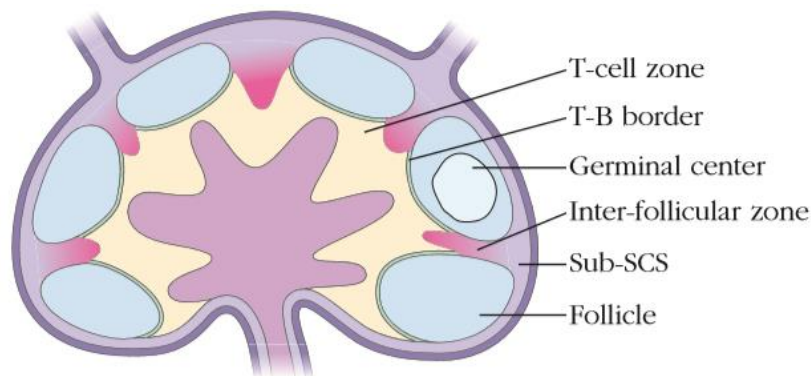


Figure 4 : Schéma de coupe ganglionnaire, Kuby, Immunology 7th edition

Bien qu'ayant des zones réservées dans les OLS, les cellules B et T sont capables de circuler dans l'organisme. La migration vers les OLS et plus précisément vers les zones B dans lesquelles les cellules vont résider est le fait d'un gradient de chimiokines, cytokines chimiotactiques qui contrôlent le mouvement des cellules portant le récepteur leur étant spécifique. Ainsi les cellules B porteuses du CXCR5 vont migrer suivant le gradient de CXCL13, le ligand de ce récepteur, produit par les CFD dans les zones B des OLS (Stein and Nombela-Arrieta, 2005). Au cours de leur circulation entre les différents ganglions, lorsqu'un lymphocyte B naïf mature (maturité acquise dans la moelle osseuse) entre dans l'OLS, il rejoint un follicule primaire à la recherche de

l'antigène dont ses BCR sont spécifiques (Batista et al., 2001). A la rencontre de cet antigène, le lymphocyte B le capture et, comme la cellule dendritique, le dégrade puis en présente des peptides sur des molécules de CMH de classe II qu'il exprime à sa surface. En parallèle, il migre à la frontière avec la zone T en région inter-folliculaire et prolifère suite aux interactions longues avec un lymphocyte T spécifique du complexe CMH-peptide exprimé par le lymphocyte B. Les lymphocytes B naïfs émigrants de la moelle osseuse portent des BCR de très grande variété (un même BCR par cellule B) générés par des processus de recombinaison génétique. Ces phénomènes permettent d'obtenir une diversité très largement supérieure à celle du nombre de gènes codant pour le BCR.

## *2. La rencontre du pathogène et du lymphocyte B, et plus si affinité*

Nous avons vu que les lymphocytes B étaient capables de reconnaître des agents issus de pathogènes ou toxines et que cette reconnaissance avait lieu dans les OLS, avec pour résultante la sécrétion d'anticorps. Cependant, la reconnaissance n'implique pas nécessairement la transformation du lymphocyte B en plasmocyte. En effet, il est admis que sur le pool de B qui répond à l'antigène, ceux qui deviennent des plasmablastes seraient ceux avec la meilleure affinité pour cet antigène (Paus et al., 2006). Des souris aux BCR transgéniques avec des B naïfs de haute affinité pour l'antigène perdent en effet leur capacité à former des centres germinatifs et ne développent ni B mémoires ni plasmocytes à longue durée de vie (O'Connor et al., 2006).

Se pose alors ici une question concernant non seulement cette première rencontre avec l'antigène mais également les suivantes dont nous discutons plus loin dans cette introduction. L'affinité moyenne de l'ensemble des lymphocytes B impliqués dans le processus est en effet en constante augmentation tout au long de la réponse humorale. D'aucuns se sont demandés ce qui causait cette augmentation d'affinité des cellules B du centre germinatif. Deux hypothèses s'affrontent et sont synthétisées en Figure 5 :

### Hypothèse 1 : l'antigène comme facteur limitant

Une des compétitions peut être celle pour l'accès à l'antigène présent sur la surface des CFD. Les cellules avec la meilleure affinité communiqueraient leur présence à celles de basse affinité en consommant tout l'antigène, bloquant ainsi l'accès aux sites sur les CFD. En cas de basse affinité, le signal BCR est insuffisant pour permettre aux cellules de résister à l'apoptose. Les cellules T présentes dans le follicule auprès des cellules B



pourraient jouer un rôle accessoire en fournissant un signal à toutes les cellules ou un signal de différenciation aux cellules « sélectionnées par l'antigène » (Manser, 2004).

### Hypothèse 2 : le T comme facteur limitant

Dans une alternative à ce modèle, les T sont le facteur limitant. Le BCR capture, internalise puis apprête les peptides des antigènes présentés par les CFD en fonction de l'affinité qu'ils ont pour ces derniers (Batista et al., 2001). Le signal émis suite à la liaison du BCR à l'antigène serait suffisant pour assurer la survie des cellules B. Cependant seules les cellules B présentant une quantité suffisante de complexe CMH-peptide à leur surface recevraient de l'aide des cellules T spécifiques de ce complexe, en nombre limité à proximité. Ce qui arriverait avec les B qui ont la meilleure affinité (Tarlinton, 2008).

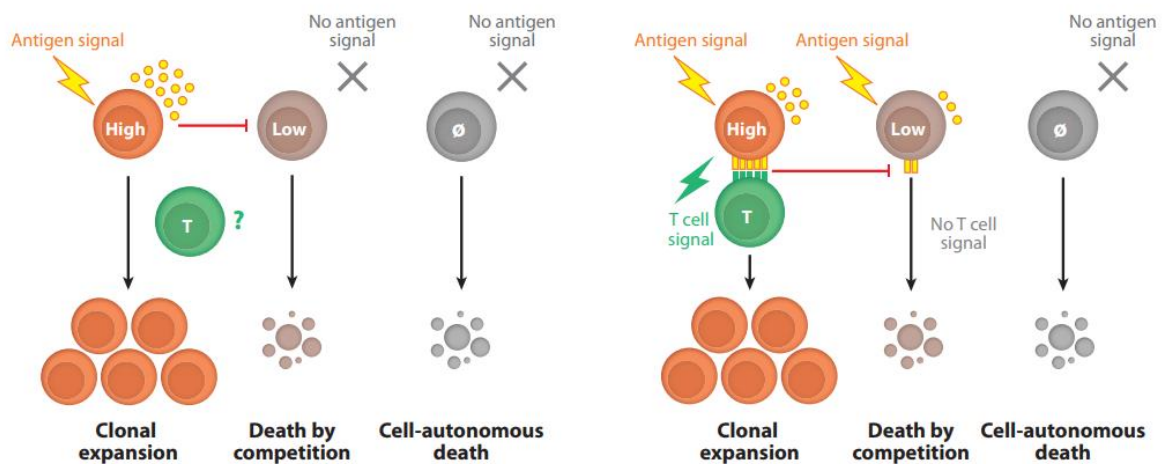


Figure 5 : Compétitions dans le centre germinatif, Victora GD., *Annu Rev Immunol.*, 2012

Précisons enfin que certains lymphocytes B activés par l'antigène n'attendent par leur coopération avec le lymphocyte T et se différencient directement en plasmablastes de courte durée de vie sécrétant des anticorps de basse affinité pour contrer rapidement le pathogène. Ces anticorps sécrétés sont de classe IgM.



### *3. De la rencontre de l'antigène à la production d'anticorps, une séquence régulée*

La génération d'anticorps de haute affinité est dépendante de la rencontre d'un lymphocyte B et d'un lymphocyte T de même spécificité. La chronologie de cette rencontre est désormais connue très précisément et a été schématisée par plusieurs équipes. Ainsi, on connaît l'exacte séquence d'activation respective des B et des T puis leur différenciation et leur avenir commun.

#### *a. Une première étape à distance*

Les cellules T en charge de l'aide aux lymphocytes B sont les cellules Tfh et leur description fera l'objet de la partie C de cette section. Au moment de sa rencontre avec l'antigène, le Tfh est une cellule T naïve. Une fois le contact établi avec la cellule dendritique qui lui présentera l'antigène, si les conditions sont réunies, le T naïf se différencie en Tfh puis se dirige à la bordure B-T de l'OLS par modulation de son expression de récepteurs de chimiokines. Le lymphocyte B quant à lui se voit présenté l'antigène comme évoqué précédemment et se localise aussi à la bordure B-T. Nos deux cellules sont prêtes à se rencontrer.

#### *b. Première rencontre, lieu neutre*

L'interaction B-T a donc lieu à la bordure entre follicules B et zones T après que le B a été activé dans les follicules et les lymphocytes T dans la zone T par une cellule dendritique. Le lymphocyte B a capté l'antigène qui lui a été présenté. La reconnaissance de cet antigène avant sa capture lui a permis de s'activer, d'endocyter l'antigène et d'en apprêter des peptides. Il l'a enfin présenté à sa surface sur les molécules de CMH de classe II. Pendant leur interaction, les lymphocytes B présentent donc l'antigène aux lymphocytes T et reçoivent des signaux en retour, précisés quelques paragraphes ci-après. La relocalisation des B et des T à la frontière entre deux microenvironnements adjacents est en grande partie nécessaire au fonctionnement du système. Elle est due à l'augmentation de l'expression d'une part de CCR7 par les lymphocytes B, récepteur des chimiokines CCL21 et CCL19 produites dans la zone T (Reif et al., 2002) et d'autre part à celle de l'expression du récepteur CXCR5 par les lymphocytes T, récepteur pour la chimiokine CXCL13 de la zone B.

La rencontre a lieu au premier jour après l'entrée de l'antigène dans l'organisme. Les lymphocytes T sont arrivés légèrement avant les B (Kerfoot et al., 2011). A ce moment, les deux types cellulaires augmentent leur expression du répresseur Bcl6 (sous l'effet des rencontres respectives de l'antigène), facteur de transcription central à la fois pour les Tfh et les B. A nouveau, cette augmentation de Bcl-6 intervient légèrement plus tôt chez les Tfh que chez les B, détectable seulement à 2 jours (J2) après l'immunisation. A J3, les Tfh se sont engouffrés dans le follicule. Les précurseurs du centre germinatif pénètrent également au centre de ce follicule et forment le centre germinatif précoce, un jour plus tard. Nous sommes au 4<sup>e</sup> jour (J4) jour après l'entrée de l'antigène.

### c. Création du centre germinatif et de ses zones

La chorégraphie savamment orchestrée des cellules B et T dans les centres germinatifs est illustrée en Figure 6. Les centres germinatifs précoces sont décelables en histologie et sont essentiellement enrichis en CFD à J4 après immunisation. Les B activés et recrutés deviennent centroblastes (cellules B en intense prolifération dans le centre germinatif) et peuplent le réseau de CFD au centre du follicule. Pendant ce processus, les lymphocytes B activés par leur reconnaissance de l'antigène, dans leur prolifération, repoussent les lymphocytes B naïfs (caractérisés par le phénotype CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>), peuplant les follicules et n'ayant pas rencontré l'antigène pour lequel leurs BCR sont spécifiques. Cette étape résulte en la formation d'un manteau de cellules B naïves autour du centre germinatif. A J5-6, le centre germinatif augmente de taille du fait de la prolifération rapide des centroblastes jusque J7, délai à partir duquel les GC sont complètement mis en place et polarisés en deux zones (Nieuwenhuis and Opstelten, 1984).

- une zone **sombre** dans laquelle d'intenses proliférations ont lieu ainsi que des hypermutations somatiques (voir section suivante). Les lymphocytes B de cette zone sont les **centroblastes** ;
- une zone **claire** dans laquelle on trouve un réseau de CFD avec l'antigène (Mandel et al., 1980). Les Tfh se trouvent dans cette zone et aident à la sélection des lymphocytes B les plus affins pour l'antigène. Les lymphocytes B de cette zone sont les **centrocytes**.

Il existe une navette entre les deux compartiments, avec une relation de progéniteur à produit (MacLennan, 1994). La polarisation des B dans les deux zones du centre germinatif est due à deux couples de chimiokines/récepteurs : CXCL13/CXCR5 et

CXCL12/CXCR4 pour la zone claire et la zone sombre du centre germinatif respectivement (Allen et al., 2004). Les raisons de cette navette sont étudiées dans le paragraphe suivant.

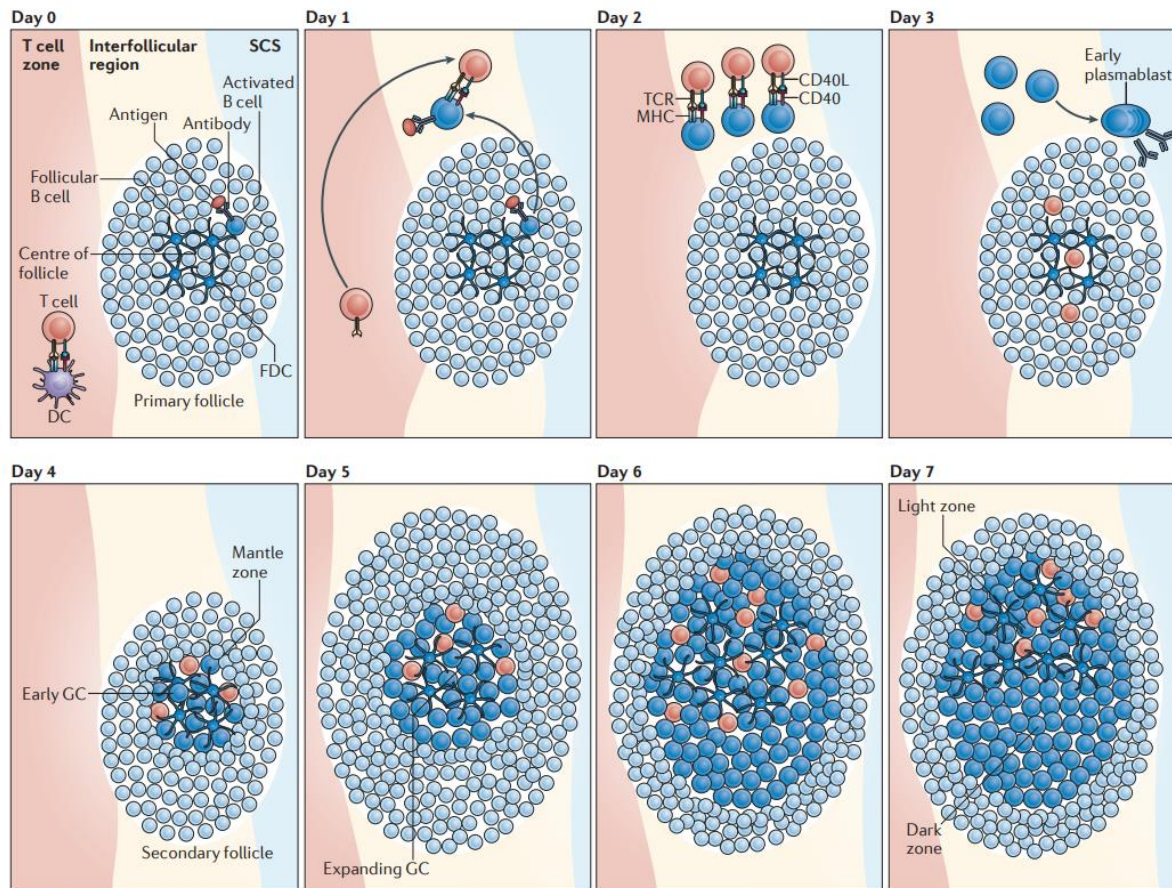


Figure 6 : Chronologie de la formation des centres germinatifs, De Silva N., Nat Rev Immunol, 2012.

#### 4. Mutations hypersomatiques, commutation de classe, survie : les deux facettes du centre germinatif

Le centre germinatif à ses débuts est constitué d'une population de cellules B oligoclonale. Quelques cellules, celles avec les BCR les plus affins pour l'antigène (en dehors des plasmablastes rapidement générés et déjà décrits), le forment et commencent à proliférer. Petit à petit, la diversité dans le centre germinatif se réduit pour arriver à environ 1 à 3 clones par centre germinatif mature (1993).

##### a. Processus génétiques dans les deux zones

Ces clones seront ensuite les chefs de file des lymphocytes B puisqu'à cette étape intervient la maturation d'affinité incluse dans un processus de ré-entrée cyclique. Il y

a en effet à ce moment-là un circuit entre la **zone sombre** du centre germinatif dans laquelle sont assurées la prolifération et les hypermutations somatiques (De Silva and Klein, 2015) et la **zone claire** en présence de Tfh et de CFD dans laquelle les cellules suffisamment affines pour l'antigène pourront recevoir des signaux de survie et se différencier (Figure 7). Dans la zone sombre ont lieu des hypermutations qui permettent à partir d'un clone B et grâce au fonctionnement de l'enzyme *activation-induced cytidine déaminase* (AID) (découverte en 1999 (Muramatsu et al., 1999)) de réaliser des remaniements dans les gènes codant pour le BCR afin d'obtenir une meilleure affinité pour l'antigène (Rajewsky et al., 1987). Le processus d'hypermutation somatique (car se produisant en dehors des gamètes) n'intervient qu'après le contact avec l'antigène et affecte les régions variables des chaînes lourdes et légères de l'anticorps. Ce processus nécessite l'interaction des B et des T *via* le couple CD40-CD40L.

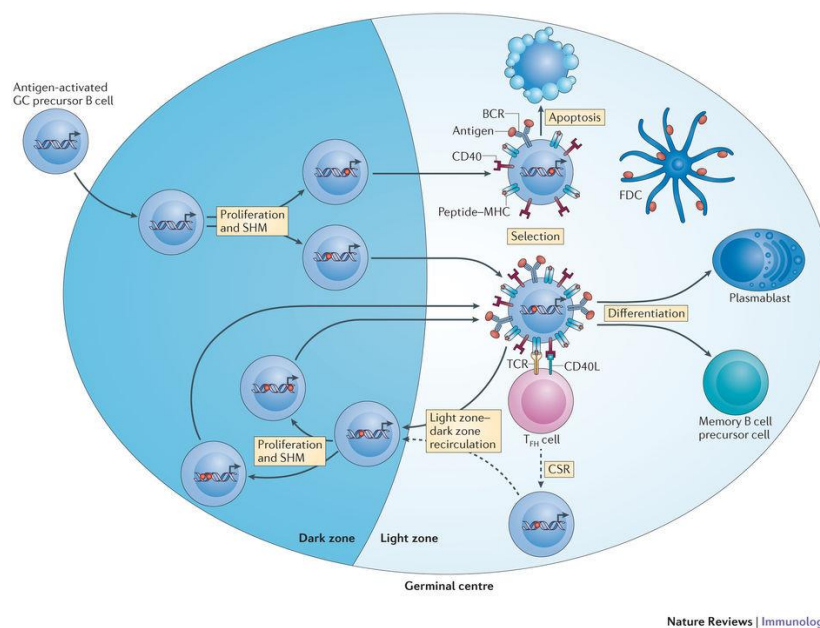


Figure 7 : Dynamique du centre germinatif, Da Silva N., Nat Rev Immunol., 2012

La commutation de classe des gènes des Ig (Cory et al., 1981) a quant à elle lieu dans la zone claire lors du contact entre centrocytes et Tfh en fonction des signaux envoyés par ceux-ci. Le signal CD40-CD40L est à nouveau très important dans ce processus. Comme l'hypermutation somatique, la commutation isotypique est orchestrée par AID. Il est à noter que la commutation IgM ou IgD, les classes initialement portées par

les BCR des lymphocytes B naïfs, qui proviennent du même transcrit, se fait au niveau de l'ARN alors que le choix d'IgM vers une autre classe d'anticorps (IgA, IgE, IgG) se fait au niveau de l'ADN.

#### b. Survie et différenciation

Dans la zone sombre du centre germinatif, la plupart du temps, les mutations induites aboutissent à une réduction de l'affinité du BCR pour l'antigène et seule une infime quantité génère un BCR de plus haute affinité. La transition de centroblaste à centrocyte est accompagnée par un arrêt du cycle et la migration vers la zone claire : à nouveau un endroit de décision. Le BCR est réexprimé et son expression contrôlée par les Tfh et les CFD (Vinuesa et al., 2005). En fonction de l'affinité du nouveau BCR, les centrocytes :

- entrent une nouvelle fois dans un cycle d'hypermutations somatiques en tant que centroblastes en cas d'affinité inchangée ;
- sont éliminés par apoptose en cas d'affinité diminuée ;
- subissent une commutation de classe pour compléter leur maturation en cas de haute affinité

Nous sommes dans un système dangereux pour le lymphocyte B qui n'a que peu d'alliés à cette étape dans le ganglion. La CFD produit le facteur de survie BAFF mais en quantité insuffisante. Le Tfh exprime Fas L, le ligand de Fas. Ce récepteur de mort exprimé en grande quantité sur le lymphocyte B (Yoshino et al., 1994) conduit la cellule à l'apoptose au moment du contact avec son ligand si des signaux contraires ne sont pas émis. Si le BCR est suffisamment affin, l'induction de Bcl2 (une molécule antiapoptotique) engendrée surpassera les signaux de mort. Dans le cas contraire, l'induction de BIM surajoutée aux autres phénomènes décrits induira l'apoptose (voie par défaut pour les lymphocytes B du centre germinatif) (Liu et al., 1989).

Les B matures, commutés et hypermutés, avec une bonne affinité et donc une augmentation de l'expression de Bcl2, sortent du centre germinatif

- soit comme cellules B mémoires commutées avec des IgG, A ou E ;
- soit après une grande expansion et une différenciation supplémentaire en plasmocytes à courte durée de vie, capables de sécréter des IgG, IgA, IgE. Une fraction de ces plasmocytes re-circulent dans des niches de la moelle osseuse et deviennent mémoires (McHeyzer-Williams et al., 2006) ;

Les B mémoires re-circulent dans les organes périphériques lymphoïdes et sont des régulateurs de la mémoire à long terme en cas de nouvelle présence de l'antigène. Dans cette situation, les B mémoires très affins et déjà commutés sont réactivés de façon spécifique par les T activés eux aussi par l'antigène, et subissent de nouveaux cycles de mutations somatiques pour certains d'entre eux afin d'obtenir une affinité encore meilleure, ou deviennent à leur tour plasmocytes à courte durée de vie pour agir dans un délai court contre le pathogène et/ou ses toxines.

### 5. *Le contact B – T et les trois signaux*

Les lymphocytes B font partie des rares cellules présentatrices d'antigènes dites professionnelles : cellules capables d'exprimer le CMH de classe II et par conséquent de présenter des peptides et d'interagir avec les cellules T CD4<sup>+</sup> *via* leur TCR. Les lymphocytes B expriment également des facteurs de co-stimulation et des cytokines permettant ces échanges B – T.

A la suite du premier signal d'activation des cellules T et B alors dans leurs zones respectives, lors de la première rencontre avec l'antigène, et des circulations des B et des T, d'abord à la bordure entre la zone B et la zone T puis dans le follicule, deux autres signaux vont contribuer de façon critique au processus de différenciation des B en cellules productrices d'anticorps.

#### a. Premier signal

Le premier signal d'activation des B provient de la reconnaissance de l'antigène *via* le BCR. Il n'y a pas de signalisation directe *via* ce BCR mais une signalisation passant par les motifs ITAM des deux corécepteurs du BCR Igα et Igβ. Ces derniers vont induire après phosphorylation une cascade de signalisation impliquant d'autres molécules, et notamment des kinases (Woyach et al., 2012). Cela augmente alors la capacité de collaboration des B avec les Tfh et la stimulation de ces mêmes Tfh. Il y a en effet une augmentation des molécules B7 (CD80/86), une augmentation de la présentation *via* une augmentation de l'expression du CMH de classe II, ainsi qu'une augmentation de l'expression de récepteurs de cytokines. Ces préalables rendent possible le deuxième signal.



### b. Deuxième signal

Le contact du TCR avec le CMH de classe II de la cellule B portant le peptide dont le T CD4 est spécifique, ainsi que la co-stimulation par la liaison CD80/86 (sur le lymphocyte B) et CD28 (sur le lymphocyte T), vont provoquer l'augmentation de l'expression des marqueurs de co-stimulation CD40L et ICOS. La liaison CD40-CD40L notamment va impliquer survie et prolifération des lymphocytes B.

### c. Troisième signal

Le troisième signal, enfin, est un signal cytokinique. Les lymphocytes B qui à la rencontre de l'antigène ont augmenté l'expression des récepteurs de cytokines vont pouvoir recevoir les signaux émis par les lymphocytes Tfh, notamment l'IL-4 et l'IL-21.

L'aide des cellules T aux cellules B revêt plusieurs formes dont un aperçu est donné dans la Figure 8. On voit notamment que le T est nécessaire à la survie, la prolifération, la différenciation des B en plasmocytes, l'adhésion ou encore la commutation de classe des cellules B. Il est à noter que seules quelques molécules impliquées dans chaque processus sont indiquées sur ce schéma car chaque action nécessite la coordination d'un grand nombre de facteurs.

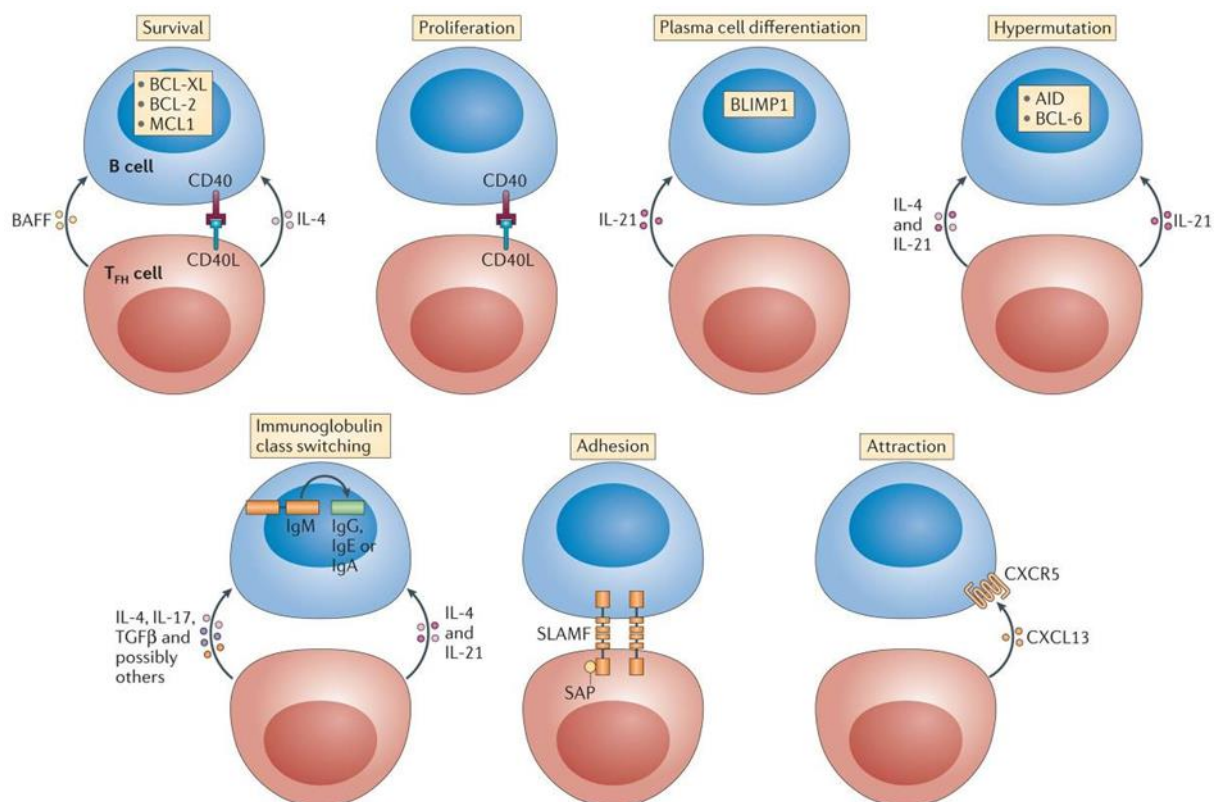


Figure 8 : Fonctions d'aide apportées par les Tfh aux B, Crotty S., Nat Rev Immunol., 2012

## C. Les T folliculaires *helpers* (Tfh)

### 1. Découverte de l'implication des cellules T dans la réponse humorale

La réponse B – T dépendante nécessite l'intervention des cellules T pour aboutir : une protéine purifiée injectée n'induit pas de manière générale d'anticorps spécifiques. On peut tout d'abord d'un point de vue finaliste se demander pourquoi la réponse B dépend d'une réponse T dans la majorité des cas. Une des explications à cela est que les répertoires BCR et TCR, générés de manière aléatoire par des réarrangements des segments génétiques V(D)J, subissent respectivement des mécanismes de sélection afin de limiter leur activation en réponse à des antigènes du soi. Cependant, certains clones auto-réactifs dans chaque catégorie de cellules persistent malgré ces phénomènes de sélection et le fait de devoir combiner une cellule B et une cellule de T de même spécificité lors d'une stimulation pour obtenir une réponse humorale permettrait de minimiser les risques d'une activation auto-immune du système.

Bien loin de ces considérations relatives à la question de la tolérance, les premières évidences de la nécessité de cellules T aidant les B (ce qui d'ailleurs leur a donné leur nom de *T helper cells*) viennent de la fin des années 1960 avec des articles de Miller et Mitchell. Grâce à des expériences de transferts cellulaires, ils ont montré que ni les cellules issues du thymus seules ni de celles de la moelle osseuse seules n'étaient suffisantes pour le développement de réponses anticorps. Mais le co-transfert de cellules issues de ces deux organes induit en revanche une bonne réponse anticorps (Miller and Mitchell, 1968; Mitchell and Miller, 1968). De nombreuses expériences confirmèrent par la suite la nécessité dans la plupart des cas de cellules issues du thymus pour l'activation des cellules productrices d'anticorps (Raff, 1970).

### 2. Découverte des Tfh en tant que sous-population

Une catégorisation trop large des cellules a néanmoins conduit à un certain retard dans la compréhension et la découverte des Tfh. A la découverte de l'IL-4 en 1982 (Howard et al., 1982) comme cytokine principale de l'aide aux cellules B et en combinaison avec la catégorisation naissante des cellules T en Th1 et Th2 (Mosmann et al., 1986), il a été conclu que seules les Th2 exprimaient l'IL-4 et donc que le rôle de ces cellules Th2 était



d'aider les B. L'article initial était certes plus fin mais la simple interprétation que les Th2 étaient les auxiliaires des B est devenue l'interprétation standard.

Certains articles montraient néanmoins que la délétion des gènes Th2 n'aboutissait pas à la délétion des centres germinatifs *in vivo* (Grusby, 1997; Kopf et al., 1995). La délétion de l'IL-4 elle-même n'aboutissant pas à l'altération de la réponse IgG suite à une immunisation, mais seulement à la perte d'IgE et d'IgG1 (Kopf et al., 1995). Ces résultats qui montrent que l'IL-4 contribue uniquement à la recombinaison en IgE mais que beaucoup d'autres aspects de l'aide B-T dépendent d'autres molécules.

Finalement, l'apparition de nouvelles catégories de cellules comme les Treg puis la découverte de leur facteur de transcription Foxp3 (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Sakaguchi et al., 1995), ainsi que les lymphocytes Th17 en 2005 (Harrington et al., 2005; Langrish et al., 2005; Park et al., 2005) ont fait voler en éclat ce monde bipolaire et clos la guerre froide Th1/Th2.

Un premier pas pour les Tfh fut franchi en 2000 (Breitfeld et al., 2000; Schaerli et al., 2000) avant que leur importance ne soit reconnue avec une montée en puissance des publications relatives à cette population (Chtanova et al., 2004; Fazilleau et al., 2007; Vinuesa et al., 2005). La découverte du facteur de transcription Bcl6 comme élément central de programmation de ces cellules a achevé de convaincre la communauté, avec des expériences montrant la nécessité de l'expression de ce Bcl6 par les cellules CD4 afin d'obtenir des anticorps commutés (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009).

### 3. Développement des Tfh

La différenciation d'un lymphocyte CD4 naïf en cellule Tfh est un processus multi-étapes. Bien que nécessaire, le contact et l'engagement (ou *priming*) par une cellule dendritique (Goenka et al., 2011) ne sont pas à eux seuls suffisants. Le premier signal indépendant du futur Tfh est l'IL-6 qui, par des cascade de signalisation, permet l'expression de Bcl6 par les T CD4 nouvellement activés (Nurieva et al., 2009). Après plusieurs divisions, l'apparition de CXCR5 (qui nécessite l'expression de Bcl6) permet la migration d'un pré-Tfh près de la zone B dans le ganglion et sa différenciation en cellule Tfh. Les signaux cytokiniques impliqués sont l'IL-6, ICOS, IL-2 et le TCR (Tubo

et al., 2013). Il a été montré que la différenciation en Tfh dépendait de la force de la liaison avec le complexe CMH-peptide (Fazilleau et al., 2009). L'absence de signalisation de l'IL-6 empêche de se diriger vers le programme Tfh (Choi et al., 2013a). On relèvera également l'importance d'autres molécules comme ICOS qui sera abordé plus bas (Choi et al., 2011).

Par la suite, la différenciation et la survie des Tfh sont très liées à la présence de cellules B avec lesquelles elles co-localisent et qui sont d'ailleurs leurs principaux stimulants au cours de la réponse immunitaire, du fait de la mort des cellules dendritiques quelques jours après une stimulation antigénique. Les B sont en fait très efficaces pour la co-stimulation en tant que CPA et une grande source d'ICOS-L (Choi et al., 2013b; Haynes et al., 2007; Liu et al., 2015) mais également pour certaines sous-populations de B d'IL-6 (Chavele et al., 2015). Très récemment, il a été montré que l'affinité de la cellule B pour l'antigène qu'elle rencontrait jouait également un rôle dans cette étape de la différenciation des Tfh : plus l'affinité du BCR était forte pour l'antigène en question et moins cette cellule avait tendance à exprimer la molécule ICOS-L notamment, limitant ainsi l'activation finale des lymphocytes Tfh (Sacquin et al., 2017).

L'IL-2 quant à elle a montré ses effets négatifs sur la génération et le développement des Tfh. Ces cellules n'expriment en effet pas l'ensemble des trois récepteurs de l'IL-2 (absence du CD25) et répondent négativement à une stimulation par cette molécule, ce qui ne fait que renforcer le potentiel de cette dernière dans son utilisation à faible dose dans les maladies auto-immunes notamment celles dont les mécanismes physiopathologiques mettent en jeu la production d'auto-anticorps (Ballesteros-Tato et al., 2012; Klatzmann and Abbas, 2015). On peut également citer la molécule *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) parmi les régulateurs négatifs de la différenciation de cellules T naïves en Tfh (Wang et al., 2015).

Il est à noter qu'une fois entré dans le centre germinatif, le Tfh est assez libre et peut en ressortir puis entrer dans d'autres centres germinatifs en modulant les différentes molécules qu'il exprime (Shulman et al., 2013).

Un schéma présenté en Figure 9 retrace les signaux importants dans la différenciation des Tfh.

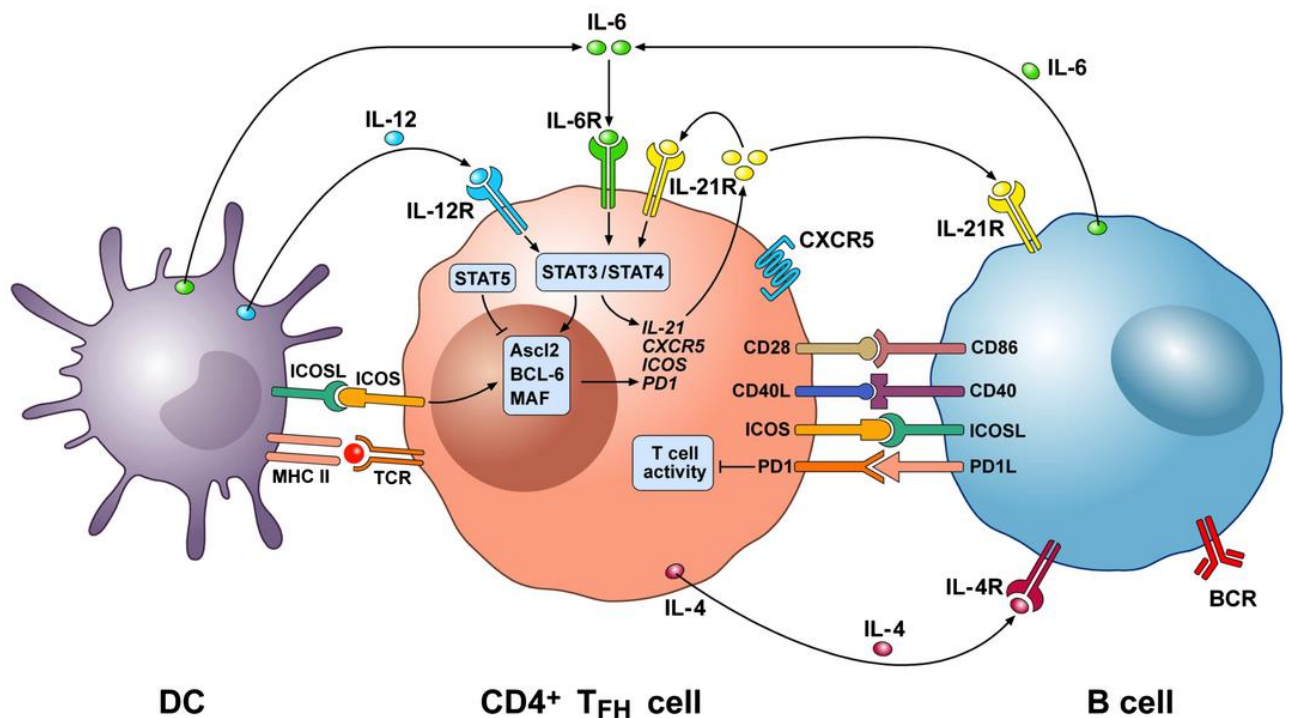


Figure 9 : Signaux de différenciation des Tfh, Varricchi G, Allergy, 2016

#### 4. Molécules importantes dans la fonction des Tfh

##### a. B-cell lymphoma 6 (Bcl6)

Ce facteur de transcription, nécessaire à la différenciation de cellules T en Tfh ainsi qu'à la réaction du centre germinatif (Nurieva et al., 2009), suscite actuellement des études approfondies après une longue période d'incertitudes. En effet, l'expression de cette molécule ne se limite pas à la seule population Tfh. Les centroblastes et plus généralement les B du centre germinatif l'expriment elles aussi (Basso and Dalla-Favera, 2012), tout comme les macrophages dans lesquels elle joue un rôle de contrôle de l'activation *via* le TLR4 (Barish et al., 2010). Il est ainsi rendu plus complexe de comprendre le réseau de Bcl6 et son rôle spécifique dans la formation des Tfh. Jusque récemment, on ne connaissait que peu de gènes régulés par Bcl6, au titre desquels on trouvait notamment *Prdm1* (Tunayaplin et al., 2004), gène codant pour la protéine *B lymphocyte-induced maturation protein-1* (Blimp-1) et dont nous parlerons dans la section consacrée aux Tfr. Toutefois, d'importantes avancées ont été réalisées grâce à des études génomiques si bien que le voile commence à être levé sur les partenaires et modes de fonctionnement de cette molécule fondamentale à la réponse immunitaire

humorale. Les travaux de Shane Crotty (Hatzi et al., 2015) chez l'humain en 2015 révèlent notamment que peu de *loci* permettent la fixation de Bcl6 directement, en comparaison avec le grand nombre de partenaires de Bcl6 adaptés à la fixation des molécules AP-1 *via* des motifs ADN correspondant, permettant un contrôle indirect par Bcl6.

Plus récemment, une autre équipe fait état de résultats différents chez la souris, ne trouvant pas d'enrichissement de sites de liaison à AP-1 chez les partenaires de Bcl6. Ces travaux soulèvent quant à eux une suppression d'IL-7R et de STAT5 sous le contrôle de Bcl6, ainsi qu'un blocage de l'activation de STAT5 *via* l'IL-2 passant par une augmentation de l'expression de la molécule Mxd4. En montrant que les sites de liaison respectifs de Bcl6 et STAT5 étaient en partie commun, ils achèvent la démonstration d'une double voie de différenciation contrôlée par Bcl6 vers le phénotype Tfh et par STAT5 et IL-7R pour les non-Tfh (Liu et al., 2016). Enfin, une étude récente affirme que l'expression de la molécule PD-1, caractéristique des Tfh, est sous le contrôle de Bcl6 (Xie et al., 2017).

#### b. Couple CD40-CD40L

CD40L est le seul ligand connu de CD40 exprimé à la surface des lymphocytes B. Le simple blocage de l'interaction CD40/CD40L entraîne la disparition des centres germinatifs déjà formés (Casamayor-Palleja et al., 1996) et plus largement de l'immunité humorale (Banchereau et al., 1994).

*In vivo*, la liaison CD40/CD40L a été montrée comme étant essentielle dans la formation du centre germinatif, la commutation de classe et la maturation d'affinité. La signalisation *via* ce couple de molécules est également reconnue comme étant indispensable pour la génération de cellules B mémoires et de plasmocytes à longue durée de vie (Foy et al., 1994a, 1994b).

#### c. *Programmed Death-1* (PD-1)

La molécule PD-1 est fortement exprimée par les Tfh sous le contrôle de Bcl6 (Xie et al., 2017) et est d'ailleurs une molécule permettant de caractériser cette population. Cette présence semble indiquer que la molécule PD-1 pourrait être importante dans le contrôle de l'activité des cellules B. La suppression de la voie PD-1 par une ablation du gène codant cette molécule mène à la réduction des plasmocytes de longue durée de

vie, altérant par là même la réponse anticorps (Good-Jacobson et al., 2010). Une autre étude à récemment montré que les souris déficientes en PD-1 avaient des quantités significativement augmentées de Tfh et une production altérée d'IgA dans les intestins, provoquant des changements importants dans la flore commensale (Kawamoto et al., 2012). D'autres travaux, enfin, ont montré que malgré un nombre accru de Tfh dans les souris déficientes, la production d'IL-4 et d'IL-21 étaient pour leur part diminuées (Good-Jacobson et al., 2010; Kinter et al., 2008)

d. *Signaling lymphocytic activation molecule Associated Protein*  
(SAP)

SAP est impliquée dans la stabilité de la réaction entre Tfh et lymphocytes B au sein du centre germinatif. Les souris déficientes en SAP ont présenté des défauts de prolifération de cellules B et de formation des centres germinatifs à la suite d'une immunisation. Il en résulte un défaut de plasmocytes producteurs d'anticorps et de lymphocytes B mémoires. Ces observations rappellent la nécessité d'un contact durable entre le B et le Tfh pour une activation des lymphocytes B (Cannons et al., 2006; Hron et al., 2004; McCausland et al., 2007) et certains auteurs se penchent sur l'intérêt de de cette stabilité dans l'amélioration des stratégies vaccinales (Hu et al., 2013).

e. CXCR5

Ce récepteur de chimiokine est essentiel sur les cellules Tfh. Il migre positivement en réponse au gradient de CXCL13 émis par les CFD dans les follicules B des ganglions et s'en approche jusqu'à l'atteindre de sorte que le Tfh peut atteindre sa zone d'action par chimiotactisme. La nécessité de ce récepteur a récemment été mise en évidence par l'incapacité de souris n'exprimant pas CXCR5 dans ses cellules T à produire des anticorps pathogènes en réponse à une stimulation dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde (Moschovakis et al., 2017).

f. *Inducible costimulator* (ICOS)

ICOS est surtout important dans la différenciation des Tfh ainsi que leur migration et le maintien du phénotype Tfh (Weber et al., 2015) plus que pour leur fonction (Choi et al., 2011; Nurieva et al., 2008; Stone et al., 2015).

#### g. IL-21

L'IL-21 est une cytokine initialement identifiée comme aidant à la prolifération des B (Parrish-Novak et al., 2002). Les souris déficientes en récepteurs à l'IL-4 et l'IL-21 présentaient des défauts de production d'anticorps, de commutation de classe et de centres germinatifs, ce qui montrait l'importance de cette signalisation (Ozaki et al., 2002). Cette cytokine, importante dans la fonction des Tfh envers les B, est également essentielle pour la différenciation en Tfh (Nurieva et al., 2008) depuis le lymphocyte T naïf, et l'interaction ICOS-ICOSL entre Tfh et lymphocyte B stimule la production d'IL21 par le Tfh, permettant d'entretenir la différenciation et le phénotype (Bauquet et al., 2009).

Il a enfin été montré récemment que l'IL-21 permettait de favoriser les Tfh plutôt que les Tfr au cours d'une réponse antigénique, renforçant ainsi la réponse humorale (Jandl et al., 2017).

Toutes ces molécules connues pour être importantes dans le développement ou la fonction des Tfh ont aidé à comprendre leurs mécanismes d'action.

#### 5. *Fonctionnement des Tfh*

Les Tfh, nous l'avons vu, interviennent dans l'aide aux lymphocytes B pour la commutation de classe, les hypermutations somatiques et la différenciation en plasmocytes ou lymphocytes B mémoires à longue durée de vie. D'un point de vue cytokinique et pour la commutation de classe, on remarquera que la cytokine IL-4 est requise pour la commutation en IgE et IgG1. En effet, son absence n'impacte pas la formation d'IgG en général. Les IgG2a sont dépendantes d'IFN $\gamma$  et la production d'IgA et d'IgG2b du TGF $\beta$ . De nombreuses publications font état de la nécessité d'environnements cytokiniques particuliers pour l'obtention de telle ou telle classe d'anticorps (Matthews et al., 2014; McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005).

#### 6. *Spécificité des Tfh*

La vaccination d'un organisme ou son immunisation avec un antigène permet en théorie d'obtenir des anticorps dirigés contre cet antigène. La cellule B, pour pouvoir produire ces anticorps spécifiques, doit être aidée par un Tfh reconnaissant le même antigène (bien que différemment). Par conséquent les Tfh devraient en toute logique être spécifiques de l'antigène utilisé pour une immunisation.

Des travaux ont confirmé ces hypothèses notamment en montrant dans des modèles de souris transgéniques que le recrutement des Tfh dans les centres germinatifs était principalement contrôlé par la spécificité (pour l'antigène immunisant). Ces résultats ont été confortés par l'analyse de souris non transgéniques et l'usage de tétramères. Il s'agit de molécules de CMH de classe II couplées au peptide dont les Tfh sont censés être spécifiques et à un fluorochrome fréquemment. Cette méthode permet d'évaluer la quantité de T en général (et ici de Tfh en particulier) capables de reconnaître un antigène (Maceiras et al., 2017a). Des travaux plus anciens sur l'étude des populations T répondant lors d'une vaccination montraient déjà qu'il existait après une immunisation des Tfh hautement spécifiques pour les peptides de l'antigène injecté (Fazilleau et al., 2007).

D'autres méthodes ont également été utilisées pour confirmer la spécificité des Tfh post-immunisation, et notamment l'évaluation des réponses T par la production – par ces cellules – de cytokines prouvant leur activation. Ces dernières en l'occurrence étaient IL-21, l'IL-4, l'IL-2 et l'IFN $\gamma$  (Leddin and Sant, 2012)

Néanmoins et comme nous le discuterons par la suite il n'existe que peu d'études sur ce sujet majeur et l'avènement de nouvelles techniques de séquençage de haut débit permettra de préciser avec détail ce point de la physiologie et des Tfh.

La réponse immunitaire humorale est aux confins de l'action des cellules B et des cellules T et permet une réponse puissante et efficace contre la plupart des pathogènes. Des systèmes de contrôle existent cependant et vont maintenant être décrits.

## II. Les Tfr, outil du contrôle

Au cœur du contrôle de ce processus de l'immunité humorale, les T *follicular regulatory cells* (Tfr) ou cellules T folliculaires régulatrices forment une population rare à l'action circonscrite aux centres germinatifs. De découverte récente, des incertitudes persistent tant quant à leur origine que concernant leur mode d'action. Nous reviendrons sur leur découverte (A) puis étudierons leur origine et leur développement (B) avant de nous attacher à décrire les marqueurs présents sur ces cellules et leur utilité (C) puis leur mode d'action (D) et enfin leur spécificité (E).

### A. Découverte des Tfr

La découverte des lymphocytes T folliculaires régulateurs (Tfr) marque l'apogée de l'étude du fonctionnement des centres germinatifs et plus largement de l'immunité humorale. D'une part et comme nous l'avons précédemment évoqué, la découverte des Tfh est intervenue quelques années plus tôt et rapidement fait florès. D'autre part, l'idée que la formation et l'activité du centre germinatif sont précisément régulées commence à poindre. Cette régulation a d'abord été attribuée aux lymphocytes T régulateurs : il avait notamment été prouvé que les cellules Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pouvaient bloquer une production d'auto-anticorps dans certains modèles (Fields et al., 2005) et qu'à contrario leur absence, dans un contexte d'allergie par exemple, pouvait conduire à une hyperproduction d'anticorps. Un autre mécanisme potentiel évoqué était la présence parmi les cellules polyclonales du follicule, dans les centres germinatifs, de lymphocytes T régulateurs avec une spécificité ubiquitaire pour le soi. On comprenait déjà à ce moment l'importance d'une régulation pour prévenir l'auto-immunité humorale.

Néanmoins, le lien entre Treg et centres germinatifs restait très peu étudié. En 2004, des lymphocytes T régulateurs qui expriment CXCR5 sont identifiés et l'on s'attend à ce qu'ils migrent vers CXCL13 (donc dans des zones B, cette chimiokine étant produite par les CFD). Plusieurs autres indices redondants montrent que des cellules Foxp3 sont capables d'exprimer CXCR5 et qu'elles sont retrouvées dans les centres germinatifs humains (amygdales) ou de souris immunisées (Alexander et al., 2011; Lim et al., 2004, 2005). D'autres équipes ont montré la présence de cellules CD25<sup>+</sup> (donc potentiellement des Treg) dans les centres germinatifs, supprimant la production d'immunoglobulines par les cellules B. Enfin, il a été découvert que certains Treg



proviennent de Tfh dans les plaques de Peyer (Tsuji et al., 2009). Les observateurs de la dynamique du centre germinatif évoquaient la possibilité d'une régulation non pas par des cellules T mais également par la consommation d'antigène ou encore par le masquage de ce dernier (Keşmir and De Boer, 1999; Tarlinton, 2008).

La découverte des Tfr est, avec le recul, attribuée à 3 équipes. Ces dernières ont simultanément (à l'échelle de la recherche scientifique) identifié cette population :

- l'une d'entre elles a montré qu'une sous-population possédait des caractéristiques communes avec les Tfh (co-expression de CXCR5 et PD-1) mais exprimait aussi le Foxp3 (Wollenberg et al., 2011) ;
- une autre est partie du constat qu'à la fois les humains atteints de syndromes *Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, X-linked syndrome* (IPEX, dû à l'absence de lymphocytes régulateurs par défaut du facteur de transcription FoxP3 (Powell et al., 1982)) et les souris *Scurfy* (présentant une mutation de *foxp3* conduisant à la traduction d'une protéine FoxP3 non fonctionnelle) présentaient des réponses humorales incontrôlées montrant qu'une sous-population Foxp3<sup>+</sup> était indispensable pour le contrôle des réactions du centre germinatif (Chung et al., 2011). Ces résultats sont connus de longue date et ont fait l'objet de nombreuses observations : les souris *Scurfy* subissent une augmentation des quantités d'IgG1 et IgE dans leurs sérums (Godfrey et al., 1991), à l'état basal et en contexte de réponse allergique (Curotto de Lafaille et al., 2008). De la même façon, les patients IPEX expriment dans leur sérum des taux anormaux d'auto-anticorps (Lampasona et al., 2013; Tsuda et al., 2010). Cette deuxième équipe découvre un sous-ensemble de cellules Foxp3<sup>+</sup> qui expriment le facteur de transcription Bcl6 et la molécule CXCR5. Ils montrent le rôle essentiel de Bcl6 pour la génération de ces cellules grâce à un modèle Knock-Out (déficient, KO) et aussi l'importance particulière de ces cellules et pas seulement des Treg grâce à l'injection de Treg CXCR5<sup>-</sup> (Chung et al., 2011) ;
- de la même façon enfin, la troisième a directement identifié qu'il s'agissait une population partageant des caractéristiques communes avec les Tfh et les Treg (Linterman et al., 2011).

Dès les premières études, la question de l'origine de ces cellules s'est posée.

## B. Origine et développement

Le développement des Tfr n'est pas aussi connu ni étudié que celui des Tfh. Cependant, certaines caractéristiques communes dans les processus ont été mises en évidence. Des points de divergence ont également été soulevés. Nous relaterons dans un premier temps les travaux réalisés sur l'origine de cette population avant d'évaluer les connaissances concernant son développement, puis la séquence temporelle d'accumulation au cours de la réponse immunitaire.

### 1. *La question de l'origine*

L'équipe de Wollenberg (Wollenberg et al., 2011) a montré que dans le thymus il n'y avait pas de cellules Foxp3 positives exprimant CXCR5 et PD-1, découverte indiquant que le phénotype Tfr était acquis en périphérie. Par des expériences de transfert, il a été montré que les Tfr provenaient des Treg et que la fraction de Tfr était plus large quand ces cellules étaient transférées avec des Tfh. Mis en lien avec le fait que des Tfh activés en présence de TGF $\beta$  (connu pour induire Foxp3 (Chen et al., 2003)) résistaient à la transformation en Tfr, les auteurs en ont conclu à une potentielle aide des Tfh à la différenciation en Tfr.

Comme nous l'avons précisé au moment de l'historique des Tfr, l'équipe de Chung est partie du constat du non contrôle des réponses humorales chez les humains IPEX et les souris *Scurfy*. Ces cellules par conséquent indispensables pour le contrôle des réactions du centre germinatif sont une sous-population Foxp3 exprimant Bcl6 et CXCR5. Ils montrent le rôle essentiel de Bcl6 avec un modèle de souris KO ainsi que l'origine Treg de ces cellules. La réaction du centre germinatif est en effet moins contrôlée dans un modèle de souris ayant des Treg n'exprimant pas CXCR5.

Ajoutons à cela l'observation faite que sous certaines conditions, les Tfr pouvaient provenir de cellules non régulatrices (Aloulou et al., 2016). Toutefois, cette découverte est à pondérer avec l'observation que lorsqu'une compétition existe avec des Treg pour la différenciation en question, ce sont toujours ces derniers qui mènent à un phénotype Tfr (Aloulou et al., 2016; Maceiras et al., 2017a).

Pas encore définitivement tranchée, l'origine des Tfr semble tout de même se préciser. Elle fera l'objet de quelques points dans notre discussion. Une fois le Tfr généré il doit se développer avant de devenir fonctionnel.

## *2. Développement : phénomènes similaires aux Tfh*

Le premier point commun dans la différenciation des populations folliculaires est le caractère multi-étapes des processus. Au moins deux étapes sont connues. Le processus a été décrit comme initié par la rencontre d'un lymphocyte T naïf avec une cellule dendritique pour les cellules Tfh, et continué par celle avec un lymphocyte B pour une différenciation finale (Crotty, 2011; Gerner et al., 2015; Goenka et al., 2011). Ces mêmes conditions semblent nécessaires pour un développement physiologique des Tfr. Plusieurs observations concordantes le confirment : des souris déficientes en cellules dendritiques présentent des défauts notamment quantitatifs en Tfr (Sage et al., 2014a) et de la même façon la déficience des souris en cellules B conduit à des défauts dans les populations Tfr (Baumjohann et al., 2013). Nous aurions donc deux interactions essentielles et successives :

- la **première** interaction avec des cellules dendritiques permet la mise en place d'un programme transcriptionnel des cellules T folliculaires régulatrices. Ces cellules ayant été identifiées dans de nombreux OLS (rate, ganglions lymphatiques, plaques de Peyer), il est probable que plusieurs sous-types de cellules dendritiques puissent être impliquées dans cette première interaction sans qu'une plus profonde caractérisation de ces dernières n'ait encore été détaillée ;
- la **seconde** interaction avec les lymphocytes B dans le follicule, permettant de renforcer et de maintenir la signature transcriptionnelle Tfr (Choi et al., 2011; Crotty, 2014).

Parmi les autres similarités de développement, nous relèverons la nécessité d'un signal *via* le TCR ainsi que de signaux de co-stimulation CD28 et ICOS, comme en attestent à nouveau des expériences avec des souris déficientes pour ces deux molécules, ne présentant ni Tfh ni Tfr (Linterman et al., 2011) ni même centre germinatifs (Ferguson et al., 1996; Sage et al., 2013). Dans la dernière étude, un mélange de moelles osseuses contenant des cellules de souris déficientes en CD28 ou non, a permis de montrer que Tfh et Tfr ne provenaient que des cellules capables d'exprimer CD28. Ces éléments importants sont à relier avec les observations de la nécessité de cellules B et de cellules dendritiques pour le développement des Tfr, puisque ces cellules expriment toutes deux les marqueurs CD80/CD86 et ICOSL, respectivement ligands de CD28 et ICOS sur les cellules folliculaires en l'occurrence.

Quant aux facteurs de transcription et molécules de signalisation, le facteur Bcl6 (Nurieva et al., 2008) est central dans le développement folliculaire, tant pour les Tfh que pour les Tfr. La molécule de signalisation Stat3 a montré son importance par l'absence de cellules Tfr dans des souris KO (Wu et al., 2016a). La principale différence entre Tfh et Tfr de ce point de vue étant la balance Bcl6/Blimp-1, cette dernière molécule n'étant pas exprimée par les Tfh (Linterman et al., 2011). Il est donc montré dans cet article que la balance entre Bcl-6 et Blimp-1 permet respectivement d'obtenir un mélange entre un phénotype Tfh-like et un mode d'action semblable aux Treg. Au cours de sa différenciation, le Tfr subit également des phénomènes qui ne concernent pas les Tfh.

### *3. Développement : Phénomènes propres aux Tfr*

Certaines étapes du développement des Tfr en revanchent différent de celui des Tfh. Parmi ces dernières, on pourra relever que seule la différenciation des Tfr semble être affectée par les signaux co-inhibiteurs : même si la molécule PD-1 est exprimée par les Tfh et les Tfr, les souris PD-1 KO présentent un nombre augmenté de Tfr pour un nombre inchangé de Tfh (Sage et al., 2013). Le mécanisme impliqué est dû à la fixation de PD-1 à PD-L1 mais pas de PD-L2. Les souris PD-L2 KO ont en effet un phénotype semblable à celui des souris PD-1 KO.

CTLA-4 a également été décrit comme ayant un impact sur la différenciation des Tfr mais moins ou pas sur celle des Tfh. Les souris n'exprimant pas cette molécule dans les cellules Foxp3 positives présentent un nombre augmenté de Tfr mais une efficacité moindre de cette population (Sage et al., 2014b).

On peut enfin citer l'IL-21 et son impact négatif sur le nombre de Tfr. Cette cytokine aide à la différenciation des Tfh en induisant le facteur de transcription Bcl6 et le mécanisme décrit (mais contesté) de la réduction des cellules Tfr est la diminution causée par Bcl-6 de l'expression récepteur CD25, réduisant ainsi la réponse à l'IL-2 (Eto et al., 2011; Jandl et al., 2017). Ainsi la balance IL-21/IL-2 serait essentielle dans le contrôle du ratio Tfh/Tfr comme les auteurs ont pu le montrer et l'observer dans des modèles de souris KO.

Récemment, un modèle murin dans lequel les cellules perdaient l'expression de CD28 quand elles étaient activées (souris OX40-Cre) a montré l'importance de CD28, qui dépasse donc la simple co-stimulation et serait nécessaire même après l'activation de la cellule T pour le maintien de la fonctionnalité Tfr (Linterman et al., 2014).

Enfin, le facteur de transcription Blimp-1 déjà évoqué semble essentiel dans la formation et la mise en place du programme transcriptionnel des Tfr en balance avec Bcl6 alors que les Tfh n'expriment pas cette molécule.

Les divergences dans la différenciation n'interviennent pas uniquement au niveau moléculaire entre Tfr et Tfh mais également au niveau temporel.

#### 4. Séquence temporelle différente

Comme nous l'avons vu, les interactions avec les différents acteurs de l'immunité adaptative semblent être similaires pour les Tfh et les Tfr. La cinétique de cette rencontre diffère quant à elle légèrement. Les Tfr arrivent en effet 5 jours plus tard sur le théâtre des opérations (Vanderleyden et al., 2014; Wollenberg et al., 2011). Un asynchronisme sûrement requis pour l'établissement initial des centres germinatifs : alors que les Tfh et les lymphocytes B doivent rapidement proliférer, la répression des Tfr n'est requise que pour limiter ces expansions une fois une taille suffisante et une réponse immunitaire atteintes.

Si l'on regarde en effet les tests réalisés *in vitro*, on remarque que les Tfr sont capables même en quantité moindre de limiter l'action des Tfh (Sage et al., 2014a). Le contrôle de la balance quantitative entre Tfr et Tfh semble donc être la seule possibilité de laisser une réponse humorale opérationnelle se mettre en place. Plus que la quantité des Tfr ce serait donc le ratio entre Tfr et Tfh (qui tendrait vers une augmentation au fil du temps de la réaction immunitaire) qui aurait son importance dans le contrôle d'une réponse immune à laquelle aurait été laissée la liberté initiale d'opérer.

Pour étayer ce décalage temporel certaines équipes rappellent que les Tfh promeuvent la formation des B du centre germinatif, cellules dont dépendent les Tfr. Indirectement, les Tfr et leur développement dépendraient donc des Tfh. D'ailleurs, des résultats non publiés de l'équipe d'A. Sharpe montrent que la différenciation des Tfr est augmentée quand les Tfh sont transférés dans des souris.

Quoi qu'il en soit, l'étude précise du développement des Tfr est rendue difficile par les nombreux points et gènes communs qui les rapprochent et des Treg et des Tfh, empêchant ou rendant difficile les études par KO de gènes.

### C. Marqueurs et mécanismes d'action

Outre le facteur de transcription Foxp3 découvert comme étant essentiel dans la mise en place du programme régulateur des cellules T régulatrices (Fontenot et al., 2003), sur lequel nous reviendrons dans quelques lignes (1), et *B lymphocyte-induced maturation protein 1* (Blimp-1) central dans leur développement (2), les Tfr partagent également des marqueurs avec les Tfh. Nous avons par exemple CXCR5 impliqué dans le chimiotactisme de ces molécules et déjà évoqué ou bien le facteur de transcription Bcl6, responsable du fonctionnement des cellules dans le centre germinatif (tant les lymphocytes T folliculaires que les B du centre germinatif).

D'autres molécules ont des rôles plus importants dans les Tfr que dans les Tfh. Nous développerons ici le cas de deux molécules, le PD-1 (3) et le CTLA-4 (4) avant d'évoquer d'autres possibles modes d'actions (5).

#### 1. *Foxp3 : régulateurs avant tout*

L'absence de ce facteur de transcription dans un organisme conduit inéluctablement à des phénomènes « d'auto-immunité catastrophique », concept développé en 2007 par l'équipe d'Alexander Rudensky (Kim et al., 2007). La protéine Foxp3, identifiée en 2003 comme « master regulator » du programme Treg (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003) a depuis suscité de nombreuses études détaillant années après années le fonctionnement complexe de ce facteur de transcription (Lu et al., 2017; Pesenacker et al., 2016). Malgré l'hétérogénéité de « LA » population régulatrice au sein desquels s'inscrivent nos travaux, le contrôle exercé par Foxp3 semble apporter une base reliant entre-elles les sous-populations exprimant cette molécule.

Des études génétiques ont montré que Foxp3 était capable de fixer quelques centaines voire milliers de gènes à la fois dans les Treg en développement et les Treg déjà phénotypiquement établis (Zheng et al., 2007) permettant à la fois le développement et la stabilité du phénotype et de la fonctionnalité des cellules l'exprimant. Tout comme Bcl6 dont nous parlions précédemment, la fixation de Foxp3 à ses cibles géniques n'est

pas majoritairement directe et peut intervenir *via* des cofacteurs. Cette protéine seule ne serait en effet pas suffisante à la transformation d'une cellule T en Treg – l'expression forcée de Foxp3 dans des cellules T non régulatrice ne menant pas à une majorité de cellules Treg par exemple (Hill et al., 2007). De façon étonnante, ces cofacteur agiraient pour la plupart de façon redondante de sorte que l'absence de l'un d'eux ne nuirait pas au contrôle génétique global exercé par Foxp3 (Fu et al., 2012). L'expression de Foxp3 agirait également en combinaison avec un patron d'hypométhylation de certains gènes comme *Foxp3*, *Il2ra* ou encore *Ctla4*, une coopération nécessaire à la stabilité et à l'activité suppressive des cellules Treg (Ohkura et al., 2012).

Cependant, l'expression de certaines molécules constitutives des Treg comme le CD25 (Sakaguchi et al., 1995), le CTLA-4 (Hori et al., 2003) ou encore la diminution de l'expression de CD127 (Seddiki et al., 2006) seraient déjà mis en place avant l'apparition de Foxp3 puis confirmés et pérennisés grâce à son expression (Gavin et al., 2007). Cette caractéristique pourrait expliquer la variété des modes d'action et la diversité de la catégorie des Treg.

## 2. *Blimp-1*

Blimp-1 et Bcl6 ont depuis une dizaine d'années été décrits comme ayant une action répressive l'un sur l'autre, notamment au cours du développement des lymphocytes B (Shaffer et al., 2002) ou celui des lymphocytes Tfh (Johnston et al., 2009).

Cette molécule est également retrouvée et décrite comme nécessaire à la fonction de Treg des muqueuses exprimant l'IL-10 et de fortes quantités d'ICOS (Cretney et al., 2011). Les transcrits de *Prdm1* (codant pour Blimp-1) ont été retrouvés en quantités bien supérieures chez les Tfr en comparaison avec plusieurs autres sous-types cellulaires, révélant la potentielle importance de ce facteur de transcription dans la population folliculaire régulatrice. La création de souris déficientes pour ce gène a permis de montrer que l'action de Blimp-1 avait pour conséquence la limitation du nombre de Tfr. Les souris déficientes présentaient en effet des taux de Tfh inchangés mais des taux de Tfr deux fois plus élevés que chez les souris non déficientes (Linterman et al., 2011).

Des hypothèses ont récemment tenté d'expliquer cette limitation de la population Tfr contrôlée par Blimp-1 en décrivant que les Treg de souris déficientes en Blimp-1 avaient une différenciation de Treg en Tfr favorisée *in vitro*. Cependant les Tfr fraîchement isolées de ces souris Blimp-1 déficientes présentent *in vitro* une capacité moindre à limiter l'activité des Tfh soulevant l'intérêt possible de Blimp-1 dans la fonction des Tfr malgré son effet limitant sur la taille de cette population (Yang et al., 2017).

### 3. PD-1 : une liaison dangereuse

L'équipe d'Arlène Sharpe à Boston est à l'origine d'une majorité des articles pour le moment parus sur les Tfr et plus particulièrement sur le rôle de PD-1 dans ces cellules. On apprend que cette molécule agit comme répresseur de la différenciation et de la fonction des Tfr. PD-1 est connu pour être exprimé lorsqu'une cellule est stimulée par un antigène (Francisco et al., 2010). Il est donc envisageable que les Tfr, (qui apparaissent en cas de stimulation par un antigène) expriment et soient même caractérisées en partie par l'expression de cette molécule.

PD-1, pourtant exprimé par les Tfh et les Tfr, ne semble pas avoir la même action dans les deux types de cellules. Dans les Tfr, la suppression de PD-1 mène à une plus grande quantité de Tfr et à une meilleure suppression de la production d'anticorps et *in vitro* et *in vivo* (Sage et al., 2013). Le mécanisme n'est pas totalement défini mais PD-1, connu comme limitant la signalisation proximale *via* le TCR, empêche une totale activation des Tfr (Fife et al., 2009). L'effet négatif de PD-1 est montré comme étant dépendant de la fixation de la molécule sur PD-L1 et non PD-L2 grâce à des souris déficientes : seules les déficientes en PD-L1 peuvent avoir le même phénotype que les souris PD-1 déficientes (Sage et al., 2013).

Cela montre d'ailleurs l'une des potentielles voies de suppression des Tfr : une séparation mécanistique du contact Tfh-B (Sage and Sharpe, 2015). Un signal TCR puissant permettrait une prise d'otage des ressources antigéniques présentées par le B au Tfr et empêcherait le Tfh d'activer le B. Il est à noter que PD-1 altère également la fonction des Tfh pour les mêmes raisons. Le blocage de PD-1 permet en effet un plus fort taux de commutation de classe (Sage et al., 2015). Mais ces effets ne sont pas forcément négatifs. En limitant le « stop signal » du TCR (arrêt de la signalisation *via*



le TCR), PD-1 permettrait aux Tfh de « scanner » plus de B et les empêche de proliférer pour se consacrer plus à l'activation des B.

#### 4. *CTLA-4*

La molécule CTLA-4 partage deux ligands avec CD28 (CD80 et CD86) et est constitutivement exprimée par les Treg. CD28 et CTLA-4 ont des fonctions opposées : le CD28 est une molécule de co-stimulation permettant d'aider à l'activation des cellules T alors que le CTLA-4 a un effet contraire et inhibiteur (Walker and Sansom, 2011).

CTLA-4 est exprimé encore plus fortement sur les Tfr que sur les Treg (Linterman et al., 2011; Sage et al., 2014b; Wing et al., 2014). Une délétion de CTLA-4 produit une plus grande quantité de Tfh mais on ne sait pas si cela est dû à l'altération des capacités suppressives des Tfr ou à des changements intrinsèques aux Tfh (Wang PNAS 2015 Sage 2014, Wing Immunity 2014).

Le mécanisme impliquant la molécule CTLA-4 est pour l'instant le seul bien défini dans le contrôle de la réponse humorale à médiation directe par les Tfr (Sage et al., 2014b; Wing et al., 2014).

Outre ces deux molécules piliers, d'autres effets et modes d'actions des Tfr ont pu être décrits.

#### 5. *Autres effets des Tfr*

Etonnamment l'absence de Tfr conduirait à une production d'anticorps de plus basse affinité mais en plus grand nombre. Cette observation a notamment été réalisée et sur des cellules de souris CTLA-4 KO dans les Treg et par des expériences de transfert dans des souris vides de cellules T naïves non régulatrices et de Treg de souris déficientes en Bcl6 (Kawamoto et al., 2012; Sage et al., 2014b).

Le mode d'action précis n'est pas encore tout à fait été élucidé. Les premières observations de 2011 (Linterman et al., 2011) montraient que l'absence de Tfr induisait une plus grande proportion de Tfh mais pas de cellules B. Par la suite, les principaux effets des Tfr ont été décrits sur les B du centre germinatifs, les plasmocytes et l'affinité des anticorps, sans oublier les Tfh.

Il a été montré que les Tfr induisaient des états de Tfh et B dans lesquels les signatures transcriptionnelles étaient maintenues mais les molécules effectrices et les voies métaboliques étaient supprimées. Cette suppression durable a été attribuée à des changements dans l'épigénétique. Il a également été prouvé que l'IL-21 était capable de surpasser la suppression des Tfr et de les inhiber à leur tour (Sage et al., 2016).

D'autres travaux ont prouvé que l'absence de Tfr induisait une augmentation des anticorps spécifiques d'antigènes dans le serum, des B du centre germinatif, des B spécifiques et des plasmocytes. Le ou les stades auxquels l'inhibition des B peut avoir lieu ne sont donc pas tout à fait déterminés. Les Tfr peuvent supprimer les B du centres germinatifs, ainsi que supprimer les B effecteurs déjà commutés. Elle intervient donc potentiellement à plusieurs étapes y compris à celle de l'activation des B initiale (Sage et al., 2014a). *In vitro*, ces cellules sont capables de diminuer l'expression de GL-7, marqueur caractéristique des centres germinatifs, et de CD80/86 sur les cellules B ainsi que de limiter leur commutation.

Les effets sur les Tfh sont moins documentés. *In vitro*, les Tfr inhibent les Tfh puisqu'ils provoquent la diminution de Ki67 (un marqueur de prolifération) sur cette population, montrant que le cycle cellulaire est bloqué (Sage et al., 2013, 2014b). Les Tfr affectent également la différenciation, l'expansion, et la production de cytokines par le Tfh incluant IL-21, IL-4, IFN $\gamma$ , IL-10 et TNF $\alpha$  *in vitro* (Sage et al., 2014a). D'ailleurs, l'atténuation des productions d'IL-21 et d'IL-4 est l'un des principaux mécanismes d'inhibition de la réponse anticorps, puisque les souris IL-21 KO et IL-4 KO ont des défauts dans la formation des centres germinatifs et la production d'immunoglobulines (cf partie I).

Parmi les mécanismes aussi évoqués il y a la production d'IL-10 (mais avec prudence) (Sage et al., 2014a) ou de TGF $\beta$  (McCarron and Marie, 2014) qui sont des modes de fonctionnements analogues à ceux déjà décrits pour les Treg.

Les auteurs font l'hypothèse de deux autres mécanismes possibles : une signalisation commune sur les B du centre germinatifs et sur les Tfh en se liant aux deux cellules, ou bien une séparation mécanistique déjà évoquée empêchant une interaction longue et

requis entre Tfh et Tfr. Ces effets des Tfr sur les cellules B et Tfh sont synthétisés et présentés en Figure 10.

Une question centrale reste cependant à élucider tant pour comprendre l'action des Tfr que leur physiologie : celle de leur spécificité.

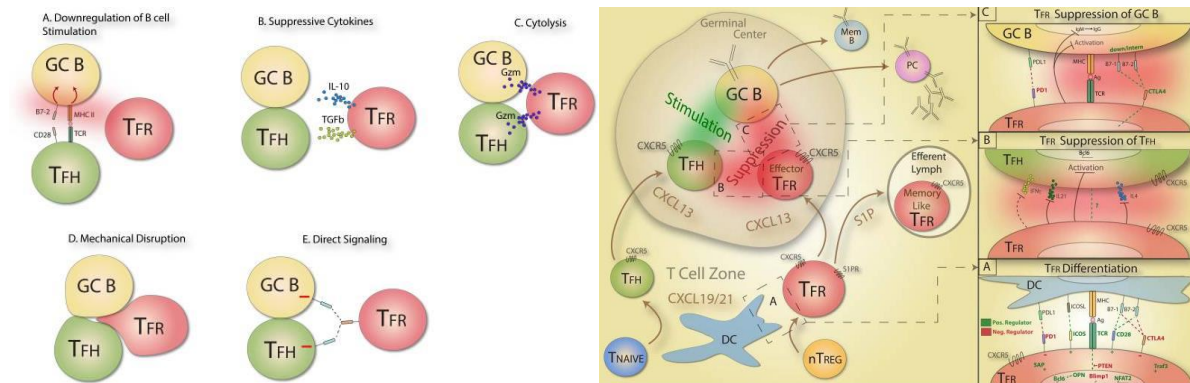


Figure 10 : Différents modes d'action des Tfr, Sage PT., Trends Immunol., 2015

## D. Spécificité

Les Tfr expriment un TCR comme toute cellule T. Il leur permet de reconnaître des peptides présentés par le CMH de classe II porté par une cellule dendritique et éventuellement par la suite par les lymphocytes B bien que rien de précis ne soit pour l'instant connu. Les travaux réalisés pour le moment sur les Tfr font remarquer que ces cellules n'ont jamais été séquencées sans biais. Les rares travaux portant sur les TCR de cette population utilisaient soit des tétramères soit du séquençage haut débit mais sur des souris transgéniques et donc avec un répertoire altéré.

Ainsi il a pu être prouvé que les Tfr en cas d'immunisation pouvaient être spécifiques de l'antigène injecté, que ce dernier soit du soi ou du non soi (Aloulou et al., 2016).

Un premier séquençage de ces cellules a permis l'identification d'un répertoire particulier, proche de celui des Treg et différent de celui des Tfh, dans le contexte d'une souris au TCRβ restreint. Le travail a montré que le répertoire était très différent dans un même centre germinatif entre Tfh et Tfr : le Tfh serait spécifique de l'antigène de l'immunisation alors que le répertoire des Tfr serait spécifique de façon prédominante du soi et pas de l'antigène introduit dans les cellules (Maceiras et al., 2017a).

Cependant tous les résultats que nous venons de citer concernant les Tfr et réalisés jusqu'à nos jours font l'objet d'une controverse grandissante.

#### E. Controverse

En effet il est depuis peu apparu que les cellules Tfr pourraient être différentes de celles étudiées jusque-là. Ou plus précisément que la population étudiée jusqu'ici était composite, avec un mélange deux types cellulaires. D'une part, des « *bona fide* » Tfr, celles qui se trouvent effectivement dans le centre germinatif et ont une action suppressive sur l'immunité humorale. D'autre part, d'autres cellules aussi appelées Tfr par la littérature qui seraient – selon les auteurs – des Tfr mais pas impliquées dans une action régulatrice dans l'instant ou bien des cellules à ranger dans la catégorie globale des Treg.

Cette controverse est née d'une observation concordante : celle de l'absence du marqueur CD25 (jusque-là défini comme caractéristique de la population (Maceiras and Graca, 2015)) sur les Tfr. L'équipe de S. Sakaguchi (Wing et al., 2017) et la nôtre avons très récemment montré qu'une population bien distincte n'exprimait pas ce marqueur. Les implications de cette redéfinition des Tfr seront présentées dans la discussion.

Quoi qu'il en soit, l'immunité humorale est mise en cause dans de nombreuses pathologies et son contrôle serait un atout majeur pour de nouvelles stratégies thérapeutiques.

### III. *Implication de l'immunité humorale dans la physiopathologie et la thérapie*

Des dysfonctionnements de l'immunité humorale ont été relevés dans de nombreuses catégories de pathologies. Petit à petit, l'implication des cellules folliculaires (majoritairement des Tfh pour l'instant, malgré quelques observations hétérogènes relatives aux Tfr dans la littérature (Maceiras et al., 2017b)) a été étudiée et la présentation de ces maladies et des anomalies qui leurs sont liées permettent de cerner les enjeux potentiels d'une meilleure compréhension de la régulation de l'immunité humorale.

#### A. Auto-immunité

##### 1. *Principes*

Après la démonstration du phénomène d'hémolyse à médiation immunitaire en 1898 par Jules Bordet, Paul Ehrlich mena en 1901 une série d'expériences d'immunisation d'animaux de plusieurs espèces. Il remarqua que l'obtention d'anticorps contre le sang injecté était possible mais jamais lorsque l'animal était injecté avec son propre sang. Le postulat de « *l'horror autotoxicus* » était né et symbolisait la réticence (mais pas l'impossibilité) pour l'organisme d'engendrer des anticorps toxiques et capables de se retourner contre lui-même.

Burnet apporta beaucoup à la matière et ce sur des décennies. De 1941 avec sa théorie de formation des anticorps à 1957 avec « *The clonal selection theory of acquired immunity* », il aura été le premier à tenter d'expliquer la tolérance centrale et l'absence théorique d'auto-anticorps. Les travaux de 1957 ont été inspirés de ceux d'un autre immunologiste (Jerne, 1955), conscient qu'il existait un mécanisme particulier de génération des anticorps pour arriver à un nombre de spécificités incomparable au nombre de gènes servant à les générer.

Le postulat de Witbsky émis par un immunologiste Germano-Américain en 1957 et revisité en 1993 décrit les preuves expérimentales permettant d'affirmer le caractère auto-immun d'une maladie (Rose and Bona, 1993). Elle doit

- être causée par des auto-anticorps ou des lymphocytes T auto-réactifs ;
- dans le cas d'auto-anticorps, la preuve directe de pathogénicité peut être obtenue dans des transferts passifs ;

- l'auto-anticorps est considéré comme pathogénique si les receveurs développent des symptômes mimés de ceux des donneurs.

En 2007, McGonagle et McDermott (McGonagle et al., 2007) classent ces inflammations non infectieuses contre le soi en trois catégories formant plus précisément un continuum :

- les maladies avec une implication principale du système immunitaire inné ;
- les maladies avec une implication combinée des deux systèmes immunitaires, le plus souvent l'inflammation était associée au CMH de classe I ;
- les maladies principalement médiées par le système immunitaire adaptatif le plus souvent liées au CMH de classe II. On comprend rapidement le lien avec les lymphocytes B et la production d'anticorps.

## *2. Mécanismes et exemples*

Depuis, de nombreux mécanismes ont été impliqués dans la formation de ces auto-anticorps et dans leur rôle pathologique. Ces derniers peuvent parfois être directement pathogéniques, causant la maladie en réduisant l'expression ou la fonction d'un antigène ou bien en recrutant d'autres éléments du système immunitaire. Ils peuvent également être des indicateurs de l'inflammation sans que l'on identifie de rôle pathogène particulier.

On trouvera dans le Tableau 1 ci-joint un exemple non exhaustif des anticorps mis en cause dans un type particulier de maladie, les synaptopathies, impliquées dans la signalisation du message nerveux. Un document extrêmement complet composé de près de 500 références fait également état des connaissances actuelles relatives aux auto-anticorps et à leur implication dans la pathologie (Ludwig et al., 2017).

| Target                   | Associated diseases or symptoms                                                                                                                                                  | Molecular mechanisms                                                   |                                                                           |                                        | Functional consequences                                                                                                                                                                        | Passive transfer animal models? |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
|                          |                                                                                                                                                                                  | Crosslinking and internalization?                                      | Complement activation?                                                    | Direct disruption of epitope function? |                                                                                                                                                                                                |                                 |
| GluN1                    | Anti-NMDAR encephalitis<br>• Early stage: psychosis and/or seizures<br>• Late stage: altered state of consciousness, movement disorder, autonomic disturbance <sup>180-182</sup> | Yes: shown in HEK293 cells and hippocampal cultures <sup>113,114</sup> | No <sup>87</sup>                                                          | Yes <sup>112,115</sup>                 | NMDAR currents reduced <sup>113,114</sup> , reduced LTP in hippocampal slices <sup>117</sup> , hyper-glutamatergic state <sup>118</sup> and increased motor cortex excitability <sup>119</sup> | Yes <sup>122,123</sup>          |
| LGI1                     | Limbic encephalitis, with or without FBD <sup>59,64,73</sup>                                                                                                                     | Unlikely, as this is mainly an IgG4                                    | Yes: four cases <sup>87</sup>                                             | Yes <sup>84</sup>                      | Facilitation of mossy fibre-CA3 pyramidal cell synaptic transmission <sup>85</sup>                                                                                                             | No <sup>90</sup>                |
| CASPR2                   | Acquired neuromyotonia, Morvan syndrome <sup>65</sup>                                                                                                                            | Unknown                                                                | Yes: but only single report in case of limbic encephalitis <sup>179</sup> | Unknown                                | Unknown                                                                                                                                                                                        | No                              |
| GlyR, $\alpha 1$ subunit | PERM <sup>130</sup>                                                                                                                                                              | Yes: shown in HEK293 cells <sup>130</sup>                              | Unknown                                                                   | Unknown                                | Unknown                                                                                                                                                                                        | No                              |
| AMPA                     | Limbic encephalitis <sup>180,181</sup>                                                                                                                                           | Yes: shown in hippocampal neurons <sup>182,183</sup>                   | Unknown                                                                   | Unknown                                | AMPA currents reduced <sup>183</sup>                                                                                                                                                           | No                              |
| GABA <sub>A</sub> R      | Variable symptoms, but can include seizures, memory impairment, hallucinations and anxiety <sup>184,185</sup>                                                                    | Yes: shown in cultured neurons <sup>184</sup>                          | Unknown                                                                   | Unknown                                | Unknown                                                                                                                                                                                        | No                              |
| GABA <sub>B</sub> R      | Limbic encephalitis <sup>186-188</sup>                                                                                                                                           | Unknown                                                                | Unknown                                                                   | Unknown                                | Unknown                                                                                                                                                                                        | No                              |
| DPPX                     | PERM, cerebellar ataxia, encephalitis and prodromal diarrhoea <sup>189,190</sup>                                                                                                 | Yes: shown in cultured neurons <sup>191</sup>                          | Unknown                                                                   | Unknown                                | Acute increase in firing in enteric neurons <sup>191</sup>                                                                                                                                     | No                              |
| D2R                      | Basal ganglia encephalitis, Sydenham chorea and Tourette syndrome <sup>192</sup>                                                                                                 | Unknown                                                                | Unknown                                                                   | Unknown                                | Unknown                                                                                                                                                                                        | No                              |
| IgLON5                   | Abnormal sleep movements and behaviours with obstructive sleep apnoea and stridor, occasional gait instability and brainstem symptoms; tauopathy <sup>4193</sup>                 | Unlikely, as this is mainly an IgG4                                    | Unknown                                                                   | Unknown                                | Unknown                                                                                                                                                                                        | No                              |
| mGluR1                   | Cerebellar ataxia <sup>194</sup>                                                                                                                                                 | Unknown                                                                | Unknown                                                                   | Unknown                                | Reduced mGluR-mediated current in cerebellar slices <sup>195</sup>                                                                                                                             | Yes <sup>196</sup>              |
| mGluR5                   | Psychiatric, cognitive and memory symptoms in individuals with Hodgkin lymphoma <sup>196</sup>                                                                                   | Unknown                                                                | Unknown                                                                   | Unknown                                | Unknown                                                                                                                                                                                        | No                              |

Tableau 1 : Liste non exhaustive des cibles d'autoanticorps dans les synaptopathies, Crisp SJ., Nat Rev Neuroscience, 2016

Plus récemment, l'implication directe des lymphocytes Tfh a logiquement été faite puisque si des anticorps sont produits il y a fort à parier que la population Tfh a contribué à cette production. Ainsi, nous citerons sans prétendre à l'exhaustivité un ensemble de maladies auto-immunes au sens des définitions précédemment indiquées, associées ou corrélées à un désordre dans la population des Tfh chez l'homme. Le plus souvent, la fréquence de ces cellules a été trouvée comme augmentée (malgré les divergences de définition phénotypique de la population) et parfois associée à une élévation des niveaux sériques d'IL-21 ou de CXCL13.

- dans la polyarthrite rhumatoïde, l'avancée de la maladie est associée à des quantités élevées d'auto-anticorps anti-CCP (*Cyclic Citrullinated Peptide*) (Ma et al., 2012). Il s'agit d'auto-anticorps présents chez certains patients et très spécifiques de cette maladie dans laquelle les auto-anticorps sont dirigés contre les articulations et notamment leur membrane synoviale ;

- le lupus ou *Systemic Lupus Erythematosus* (SLE) est également très étudié sous cet aspect avec une corrélation des altérations Tfh et de l'augmentation de la sévérité de la maladie, les anticorps étant directement pathogéniques dans cette affection (Simpson et al., 2010; Wong et al., 2010) ;
- la myasthénie enfin peut être prise comme exemple, les auto-anticorps se fixant à un neurorécepteur (le récepteur à l'acétylcholine) et empêchant la fixation du ligand, ralentissant par là même le message nerveux. Des fréquences de Tfh augmentées sont également retrouvées chez les patients et corrélées avec la gravité de la maladie (Saito et al., 2005; Tackenberg et al., 2007).

Parfois enfin, des Tfh sont détectés dans les organes affectés par les maladies auto-immunes. Nous donnerons le seul exemple des glandes salivaires pour le syndrome de Sjögren dans lequel certaines glandes sont cibles du système immunitaire (Salomonsson et al., 2002).

L'étude des Tfr dans ces maladies est quant à elle très restreinte et concerne une caractérisation hétérogène de la population. On a ainsi pu être relevées une diminution de la fréquence des Tfr chez des patients atteints de sclérose en plaques (Dhaeze et al., 2015) ou de myasthénie (Wen et al., 2016), mais des résultats contradictoires apparaissent par exemple avec une augmentation des taux de Tfr chez des patients atteints de spondylarthrite ankylosante (Shan et al., 2015). Ces études se basent sur des proportions de Tfr circulantes, concept que nous aborderons dans notre discussion. Très récemment enfin, l'équipe de L. Graca a observé des quantités élevées de Tfr circulants chez des malades atteints du syndrome de Sjögren et font l'hypothèse que cette élévation des Tfr serait plutôt un indicateur d'une réponse humorale plutôt que d'une augmentation de l'activité régulatrice (Fonseca et al., 2017).

## B. Cancer

De nombreuses évidences viennent appuyer l'impact délétère d'une augmentation de la quantité de cellules Tfh ainsi que de l'expression de CXCL13 et d'IL21 dans des lymphomes, maladies corrélées avec des hyperplasies folliculaires, des hypergammaglobulinémies (hyperproduction d'IgG) et la production d'auto-anticorps.



C'est le cas dans le lymphome T angioblastique (Roncador et al., 2007) avec la preuve au niveau transcriptomique que ce sont les cellules Tfh qui sont malignes dans ce type de maladies (de Leval et al., 2007).

Les Tfh s'avèrent également être problématiques dans le contexte de tumeurs folliculaires B en aidant la survie et la prolifération de ces dernières. Il a notamment été montré le rôle prédictif de l'infiltration des cellules T dans les tumeurs B (Lee et al., 2006). Il a successivement été relevé que les lymphomes folliculaires voyaient leur pronostic déterminé plus par le profil génétique des T infiltrants que des B, et que le pronostic était mauvais quand ces mêmes T étaient localisés dans les follicules néoplasiques (Dave et al., 2004; Glas et al., 2007).

Mais les tumeurs d'origine non immunologique sont aussi concernées avec des proportions élevées de Tfh dans le cancer colorectal (Wang et al., 2014) ou encore dans les cancers du foie (Guo et al., 2017; Shi et al., 2014) bien que les mécanismes impliqués et les conséquences de la présence de ces cellules ne soient pas suffisamment évalués.

Cependant la venue de Tfh peut avoir un impact positif sur un cancer. C'est ce que tend à montrer une étude réalisée sur des cancers du sein (Bindea et al., 2013; Gu-Trantien et al., 2013) chez l'homme. Des résultats similaires ont été trouvés dans un cas de cancer colorectal : un pronostic positif associé à une signature Tfh. Dans ces cas de valeur thérapeutique positive néanmoins, le mécanisme n'a pas été précisément élucidé et semblerait indépendant de la production d'anticorps. Nous ne citerons ici que quelques exemples d'une catégorie largement fournie et documentée mais assez peu homogène (Ma and Deenick, 2014).

## C. Immunodéficiences

### 1. Primaires

Chez la souris, les modèles KO ont permis de comprendre largement le fonctionnement du système immunitaire et plus précisément comme nous l'avons mentionné plus tôt dans ce manuscrit, le fonctionnement des cellules T folliculaires.

L'équivalent humain de ces cellules KO peut être trouvé chez les patients atteints d'immunodéficiences immunitaires primaires :

La cheffe de file de ces maladies impliquant les cellules folliculaires et la production d'anticorps est le syndrome hyper IgM. Connu de longue date, ce syndrome a été attribué en 1993 à une déficience dans les molécules CD40 et CD40L que nous avons déjà décrites comme fondamentales dans le contact entre B et Tfh au moment du commutation (Allen et al., 1993; DiSanto et al., 1993). Les individus atteints, incapables de signaler par cette voie, ne subissent pas de commutation de classe et présentent donc des quantités très réduites d'IgG, IgA et IgE sériques. La formation des centres germinatifs chez ces patients est abolie (Aruffo et al., 1993; Facchetti et al., 1995) et ils présentent des quantités réduites de cellules Tfh (avec un lien direct de cause à effet).

Le *X-linked lymphoproliferative disease* (XLP) implique une mutation du gène *SH2D1A* codant pour la molécule SAP. Résultat pour le patient : défaut dans la formation des centres germinatifs (Ma et al., 2007).

Le syndrome hyper IgE autosomique dominant quant à lui provoque une récurrence des infections à *Staphylococcus Aureus* et *Candida Albicans* avec IgE élevées et est dû à des mutations du gène codant pour la molécule de signalisation STAT 3 impliquée dans les voies de signalisation de l'IL-2 et de l'IL-6 notamment (Holland et al., 2007; Minegishi et al., 2007).

Enfin, une récente étude a synthétisé les déficiences décrites et leurs implications sur le fonctionnement des Tfh, en déduisant que la qualité de ces cellules importait au moins autant que leur quantité (Ma, 2016).

## 2. Acquis

Les Tfh sont des cellules porteuses de la molécule CD4, récepteur du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Klatzmann et al., 1984) et donc cibles de ce virus. Ils font d'ailleurs partie des principaux réservoirs d'ADN et d'ARN d'HIV 1 en comparaison avec d'autres cellules CD4 (Perreau et al., 2013; Xu et al., 2013). L'implication et l'altération des Tfh suite à l'infection par le VIH a fait l'objet récent d'une synthèse (Ruffin et al., 2017). Dans cette affection, il semblerait qu'il y ait une grande quantité de cellules spécifiques pour le virus en comparaison avec des cellules T CD4 effecteurs ou mémoires (Lindqvist et al., 2012) résultant en la production de plus d'anticorps spécifiques du virus. Ces derniers sont néanmoins souvent non neutralisants (Moir and Fauci, 2009). De plus, les cellules des patients infectés ont été

testées *in vitro* comme étant moins efficaces à la stimulation de la différenciation de cellules B (Colineau et al., 2015; Cubas et al., 2013).

#### D. Vaccination

La vaccination est un processus menant à la production d'anticorps, empêchant un pathogène de se développer dans l'organisme et menant à sa destruction. Il s'agit de préparer le système immunitaire à rencontrer un pathogène en le lui présentant atténué ou bien tué par exemple. Nous n'allons pas ici préciser les mécanismes et l'implication des Tfh et Tfr dans la vaccination puisque ce serait en quelque sorte reprendre l'ensemble des parties I et II de cette introduction. Nous indiquerons néanmoins brièvement en quoi la modulation de la réponse vaccinale et de son efficacité pourrait avoir comme cible les cellules folliculaires T.

Il a en effet pu être montré que la réponse anticorps était directement corrélée à la dose de protéine injectée, elle-même corrélée à la quantité de Tfh chez la souris (Baumjohann et al., 2013) et chez l'homme en réponse à une vaccination contre la grippe (Chen et al., 2011). Plus largement, les corrélations entre Tfh et plasmablastes circulants après la vaccination anti-grippale (Bentebibel et al., 2013) ou entre Tfh et B du GC (Rolf et al., 2010) ne sont plus confidentielles.

Cibler les Tfh dans la vaccination est ainsi un des moyens d'améliorer la stratégie vaccinale. C'est chose faite depuis de nombreuses années, avant même la découverte de cette sous-population avec ce que C. Janeway appelait « *the immunologist's dirty little secret* » (le lecteur excusera la non-traduction de cette locution qui en perdrait son intérêt historique). En effet, le système immunitaire n'est pas capable de reconnaître le non-soi sans une stimulation inflammatoire. Lors d'une agression par une bactérie, par exemple, les composants de cette dernière (comme les CpG ou le LPS) suffisent à indiquer au système immunitaire la présence d'un pathogène et à activer ce dernier. Polly Matzinger a quant à elle introduit la notion de théorie du danger, aux conclusions similaires (Matzinger, 1994). Quoi qu'il en soit, la réponse se trouve en l'adjuvant, composés d'agonistes de *Toll-Like Receptor* (TLR) permettant une meilleure activation du système immunitaire. Certains auteurs proposent donc de cibler spécifiquement et *via* les adjuvants certaines voies importantes dans le développement des Tfh comme l'immunisation avec des nanoparticules enrichies en agonistes des TLR4, 7 et 8 améliorant chez la souris la production d'anticorps et leur

qualité (Moon et al., 2012), et protégeant contre une infection secondaire (modèle de la grippe) (Kasturi et al., 2011).

L'observation pertinente du lien entre signalisation *via* le TLR9 et production d'IL-6 par la cellule dendritique puis de l'impact de la production d'IL-6 par la cellule dendritique et la génération de Tfh a pu améliorer les réponses anticorps avec une immunisation complétée avec des agonistes de TLR9 (Chakarov and Fazilleau, 2014; Rookhuizen and DeFranco, 2014). De la même façon, la liaison ICOS-ICOSL semblant nécessaire à la génération des Tfh mais pas d'autres sous-types de cellules T, l'augmentation de l'expression d'ICOSL sur les cellules dendritiques par stimulation du TLR2 a également montré des effets positifs dans la réponse à une immunisation (Redecke et al., 2004).

Trois types de stratégies ont ainsi été synthétisées par Michelle Lintermann (Linterman and Hill, 2016), et sont présentées dans la Figure 11.

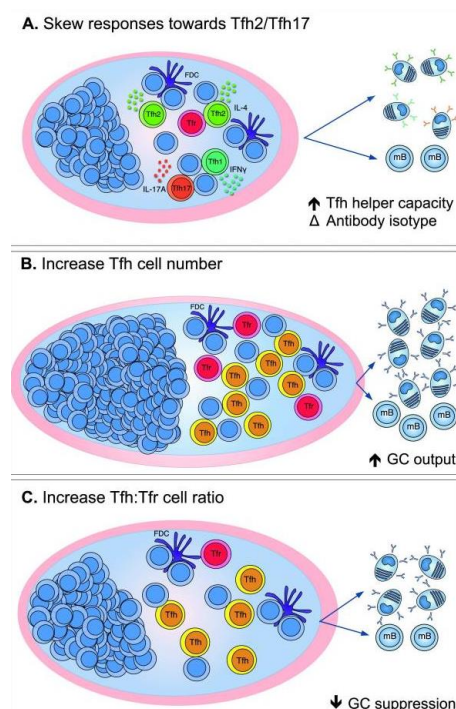


Figure 11 : Stratégies d'améliorations vaccinales basées sur les Tfh, Lintermann MA., *F1000*, 2016

## E. Greffes

Peter Medawar, Prix Nobel 1960 et pionnier de la transplantation a pu confirmer les dires de Burnet (avec qui il a conjointement reçu le prix) et sa théorie de la tolérance

immunologique. Il a confirmé l'hypothèse que le "soi" était défini au cours de la vie embryonnaire et porté ses travaux sur la découverte de la tolérance immunologique acquise. Ces travaux ont permis la montée en puissance de la greffe qui est désormais une opération répandue mais qui nécessite un contrôle fin de la réponse immunitaire. En effet, le rejet de greffe impliquant souvent la présence d'anticorps contre le greffon, la mise en cause du système impliquant les Tfh commence – lentement mais sûrement – à poindre. Peu d'études se sont pour l'instant intéressées au sujet mais il a été montré notamment chez le macaque que le blocage du couple CD40/CD40L connu pour empêcher un bon développement des Tfh et une bonne coopération avec les B, réduisait par conséquent le nombre d'anticorps anti-donneur *de novo*, autrement dit la réaction humorale contre le greffon (Kim et al., 2014). Des résultats similaires avec le blocage de cette voie ont été identifiés chez la souris dans un modèle de greffe de peau (Rodriguez-Barbosa et al., 2017) et la modulation de la voie CD28 s'est avérée efficace chez le babouin dans la greffe de rein à nouveau (Ville et al., 2016).

Chez l'homme à ce jour peu d'études relatent les faits et c'est dans le sens contraire que la corrélation est relevée : les patients avec rejet d'organe présentent une plus grande quantité de Tfh que les patients tolérants envers le greffon (de Graav et al., 2015; Shi et al., 2017). En sus, seules de rares Tfr sont présents dans les organes lymphoïdes tertiaires après une greffe de rein (Xu et al., 2016). Ces travaux ouvrent néanmoins la voie à de nouvelles thérapies dans le contrôle de la réponse contre le greffon.

Conscients des enjeux thérapeutiques que représentent la compréhension de l'immunité humorale et de ses limites, nous avons tenté de contribuer à notre échelle à la compréhension de son contrôle *via* une (re)définition des Tfr, la découverte d'un nouveau mécanisme de contrôle et la description de leur répertoire.

### *Objectifs poursuivis*

Cette introduction a tenté de présenter au lecteur les enjeux majeurs liés à la compréhension du contrôle de l'immunité humorale. Les Tfr sont une des clefs de ce contrôle et leur étude approfondie n'a pas encore eu le temps d'éclore depuis les 6 ans qui nous séparent de leur découverte. Le projet d'étude de ces cellules né en parallèle de cette thèse a eu pour objectif de répondre à trois préoccupations :

- une **première étape** de caractérisation précise de ces cellules afin d'obtenir une population pure et dénuée de toute contamination par d'autres types cellulaires. Il s'agit d'un préalable essentiel à la découverte de nouvelles caractéristiques d'une population d'une taille si modeste ;
- une **deuxième étape** de compréhension des mécanismes de contrôle de l'immunité humorale à partir de données transcriptomiques obtenues sur la base d'une sélection stricte des cellules telle qu'évoquée dans le point 1 ;
- une **troisième et dernière étape** d'analyse du répertoire de ces cellules afin d'avancer dans la compréhension de leur origine, de leur spécificité, et de leur mode d'action.

# *Résultats*

*Article 1 – Redéfinition et mode d'action des Tfr*

**Tfr cells lack IL-2R $\alpha$  but express decoy IL-1R2 and IL-1Ra and suppress the IL-1-dependent activation of Tfh cells**

Publié le 8 septembre 2017 – *Science Immunology*

Paul-Gydéon Ritvo, Guillaume Churlaud, Valentin Quiniou, Laura Florez, Faustine Brimaud, Gwladys Fourcade, Encarnita Mariotti-Ferrandiz, David Klatzmann.



Les immunoglobulines ou anticorps forment le principal composant de l'immunité humorale et permettent une défense efficace contre des pathogènes entre autres fonctions. Elles sont produites par des cellules hautement spécialisées appelées plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Les plasmocytes se différencient à partir de lymphocytes B naïfs ; ce mécanisme nécessite l'aide d'une sous-population de lymphocytes T, les T folliculaires *helper* (Tfh). L'aide apportée par le Tfh aux B peut être contrôlée dans les organes lymphoïdes secondaires par les lymphocytes T folliculaires régulateurs (Tfr) qui contrôleraient ainsi indirectement la production d'anticorps.

La population des Tfr est très restreinte tant chez la souris que chez l'homme et a souvent été décrite comme portant – à l'aune des lymphocytes T régulateurs (Treg) – la sous-unité alpha du récepteur à l'interleukine (IL)-2, CD25. Ces cellules ont également été décrites comme dérivant des Treg.

Au cours de ces travaux, nous avons fait la surprenante observation de la non-réponse des cellules Tfr à l'IL-2 *in vivo*, contrairement aux Treg. Une dissection approfondie du phénotype de ces cellules a donc été réalisée. Elle s'est fondée sur

- l'expression des marqueurs caractéristiques des populations folliculaires ;
  - Bcl6, facteur de transcription commun aux Tfr et aux Tfh nécessaire au programme folliculaire de ces cellules et plus généralement à l'existence des centres germinatifs ;
  - PD-1 et CXCR5, molécules importantes dans la fonction, les interactions et la localisation de ces cellules près et dans la zone B des organes lymphoïdes secondaires.
- l'expression de Foxp3, facteur de transcription responsable du programme régulateur des Treg, distinguant les Tfr (Foxp3<sup>+</sup>) des Tfh (Foxp3<sup>-</sup>).

Ce travail a révélé l'absence du marqueur CD25 à la surface des Tfr tant chez la souris que chez l'homme. Cette nouvelle caractérisation a permis l'étude d'une population dénuée de contamination par des Treg et une approche transcriptomique a révélé l'expression de plusieurs récepteurs à l'IL-1 sur les populations folliculaires. Alors que les Tfh expriment le récepteur dont l'IL-1 est agoniste (IL-1R1), transmettant le signal inflammatoire, les Tfr expriment le récepteur leurre IL-1R2 non associé à une transmission de signal, et sécrètent l'IL-1Ra, antagoniste du récepteur IL-1R1.

Par la suite, nous avons pu montrer que le traitement de souris avec de l'IL-1 permettait *in vivo* une large expansion de la population Tfh. In vitro, l'ajout d'IL-1 dans des puits contenant des Tfh a permis une forte augmentation de la production par les Tfh des cytokines responsables de l'aide aux cellules B, IL-4 et IL-21. L'ajout de Tfr in vitro supprimait l'activation induite par l'IL-1 montrant le rôle des Tfr sur cette voie. Cette suppression est d'ailleurs aussi efficace que celle produite par l'ajout de d'Anakinra, l'IL-1Ra humain recombinant.

Nous avons donc levé le voile sur un axe de régulation IL-1 dans le contrôle des réponses B et conclu à une dichotomie présentée dans le schéma ci-dessous, entre d'une part le contrôle des Teff par les Treg en dehors du centre germinatif via notamment l'IL-2 et le contrôle des Tfh par les Tfr via l'IL-1 dans les centres germinatifs.

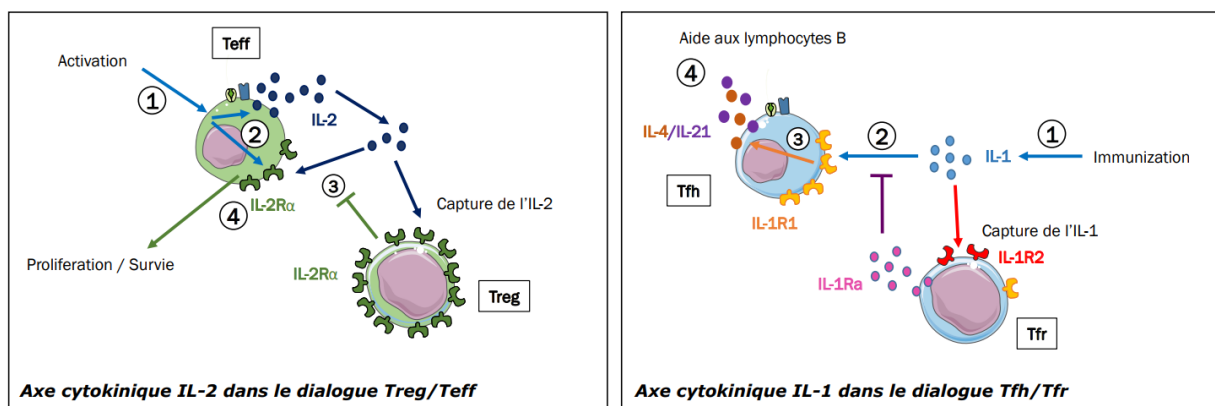


Figure 12 : Dichotomie des dialogues Treg/Teff et Tfr/Tfh

## IMMUNE REGULATION

# T<sub>fr</sub> cells lack IL-2R $\alpha$ but express decoy IL-1R2 and IL-1Ra and suppress the IL-1–dependent activation of T<sub>fh</sub> cells

Paul-Gydeon G. Ritvo,<sup>1</sup> Guillaume Churlaud,<sup>1,2</sup> Valentin Quiniou,<sup>1,2</sup> Laura Florez,<sup>1</sup> Faustine Brimaud,<sup>1</sup> Gwladys Fourcade,<sup>1</sup> Encarnita Mariotti-Ferrandiz,<sup>1</sup> David Klatzmann<sup>1,2\*</sup>

Copyright © 2017  
The Authors, some  
rights reserved;  
exclusive licensee  
American Association  
for the Advancement  
of Science. No claim  
to original U.S.  
Government Works

Follicular regulatory T (T<sub>fr</sub>) cells from lymph node germinal centers control follicular helper T (T<sub>fh</sub>) cell–dependent B cell activation. These scarce cells, often described and purified as CD25<sup>+</sup> cells, are thought to be derived from thymic regulatory T (T<sub>reg</sub>) cells. However, we observed that mouse T<sub>fr</sub> cells do not respond to interleukin-2 (IL-2), unlike T<sub>reg</sub> cells. Stringent immunophenotyping based on B cell lymphoma 6 (Bcl6), programmed cell death protein 1 (PD-1), and CXCR5 expression revealed that T<sub>fr</sub> cells are actually CD25<sup>−</sup> in mice and humans. Moreover, T<sub>fr</sub> cell characterization based only on CXCR5 and PD-1 high expression without excluding CD25<sup>+</sup> cells resulted in contamination with T<sub>reg</sub> cells. Transcriptome studies of CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>Bcl6<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>−</sup> T<sub>fr</sub> cells revealed that they express the IL-1 decoy receptor IL-1R2 and the IL-1 receptor antagonist IL-1Ra, whereas T<sub>fh</sub> cells express the IL-1R1 agonist receptor. IL-1 treatment expanded T<sub>fh</sub> cells in vivo and activated their production of IL-4 and IL-21 in vitro. T<sub>fr</sub> cells suppressed the IL-1–induced activation of T<sub>fh</sub> cells as efficiently as the IL-1 receptor antagonist Anakinra. Altogether, these results reveal an IL-1 axis in the T<sub>fh</sub> cell control of B cell responses and an IL-2/IL-1 dichotomy for T<sub>reg</sub> cell control of effector T cells versus T<sub>fr</sub> cell control of T<sub>fh</sub> cells.

## INTRODUCTION

Germinal centers (GCs) form within peripheral lymphoid organs to foster T cell–dependent stimulation of B cells that results in the production of high-affinity antibodies (1, 2). To produce such antibodies, GC B (GCB) cells interact with follicular helper T (T<sub>fh</sub>) cells to enable their activation and differentiation into plasma cells (3–5). The T<sub>fh</sub> cell lineage is imprinted by expression of B cell lymphoma 6 (Bcl6), a transcription factor that represses alternative fates and promotes T<sub>fh</sub> cell differentiation and function (6). Bcl6 promotes the expression of CXCR5 (7–9), which controls the homing of T<sub>fh</sub> cells to the B cell follicle and GCs (10, 11). Interleukin-6 (IL-6) and IL-21 contribute to T<sub>fh</sub> cell differentiation (12, 13) when naïve T cells are stimulated through their T cell receptor (TCR) and costimulatory molecules, such as ICOS (inducible costimulator) and CD28 (7, 14, 15). T<sub>fh</sub>-mediated CD40L/CD40 signaling in the presence of IL-21 and IL-4 induces proliferation, isotype switching, and differentiation of B cells (16–20).

The generation of autoantibodies and the development of autoimmune diseases can result not only from the activation of autoreactive T and B cells but also from a dysregulation of GC formation and maintenance by T<sub>fh</sub> cells (21, 22). Limiting the number of T<sub>fh</sub> cells within GCs is critical to warding off the emergence of autoantibodies (23–25). Thus, regulation of T<sub>fh</sub> cells is essential for limiting GC reactions against self-antigens and preventing autoimmunity (26, 27).

Follicular regulatory T (T<sub>fr</sub>) cells were found to limit the GC reaction and to reduce antibody production within B cell follicles in human tonsils (28) and in mice (29). These cells were initially reported to express Bcl6, programmed cell death protein 1 (PD-1), and CXCR5, the canonical markers of T<sub>fh</sub> cells, as well as forkhead box P3 (Foxp3) and CD25, the canonical markers of regulatory T (T<sub>reg</sub>) cells (30, 31). T<sub>fr</sub> cells were first described as CD25<sup>hi</sup>, similar to T<sub>reg</sub> cells (29, 32), and T<sub>fr</sub>

cells are characterized/purified according to this marker in most studies. Except for mice expressing a reporter gene of Foxp3 expression, there is no other physiological surface marker that allows one to separate live T<sub>fr</sub> cells from T<sub>fh</sub> cells. T<sub>fr</sub> cells were proposed to develop not only from thymus-derived T<sub>reg</sub> cells but also from Foxp3<sup>−</sup> precursors in a PD ligand 1–dependent manner (33).

How T<sub>fr</sub> cells control the GC reaction remains unclear. In vitro suppression assays showed that T<sub>fr</sub> cells suppress B and T<sub>fh</sub> cell responses, inhibiting B cell activation and class switch recombination and decreasing T<sub>fh</sub> cell production of cytokines such as IL-4 (34, 35). T<sub>fr</sub> suppression of T<sub>fh</sub> cells has been reported to be dependent on cytotoxic T lymphocyte–associated protein 4 (36, 37). Depletion of T<sub>fr</sub> cells in Bcl6<sup>fl/fl</sup> × Foxp3<sup>CRE</sup> mice had no impact on the size of the T<sub>fh</sub> cell or GCB cell compartments (38). However, vaccinated T<sub>fr</sub>-depleted mice have altered antigen-specific antibody responses, with significantly increased immunoglobulin A (IgA) levels and decreased avidity of IgGs against the immunogen, suggesting a qualitative role of T<sub>fr</sub> cells in antibody production (38).

The antigen specificity of T<sub>fh</sub> and T<sub>fr</sub> cells is not well known, and diverging results have been reported regarding T<sub>fr</sub> cells. Concordant results showed that T<sub>fh</sub> cells are specific for the immunizing antigen (33, 39, 40). In contrast, a previous study showed that T<sub>fr</sub> and T<sub>fh</sub> cells share TCRs specific for the immunizing antigen (33), whereas a recent one reported oligoclonal expansions in T<sub>fh</sub> cells and a broad TCR usage in T<sub>fr</sub> cells from the same GCs (41).

In this work, we identified T<sub>fr</sub> cells as a rare population of CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells that do not express CD25 and likewise do not respond to IL-2. On the basis of a stringent characterization of T<sub>fr</sub> cells, we analyzed their transcriptome and compared it with that of T<sub>fh</sub> and T<sub>reg</sub> cells. Transcriptome studies clustered T<sub>fr</sub> cells with T<sub>fh</sub> cells rather than T<sub>reg</sub> cells and revealed a previously uncharacterized IL-1 axis in T<sub>fr</sub> cell suppression of T<sub>fh</sub> cells. Together, our work should prompt a reassessment of the biology of T<sub>fr</sub> cells based on their better characterization and highlights an IL-2/IL-1 dichotomy for T<sub>reg</sub> cell control of effector T (T<sub>eff</sub>) cells versus T<sub>fr</sub> cell control of T<sub>fh</sub> cells.

<sup>1</sup>Sorbonne Université, University Pierre and Marie Curie (UPMC), Univ Paris 06, INSERM, UMR\_S 959, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (i3), F-75005 Paris, France. <sup>2</sup>AP-HP (Assistance Publique–Hôpitaux de Paris), Hôpital Pitié-Salpêtrière, Biotherapy (CIC-BT), and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (i2B), F-75651 Paris, France.

\*Corresponding author. Email: david.klatzmann@upmc.fr

## RESULTS

**T<sub>fr</sub> and T<sub>fh</sub> cell response to IL-2**

We investigated the *in vivo* response of T<sub>fh</sub> and T<sub>fr</sub> cells to IL-2. Mice expressing the green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene of Foxp3 expression were injected with an adeno-associated virus coding for IL-2 (AAV-IL-2) that allows continuous production of IL-2 (42). Twenty-one days after AAV-IL-2 injection, mice were immunized or not immunized with ovalbumin (OVA), and their spleens were analyzed 10 days after the immunization. CD19<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> B cells, which are known to be CXCR5<sup>hi</sup> and PD-1<sup>+</sup>, were used to select the appropriate gating for defining CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup> follicular T (T<sub>fol</sub>) cells (fig. S1). GFP expression was then used to identify the subsets of Foxp3<sup>+</sup> T<sub>fr</sub> cells and Foxp3<sup>+</sup> T<sub>fh</sub> cells within T<sub>fol</sub> cells.

IL-2 increased the proportion (Fig. 1A) and numbers (fig. S2) of splenic T<sub>reg</sub> cells, as previously reported (42–44), irrespective of the immunization. The marked increase of T<sub>fh</sub> cells induced by immunization was reduced by IL-2 (Fig. 1B). In contrast, whereas immunization had no impact on the proportion of T<sub>fr</sub> cells, IL-2 induced a significant decrease of their proportion in CD4<sup>+</sup> cells (Fig. 1C). The combined effects of IL-2 on T<sub>fh</sub> and T<sub>fr</sub> cells led to a decreased T<sub>fr</sub>/T<sub>fh</sub> ratio for both immunization and IL-2 treatment, alone or in combination (Fig. 1D).

**T<sub>fr</sub> cells do not express CD25**

This negative impact of IL-2 on T<sub>fr</sub> cells led us to carefully assess their expression of CD25 (IL-2R $\alpha$ , a component of the high-affinity receptor for IL-2) by flow cytometry. We first stringently defined T<sub>fol</sub> cells on the basis of high CXCR5 and PD-1 expression within CD4<sup>+</sup> cells. This gating defined T<sub>fol</sub> cells as all CXCR5<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup> cells expressing Bcl6 (6), whereas CXCR5<sup>int/lo</sup>PD-1<sup>int/lo</sup> non-T<sub>fol</sub> cells did not (Fig. 2A). Within each of these two cell populations, we could detect the presence of a subset of Foxp3<sup>+</sup> cells, thus defining CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup>Bcl6<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T<sub>fr</sub> cells and CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>int/lo</sup>PD-1<sup>int/lo</sup>Bcl6<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> cells (Fig. 2B). T<sub>fr</sub> cells did not express CD25, unlike T<sub>reg</sub> cells that expressed it highly (Fig. 2C). Similar observations were made with cells obtained from C57BL/6, BALB/c, and NOD (nonobese diabetic) genetic backgrounds (fig. S3). Expression levels of Bcl6 and CD25 were comparable among CXCR5<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup> T<sub>fh</sub> and T<sub>fr</sub> cells (fig. S4).

To confirm the *bona fide* nature of CXCR5<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>−</sup> T<sub>fr</sub> cells, we studied their suppressive activity in a classic *in vitro* assay investigating the inhibition of IL-4 and IL-21 production by T<sub>fh</sub> cells from immunized mice cocultured with B cells (34). Adding T<sub>fr</sub> cells to

these cocultures significantly decreased IL-4 production (Fig. 2D) and almost completely suppressed IL-21 production (Fig. 2E).

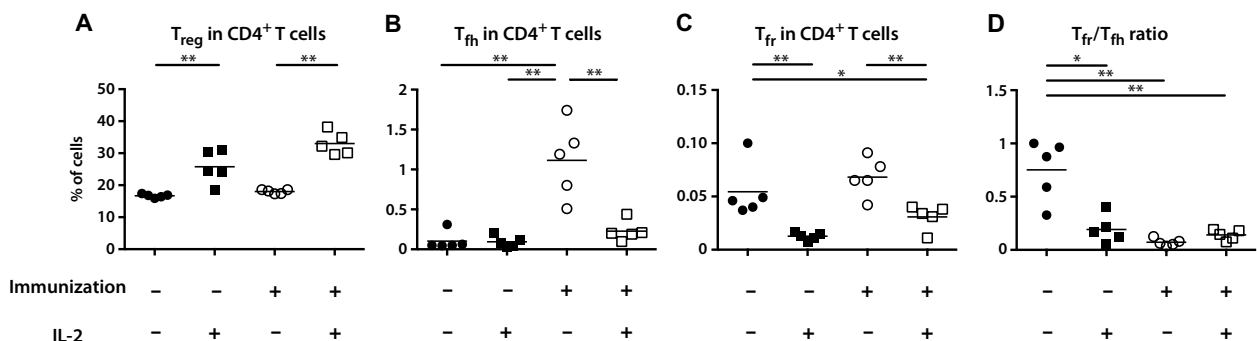
Because T<sub>fr</sub> cells were initially described as CD25<sup>+</sup> (32), we speculated that this could be due to contamination by CXCR5<sup>int/lo</sup>PD-1<sup>int/lo</sup> T<sub>reg</sub> cells. We thus analyzed CD25 and Bcl6 expression on a gradient of subsets defined by the intensity of CXCR5 and PD-1 expression among CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells (Fig. 2F, left). Whereas CXCR5<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup> T<sub>fr</sub> cells homogeneously express Bcl6 and are CD25<sup>−</sup>, the progressive decrease in the intensity of CXCR5 and PD-1 expression was associated with a parallel loss of Bcl6 expression and an increase in CD25 expression (Fig. 2F, middle and right). These results indicate that a nonstringent characterization of T<sub>fr</sub> cells leads to the inclusion of T<sub>reg</sub> cells.

**T<sub>fr</sub> cells' transcriptomic profile distinguishes them from T<sub>reg</sub> and T<sub>fh</sub> cells**

We analyzed the expression profile of a set of 545 immune-related genes in T<sub>fh</sub>, T<sub>fr</sub>, and T<sub>reg</sub> cells from NOD and BALB/c mice using NanoString technology. Hierarchical clustering based on the entire set of genes clustered T<sub>reg</sub> cells samples apart from T<sub>fol</sub> cell samples (fig. S5). We further used the 81 genes that better separate the three cell subsets (see the Supplementary Materials) to perform an additional hierarchical clustering (Fig. 3A) that again identified two main clusters of T<sub>fol</sub> and T<sub>reg</sub> cells, regardless of the genetic background. Within the T<sub>fol</sub> cluster, T<sub>fr</sub> and T<sub>fh</sub> cells were well separated. We evaluated the accuracy and statistical robustness of this clustering by multiscale bootstrap resampling using the pvclust R package (Fig. 3B) (45, 46). This statistical process attributes accuracy to each branch of the clustering by calculating an approximately unbiased (AU) *P* value as a percentage (45). The higher the percentage, the higher the accuracy of a given branch of the clustering. In our data set, the AU *P* values for the separation of T<sub>reg</sub> and T<sub>fol</sub> cells, as well as for the separation of T<sub>fr</sub> and T<sub>fh</sub> cells within T<sub>fol</sub> cells, were 100%, indicating the robustness of the cell subset identification.

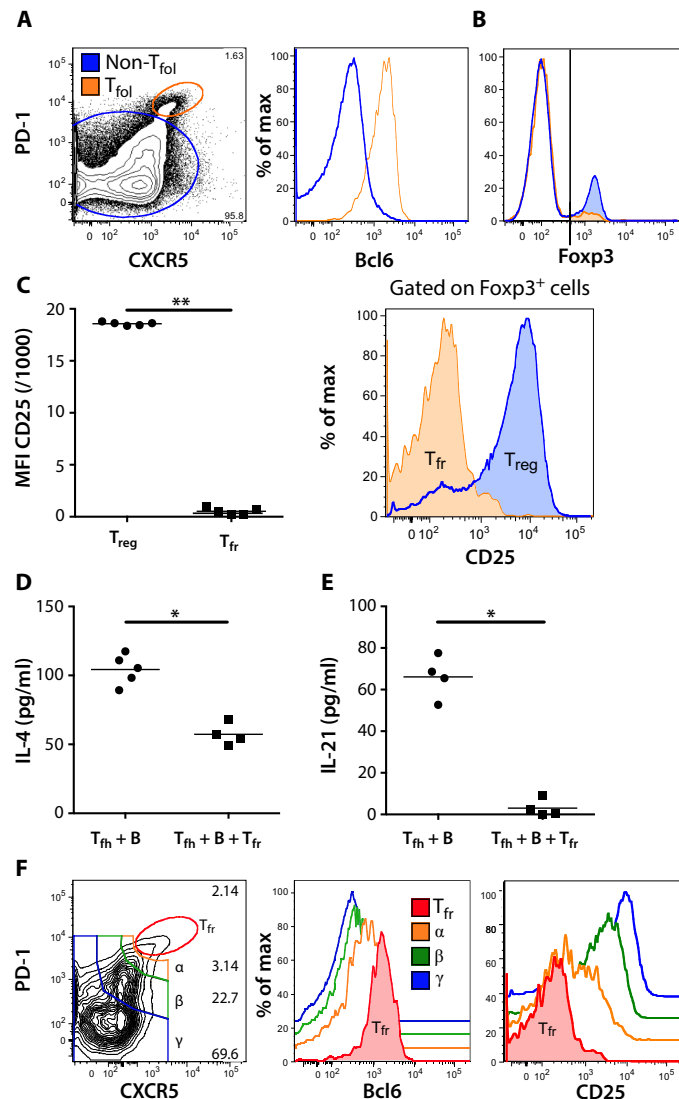
**Differential gene expression in T<sub>reg</sub>, T<sub>fh</sub>, and T<sub>fr</sub> cells**

We next analyzed the genes differentially expressed between T<sub>fh</sub>, T<sub>fr</sub>, and T<sub>reg</sub> cells using Ingenuity Pathway Analysis (IPA). The IPA's Upstream Regulator analytic tool identified NFATc1, a subunit of the NFAT (nuclear factor of activated T cells) complex known to interact with Foxp3 (47, 48), as a key component differentiating the transcriptome profiles of our three cell populations. NFATc1 is down-regulated (blue) in T<sub>reg</sub> cells and up-regulated (orange) in T<sub>fh</sub> and T<sub>fr</sub> cells, in



**Fig. 1. T<sub>fr</sub> and T<sub>fh</sub> cell response to IL-2.** (A to D) Proportions of T<sub>reg</sub> (A), T<sub>fh</sub> (B), and T<sub>fr</sub> (C) cells in CD4<sup>+</sup> T cells and the T<sub>fr</sub>/T<sub>fh</sub> ratio (D) of untreated mice (filled circles), IL-2-treated mice (filled squares), immunized mice (empty circles), and immunized IL-2-treated mice (empty squares). *n* = 5; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, Mann-Whitney *U* test. Data are representative of three independent experiments.

accordance with (i) the observed expression levels of genes regulated by NFATc1 and (ii) their expected positive or negative regulation by NFATc1 (49), as modeled by IPA. Foxp3 expression aside, the pattern of NFATc1-dependent gene expression was identical between  $T_{fh}$  and  $T_{fr}$  cells. In contrast, each of the NFATc1 up-regulated genes in  $T_{reg}$  cells was down-regulated in  $T_{fr}$  and  $T_{fh}$  cells, and vice versa (Fig. 4A).



**Fig. 2.  $T_{fr}$  cells do not express CD25.** (A) Flow cytometry contour plots (left) showing CXCR5<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup>  $T_{fol}$  (orange) and CXCR5<sup>int/lo</sup>PD-1<sup>int/lo</sup> non- $T_{fol}$  (blue) cells within CD4<sup>+</sup> T cells and histograms showing their Bcl6 expression status (right). (B) Foxp3 expression of  $T_{fol}$  and non- $T_{fol}$  cells defining  $T_{reg}$  cells and  $T_{fr}$  cells (both Foxp3<sup>+</sup>). (C) Mean fluorescence intensity (MFI) of CD25 expression levels in  $T_{reg}$  cells and  $T_{fr}$  cells ( $n = 5$ ). Data are representative of three independent experiments (left). Representative histogram of the expression of CD25 in  $T_{fr}$  and  $T_{reg}$  cells (right). (D and E) IL-4 (D) and IL-21 (E) production by  $T_{fh}$  cells from immunized mice, in the presence ( $n = 4$ ) or absence ( $n = 4$  to 5) of  $T_{fr}$  cells. Results are representative of two independent experiments. (F) Flow cytometry plot identifying different populations according to their PD-1 and CXCR5 expression within CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells (left) and their expression of Bcl6 (middle) and CD25 (right). For (C) to (E), \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Mann-Whitney  $U$  test.

IPA then identified the pathways differentially modulated between the cell subsets.  $T_{fr}$  cells appeared as very active cells, with markedly up-regulated pathways related to movement, survival, viability, and proliferation. In contrast, pathways related to death and mortality were up-regulated in  $T_{fh}$  cells (Fig. 4B).

Supervised analyses then identified ILs and their receptors as markedly differentially expressed among the three cell subsets. IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$ , and IL-2R $\gamma$  are highly expressed by  $T_{reg}$  cells, whereas  $T_{fr}$  and  $T_{fh}$  cells only express IL-2R $\beta$  and IL-2R $\gamma$  (Fig. 4C, left). IL-1Rs were not expressed by  $T_{reg}$  cells and had distinct expression profiles for  $T_{fol}$  subsets (Fig. 4C, right).  $T_{fh}$  cells only expressed the agonist IL-1 receptor IL-1R1, which transmits the inflammatory message of IL-1. In contrast,  $T_{fr}$  cells expressed lower levels of IL-1R1 than  $T_{fh}$  cells but high levels of IL-1R2, the IL-1 receptor decoy (50), and, to a lesser extent, IL-1Rn, the IL-1R antagonist (51).

IL-4 and IL-21, cytokines involved in  $T_{fh}$ -mediated B cell help (16, 20, 52), were mostly expressed by  $T_{fh}$  cells (fig. S6). IL-2 expression could not be detected in any of the subsets, whereas IL-1 $\beta$  expression was at the limit of detection (number of transcripts  $\approx 100$ ) and was similar in each subset (fig. S6). Costimulation molecules involved in B-T cell cooperation were also differentially expressed in  $T_{fol}$  cells. CD40L was mostly expressed on  $T_{fh}$  cells, whereas OX40 (fig. S6) was mostly expressed on  $T_{fr}$  cells. Thus, the IL-1 receptors CD40L and OX40 are the main molecules that discriminate  $T_{fh}$  and  $T_{fr}$  cells, as also confirmed by flow cytometry for IL-1R2 and OX40 (Fig. 4, D and E, and fig. S7).

### IL-1-dependent $T_{fh}$ cell activation

To assess the functional relevance of our IL-1-related gene expression profile, we investigated the role of IL-1 $\beta$  in  $T_{fh}$  cells. We treated immunized mice with recombinant IL-1Ra (Anakinra), which blocks the IL-1 $\beta$  response in humans (53) and mice (54–56), or with murine IL-1 $\beta$ .

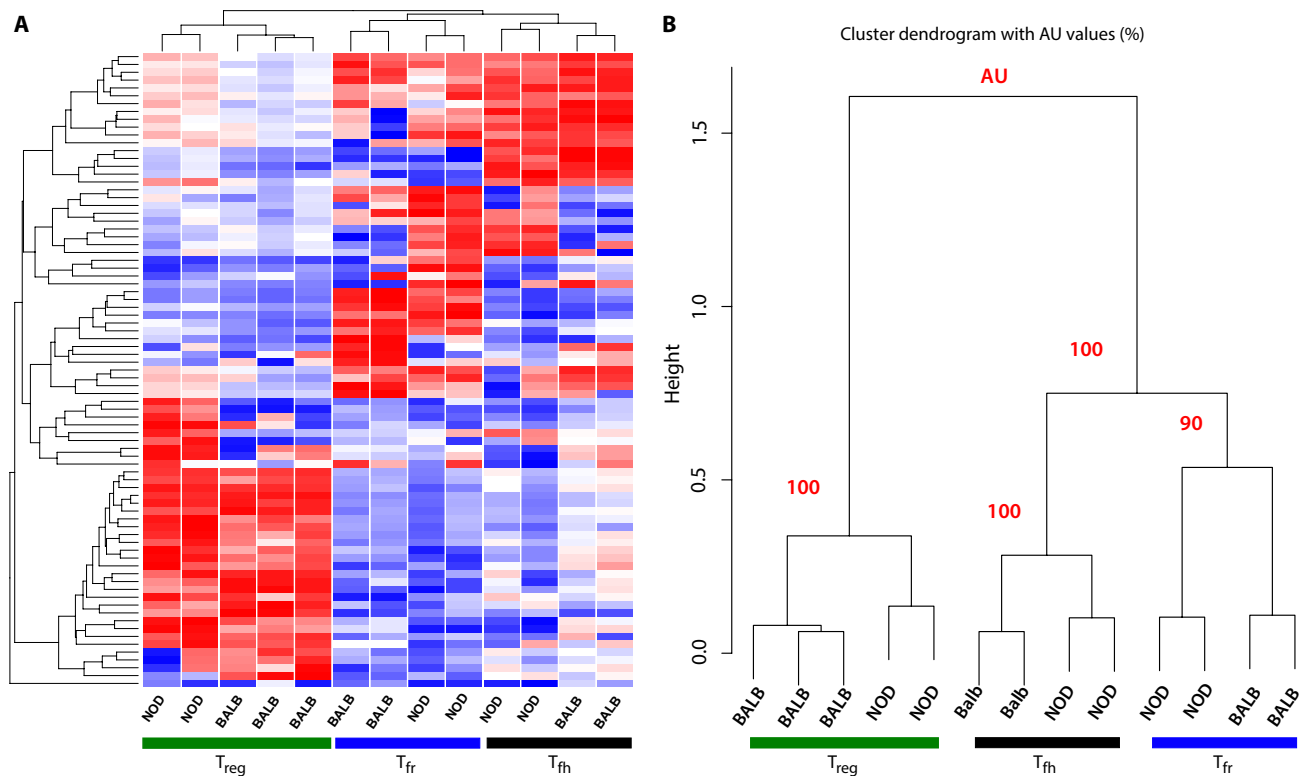
Compared with untreated immunized mice (OVA + Alum), inhibition of IL-1 $\beta$  during immunization led to a significantly reduced proportion of  $T_{fh}$  cells (Fig. 5A), whereas injection of IL-1 $\beta$  induced a significant increase of  $T_{fh}$  cell proportion. This increase was observed even when immunization was performed without Alum, indicating the autonomous effect of IL-1 $\beta$  on  $T_{fh}$  cells. The increased  $T_{fh}$  cell response induced by IL-1 $\beta$  translated into an increased production of anti-OVA-specific IgG (Fig. 5B).

We then tested the contribution of IL-1 $\beta$  to the production of IL-4 by  $T_{fh}$  cells from immunized mice (Fig. 5C). B cells alone did not produce IL-4, whereas baseline  $T_{fh}$  cell IL-4 production was around 50 pg/ml. Coculture of B and  $T_{fh}$  cells led to a doubling of IL-4 production, whereas the addition of IL-1 $\beta$  rather than B cells led to an even more pronounced increase of IL-4 production by  $T_{fh}$  cells. Thus,  $T_{fh}$  cells are directly activated by IL-1 $\beta$ .

We next investigated the IL-1 $\beta$  dependence of the  $T_{fh}$  cell suppression by  $T_{fr}$  cells. When  $T_{fr}$  cells (at a  $T_{fh}/T_{fr}$  ratio of 2) were added to a coculture of  $T_{fh}$  and B cells, we observed a 50% reduction in IL-4 production (Fig. 5D), which corresponds to the value of basal IL-4 production by  $T_{fh}$  cells (Fig. 5C). This inhibition was equivalent to the inhibition observed when adding Anakinra (Fig. 5D). This also suggests that some cells in the culture produced IL-1 $\beta$ . We confirmed by flow cytometry that this production was mainly from B cells (fig. S8). Similar results were observed for the production of IL-21, leading to a sevenfold decrease of IL-21 production when  $T_{fr}$  cells are added to the culture (Fig. 5D).

$T_{fr}$  cells could suppress the IL-1 $\beta$ -induced  $T_{fh}$  cell activation (Fig. 5E). Whereas IL-1 $\beta$  led to a 10-fold increase of IL-4 and IL-21





**Fig. 3. T<sub>fr</sub> cells' transcriptomic profile distinguishes them from T<sub>reg</sub> and T<sub>h1</sub> cells. (A)** Heat map comparing the gene expression profiles of T<sub>reg</sub> (green), T<sub>fr</sub> (blue), and T<sub>h1</sub> (black) cells from two genetic backgrounds after immunization. Red, high gene expression; blue, low gene expression. **(B)** Dendrogram of T<sub>reg</sub>, T<sub>fr</sub>, and T<sub>h1</sub> cells representing the hierarchical cluster analysis performed with the pvclust R package.

production by T<sub>h1</sub>, the addition of T<sub>fr</sub> cells markedly inhibited this IL-1 $\beta$ -dependent IL-4 and IL-21 production (Fig. 5E). Together, these results indicate that there is an IL-1 $\beta$ -dependent activation of T<sub>h1</sub> cells that can be suppressed by T<sub>fr</sub> cells.

### T<sub>fr</sub> cell response to immunization with self-antigens or foreign antigens

We compared the response of T<sub>fr</sub> cells to antigenic stimulation with two representative antigens. OVA immunization led to a higher increase in T<sub>fr</sub> cells compared with insulin (INS) immunization (Fig. 6A), and vice versa, for the proportion of T<sub>fr</sub> cells (Fig. 6B). The resulting T<sub>fr</sub>/T<sub>h1</sub> ratio was thus about fourfold higher after immunization with a self-antigen compared with a foreign antigen (Fig. 6C). This translated well in a higher proportion of CD19<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Bcl6<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> GCB cells among CD19<sup>+</sup> B cells (fig. S9) after OVA immunization compared with INS immunization (Fig. 6D). There was an inverse correlation between the proportions of T<sub>fr</sub> cells and GCB cells (Fig. 6E). When IL-1 $\beta$  was added during INS immunization, GCB cell values were in the range of those obtained after OVA immunization (Fig. 6F), indicating that the lower expansion of GCB cells after INS immunization was not intrinsically limited by a lower frequency of INS-specific B cells. There was again an inverse correlation between the proportions of T<sub>fr</sub> cells and GCB cells (Fig. 6G).

### Phenotype of T<sub>fr</sub> cells in humans

We investigated the phenotype of T<sub>fr</sub> and T<sub>h1</sub> cells in humans by analyzing these cells in spleen or mesenteric lymph node cells obtained from

healthy organ donors, or from tonsils. By using the same gating strategy that we used for mice (Fig. 7A), we could show the absence of CD25 expression on human T<sub>fr</sub> cells (Fig. 7B). As for mice, we analyzed CD25 expression on a gradient of subsets defined by the intensity of CXCR5 and PD-1 expression among CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells (Fig. 7C, left). Although CXCR5<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup> T<sub>fr</sub> cells are homogeneously CD25<sup>+</sup>, the progressive decrease in the intensity of CXCR5 and PD-1 expression was associated with a parallel increase in CD25 expression (Fig. 7C, right). As for mice, IL-1R2 was expressed only on T<sub>fr</sub> cells (Fig. 7D).

### DISCUSSION

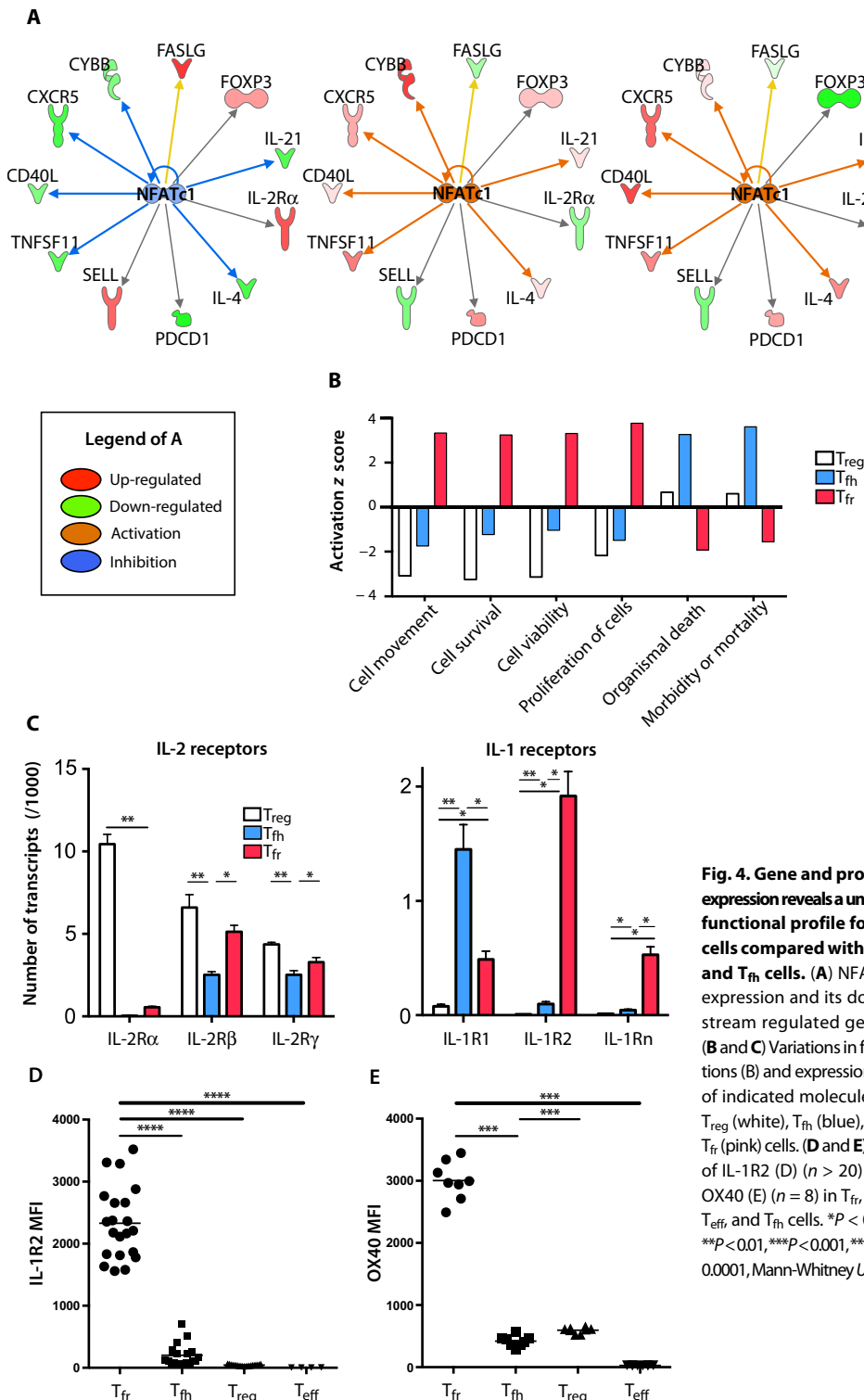
IL-2 is now widely developed for stimulating T<sub>reg</sub> cells in the context of inflammatory and autoimmune diseases (57). To better understand the consequences of an IL-2 treatment, and because T<sub>fr</sub> cells are thought to derive from T<sub>reg</sub> cells, we assessed T<sub>fr</sub> cell response to IL-2. We found that T<sub>fr</sub> cell proportion was reduced rather than augmented during IL-2 treatment. This intriguing observation led us to thoroughly assess their CD25 phenotype and to determine that T<sub>fr</sub> cells do not express CD25, neither in mice nor in humans. Contrary to T<sub>reg</sub> cells, which comprise both CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>+</sup> subsets (58), careful investigations assessing expression of the canonical Bcl6 marker (Fig. 2F) led us to conclude that T<sub>fr</sub> cells are homogeneously CD25<sup>+</sup> and CXCR5<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup>. These results initially obtained in C57BL/6 mice were further confirmed in BALB/c and NOD mice (fig. S3) and also observed for human T<sub>fr</sub> cells (Fig. 7C). Although a recent study on T<sub>fr</sub> cell conditional depletion in Bcl6<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>CRE</sup> mice suggested that

$T_{fr}$  cells are  $CD25^{lo}$  rather than  $CD25^{+}$  (38), we believe that they are truly  $CD25^{-}$ , as also supported by their lack of expansion (Fig. 1C) after treatment with IL-2. IL-2 treatment not only expands  $CD25^{+}$   $T_{reg}$  cells but also induces an increase of CD25 expression by  $CD25^{lo/-}$  lymph node  $T_{reg}$  cells (59, 60). Our results now define  $T_{fr}$  cells as a

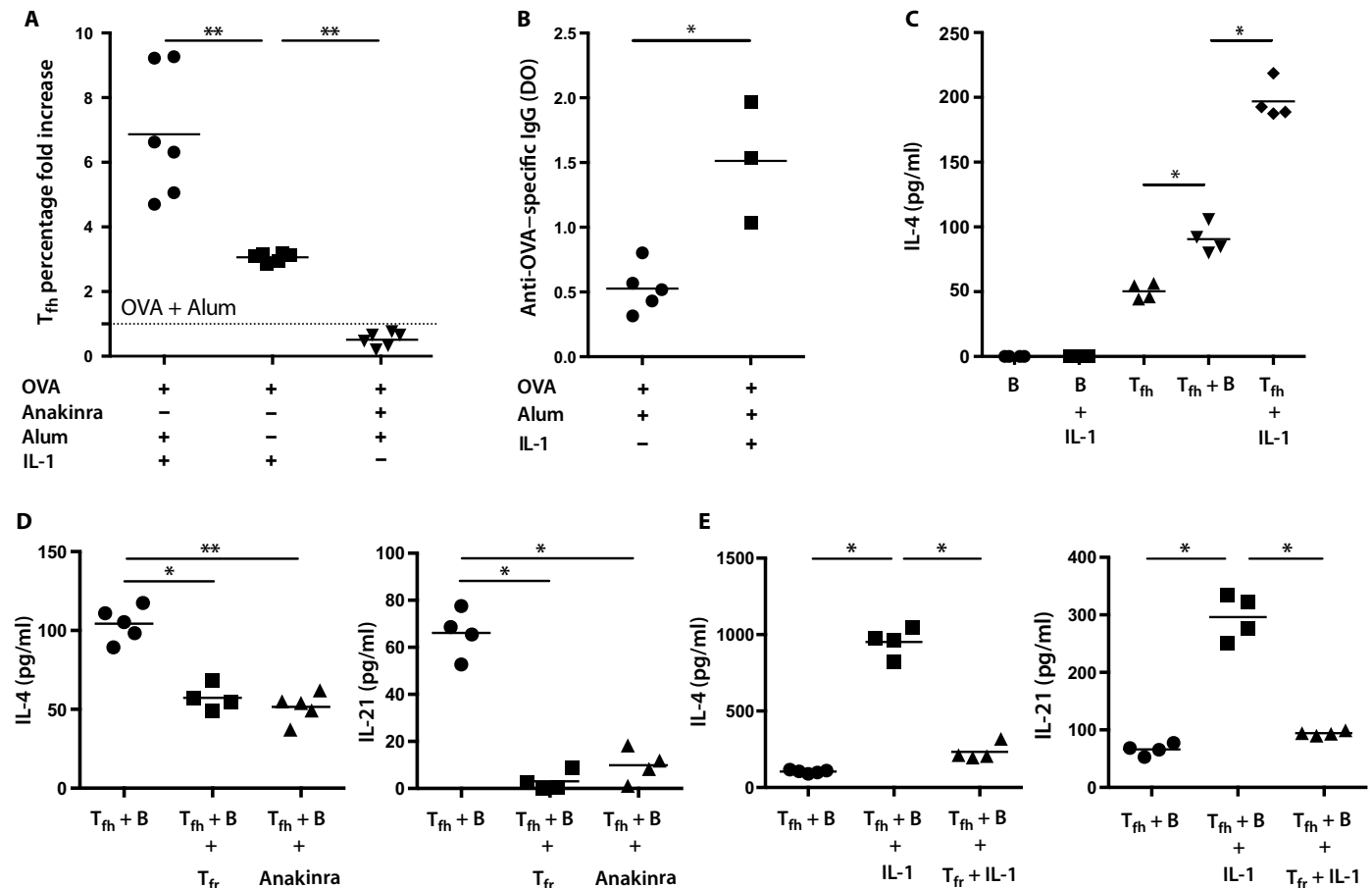
very small population of  $CD4^{+}CXCR5^{hi}PD-1^{hi}Foxp3^{+}Bcl6^{+}CD25^{-}$  cells. Therefore, when analyzing  $T_{fr}$  cells, which are scarce, if a very stringent gating on the highest CXCR5 and PD-1 expression and/or an exclusion of  $CD25^{+}$  cells is not implemented, there will be significant contamination of the studied population by  $T_{reg}$  cells that we estimated at  $>50\%$  with commonly used gating. Thus, many of the properties initially assigned to  $T_{fr}$  cells have likely been attributed to a mixed population of  $T_{reg}$  and  $T_{fr}$  cells. Our results suggest that there is a need to revisit these properties in more stringently selected  $T_{fr}$  cells. It should be realized that this will be difficult, because  $T_{fr}$  cells are reduced to a minute population.

With this phenotypic characterization, we were able to sort only 2000 to 6000  $T_{fr}$  cells per spleen of immunized mice. Nonetheless, we could confirm the functionality of  $T_{fr}$  cells. In vitro, they suppress  $T_{fh}$ -mediated production of IL-4 and IL-21 (Fig. 2, D and E), necessary cytokines for  $T_{fh}$ -mediated differentiation of antibody-producing B cells (61). Such a reduction of IL-21 and IL-4 production has been described as the main mechanism by which  $T_{fr}$  cells inhibit antibody responses (34). The in vivo suppressive activity of  $CD25^{-}$   $T_{fr}$  cells is also supported by the observation that the sole elimination of Bcl6/ $Foxp3$  cells led to highly abnormal  $T_{fh}$  cell and GCB cell responses (38). As we show that our cells are the only  $Bcl6^{+}Foxp3^{+}$  cells (Fig. 2F), this work strongly supports our conclusions. In vivo, the increase in  $T_{fr}$  and  $T_{fh}$  cells upon immunization was reciprocally dependent on the self/nonself nature of the antigen, suggesting different antigenic specificities, as recently reported (41).

To further revisit  $T_{fr}$  cell functionality on the basis of this previously unknown characterization, we studied the transcriptomic profile of  $T_{fr}$  cells and compared it with that of  $T_{fh}$  and  $T_{reg}$  cells. We used the NanoString technology, which is reported to be more quantitative for small cell populations (62). These analyses first showed that  $T_{fr}$  cells were clustered with  $T_{fh}$  and not with  $T_{reg}$  cells (Fig. 3A and fig. S5). This clustering was shown to be robust by a multiscale bootstrap sampling statistical validation (Fig. 3B). This suggests that the transcriptional program controlled by Bcl6 imprints the transcriptome landscape of  $T_{fr}$  cells more than the transcriptional program controlled by Foxp3. The first study describing  $T_{fr}$  cells (29) showed a clustering of  $T_{fr}$  cells with  $T_{reg}$



**Fig. 4. Gene and protein expression reveals a unique functional profile for  $T_{fr}$  cells compared with  $T_{reg}$  and  $T_{fh}$  cells.** (A) NFATc1 expression and its downstream regulated genes. (B and C) Variations in functions (B) and expression (C) of indicated molecules in  $T_{reg}$  (white),  $T_{fh}$  (blue), and  $T_{fr}$  (pink) cells. (D and E) MFI of IL-1R2 (D) ( $n > 20$ ) and OX40 (E) ( $n = 8$ ) in  $T_{fr}$ ,  $T_{reg}$ ,  $T_{eff}$ , and  $T_{fh}$  cells. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , Mann-Whitney  $U$  test.



**Fig. 5. IL-1 $\beta$  induces T<sub>fh</sub> cell activation that is inhibited by T<sub>fr</sub> cells.** (A) Fold change in T<sub>fh</sub> cell proportion among CD4<sup>+</sup> cells from indicated conditions in comparison with OVA + Alum control condition (dotted line) ( $n = 6$  to  $7$ ). Data shown are from one experiment and representative of two independent experiments. (B) Serum anti-OVA-specific IgG production by mice immunized with OVA, treated ( $n = 3$ ) or not treated ( $n = 5$ ) with IL-1 $\beta$ . (C) IL-4 production by B cells and T<sub>fh</sub> cells from immunized mice, in the presence or absence of B cells or IL-1 $\beta$ . (D and E) IL-4 and IL-21 production by T<sub>fh</sub> cells from immunized mice cocultured with B cells, with or without T<sub>fr</sub> cells or Anakinra (D) and with or without IL-1 $\beta$  and T<sub>fr</sub> cells (E). (C to E)  $n = 4$  to  $5$ ; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Mann-Whitney  $U$  test.

cells; we believe that this could be due to contamination of the T<sub>fr</sub> cells by T<sub>reg</sub> cells.

Our observation does not give clues as to the origin of T<sub>fr</sub> cells as cells either derived from thymic T<sub>reg</sub> cells or induced from T<sub>fh</sub> cells. The Bcl6-imprinted program could be secondarily imprinted over an initial imprinting by Foxp3, or vice versa. Lineage study and possibly TCR repertoire studies should help address this important issue.

We found that murine T<sub>fr</sub> cells highly express the decoy receptor IL-1R2 (Fig. 4C). IL-1R2, an IL-1 $\beta$  and IL-1 $\beta$  negative regulator, has been observed on neutrophils, macrophages, monocytes, B cells, and CD4<sup>+</sup> T cells (63–66). T<sub>fr</sub> cells also express IL-1Ra, the IL-1 receptor antagonist. We confirmed IL-1R2 expression on most, if not all, mouse and human T<sub>fr</sub> cells by flow cytometry (Figs. 4D and 7D). IL-1R2 has also been described in some T<sub>reg</sub> cells after in vitro activation (65, 66) and in pancreatic (67) and infiltrating T<sub>reg</sub> cells from colorectal tumors, but not from lung tumors or normal tissues (68). We could not detect significant expression of IL-1R2 in T<sub>reg</sub> cells from immunized mouse splenocytes or human lymph nodes. In contrast, T<sub>fh</sub> cells express the IL-1R1 agonist receptor but do not express IL-1R2 or IL-1Ra. These notable observations suggest that there could be an IL-1 axis in the regulation of T<sub>fh</sub> cells by T<sub>fr</sub> cells.

This IL-1 axis in the control of T<sub>fh</sub> cell activation is directly supported by in vitro and in vivo results. The following observations collectively highlight the importance of IL-1 $\beta$  in T<sub>fh</sub> cell activation and argue for a direct action of IL-1 $\beta$  on T<sub>fh</sub> cells: (i) T<sub>fh</sub> cells express IL-1R1 agonist receptor; (ii) IL-1 $\beta$  alone activates T<sub>fh</sub> cell-dependent production of IL-4 and IL-21 in vitro; (iii) IL-1 $\beta$  alone (without adjuvant) triggers the expansion of T<sub>fh</sub> cells in vivo in response to immunization; and (iv) Anakinra blocks the expansion of T<sub>fh</sub> cells in vivo in response to immunization. Furthermore, the following observations demonstrate the biological relevance of antagonist IL-1Ra expression on T<sub>fr</sub> cells: (i) T<sub>fr</sub> cells suppress the production of both IL-4 and IL-21 by T<sub>fh</sub> cells cocultured with B cells to the same extent as Anakinra, and (ii) T<sub>fr</sub> cells suppress the IL-1 $\beta$ -triggered production of both IL-4 and IL-21 by T<sub>fh</sub> cells.

Last, in the literature, the IL-1 axis in T<sub>fh</sub> cell control of B cell response is indirectly supported by numerous observations: (i) administering IL-1 during immunization leads to enhanced antibody production (69–71); (ii) antibody production is significantly reduced in IL-1-deficient mice (72, 73) but enhanced in mice lacking the expression of the IL-1 receptor antagonist IL-1Ra (72, 73); (iii) the effect of IL-1 on antibody production works through induction of CD40L



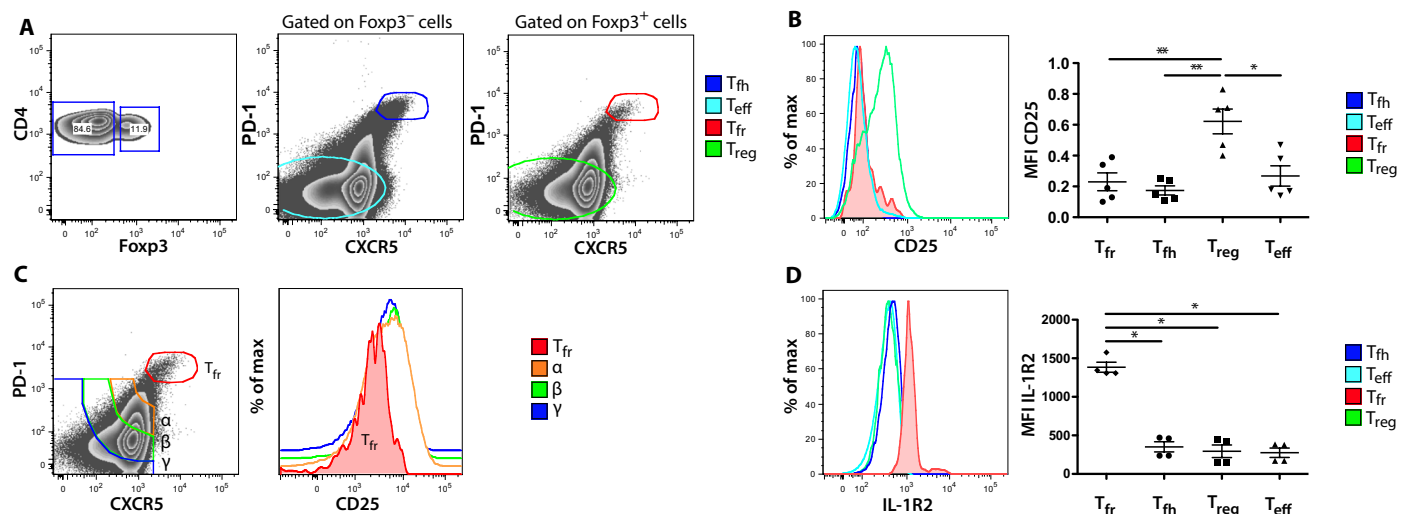
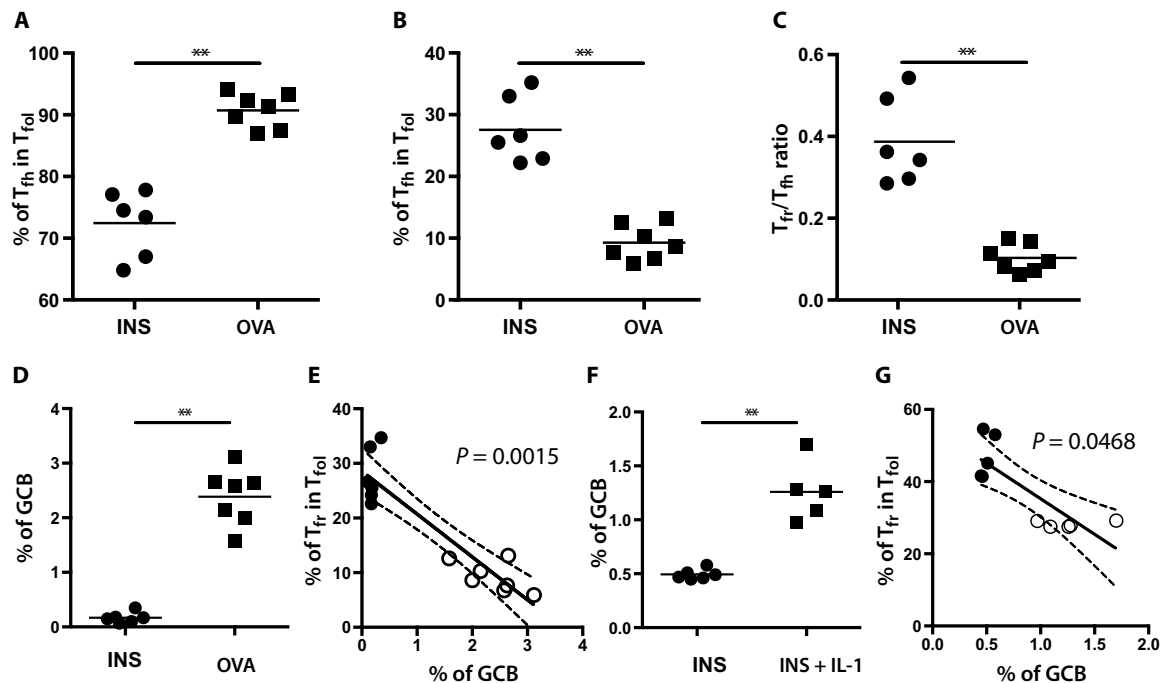
(73), which is highly expressed on  $T_{fh}$  cells (fig. S6); and (iv) many adjuvants used for immunization are IL-1 inducers (74, 75). These effects have been ascribed to IL-1 $\beta$ , rather than to IL-1 $\alpha$  (72). These results, together with the observation that IL-1 $\beta$  alone activates  $T_{fh}$  cells in vitro and in vivo, support the idea that our results should be relevant to all immunization procedures increasing IL-1 $\beta$  production.

$T_{fh}$  and  $T_{fr}$  cells are important for the regulation of humoral responses, in health and disease. Our results support that (auto)antibody production depends on IL-1 $\beta$  availability for  $T_{fh}$  cells, regulated by IL-1

antagonists expressed by  $T_{fr}$  cells. However, how general the contribution of the IL-1 axis is in the  $T_{fh}$ /B cell response to various antigenic stimulations (such as against other foreign antigens or self-antigens and during infection or autoimmune diseases) remains to be investigated, because this was not explored in this study. The mechanisms at work for its regulation also remain to be dissected. Selective knockout of IL-1R1 and IL-1R2/IL-1Ra in  $T_{fh}$  and  $T_{fr}$  should help address these questions. Last, the lineage of  $T_{fr}$  cells remains to be elucidated. Together, our results indicate a dual regulation of T cells in lymph nodes, one

**Fig. 6.  $T_{fr}$  cells respond better to immunization with self-antigens than with foreign antigens.**

(A to C)  $T_{fh}$  (A) and  $T_{fr}$  (B) cell proportions within  $T_{fol}$  cells and  $T_{fr}/T_{fh}$  ratio (C) after INS ( $n = 6$ ) or OVA ( $n = 7$ ) immunization. (D and E) GCB cell proportions within CD19 $^{+}$  B cells (D) and correlation between the percentage of  $T_{fr}$  and GCB cells from INS-immunized (filled circles) or OVA-immunized mice (empty circles) (E). (F and G) GCB cell proportions within CD19 $^{+}$  B cells (F) and correlation between the percentage of  $T_{fr}$  and GCB cells from INS-immunized mice receiving IL-1 $\beta$  (empty circles) or not (filled circles) (G). (A to C and F)  $**P < 0.01$ , Mann-Whitney  $U$  test. (E and G) Each symbol represents one mouse, and the Spearman rank correlation value is shown.



**Fig. 7. Human  $T_{fr}$  cells do not express CD25.** (A) Flow cytometry contour plots showing CD4 $^{+}$ Foxp3 $^{-}$  and CD4 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$  T cells (left); CXCR5 $^{hi}$ PD-1 $^{hi}$   $T_{fh}$  cells (blue) and CXCR5 $^{int/lo}$ PD-1 $^{int/lo}$   $T_{eff}$  cells (cyan) within CD4 $^{+}$ Foxp3 $^{-}$  T cells (middle); and CXCR5 $^{hi}$ PD-1 $^{hi}$   $T_{fr}$  cells (red) and CXCR5 $^{int/lo}$ PD-1 $^{int/lo}$   $T_{reg}$  cells (green) within CD4 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$  T cells (right). (B) Histograms showing CD25 expression level (left) and MFI (right) on gated subsets from (A). (C) Flow cytometry contour plot identifying different subsets according to PD-1 and CXCR5 expression within CD4 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$  T cells (left) and the corresponding expression of CD25 (right). (D) Histograms showing the IL-1R2 expression level of the subsets mentioned above (left) and their MFI (right). (B and D)  $n = 5$ ;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , Mann-Whitney  $U$  test.

between  $T_{\text{reg}}$  and  $T_{\text{eff}}$  cells regulated by IL-2 outside GCs and the other between  $T_{\text{fh}}$  and  $T_{\text{fr}}$  cells regulated by IL-1 $\beta$  inside GCs.

## MATERIALS AND METHODS

### Study design

For human and mice flow cytometry assays, the sample sizes were of at least five individuals per experiment. For enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and NanoString, sample sizes were of at least four per condition for which cells were sorted from pooled splenocytes from nine mice to ensure a sufficient number of  $T_{\text{fr}}$  cells. Sample size was determined on the basis of experimental feasibility and for statistical significance. The experiments were not randomized. The investigators were not blinded to the allocation during experiments and analyses.

### Mice

Male and female NOD Foxp3-GFP and BALB/c Foxp3-GFP (C.129X1-Foxp3tm3Tch/J) mice (8 to 14 weeks old) expressing GFP under the control of the promoter of *Foxp3* gene were provided by V. Kuchroo of Brigham and Women's Hospital (Boston, MA). C57BL/6 Foxp3-GFP mice expressing GFP under the control of the promoter of *Foxp3* gene were provided by B. Malissen of the Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (France). All animals were maintained at the University Pierre and Marie Curie (UPMC) Centre d'Expérimentation Fonctionnelle animal facility (Paris, France) under specific pathogen-free conditions in agreement with current European legislation on animal care, housing, and scientific experimentation (agreement number A751315). All procedures were approved by the local animal ethics committee.

### IL-2 treatment in mice

AAV8-CAG-IL2 recombinant vectors (rAAVs) were generated by triple transfection of human embryonic kidney 293T cells, as described previously (42). Mice were injected intraperitoneally once before immunization at day -21 (D-21) with  $10^{10}$  viral genomes of rAAVs diluted in 100  $\mu$ l of 1 $\times$  phosphate-buffered saline (PBS1 $\times$ ).

### Immunization

Mice were either immunized once (D0) and sacrificed at D10 for  $T_{\text{fr}}/T_{\text{fh}}$  phenotypic and transcriptomic studies or immunized twice (D0 and D14) and then euthanized at D28 for the analysis of GCB cells. Intraperitoneal injection was performed with 100  $\mu$ g of OVA (OVA A5503, Sigma-Aldrich) mixed with 500  $\mu$ g of aluminum hydroxide (Alum) gel (ALH303, Sigma) or with 4.5 IU of human INS (Umuline Rapide, Lilly) mixed with 500  $\mu$ g of Alum.

### In vivo treatment

Mice treated with recombinant human IL-1Ra received Anakinra (1 mg per mouse; Amgen) every 24 hours from D-1 before immunization to D4 after immunization. Mice treated with IL-1 $\beta$  received recombinant mouse IL-1 $\beta$  (0.5  $\mu$ g per mouse; BioLegend) at D1 and D2 after immunization.

### Flow cytometry analysis of mouse cells

Fresh total cells from lymph nodes and spleens were isolated in PBS1 $\times$ -3% fetal bovine serum (FBS) and stained for 20 min at 4°C with the following monoclonal antibodies at predetermined optimal dilutions: CD121b-BV421, CD19-PeCF594, CD4-V500, CD8a-AF700,

Bcl6-APC, CD278-BV421, CXCR5-Biotin (BD Biosciences), GL7-e450, Foxp3-AF488, PD-1-PE (PD-1-phycoerythrin), CD134-APC (CD134-allophycocyanin) (eBioscience), streptavidin-APC (eBioscience) or streptavidin-APC-Cy7 (BD Biosciences), CD25-PC7 (eBioscience), or CD25-eFluor 660 (BD Biosciences). CXCR5 staining was performed using biotinylated anti-CXCR5 for 30 min at 20°C followed by APC- or APC-Cy7-labeled streptavidin at 4°C. Intracellular detection of Foxp3 was performed on fixed and permeabilized cells using appropriate buffer (eBioscience), following the manufacturer's recommendations. Cells were acquired on an LSR II flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed using FlowJo software (TreeStar Inc.). Dead cells were excluded by forward/side scatter gating.

### Human tissues

Human tissues were obtained from prospective organ donors through an approved research protocol (no. 2014-108) authorized by the French Biomedicine Agency and the Ministry of Education and Research. Relatives of the donors provided informed consent for the collection of samples. Tissues were collected after the organs were flushed with cold preservation solution.

Tissue samples were maintained in cold PBS and brought to the laboratory within 2 to 4 hours of organ procurement where they were rapidly processed using mechanical digestion, resulting in high yields of living lymphocytes. For the spleen, an additional step was carried out to isolate mononuclear cells by density gradient centrifugation with Lymphoprep (STEMCELL Technologies).

### Flow cytometry analysis of human cells

Cell pellets were resuspended in a  $10^6$  cells/50  $\mu$ l of FBS concentration and then treated using the PerFix-nc kit (Beckman Coulter), following the manufacturer's recommendations. Cells were stained using a panel of fluorescence-conjugated fluorescein isothiocyanate (FITC), PE, PE-Texas Red (PE-TR), AF647, PE-Cy7, AF405, Pacific Blue, or BV510 monoclonal antibodies to detect the following cell proteins: CD4, CD25, CD127, Foxp3 (Beckman Coulter), CD3 (BD Biosciences), PD-1, CXCR5 (Ozyme), and IL-1R2 (R&D Systems). Flow cytometry data acquisition was performed on BD FACSAria II (BD Biosciences). Control samples included unstained and single fluorochrome-stained compensation beads (UltraComp eBeads, eBioscience). Flow cytometry data were analyzed using FlowJo software (TreeStar Inc.).

### Cell sorting

Splenocytes from immunized mice were stained with Ter-119-biotin and B220-biotin antibodies for 20 min at 4°C and labeled with anti-biotin magnetic beads (Miltenyi Biotec) for 15 min at 4°C. B cells and erythrocytes were depleted on an autoMACS separator (Miltenyi Biotec), following the manufacturer's procedure. Enriched T cells were stained as described in the "Flow cytometry analysis of human cells" section, and the following subsets were sorted on BD FACSAria II (BD Biosciences), with a purity of >98%:  $CD4^+CD8^-CXCR5^{\text{hi}}PD-1^{\text{hi}}Foxp3^-T_{\text{fh}}$  cells,  $CD4^+CD8^-CXCR5^{\text{hi}}PD-1^{\text{hi}}Foxp3^+T_{\text{fr}}$  cells, and  $CD4^+CD8^-CXCR5^{\text{int/lo}}PD-1^{\text{int/lo}}Foxp3^+T_{\text{reg}}$  cells.

### Suppression assays

$T_{\text{fh}}$ ,  $T_{\text{fr}}$ , and CD19 $^+$  B cells were sorted from D-10 OVA-immunized mice, following a previously described "Immunization" protocol. For all the conditions,  $2 \times 10^4$   $T_{\text{fh}}$  cells and  $5 \times 10^4$  B cells were cultured for 96 hours in 96-well plates (Nunc) in complete RPMI 1640 (Thermo

Scientific) with anti-IgM (5 µg/ml; clone eB121-15F9, eBioscience) and three CD3/CD28 beads for one T cell (Dynabeads Mouse T-Activator, Thermo Scientific). We then added either (i)  $1 \times 10^4$  T<sub>fr</sub> cells with (“T<sub>fh</sub> + B + T<sub>fr</sub> + IL-1”) or without (“T<sub>fh</sub> + B + T<sub>fr</sub>”) 1 µg of recombinant mouse IL-1β (BioLegend), (ii) only 1 µg of recombinant mouse IL-1β (“T<sub>fh</sub> + B + IL-1”), or (iii) Anakinra (500 ng/ml; Amgen) (“T<sub>fh</sub> + B + Anakinra”). IL-4 and IL-21 secretion levels were measured by ELISA (eBioscience) in supernatants of cultured cells, according to the manufacturer’s recommendations.

### Gene expression analysis based on a NanoString immunology panel

Sorted cells were washed in PBS1× and stored in RNAqueous lysis buffer (Ambion Inc./Life Technologies) at –80°C. Total RNA was extracted according to the manufacturer’s instructions, and quality was assessed on a bioanalyzer using the Pico RNA Reagent Kit (Agilent Technologies). Gene expression was analyzed using a NanoString mouse immunology panel, following the manufacturer’s recommendation (see Supplementary Materials and Methods).

### Statistical analysis

Flow cytometry, cytokine production, and gene expression data were analyzed using nonparametric Mann-Whitney *U* test on GraphPad Prism v5 [*P* values, such as *P* > 0.05 (not significant), \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, and \*\*\*\**P* < 0.0001, are indicated in the figures]. Exact *P* values are provided in table S1. Nonparametric correlation analyses were performed by Spearman rank correlation coefficient calculation. NanoString data were analyzed using IPA (QIAGEN). Clustering analysis and multiscale bootstrap resampling were performed using heatmap.2 and pvcust R packages on R version 3.1.3 (cluster method, average; distance, correlation).

See the Supplementary Materials for additional Materials and Methods information.

### SUPPLEMENTARY MATERIALS

immunology.sciencemag.org/cgi/content/full/2/15/eaan0368/DC1  
Materials and Methods

Fig. S1. Representative flow cytometry gating for T<sub>fol</sub> cells.  
Fig. S2. IL-2 increases the number of splenic T<sub>reg</sub> cells.  
Fig. S3. Expression of CD25 on T<sub>fr</sub> and T<sub>fh</sub> cells in three different genetic backgrounds.  
Fig. S4. T<sub>fh</sub> and T<sub>fr</sub> cells have similar expressions of Bcl6 and CD25.  
Fig. S5. Clustering of T<sub>reg</sub>, T<sub>fr</sub>, and T<sub>fh</sub> cells based on the expression of the entire 545-gene set from the NanoString mouse immunology panel.  
Fig. S6. Cytokines, CD40L, and OX40 expression of T<sub>fr</sub>, T<sub>reg</sub>, and T<sub>fh</sub> cells.  
Fig. S7. IL-1R2 and OX40 expression of T<sub>fr</sub>, T<sub>reg</sub>, T<sub>eff</sub>, and T<sub>fh</sub> cells.  
Fig. S8. IL-1β production in coculture of B and T<sub>fh</sub> cells.  
Fig. S9. GCB representative gating after INS or OVA immunization.  
Table S1. Exact *P* values of the asterisk symbols shown in figures.  
Source data (Excel file)

### REFERENCES AND NOTES

1. I. C. M. MacLennan, Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 117–139 (1994).
2. N. S. De Silva, U. Klein, Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 137–148 (2015).
3. S. L. Nutt, D. M. Tarlinton, Give and take in the germinal center. *Nat. Immunol.* **11**, 464–466 (2010).
4. B. B. Ding, E. Bi, H. Chen, J. J. Yu, B. H. Ye, IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. *J. Immunol.* **190**, 1827–1836 (2013).
5. K. L. Good-Jacobson, M. J. Shlomchik, Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: The influence of germinal center interactions and dynamics. *J. Immunol.* **185**, 3117–3125 (2010).
6. S. Crotty, T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* **41**, 529–542 (2014).
7. R. J. Johnston, A. C. Poholek, D. DiToro, I. Yusuf, D. Eto, B. Barnett, A. L. Dent, J. Craft, S. Crotty, Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* **325**, 1006–1010 (2009).
8. R. I. Nurieva, Y. Chung, G. J. Martinez, X. O. Yang, S. Tanaka, T. D. Matskevitch, Y.-H. Wang, C. Dong, Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* **325**, 1001–1005 (2009).
9. D. Yu, S. Rao, L. M. Tsai, S. K. Lee, Y. He, E. L. Sutcliffe, M. Srivastava, M. Linterman, L. Zheng, N. Simpson, J. I. Ellyard, I. A. Parish, C. S. Ma, Q.-J. Li, C. R. Parish, C. R. Mackay, C. G. Vinuesa, The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* **31**, 457–468 (2009).
10. S. Hardtke, L. Ohl, R. Förster, 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 (2005).
11. N. M. Haynes, C. D. C. Allen, R. Lesley, K. M. Ansel, N. Killeen, J. G. Cyster, Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1<sup>high</sup> germinal center-associated subpopulation. *J. Immunol.* **179**, 5099–5108 (2007).
12. D. Eto, C. Lao, D. DiToro, B. Barnett, T. C. Escobar, R. Kageyama, I. Yusuf, S. Crotty, IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (T<sub>fh</sub>) differentiation. *PLOS ONE* **6**, e17739 (2011).
13. R. I. Nurieva, Y. Chung, D. Hwang, X. O. Yang, H. S. Kang, L. Ma, Y. H. Wang, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian, C. Dong, Generation of follicular helper T cells is mediated by IL-21 but independent of TH1, TH2 or TH17 lineages. *Immunity* **29**, 138–149 (2008).
14. J. P. Weber, F. Fuhrmann, R. K. Feist, A. Lahmann, M. S. Al Baz, L.-J. Gentz, D. V. Van, H. W. Mages, C. Haftmann, R. Riedel, J. R. Grün, W. Schuh, R. A. Krocze, A. Radbruch, M.-F. Mashreghi, A. Hutloff, ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2. *J. Exp. Med.* **212**, 217–233 (2015).
15. E. K. Deenick, C. S. Ma, The regulation and role of T follicular helper cells in immunity. *Immunology* **134**, 361–367 (2011).
16. R. Elgueta, M. J. Benson, V. C. De Vries, A. Wasiuk, Y. Guo, R. J. Noelle, Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.* **229**, 152–172 (2009).
17. R. J. Noelle, M. Roy, D. M. Shepherd, I. Stamenkovic, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 6550–6554 (1992).
18. D. T. Avery, V. L. Bryant, C. S. Ma, R. de Waal Malefyt, S. G. Tangye, IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *J. Immunol.* **181**, 1767–1779 (2008).
19. S. Crotty, Follicular helper CD4 T cells (T<sub>fh</sub>). *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 621–663 (2011).
20. I. Yusuf, R. Kageyama, L. Monticelli, R. J. Johnston, D. DiToro, K. Hansen, B. Barnett, S. Crotty, Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J. Immunol.* **185**, 190–202 (2010).
21. C. G. Vinuesa, M. C. Cook, The molecular basis of lymphoid architecture and B cell responses: Implications for immunodeficiency and immunopathology. *Curr. Mol. Med.* **1**, 689–725 (2001).
22. H.-J. Park, D.-H. Kim, S.-H. Lim, W.-J. Kim, J. Youn, Y.-S. Choi, J.-M. Choi, Insights into the role of follicular helper T cells in autoimmunity. *Immune Netw.* **14**, 21–29 (2014).
23. M. A. Linterman, R. J. Rigby, R. K. Wong, D. Yu, R. Brink, J. L. Cannons, P. L. Schwartzberg, M. C. Cook, G. D. Walters, C. G. Vinuesa, Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* **206**, 561–576 (2009).
24. C. C. Goodnow, J. Sprent, B. F. de St. Groth, C. G. Vinuesa, Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**, 590–597 (2005).
25. D. Yu, C. G. Vinuesa, Multiple checkpoints keep follicular helper T cells under control to prevent autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* **7**, 198–203 (2010).
26. C. King, S. G. Tangye, C. R. Mackay, T follicular helper (T<sub>fh</sub>) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 741–766 (2008).
27. C. G. Vinuesa, I. Sanz, M. C. Cook, Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 845–857 (2009).
28. Y. Chung, S. Tanaka, F. Chu, R. I. Nurieva, G. J. Martinez, S. Rawal, Y.-H. Wang, H. Lim, J. M. Reynolds, X.-h. Zhou, H.-m. Fan, Z.-m. Liu, S. S. Neelapu, C. Dong, Follicular regulatory T (T<sub>fr</sub>) cells with dual Foxp3 and Bcl6 expression suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* **17**, 983–988 (2011).
29. M. A. Linterman, W. Pierson, S. K. Lee, A. Kallies, S. Kawamoto, T. F. Rayner, M. Srivastava, D. P. Divekar, L. Beaton, J. J. Hogan, S. Fagaras, A. Liston, K. G. C. Smith, C. G. Vinuesa, Foxp3<sup>+</sup> follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* **17**, 975–982 (2011).
30. J. D. Fontenot, M. A. Gavin, A. Y. Rudensky, Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330–336 (2003).

31. S. Hori, T. Nomura, S. Sakaguchi, Control of regulatory T cell development by the transcription factor *Foxp3*. *Science* **299**, 1057–1061 (2003).
32. A. R. Maceiras, L. Graca, Identification of *Foxp3*<sup>+</sup> T follicular regulatory (T<sub>fr</sub>) cells by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* **1291**, 143–150 (2015).
33. M. Aloulou, E. J. Carr, M. Gador, A. Bignon, R. S. Liblau, N. Fazilleau, M. A. Linterman, Follicular regulatory T cells can be specific for the immunizing antigen and derive from naive T cells. *Nat. Commun.* **7**, 10579 (2016).
34. P. T. Sage, D. Alvarez, J. Godec, U. H. von Andrian, A. H. Sharpe, Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. *J. Clin. Invest.* **124**, 5191–5204 (2014).
35. P. T. Sage, L. M. Francisco, C. V. Carman, A. H. Sharpe, The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat. Immunol.* **14**, 152–161 (2013).
36. J. B. Wing, W. Ise, T. Kurosaki, S. Sakaguchi, Regulatory T cells control antigen-specific expansion of T<sub>fh</sub> cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4. *Immunity* **41**, 1013–1025 (2014).
37. P. T. Sage, A. M. Paterson, S. B. Lovitch, A. H. Sharpe, The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity* **41**, 1026–1039 (2014).
38. H. Wu, Y. Chen, H. Liu, L.-L. Xu, P. Teuscher, S. Wang, S. Lu, A. L. Dent, Follicular regulatory T cells repress cytokine production by follicular helper T cells and optimize IgG responses in mice. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1152–1161 (2016).
39. N. Fazilleau, M. D. Eisenbraun, L. Malherbe, J. N. Ebright, R. R. Pogue-Caley, L. J. McHeyzer-Williams, M. G. McHeyzer-Williams, Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. *Nat. Immunol.* **8**, 753–761 (2007).
40. N. Fazilleau, L. J. McHeyzer-Williams, H. Rosen, M. G. McHeyzer-Williams, The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat. Immunol.* **10**, 375–384 (2009).
41. A. R. Maceiras, S. C. P. Almeida, E. Mariotti-Ferrandiz, W. Chaara, F. Jebbawi, A. Six, S. Hori, D. Klatzmann, J. Faro, L. Graca, T follicular helper and T follicular regulatory cells have different TCR specificity. *Nat. Commun.* **8**, 15067 (2017).
42. G. Churlaud, V. Jimenez, J. Ruberte, M. A. Zin, G. Fourcade, G. Gottrand, E. Casana, B. Lambrecht, B. Bellier, E. Piaggio, F. Bosch, D. Klatzmann, Sustained stimulation and expansion of Tregs by IL2 control autoimmunity without impairing immune responses to infection, vaccination and cancer. *Clin. Immunol.* **151**, 114–126 (2014).
43. A. Hartemann, G. Bensimon, C. A. Payan, S. Jacqueminet, O. Bourron, N. Nicolas, M. Fonfrede, M. Rosenzweig, C. Bernard, D. Klatzmann, Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: A phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **1**, 295–305 (2013).
44. D. Saadoun, M. Rosenzweig, F. Joly, A. Six, F. Carrat, V. Thibault, D. Sene, P. Cacoub, D. Klatzmann, Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2067–2077 (2011).
45. R. Suzuki, H. Shimodaira, Pvcust: An R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* **22**, 1540–1542 (2006).
46. H. Shimodaira, Approximately unbiased tests of regions using multistep-multiscale bootstrap resampling. *Ann. Stat.* **32**, 2616–2641 (2004).
47. Y. Wu, M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A. D. Lapan, J. C. Stroud, D. L. Bates, L. Guo, A. Han, S. F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, A. Rao, FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* **126**, 375–387 (2006).
48. T. Lozano, L. Villanueva, M. Durántez, M. Gorraiz, M. Ruiz, V. Belsúe, J. I. Riezu-Boj, S. Hervás-Stubbs, J. Oyarzábal, H. Bandukwala, A. R. Lourenço, P. J. Coffey, P. Sarobe, J. Prieto, N. Casares, J. J. Lasarte, Inhibition of FOXP3/NFAT interaction enhances T cell function after TCR stimulation. *J. Immunol.* **195**, 3180–3189 (2015).
49. K. J. Oestreich, H. Yoon, R. Ahmed, J. M. Boss, NFATc1 regulates programmed death-1 expression upon T cell activation. *J. Immunol.* **181**, 4832–4839 (2008).
50. V. A. Peters, J. J. Joesting, G. G. Freund, IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. *Brain Behav. Immun.* **32**, 1–8 (2013).
51. W. P. Arend, M. Malyak, C. J. Guthridge, C. Gabay, Interleukin-1 receptor antagonist: Role in biology. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 27–55 (1998).
52. P. T. Sage, N. Ron-Harel, V. R. Juneja, D. R. Sen, S. Maleri, W. Sungnak, V. K. Kuchroo, W. N. Haining, N. Chevrier, M. Haigis, A. H. Sharpe, Suppression by T<sub>fr</sub> cells leads to durable and selective inhibition of B cell effector function. *Nat. Immunol.* **17**, 1436–1446 (2016).
53. R. Goldbach-Mansky, Blocking interleukin-1 in rheumatic diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1182**, 111–123 (2009).
54. A. de Luca, S. P. Smeekeens, A. Casagrande, R. Iannitti, K. L. Conway, M. S. Gresnigt, J. Begun, T. S. Plantinga, L. A. B. Joosten, J. W. M. van der Meer, G. Chamilos, M. G. Netea, R. J. Xavier, C. A. Dinarello, L. Romani, F. L. van de Veerdonk, IL-1 receptor blockade restores autoophagy and reduces inflammation in chronic granulomatous disease in mice and in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 3526–3531 (2014).
55. U. Harnack, H. Johnen, G. Pecher, IL-1 receptor antagonist anakinra enhances tumour growth inhibition in mice receiving peptide vaccination and  $\beta$ -(1-3),(1-6)-D-glucan. *Anticancer Res.* **30**, 3959–3965 (2010).
56. J. Petrasek, S. Bala, T. Csak, D. Lippai, K. Kody, V. Menashy, M. Barrieau, S.-Y. Min, E. A. Kurt-Jones, G. Szabo, IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 3476–3489 (2012).
57. D. Klatzmann, A. K. Abbas, The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 283–294 (2015).
58. S. Zelenay, T. Lopes-Carvalho, I. Caramalho, M. F. Moraes-Fontes, M. Rebelo, J. Demengeot, *Foxp3*<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 4091–4096 (2005).
59. L. Barron, H. Dooms, K. K. Hoyer, W. Kuswanto, J. Hofmann, W. E. O’Gorman, A. K. Abbas, Cutting edge: Mechanisms of IL-2-dependent maintenance of functional regulatory T cells. *J. Immunol.* **185**, 6426–6430 (2010).
60. Y. Grinberg-Bleyer, A. Baeyens, S. You, R. Elhage, G. Fourcade, S. Gregoire, N. Cagnard, W. Carpentier, Q. Tang, J. Bluestone, L. Chatenoud, D. Klatzmann, B. L. Salomon, E. Piaggio, IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **207**, 1871–1878 (2010).
61. J. S. Weinstein, E. I. Herman, B. Lainez, P. Licona-Limón, E. Esplugues, R. Flavell, J. Craft, T<sub>fh</sub> cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat. Immunol.* **17**, 1197–1205 (2016).
62. G. K. Geiss, R. E. Bumgarner, B. Birditt, T. Dahl, N. Dowidar, D. L. Dunaway, H. Perry Fell, S. Ferree, R. D. George, T. Grogan, J. J. James, M. Maysuria, J. D. Mitton, P. Oliveri, J. L. Osborn, T. Peng, A. L. Ratcliffe, P. J. Webster, E. H. Davidson, L. Hood, K. Dimitrov, Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat. Biotechnol.* **26**, 317–325 (2008).
63. R. Bonecchi, C. Garlanda, A. Mantovani, F. Riva, Cytokine decoy and scavenger receptors as key regulators of immunity and inflammation. *Cytokine* **87**, 37–45 (2016).
64. A. Bebes, F. Kovács-Sólyom, J. Prihoda, R. Kui, L. Kemény, R. Gyulai, Interleukin-1 receptors are differentially expressed in normal and psoriatic T cells. *Mediators Inflamm.* **2014**, 472625 (2014).
65. F. Mercer, L. Kozhaya, D. Unutmaz, Expression and function of TNF and IL-1 receptors on human regulatory T cells. *PLOS ONE* **5**, e8639 (2010).
66. D. Q. Tran, J. Andersson, D. Hardwick, L. Bebris, G. G. Illei, E. M. Shevach, Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood* **113**, 5125–5133 (2009).
67. T. G. Tan, D. Mathis, C. Benoist, Singular role for T-BET<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> regulatory T cells in protection from autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 14103–14108 (2016).
68. M. De Simone, A. Arrigoni, G. Rossetti, P. Gruarin, V. Ranzani, C. Politano, R. J. P. Bonnal, E. Provasi, M. L. Sarnicola, I. Panzeri, M. Moro, M. Crosti, S. Mazzara, V. Vaira, S. Bosari, A. Palleschi, L. Santambrogio, G. Bovo, N. Zucchini, M. Toti, L. Gianotti, G. Cesana, R. A. Perego, N. Maroni, A. P. Ceretti, E. Opoche, R. De Francesco, J. Geginat, H. G. Stunnenberg, S. Abrignani, M. Pagani, Transcriptional landscape of human tissue lymphocytes unveils uniqueness of tumor-infiltrating T regulatory cells. *Immunity* **45**, 1135–1147 (2016).
69. M. J. Staruch, D. D. Wood, The adjuvant activity of interleukin 1 in vivo. *J. Immunol.* **130**, 2191–2194 (1983).
70. L. Nencioni, L. Villa, A. Tagliabue, G. Antoni, R. Presentini, F. Perin, S. Silvestri, D. Boraschi, In vivo immunostimulating activity of the 163-171 peptide of human IL-1 beta. *J. Immunol.* **139**, 800–804 (1987).
71. S. G. Reed, D. L. Pihl, P. J. Conlon, K. H. Grabstein, IL-1 as adjuvant. Role of T cells in the augmentation of specific antibody production by recombinant human IL-1 alpha. *J. Immunol.* **142**, 3129–3133 (1989).
72. S. Nakae, M. Asano, R. Horai, Y. Iwakura, Interleukin-1 $\beta$ , but not interleukin-1 $\alpha$ , is required for T-cell-dependent antibody production. *Immunology* **104**, 402–409 (2001).
73. S. Nakae, M. Asano, R. Horai, N. Sakaguchi, Y. Iwakura, IL-1 enhances T cell-dependent antibody production through induction of CD40 ligand and OX40 on T cells. *J. Immunol.* **167**, 90–97 (2001).
74. A. Bromander, J. Holmgren, N. Lycke, Cholera toxin stimulates IL-1 production and enhances antigen presentation by macrophages in vitro. *J. Immunol.* **146**, 2908–2914 (1991).
75. H. Li, S. Nookala, F. Re, Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 $\beta$  and IL-18 release. *J. Immunol.* **178**, 5271–5276 (2007).

**Acknowledgments:** We are grateful to B. Gouritin for help in cell sorting, to P.-A. Vinot for advice regarding ELISA assays, and to W. Chaara for advice regarding gene expression analysis. We thank the Institut Curie Genomic Platform for advising and performing the NanoString experiment, G. Lebreton and colleagues from the Cardio-Thoracic Surgery Department of the Pitié-Salpêtrière Hospital for providing the human tissues, F. Tankere from the Otolaryngology Department of the Pitié-Salpêtrière Hospital for providing the human tonsils, and V. Kuchroo



and B. Malissen for the mice provided. **Funding:** P.-G.G.R. is a doctoral fellow of the "Ecole de l'Inserm Liliane Bettencourt" and was sponsored by Servier. L.F. was funded by a "DIM Région Ile de France" doctoral fellowship. The work of D.K., E.M.-F., G.C., V.Q., G.F. and F.B. was funded by Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, INSERM, Sorbonne Université-UPMC (Paris 6), as well as by LabEx Transimmunom (ANR-11-IDEX-0004-02) and European Research Council Advanced Grant TRiPoD (322856) (to D.K.). **Author contributions:** P.-G.G.R., G.C., F.B., G.F., and L.F. performed the mouse experiments. P.-G.G.R. performed analyses, including statistical analysis. V.Q. performed the experiment on human samples and analyses, including statistical analysis. P.-G.G.R., G.C., E.M.-F., and D.K. conceived the experiments. P.-G.G.R., E.M.-F., and D.K. wrote the manuscript, with input from all authors. D.K. conceived, supervised, and obtained funding for the entire study. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the

conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials. Additional data related to this paper may be requested from the authors.

Submitted 24 February 2017

Resubmitted 26 May 2017

Accepted 19 July 2017

Published 8 September 2017

10.1126/sciimmunol.aan0368

**Citation:** P.-G. G. Ritvo, G. Churlaud, V. Quiniou, L. Florez, F. Brimaud, G. Fourcade, E. Mariotti-Ferrandiz, D. Klatzmann,  $T_{fr}$  cells lack IL-2R $\alpha$  but express decoy IL-1R2 and IL-1Ra and suppress the IL-1-dependent activation of  $T_H$  cells. *Sci. Immunol.* **2**, ean0368 (2017).

## **T<sub>fr</sub> cells lack IL-2R $\alpha$ but express decoy IL-1R2 and IL-1Ra and suppress the IL-1–dependent activation of T<sub>fh</sub> cells**

Paul-Gydeon G. Ritvo, Guillaume Churlaud, Valentin Quiniou, Laura Florez, Faustine Brimaud, Gwladys Fourcade, Encarnita Mariotti-Ferrandiz and David Klatzmann

*Sci. Immunol.* **2**, eaan0368.  
DOI: 10.1126/sciimmunol.aan0368

### **Immune regulation in the germinal center**

Unregulated production of antibodies may contribute to the development of autoimmunity. Follicular regulatory T (T<sub>fr</sub>) cells are thought to limit the germinal center (GC) reaction and to reduce antibody production within B cell follicles in both humans and mice, yet how T<sub>fr</sub> cells control the GC reaction remains unclear. Ritvo *et al.* closely characterize T<sub>fr</sub> cells and identify these cells as a rare population of CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells that do not express CD25 and do not respond to interleukin-2. When compared with follicular helper T (T<sub>fh</sub>) cells and regulatory T cells, T<sub>fr</sub> cells clustered with T<sub>fh</sub> cells. Moreover, they expressed decoy molecules for the interleukin-1 signaling pathway, suggesting a mechanism for the suppression of T<sub>fh</sub> cells.

#### ARTICLE TOOLS

<http://immunology.sciencemag.org/content/2/15/eaan0368>

#### SUPPLEMENTARY MATERIALS

<http://immunology.sciencemag.org/content/suppl/2017/09/05/2.15.eaan0368.DC1>

#### REFERENCES

This article cites 75 articles, 27 of which you can access for free  
<http://immunology.sciencemag.org/content/2/15/eaan0368#BIBL>

#### PERMISSIONS

<http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions>

Use of this article is subject to the [Terms of Service](#)

## Supplementary Materials

### Materials and Methods

#### Nanostring

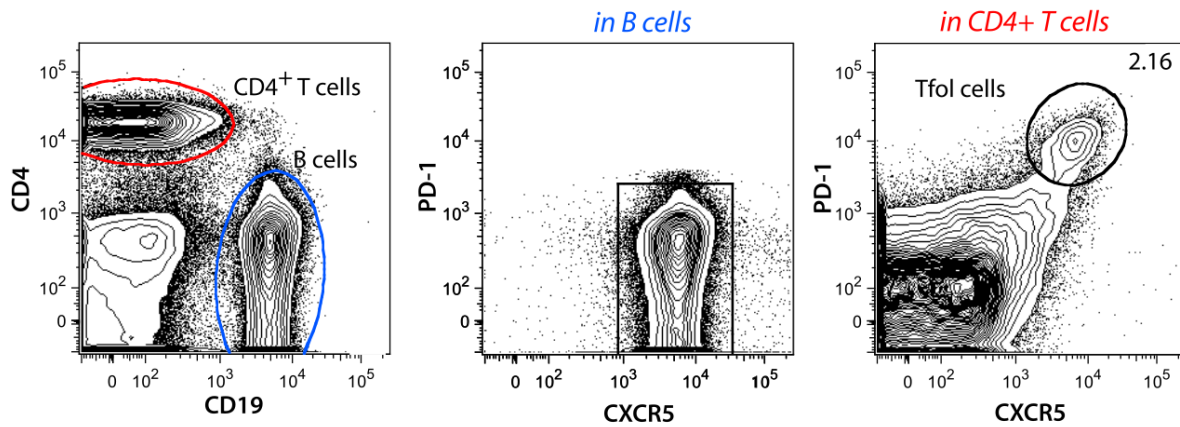
##### *Gene expression analysis based on a NanoString immunology panel*

**RNA extraction and NanoString procedure:** Sorted cells were washed in PBS1X and stored in RNAqueous kit Lysis Buffer (Ambion, Inc/Life Technologies) at -80°C. Total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions and quality was assessed on a bioanalyzer using the Pico RNA Reagent Kit (Agilent Technologies). Gene expression was analyzed using the NanoString mouse immunology panel (NanoString, Seattle, USA). 5 ng of total RNA was pre-amplified (5 cycles of PCR) using the specific multiprobe approaches following the manufacturer's instructions. Each sample was analyzed in a separate multiplexed reaction including in each, eight negative probes and six concentrations of positive control probes. Negative control analysis was performed to determine the background for each sample.

**Data quality control and normalization:** Data were imported into NanoString nSolver analysis software (version 2.5) for quality control and normalization. A preliminary quality control analysis was performed on raw data as follows: A first normalization step using the internal positive controls was applied to correct potential sources of technical variations. To do so, we calculated for each sample the geometric mean of the positive probe counts. A scaling factor for a sample was the ratio of the average across all geometric means and the geometric mean of the sample. For each sample, we multiplied all gene counts by the corresponding scaling factor. Next, for each sample and all genes of interest, non-specific measurements counted in a water sample (No Template Control) were subtracted from all measurements for all samples. Finally, to take into account biological variation, 14 housekeeping genes were used to normalize all the 545 genes of interest using the same method as in the positive control normalization step.

**Selection of highly discriminant genes:** We further analyzed the genes that better separate the cell subsets. As 100 transcripts per gene represent the limit for a robust detection of expression, we first selected genes with such expression in at least one sample. We then selected genes whose mean expression in one subset was at least twice or half the mean expression in the two other subsets, leading to a set of 81 genes that were used for Tfr, Tfh and Treg functional profile study.





**Fig. S1: Representative flow cytometry gating for Tfol cells**

Flow cytometry contour plots identifying CXCR5<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup> follicular T cells (Tfol cells) within CD4<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> T cells (middle panel) and CXCR5<sup>hi</sup>PD-1<sup>-</sup> status of CD4<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> B cells (right panel).

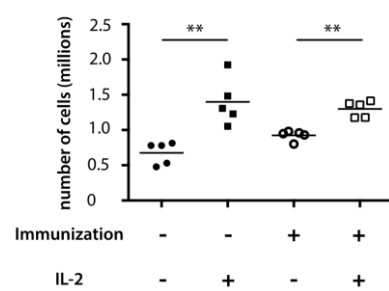


Fig. S2: **IL-2** increases the number of splenic Treg cells

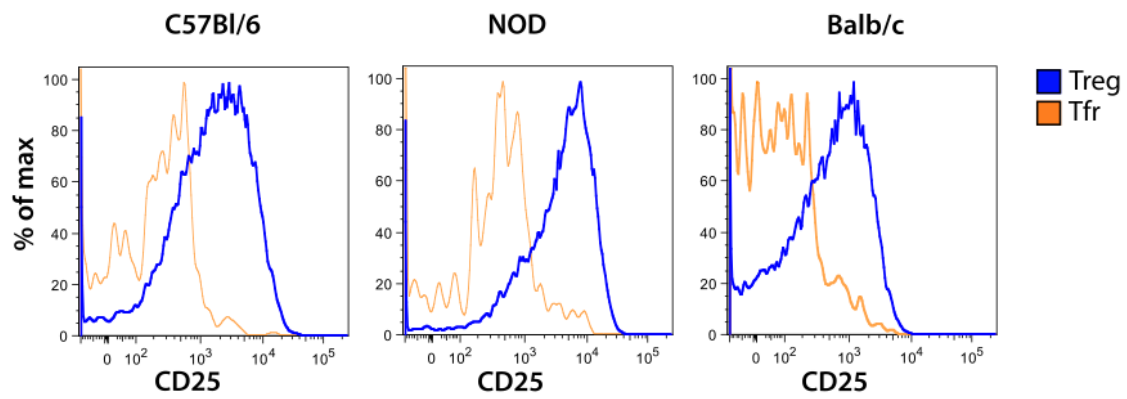


Figure S3: Expression of CD25 on Tfr and Tfh cells in three different genetic backgrounds

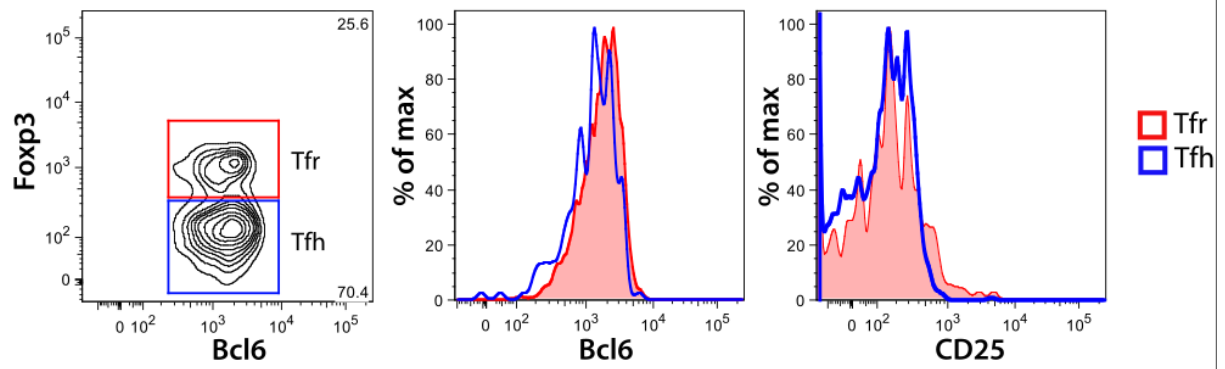
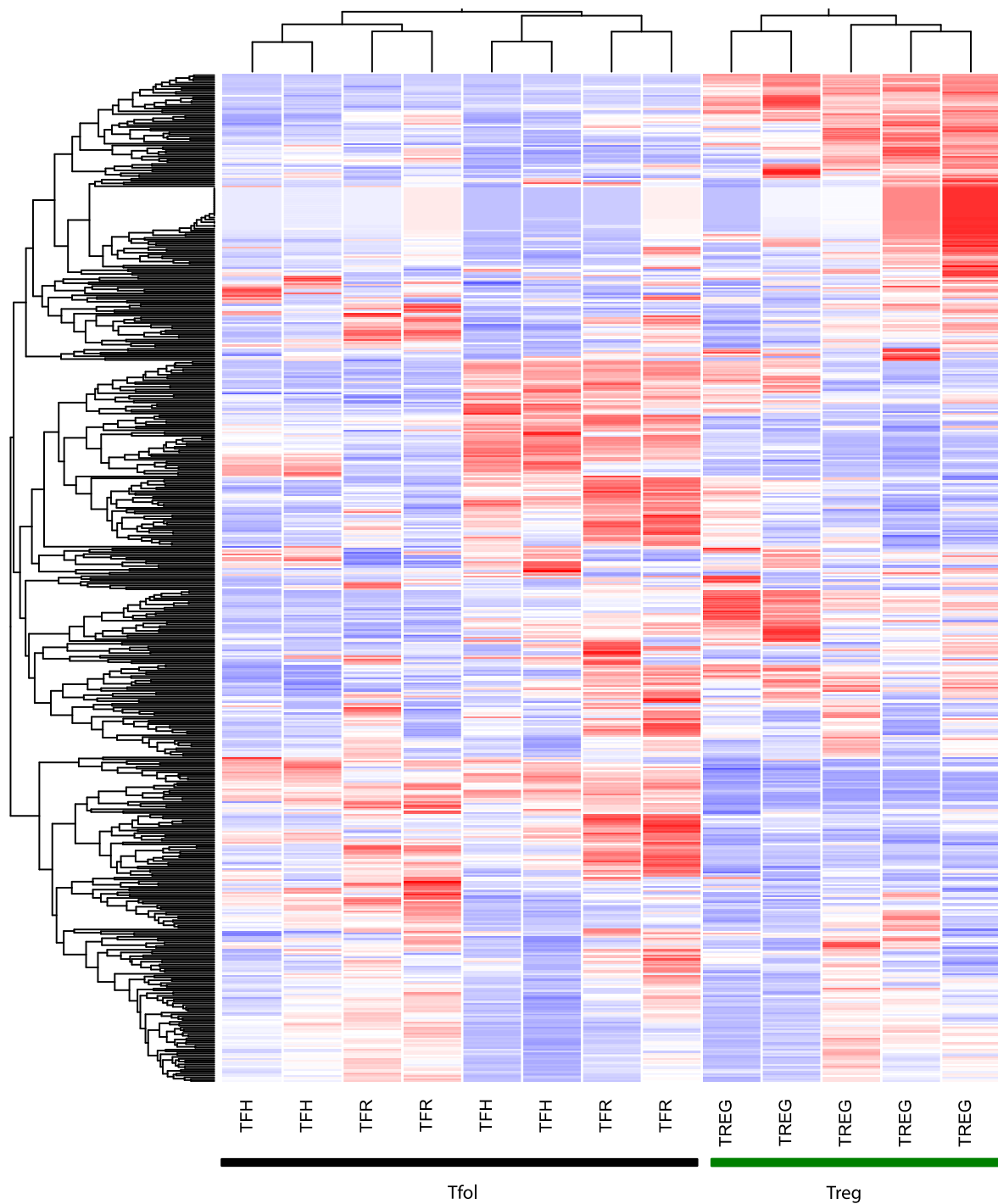


Figure S4: **Tfh and Tfr cells have similar expressions of Bcl6 and CD25**

Flow cytometry contour plot identifying CD4<sup>+</sup>Bcl6<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tfr (red) and CD4<sup>+</sup>Bcl6<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Tfh (blue) cells within Tfol cells of A (left) and their expression of Bcl6 (middle panel) and CD25 (right panel).



**Figure S5: Clustering of Treg, Tfr and Tfh cells based on the expression of the entire 545 gene set from the Nanostring mouse immunology panel**

Heat map comparing the gene expression profiles of Treg, Tfr and Tfh cell subsets from two genetic backgrounds ten days after immunization. High (red) and low (blue) gene expression.

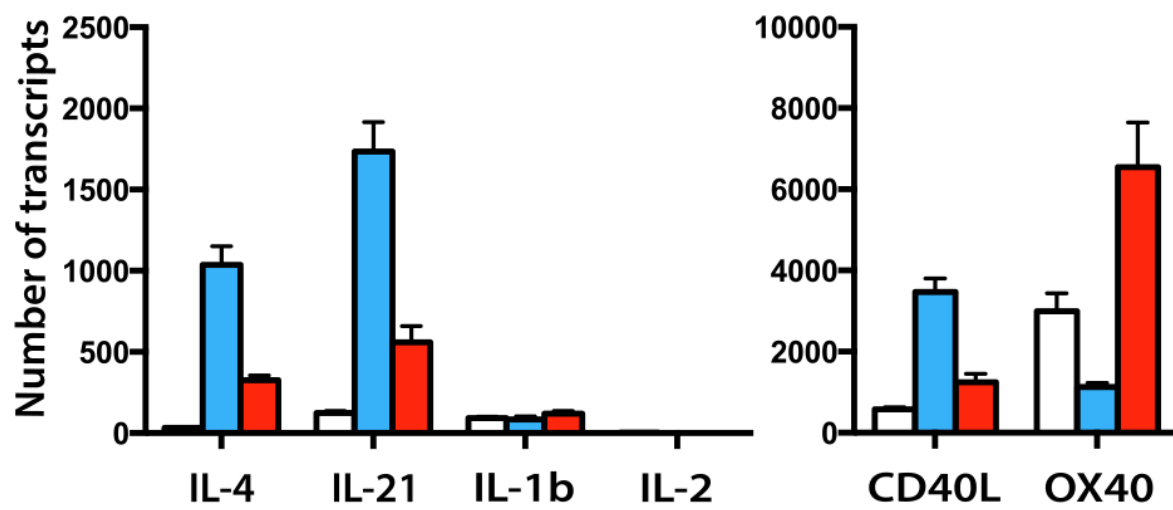


Figure S6: Cytokines, CD40L and OX40 expression of Tfr, Treg and Tfh cells

Expression of indicated molecules in Treg (white), Tfh (blue) and Tfr (red) cells.

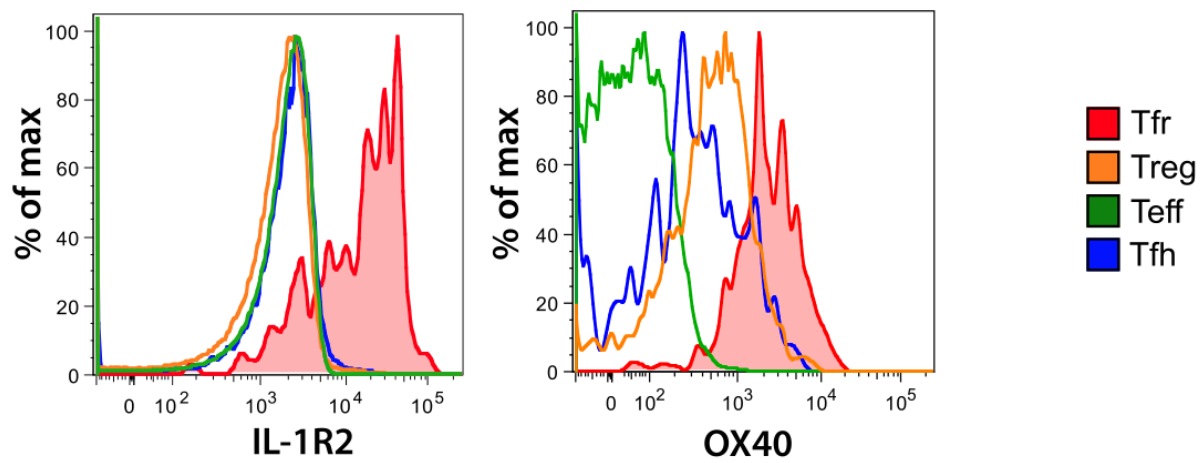


Figure S7: **IL-1R2 and OX40 expression of Tfr, Treg, Teff and Tfh cells**

IL-1R2 (left) and OX40 (right) protein expression of Tfr, Treg, Teff and Tfh cells.

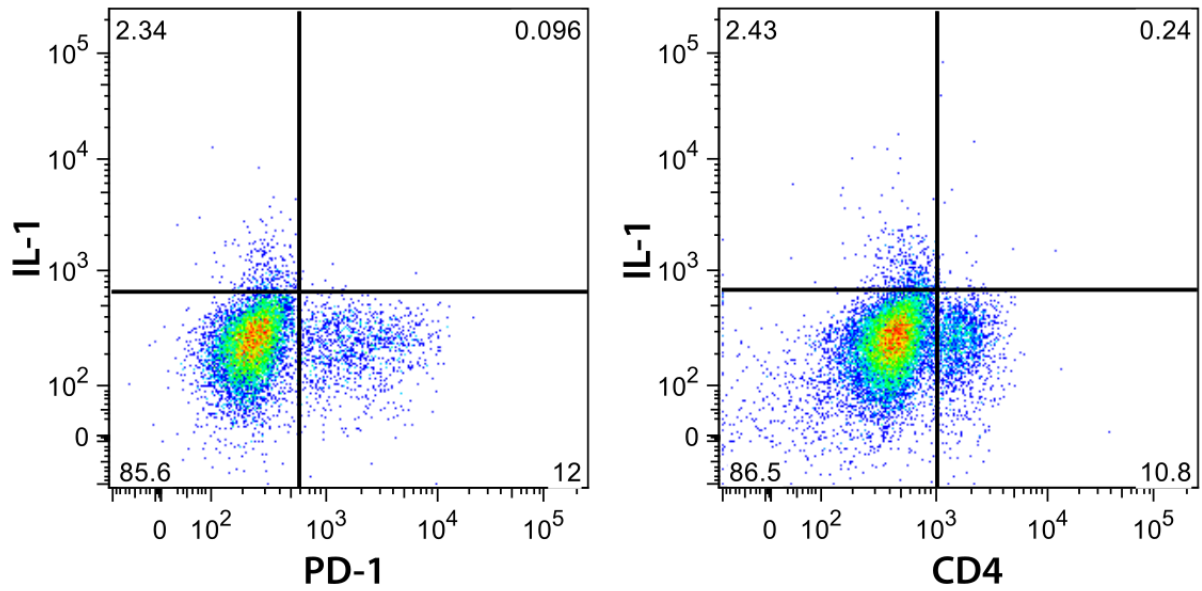


Figure S8: **IL-1 $\beta$  production in co-culture of B and Tfh cells**

Flow cytometry dot plot showing the IL-1 $\beta$  production of PD-1<sup>-</sup> B cells and PD-1<sup>+</sup> Tfh cells (left) and of CD4<sup>-</sup> B cells and CD4<sup>+</sup> Tfh cells (right) in co-culture of B and Tfh cells. IL-1 was stained using the IL-1 $\beta$ -APC (eBioscience).



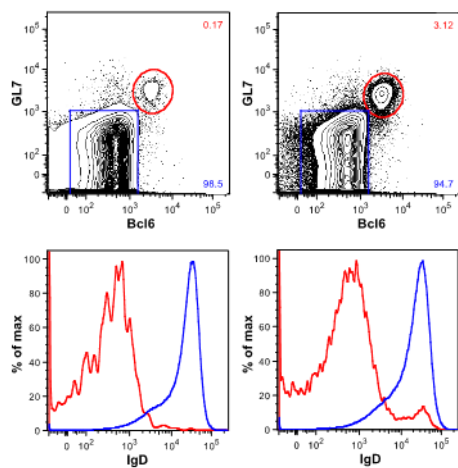


Figure S9: **GCB representative gating after INS or OVA immunization**

Bcl6<sup>-</sup> GL7<sup>-</sup> B cells and Bcl6<sup>+</sup> GL7<sup>+</sup> germinal center B cell (GCB cell) proportions within CD19<sup>+</sup> B cells after INS or OVA immunization

| Figure   | Comparison | Exact p-value                                                                |
|----------|------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 1        | throughout | *: p=0.0159, **: p =0.0079                                                   |
| 2C       |            | **: p = 0.0079                                                               |
| 2D       |            | *: p=0.0159                                                                  |
| 2E       |            | *: p=0.0256                                                                  |
| 4C       | throughout | *: p=0.0159, **: p =0.0079                                                   |
| 4D       | throughout | ****: p<0,0001                                                               |
| 4E       |            | *** : p=0.0002 except comparison between Tfh and Treg for OX40 MFI, p=0.0006 |
| 5A       |            | **: p=0.0022                                                                 |
| 5B       |            | *: p=0.0357                                                                  |
| 5C       |            | *: p=0.0286                                                                  |
| 5D left  |            | *: p=0.0159, **: p =0.0079                                                   |
| 5D right |            | *: p=0.0286                                                                  |
| 5E left  |            | *: p=0.0159, **: p =0.0079                                                   |
| 5E right |            | *: p=0.0286                                                                  |
| 6A-D     |            | **: p=0.0012                                                                 |
| 6E       |            | **: p=0.0043                                                                 |
| 7B       |            | *: p=0.0238, **:p=0.0079                                                     |
| 7D       |            | *: p =0.0286                                                                 |

Table S1: exact p-values of manuscript figures

## *Article 2 – Répertoire des Tfr*

**High resolution Tfh and Tfr repertoire analysis reveals an unexpected high diversity and suggests a bystander activation of follicular T cells**

Soumis le 11 septembre 2017 – *Nature Communications*

Paul-Gydéon Ritvo, Wahiba Chaara, Benjamin Bonnet, Adrien Six, Encarnita Mariotti-Ferrandiz, David Klatzmann.

Les cellules Tfh et Tfr jouent un rôle important et antagoniste dans l'activation des cellules B et la production d'anticorps dans les centres germinatifs.

De précédentes études montrent de façon concordante que les cellules Tfh sont spécifiques pour l'antigène utilisé lors d'une immunisation. La question de la spécificité des Tfr est quant à elle moins étudiée (deux publications à ce jour) et fait l'objet de controverses bien qu'elles semblent avoir un répertoire spécifique du soi.

Les études du répertoire des cellules folliculaires se sont toujours basées soit sur le séquençage de répertoire de souris transgéniques pour le TCR avec par exemple une des deux chaînes du TCR fixe (Maceiras et al., 2017a), pouvant avoir un impact sur la différenciation des Tfr si l'on considère le TCR comme une unité importante pour la cette population, soit sur l'analyse de cellules spécifiques d'antigènes obtenues par l'utilisation de tétramères couplés à des peptides immunodominants (Aloulou et al., 2016), conduisant à la sélection de cellules spécifiques pour un complexe CMH-peptide donné. Aussi, suite notre redéfinition du phénotype des Tfr (article 1), nous avons entrepris le premier séquençage à haut débit des transcrits du TCR sur plusieurs échantillons de Tfh, Tfr, Treg et Teff de souris non manipulées génétiquement et immunisées avec un antigène du soi (l'insuline) ou un antigène du non soi (l'ovalbumine).

Nous montrons dans un premier temps que les répertoires Tfh et Tfr, bien que moins divers que ceux des Teff et des Tregs, présentent une diversité importante associée à au moins 5 000 TCRbd différents, en réponse à un seul antigène donné.

L'analyse de l'utilisation des gènes TRBV permet par la suite de grouper les cellules folliculaires et non folliculaires respectivement ainsi que les cellules régulatrices et non régulatrices respectivement. A une échelle de grandeur plus fine, l'analyse du partage clonotypique entre plusieurs échantillons a permis de révéler qu'une réponse contre un antigène injecté ne pouvait être détectée dans les Tfh que lorsque cet antigène n'était pas une protéine du soi. De plus, les Tfr ne semblent pas répondre à l'antigène injecté.

Enfin, nous avons pu montrer que les Tfr partageaient une plus grande partie de leur répertoire avec les Treg en comparaison avec les Tfh ou les Teff.

Ces analyses nous ont permis de conclure à une activation au moins en partie *bystander* (non spécifique de l'antigène) pour les populations folliculaires durant une réponse à un antigène. En effet, nous nous attendions à ne trouver que quelques clonotypes et avec des expansions majeures au moins dans les échantillons de Tfh de souris immunisées avec l'ovalbumine en lieu et place de quoi seule quelques expansions robustes et communes ont pu être observées.

Enfin, nos travaux appuient également les différentes études affirmant l'origine régulatrice des Tfr. En effet, malgré la ressemblance phénotypique des Tfr avec les Tfh, nous faisons l'hypothèse qu'une proximité de répertoires semble plus difficile à mimer qu'une proximité dans l'expression de nombreux gènes qui pourraient être sous la dépendance d'un ou plusieurs facteurs de transcriptions. Cette théorie est schématisée dans la Figure 13.

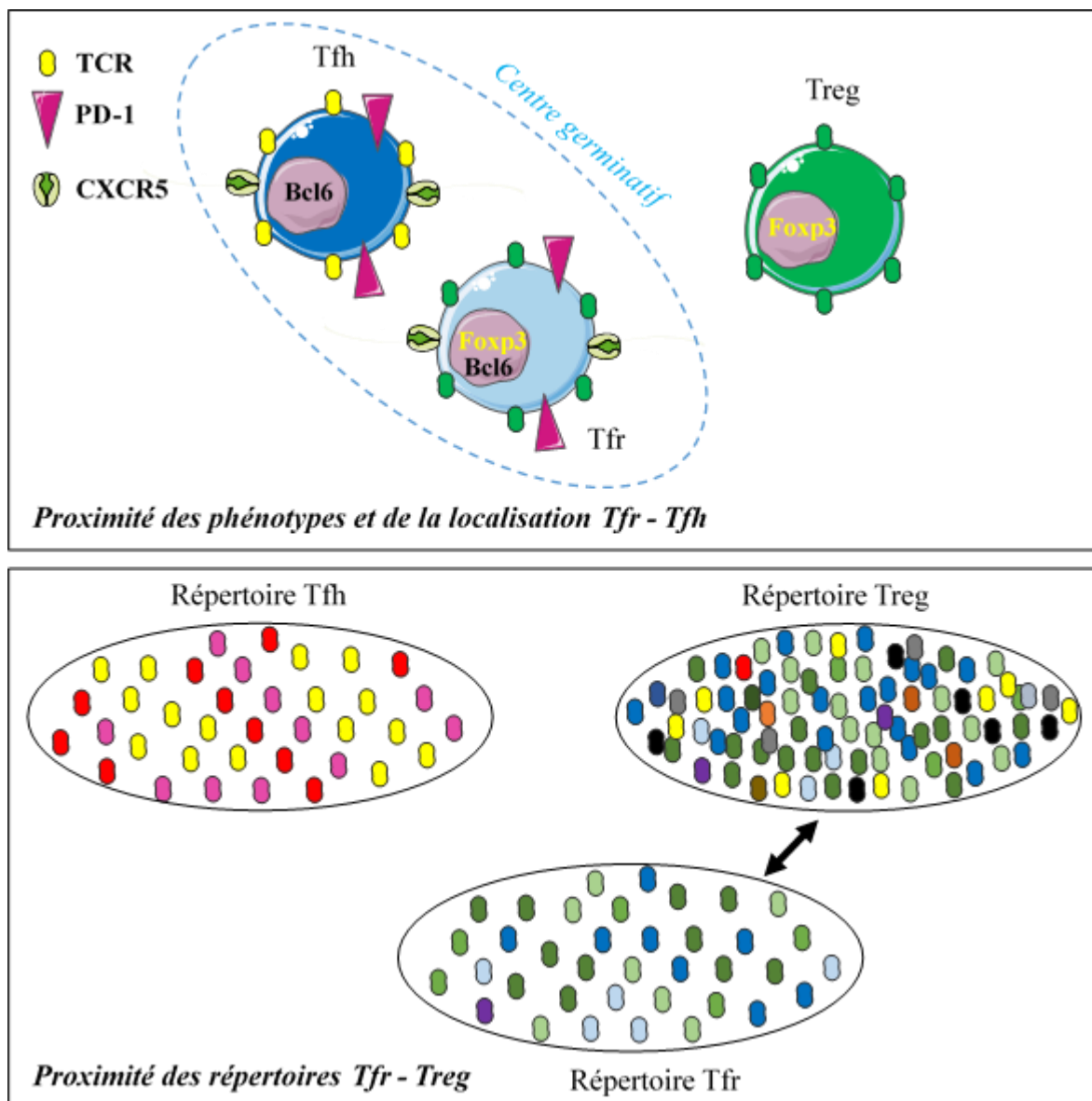


Figure 13 : Proximités respectives des Tfr avec les Tfh et les Treg

# **High-resolution repertoire analysis of Tfr and Tfh cells reveals unexpectedly high diversities indicating a bystander activation of follicular T cells**

**Authors:** Paul-Gydéon Ritvo<sup>1</sup>, Wahiba Chaara<sup>1,2</sup>, Benjamin Bonnet<sup>1</sup>, Adrien Six<sup>1,2</sup>, Encarnita Mariotti-Ferrandiz<sup>1,2</sup>, David Klatzmann<sup>1,2\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR S 959, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (I3); F-75005, Paris, France;

<sup>2</sup> Biotherapy (CIC-BTi) and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (DHU- i2B), Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, F-75651, Paris, France;

\*Corresponding author: David Klatzmann, david.klatzmann@upmc.fr

## **Abstract**

T follicular helper (Tfh) and regulatory (Tfr) cells regulate B cell activation and ultimately antibody production in germinal centres. While concordant results show that Tfh cells are specific for the immunizing antigens, limited and even controversial results have been reported regarding the specificity of Tfr cells. Here we used high-throughput T cell receptor (TCR) sequencing to address this issue. We observed that although the Tfh- and Tfr-cell repertoires are less diverse than those of effector (Teff) and regulatory T (Treg) cells, they still represent 2 500 to 10 000 specificities in response to a single antigen. T-cell receptor beta variable (TRBV) gene usage distinguishes both follicular T cells (Tfol) from non-Tfol cells, as well as helper (Teff and Tfh) vs. regulatory (Treg and Tfr) cells. Analysis of the sharing of clonotypes between samples revealed that (i) a specific response to the immunizing antigen can only be detected in Tfh cells immunized with a non-self-antigen, and that (ii) Tfr cells seem not to respond to the immunizing antigen. Finally, the Tfr TCR repertoire is more similar to that of Tregs than to that of Tfh or Teff cells. Altogether, our results highlight a bystander Tfol-cell activation during antigenic response in the germinal centres and support the Treg-cell origin of Tfr cells.

## Introduction

The germinal centre (GC) is an essential structure for the activation of B cells and the generation of high-affinity antibodies providing a humoral protection against pathogens<sup>1,2</sup>. Follicular helper (Tfh) cells promote the differentiation and activation of B cells into plasma cells, enabling antibody production<sup>3,4</sup>REF. In contrast, the recently discovered T follicular regulatory (Tfr) cells<sup>5-7</sup> inhibit this GC reaction, therefore reducing antibody production, in humans<sup>6</sup> and mice<sup>7</sup>. Tfr also promote high-affinity antibodies, as mainly low-affinity antibodies were detected in the absence of Tfr<sup>8,9</sup>. In addition, Tfr are increased in infectious diseases with insufficient antibody production<sup>10-13</sup>. Contradictory results have been found so far in autoimmune diseases, where Tfr are either increased or decreased<sup>14-17</sup>. Their suppressive effect on Tfh and GC B cells is associated with the expression of CTLA-4<sup>18,19</sup>. We recently showed that Tfr control Tfh by IL-1 deprivation<sup>20</sup>. This unknown mechanism was revealed after redefining Tfr phenotype as CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>hi</sup>PD1<sup>hi</sup> Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup><sup>20</sup>, as reported by others<sup>21</sup>. Most studies on Tfr were performed on CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>22</sup> cells, which we found to be enriched in conventional regulatory T cells<sup>20</sup>. Therefore, those recent observations highlight the need to revisit many aspects of Tfr cell biology as previous studies might have reported results from a mixture of Tfr cells and regulatory T cells (Treg cells)<sup>20</sup>.

Two such aspects are Tfr specificity and origin. It is believed that to activate B cells, Tfh cells must recognize the same antigen as the B cells they help<sup>23,24</sup>. Several studies based on peptide-class II major histocompatibility complex (pMHCII) tetramers<sup>25,26</sup> or ELISPOT assays<sup>27</sup> established that Tfh cells are specific for peptides of the immunizing antigen. However, contradictory results have been obtained for Tfr cells. A recent study addressed this issue by comparing the T cell repertoires after immunization with the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in wild-type and MOG knock-out mice. MOG is a self-antigen in the former and a non-self antigen in the latter. In both conditions, Tfr specific for the immunodominant peptide of MOG assessed by tetramers were identified, indicating that independently of the self or foreign nature of the immunizing antigen, Tfr cells could be specific



for it<sup>28</sup>. They also showed that Tfh cells share with Tfr cells TCRs specific for the immunizing antigen<sup>28</sup>, suggesting that Tfr cells can differentiate from naïve helper T cells. In contrast, in a previous study using high-throughput sequencing (HTS) in immunized mice with a fixed TCR  $\beta$  chain, we reported oligoclonal expansion in Tfh cells and a broad TCR usage in Tfr cells from the same GCs<sup>29</sup>. In addition, only Tfh specific for the immunizing antigen were found in draining lymph nodes, not Tfrs, and the Tfr repertoire was closer to Treg than to Tfh, suggesting a Treg origin. However, all these results<sup>28,29</sup> were obtained with CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>hi</sup>PD1<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> “Tfr” cells. Therefore, the observed TCR repertoire diversity and composition was probably that of a mixture of TCRs derived from Treg and Tfr cells.

In these previous studies, it should be noted that Tfr cell specificity was studied either (i) with tetramers that assess only limited specificities<sup>28</sup> or (ii) using HTS in TCR-transgenic mice which thus have a biased repertoire<sup>29</sup>. Here, we performed HTS on stringently defined Tfr cells CD4<sup>+</sup>PD1<sup>hi</sup>CXCR5<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> from wild-type mice and compared their TCR repertoires to that of Tfh, Treg and Teff cells by HTS targeting the  $\beta$  chain. Cells were obtained from non-immunized mice or mice immunized either with a self-antigen (insulin, INS) or a non-self-antigen (ovalbumin, OVA). Our work reveals strong similarities between the repertoires of Tfr cells irrespective of the immunizing antigen, while Tfh repertoires seem more sensitive to the nature of the immunization. We also show an overlap between Tfr and Treg cell repertoires that was not observed between Tfr and Teff cells or between Tfh and Treg cells. Moreover, the diversity of the Tfh- and Tfr-cell repertoires is lower than that of Teff and Treg cells, although surprisingly high for cells that are localized in an anatomical and functional structure that is supposed to respond to a given antigen. Altogether, our observations suggest a significant bystander activation of Tfol cells during antigen-specific responses and support a Treg-cell origin for Tfr cells.

## Results:

To investigate the TCR $\beta$  repertoire of Tfr cells, we used mice with the transgenic expression of green-fluorescent protein (GFP) under the promoter of Foxp3 to purify Tfh (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CXCR5<sup>hi</sup>PD1<sup>hi</sup>Foxp3<sup>-</sup>), Tfr (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CXCR5<sup>hi</sup>PD1<sup>hi</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>), Teff (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CXCR5<sup>lo/-</sup>PD1<sup>lo/-</sup>Foxp3<sup>-</sup>) and Treg (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CXCR5<sup>lo/-</sup>PD1<sup>lo/-</sup>Foxp3<sup>+</sup>) cells. In order to recover sufficient amounts of the scarce Tfr-cell population, cells were purified from pools of six to eight mice (later named "individuals") receiving the same treatment. We generated three pools of mice immunized intraperitoneally with OVA in alum, three pools with INS in alum and two pools that were not immunized in order to study cells at homeostasis. Finally, we massively sequenced T-cell mRNA from sorted Tfr-, Tfh-, Teff- and Treg-cell subsets

### *Tfol cells have a lower diversity than non-Tfol cells*

We first analyzed the TCR diversity of the four cell subsets in the three immunization settings. Sequence and clonotype numbers obtained for all samples are provided in **Supplementary Table S1** for reference. Rarefaction curves (**Fig. 1A**), which represent the observed numbers of different clonotypes (i.e. unique combination of TRBV-CDR3p-TRBJ) observed at a given size sample (TR sequences), showed that both Tfr- and Tfh-cell repertoires are less diverse than those of Teff and Treg cells. Indeed, from 100 000 sequences and over, Tfol-cell clonotype numbers are systematically two- to three-fold lower than that of Teff/Treg cells ( $p=0.0079$ , Mann-Whitney U). At the sequencing depth used, we have almost captured the entire diversity of Tfh and Tfr cell TCR repertoires, as shown by the almost flat slopes, while this is not the case for Teff and Treg cells.

Other commonly used diversity indices confirmed these observations. The percentage of the most predominant clonotypes that account for 50% of the sequences of a sample size (D50)<sup>30</sup> of Tfol cells (1 to 2%) is significantly lower than the average D50 of Teff and Treg cell repertoires (**Fig. 1B**). This marked difference between Tfol and non-Tfol cells, which is more pronounced than the one evidenced by rarefaction curves, suggests that there are important clonotype expansions in Tfol cells.

The Pielou index<sup>31</sup>, ranging from 0 to 1, assesses the evenness of a repertoire: the higher the index the more equally represented the clonotypes are. Repertoire evenness is both high and yet significantly different for Treg and Teff cells. In contrast, the Pielou index is significantly lower for Tfol cells compared to non-Tfol cells (**Fig. 1C**). The lower richness described by the rarefaction curves and the D50 index could thus be explained by a higher number of expansions among Tfr and Tfh cells compared with Teff and Treg cells. This was confirmed by analyzing the frequency of the predominant clonotypes in the different cell populations (**Fig. 1D**). The predominant 1% of clonotypes for Tfr and Tfh cells represent at least 50% of the total repertoire, compared to only 10% for Teff and Treg cells. In particular, some clonotypes represent more than 1% of the sample in Tfr- and Tfh-cell samples, which is not observed in Treg and Teff cells. Finally, reconstruction of immunoscope profiles from NGS data showed a Gaussian distribution profile for Teff and Treg cells, and numerous expansions in Tfol-cell samples, as exemplified for representative TRBVs (**Supplementary Fig. S1**). Altogether, these results suggest that the global characteristics of the Tfh- and Tfr-cell repertoires are similar and that both subsets have a skewed diversity compared to non-Tfol cells.

#### *TRBV but not TRBJ genes are differentially used by the four cell populations*

We first performed a principal component analysis (PCA) of TRBV (**Fig. 2A**) and TRBJ (**Fig. 2B**) gene frequencies. Strikingly, the first component (PC1) of the PCA using TRBV gene frequencies (**Fig. 2A**), which explains about  $\approx 32\%$  of the variability, separates very well Tfol- from non-Tfol-cell subsets, while the second (PC2; 12% of the variability) separates the regulatory subsets (Tfr and Treg cells) from the non-regulatory ones. In contrast, no clear separation of the four T cell subsets (**Fig. 2B**) could be observed using TRBJ gene usage. The same analysis for the TRBVBJ combination frequencies (**Fig. 2C**) showed clear separation of the four T cell subsets, although only  $\approx 30\%$  of the variability is explained by the first two components compared to  $\approx 50\%$  when focusing on the TRBV gene frequencies only.

We next computed the Morisita–Horn (MH) index between all samples based on their TRBVBJ usage (**Fig. 2D**), which calculates a similarity score ranging from 0 (dissimilar) to 1 (similar) between each pair of samples, and performed a hierarchical clustering (Euclidean distance and “complete” method) of all the samples using this metric. In line with the PCA analysis, Tfh- and Tfr-cell samples (Tfol) were clustered together, apart from the Teff and Treg (non-Tfol) cells. However, Tfol samples are mixed within their cluster. Although their TRBV and TRBVBJ usage appeared to distinguish regulatory vs. helper cells on PCA for Tfol and non-Tfol cells, the sharing of TRBVBJ gene usage between Treg and Teff cells is higher than that between Tfh and Tfr cells (**Fig. 2D, Supplementary Fig. S2**). Hierarchical clustering of TRBVBJ frequencies (**Fig. 2E**) also showed Teff and Treg cell co-clustering. In contrast, Tfol cells do not cluster together but are just separated from non-Tfol cells. This suggests heterogeneity among Tfol-cell samples.

Since samples originated from mice undergoing different immunization protocols, we computed the MH similarity matrix between samples from mice immunized with either INS (**Fig. 2F**) or OVA (**Fig. 2G**). Similar observations were made.

In order to understand whether the difference of TRBV and TRBVBJ usage between samples on PCA was due to major changes in TRBV usage at the individual level, we plotted the frequencies of TRBV genes of the four subsets and observed no major differences except for TRBV31 gene expression, which was overexpressed in Tfol cells (**Fig. 2H**). We confirmed these observations in all our samples (**Fig. 2I**). This further demonstrates a peculiar TRBV repertoire in Tfol vs. non-Tfol samples.

#### *The clonotype distribution is different among the four cell populations*

We further analyzed the data by exploring the diversity at the clonotype level, i.e. TRBV-CDR3-TRBJ combinations. The projection of clonotype frequencies by PCA was performed on clonotypes shared by at least five samples to reduce noise due to private clonotypes. Tfol cells are well separated from non-Tfol cells on PC1 (34%). Strikingly, in contrast with our observations on the TRBVBJ usage, we

observed that Tfh and Tfr cells are remarkably close to each other, while Teff and Treg cells are rather well separated (**Fig. 3A**). When focusing on Tfh and Tfr cells, their differences were revealed. The two subsets are separated on the first two components with a PC1 of 26%, suggesting that the two subsets are close in **Figure 3A** because they have similar overall characteristics compared to non-Tfol cells, but are in fact different at a closer clonotype level (**Fig. 3B**). As expected, PCA also well separated Treg and Teff cells (**Fig. 3C**).

#### *Tfr and Tfh cells have distinct repertoires but share clonotypes at the individual level*

We then compared the clonotype composition of Tfr and Tfh cell repertoires. We ordered all clonotypes of a given Tfr-cell sample by decreasing frequency and selected the 250 predominant clonotypes. We then analyzed the frequencies of these selected clonotypes in the seven other Tfr cell samples and in the corresponding Tfh cell samples (the Tfh-cell sample of the same individual was excluded), and plotted mean frequency values. We performed this calculation for each of the eight available samples (**Fig. 4A**). Inversely, we followed the same methodology with Tfh cell predominant clonotypes (**Fig. 4B**). Results showed that clonotypes found predominantly in Tfr cells are also found in higher proportions in other Tfr-cell samples than in Tfh-cell samples (**Fig. 4A**). Conversely, clonotypes predominantly found in Tfh cells are mostly shared with other Tfh-cell samples rather than with Tfr-cell samples (**Fig. 4B**).

We then looked at the clonotypes shared by homologous Tfr and Tfh cell samples from the same individual. For the eight available individuals, the 250 predominant clonotypes of Tfh cells ranged from 2 to 12% in Tfr cells, regardless of the immunizing protein. In contrast, the 250 predominant clonotypes of Tfr cells were found at high frequencies (>9%) in Tfh cells from mice immunized with OVA compared to only 2 to 3% in mice immunized with INS (**Fig. 4C-D**).

#### *Tfr cells do not have a repertoire specific for the immunizing antigen*

In order to compare the T follicular responses by immunizing antigen, we sorted sequences that were present in at least two of the three Tfh samples of OVA-immunized mice. We observed strong public expansions reaching an average of 5% of the repertoire of these cells, while the same sequences represent less than 1% of the repertoires of the other categories of cells (Tfr cells from all conditions or Tfh cells from mice immunized with nothing or INS) (**Fig. 5A**). Interestingly, when we did the same analysis for Tfh cells of mice immunized with INS, we found no major public expansions and the average of frequency was the same among all samples (Tfh and Tfr cells, irrespective of the immunization) (**Fig. 5B**). Finally, sequences shared by at least three samples of Tfr cells from mice immunized with OVA or with INS seemed to be the same sequences and no particular repertoire emerged compared to that of Tfh cells immunized with OVA (**Fig. 5C-D**). Interestingly, the repertoire of Tfr cells was not significantly shared by Tfh cells, suggesting the existence of a specific Tfr-cell repertoire.

#### *Tfr cells share more of their repertoire with Treg than with Teff cells*

To quantify the sharing of major clonotypes, we drew a Venn diagram with predominant clonotypes of all individuals pooled by cell subsets. This revealed that 13% of Tfr-cell clonotypes are shared with Treg cells, while only 6% are shared with Teff cells. Inversely, the percentage of Treg-cell clonotypes shared with Tfr cells was 1.7% and 0.8% with Tfh cells (**Fig. 6A**). This information on the number of clonotypes found shared between Tfr and Treg cells is confirmed by the sharing in terms of cumulative frequencies.

In **Figure 6B**, we represent, individual by individual, the 250 predominant clonotypes of Treg cells (if found) in Tfr or Tfh cells. Treg-cell major clonotypes are found at significantly higher frequencies in Tfr than Tfh cells. Conversely, Tfr-cell major clonotypes are found at significantly higher frequencies in Treg than in Teff cells (**Fig. 6C**).

## Discussion:

### *Tfh and Tfr cells have a higher TCR diversity than expected*

Tfol cell TCR repertoires appear less diverse than those of non-Tfol cells (**Fig. 1**), as previously found<sup>29</sup>. This was expected, given that it is known that these cells are proliferating in response to immunization, which is accompanied by an activated profile and their increase in numbers upon acute immune response<sup>20</sup>. These cells are stringently identified<sup>20</sup> by markers that assign them to GCs, a specialized site in which antigen-specific antibodies are formed<sup>2</sup>. In addition, it is thought that antigen-specific B cells act as antigen-presenting cells for Tfh cells, with the B cells and the Tfh cells therefore being specific for the same antigen. It could have been conjectured that Tfh cells would have a repertoire limited to a few clonotypes with large expansions. To our surprise, the diversity of the Tfol-cell repertoires was much higher than expected, at least for the Tfh cells as previously shown<sup>29</sup>. Instead of restricted clonotype expansions, we found thousands of sequences in every Tfh- and Tfr-cell sample (**Fig. 1**), a point that was missed by analyzing Tfh cells purified using tetramers<sup>28</sup> and from mice bearing a fixed TCR $\beta$  chain<sup>29</sup>.

As we detected approximately 20 000 to 100 000 clonotypes per Tfh-cell sample (**Supplementary Table T1**), and given that samples are from pools of 6-8 mice, this would indicate that at least 2 500 clonotypes per mice respond to immunization. This is a clear underestimate due to sampling and dilutions during the TCR sequencing process<sup>32</sup>. Thus, our results establish, for the first time, that the TCR repertoire of Tfh cells and of stringently purified Tfr cells from wild-type mice in response to single antigens are rather diverse. This relatively high diversity of the Tfh-cell repertoire indicates a bystander activation of naïve T cells at the initiation of the response in the lymph node medulla. The initial trigger of the immune response by dendritic cells activates not only some high-affinity antigen-specific Tfh cells<sup>25</sup>, but possibly also bystander T cells. The latter could have specificity for other antigens presented by these dendritic cells and/or be activated under the effects of the cytokine

environment. Alternatively, or complementarily, the very high cross-reactivity of T cell TCRs that have been shown to recognize thousands of different peptides<sup>33</sup> could explain this bystander activation. In both cases, pure bystander activation or activation of promiscuous TCRs, these cells would be less strongly stimulated and will not be driven to proliferate highly, which in turn will limit clonotypic expansions. This bystander activation could possibly be related to the major role of IL-1 in Tfh-cell activation that we recently reported <sup>20</sup>.

Similarly, our results show that Tfr-cell repertoire diversity is high, regardless of the nature of the immunizing antigen. Indeed, the high polyclonal repertoire of Tfr cells was observed when immunizing with both representative self- and non-self-antigens, suggesting that Tfr cells can differentiate upon any GC formation. This is in line with recent results showing that tissue Tfr cells may differentiate independently of B cell interaction<sup>34,35</sup>. Additional experiments with other antigens should help confirm this hypothesis. However, we recently found that Tfr cells increase significantly more in INS- compared with OVA-immunized animals <sup>20</sup>. Therefore, the Tfr repertoire in OVA-immunized animals could reflect a bystander recruitment of Tfr cells, independently of the immunizing antigen, while the Tfr repertoire in INS-immunized mice could be self-specific. This is supported by higher expansions among Tfr from INS- compared to OVA- immunized mice (**Fig. 4C**).

#### *Tfh- and Tfr-cell repertoires share global characteristics but have distinct clonotype compositions*

Other than the diversity – found to be similar between Tfh and Tfr cells – some global characteristics were similar between Tfr- and Tfh-cell repertoires. Amongst them, TRBV gene usage was found to clearly separate Tfol from non-Tfol cells, while TRBJ genes do not. This result is not unexpected if it is realized that Tfol cells represent a population of activated cells, while non-Tfol cells are mostly at homeostasis.

Only little differences affect the TRBV usage pattern, except for TRBV 31, which is expressed with an average of 20% in Tfol cells and of 10% in non-Tfol cells across all our dataset. This is observed for



both OVA and INS immunization, and is thus probably not antigen-specific. As the function of Tfh cells is considered to be regulated by the strength of T cell antigen receptor binding<sup>25</sup>, this suggests that TRVB31 could mediate higher affinity interactions than other TRBV. Further experiments should address these questions.

When all cell subsets were analyzed, the Tfh and Tfr cells were indistinguishable for their TRBV usage, while they were well separated when only Tfol cells were analyzed. This is compatible with the fact that the variation in TRBV usage induced by the immunization in comparison with cells at homeostasis is so strong that it masked the existing differences between Tfh and Tfr cells.

At the clonotype level, we confirmed previous observations<sup>29</sup> that Tfh and Tfr cells have two distinct repertoires. The predominant clonotypes of Tfr cells in one individual are systematically found at higher frequencies in Tfr cells of other individuals than in Tfh cells, and inversely for Tfh-cell predominant clonotypes.

However, the sharing between Tfh cells from different individuals and the one for Tfr cells could have distinct causality. Indeed, our results show that Tfh cells are specific for the immunizing antigen, while Tfr cells instead respond to self-antigen. The high clonotype sharing between Tfh repertoires of mice immunized with OVA supports a specific response to OVA. We observed a major expansion (approximately 1% of the sample sequences) common to the three Tfh-cell samples of mice immunized with OVA, and not found in the other samples. Other than this major expansion, we also noticed that the sequences common to at least three Tfh-cell samples of mice immunized with OVA represented about 5% of the repertoire (**Fig. 5A**), compared with about 1.5% for Tfh from mice immunized with INS (**Fig. 5B**), suggesting a specific response, with different degrees of expansion depending on the immunizing antigen. If Tfh derives from naïve effector T cells, they may have a negatively-selected repertoire for self-antigens (REF).

In contrast, the comparable clonotype sharing between Tfr cells responding to the same antigen compared to the Tfr cells responding to others suggests a response that is not specific for the

immunizing antigen (**Fig. 5C-D**). Instead, it is conceivable that Tfr cells, which we found to be highly similar to Tregs in terms of repertoire (see below), are self-antigen-specific, like Treg cells. This hypothesis is also indirectly supported by the higher sharing between homologous (of the same individual) Tfh and Tfr cells of INS-immunized (self-antigen) mice than of OVA-immunized mice (non-self-antigen) (**Fig. 5A-B**).

#### *The Tfr-cell repertoire is close to the Treg-cell repertoire*

Using stringently purified Tfr cells, devoid of contaminating Treg cells, we show that the full Tfr-cell repertoire distribution is closer to Tfh than to Tregs (Fig 3), while clonotype sharing likens the Tfr cell repertoire to the Treg-cell repertoire (Fig. 6). In apparent contradiction, these results suggest that Tfr cells are enriched in Treg clonotypes with a clonotype distribution closer to Tfh, in line with the restricted Tfol compartment, indicative therefore of self-specificity of these cells (**Fig. 6**). This also provides an indication of the origin of Tfr cells. Indeed, it should be more difficult to mimic a repertoire than a phenotype. The follicular phenotype has been shown to be mainly dependent on the expression of Bcl6, and is thus triggered by the expression of this unique molecule<sup>7,36,37</sup>. In contrast, major sharing in a repertoire is dependent on many complex processes, from cell selection in the thymus to the dynamics of post-thymic cells. Thus, the fact that two subsets (here Tfr and Treg cells) share more of their repertoire than with the other two subsets (Tfr and Tfh cells) is indicative of a higher probability of a common origin for the highly sharing populations.

Altogether, our results better characterize Tfol repertoires by showing that both Tfh and Tfr can be very diverse and confirm previous observations indicating that some Tfh cells are specific for the immunizing antigen. They also suggest that Tfr cells are not specific for the immunizing antigen but rather are formed through bystander activation of possibly naïve Tregs, a point that was controversial. Importantly, this observation is made, for the first time, with the full repertoire of Tfr

cells that are not contaminated by Treg cells and are from wild-type mice. Since we<sup>20</sup> and others<sup>21</sup> recently showed that *bona fide* Tfr cells are CD25<sup>-</sup>, and that the commonly used purification of Tfr was typically contaminated with approximately 50% Treg cells, we show here that, with more stringent characterization, Tfr-cell clonotype composition is closer to that of Treg cells compared to other subsets, although with a diversity distribution closer to that of Tfh . As converging results indicate that the repertoire of Treg cells is in large part self-specific<sup>38,39</sup>, this indicates that this could also be the case for that of Tfr cells. Besides these distinct specificities of Tfh and Tfr cells, we made the striking observation of high diversity following immunization, which indicates an important bystander activation of these cells within the highly antigen-specific GCs.

## Material and Methods

### *Mice*

8- to 14-week-old male and female NOD Foxp3-gfp mice, which express the green-fluorescent protein (GFP) under the control of the Foxp3 gene promoter, were provided by V. Kuchroo, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA. All animals were maintained at the University Pierre and Marie Curie Centre d'Expérimentation Fonctionnelle animal facility under specific pathogen-free conditions in agreement with current European legislation on animal care, housing and scientific experimentation (agreement number A751315). All procedures were approved by the local animal ethics committee.

### *Immunization*

Mice were immunized once (D0) and sacrificed at D10. Intraperitoneal injection was performed with 100 µg of OVA (Ova A5503; Sigma-Aldrich) mixed with 500 µg of aluminium hydroxide (alum) gel (ALH303; Sigma) or with 4.5 IU of human insulin (Umuline Rapide; Lilly) mixed with 500 µg of alum.

### *Cell sorting*

Splenocytes from immunized mice were stained with Ter-119-biotin and B220-biotin antibodies for 20 min at 4°C and labelled with anti-biotin magnetic beads (Miltenyi Biotec) for 15 min at 4°C. B cells and erythrocytes were depleted on an AutoMACS separator (Miltenyi Biotec) following the manufacturer's procedure. Enriched T cells were stained for 20 min at 4°C with the following monoclonal antibodies at predetermined optimal dilutions: CD4-V500 (BD Biosciences), CD8a-AF700 (BD Biosciences), streptavidin-APC (eBioscience) or -APC-Cy7 (BD Biosciences), PD-1-PE (eBioscience), CXCR5-Biotin (BD Biosciences). CXCR5 staining was performed using biotinylated anti-CXCR5 for 30 min at 20°C followed by APC- or APC-Cy7-labelled streptavidin at 4°C. The following subsets were sorted on a BD FACS Aria II (BD Biosciences) with a purity > 98%: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CXCR5<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup>Foxp3<sup>-</sup> T follicular helper T cells (Tfh); CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CXCR5<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup> follicular regulatory T cells (Tfr); CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> CXCR5<sup>int/lo</sup>PD-1<sup>int/lo</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Treg) and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> CXCR5<sup>int/lo</sup>PD-

1<sup>int/lo</sup>Foxp3<sup>-</sup> effector T cells (Teff). Sorted cells were stored in lysis buffer (Ambion) at -80°C until processing.

#### *TCR deep sequencing*

RNA from sorted cells was extracted using the RNAqueous kit (Ambion) and sent to iRepertoire® (Huntsville) for cDNA synthesis and TCR amplification following their protocol<sup>40</sup>. Briefly, each TCR is reverse-transcribed using a set of 24 forward primers, each targeting one TRBV mouse gene, and a reverse primer located in the TRBC gene to ensure a complete coverage of the clonotype sequence. PCR1 primers include barcodes to allow sample identification after the sequencing. PCR1 products are then purified on magnetic beads and a second round of PCR is performed. Amplified libraries are excised from agarose gel and purified. Paired-end sequencing is then carried out on a Miseq Illumina sequencer using a 2x250-bp read length protocol.

#### *TCR deep sequencing data processing*

Each FASTQ raw data file obtained from iRepertoire was processed for TRB sequence annotation using the clonotypeR toolkit and associated R packages<sup>41</sup>. Each dataset can be summarized as a list of clonotypes (defined as a unique combination of TRBV-CDR3aa-TRBJ sequence) and their associated counts in the dataset. These values are computed to quantify the differences between repertoires at several complementary levels. Clonotypes observed only once in a dataset were discarded.

#### *Data analysis*

Statistical comparisons and multivariate analyses (PCA, hierarchical clustering, Venn diagrams) were performed using R software version 3.1.3 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). The Morisita-Horn index<sup>43</sup> assesses the similarity between sample sets. It ranges from 0 (no common species between the two samples) to 1 (all species are equally present in the two samples). Unlike the Morisita index, the Morisita-Horn variant takes into account the relative abundance of species in the sample. D50<sup>30</sup> was calculated as the percentage of unique predominant clonotypes necessary to reach 50% of the number of

sequences in a given sample. The repertoire's diversity was assessed using the Pielou index, which calculates for each dataset how close each species are in number<sup>31,44</sup>.

Simple comparisons were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney U test on GraphPad Prism v5 (p-values are indicated in the figures such as ns:  $p > 0.05$ , \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

## References

1. MacLennan, I. C. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 117–139 (1994).
2. Victora, G. D. & Nussenzweig, M. C. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 429–457 (2012).
3. Crotty, S. T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity* **41**, 529–542 (2014).
4. Vinuesa, C. G., Linterman, M. A., Goodnow, C. C. & Randall, K. L. T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunol. Rev.* **237**, 72–89 (2010).
5. Wollenberg, I. *et al.* Regulation of the germinal center reaction by Foxp3<sup>+</sup> follicular regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 4553–4560 (2011).
6. Chung, Y. *et al.* Follicular regulatory T (Tfr) cells with dual Foxp3 and Bcl6 expression suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* **17**, 983–988 (2011).
7. Linterman, M. A. *et al.* Foxp3<sup>+</sup> follicular regulatory T cells control T follicular helper cells and the germinal center response. *Nat. Med.* **17**, 975–982 (2011).
8. Kawamoto, S. *et al.* Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* **41**, 152–165 (2014).
9. Wu, H. *et al.* Follicular regulatory T cells repress cytokine production by follicular helper T cells and optimize IgG responses in mice. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1152–1161 (2016).
10. Miles, B. *et al.* Follicular regulatory T cells impair follicular T helper cells in HIV and SIV infection. *Nat. Commun.* **6**, 8608 (2015).
11. Colineau, L. *et al.* HIV-Infected Spleens Present Altered Follicular Helper T Cell (Tfh) Subsets and Skewed B Cell Maturation. *PLOS ONE* **10**, e0140978 (2015).
12. Chen, X. *et al.* Distribution of Peripheral Memory T Follicular Helper Cells in Patients with Schistosomiasis Japonica. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0004015 (2015).
13. Wang, L. *et al.* Increased numbers of CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD1d<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> Bregs, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs, CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> follicular regulatory T (TFR) cells in CHB or CHC patients. *J. Transl. Med.* **12**, 251 (2014).
14. Dhaeze, T. *et al.* Circulating Follicular Regulatory T Cells Are Defective in Multiple Sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **195**, 832–840 (2015).
15. Shan, Y. *et al.* Higher frequency of peripheral blood follicular regulatory T cells in patients with new onset ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **42**, 154–161 (2015).
16. Wen, Y. *et al.* Imbalance of circulating CD4(+)CXCR5(+)FOXP3(+) Tfr-like cells and CD4(+)CXCR5(+)FOXP3(-) Tfh-like cells in myasthenia gravis. *Neurosci. Lett.* **630**, 176–182 (2016).
17. Wang, J. *et al.* High frequencies of activated B cells and T follicular helper cells are correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **174**, 212–220 (2013).

18. Wing, J. B., Ise, W., Kurosaki, T. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4. *Immunity* **41**, 1013–1025 (2014).
19. Sage, P. T., Paterson, A. M., Lovitch, S. B. & Sharpe, A. H. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity* **41**, 1026–1039 (2014).
20. Ritvo, P.-G. *et al.* Tfr cells lack IL-2R $\alpha$  but express decoy IL-1R2 and IL-1Ra and suppress the IL-1-dependent activation of Tfh cells. *Sci. Immunol.* (2017).
21. Wing, J. B. *et al.* A distinct subpopulation of CD25<sup>+</sup> T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201705551 (2017). doi:10.1073/pnas.1705551114
22. Maceiras, A. R. & Graca, L. Identification of Foxp3<sup>+</sup> T follicular regulatory (Tfr) cells by flow cytometry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1291**, 143–150 (2015).
23. Abbas, A. K., Burstein, H. J. & Bogen, S. A. Determinants of helper T cell-dependent antibody production. *Semin. Immunol.* **5**, 441–447 (1993).
24. Lanzavecchia, A. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 773–793 (1990).
25. Fazilleau, N. *et al.* Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. *Nat. Immunol.* **8**, 753–761 (2007).
26. Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L. J., Rosen, H. & McHeyzer-Williams, M. G. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat. Immunol.* **10**, 375–384 (2009).
27. Leddon, S. A. & Sant, A. J. The Peptide Specificity of the Endogenous T Follicular Helper Cell Repertoire Generated after Protein Immunization. *PLoS ONE* **7**, (2012).
28. Aloulou, M. *et al.* Follicular regulatory T cells can be specific for the immunizing antigen and derive from naive T cells. *Nat. Commun.* **7**, 10579 (2016).
29. Maceiras, A. R. *et al.* T follicular helper and T follicular regulatory cells have different TCR specificity. *Nat. Commun.* **8**, ncomms15067 (2017).
30. Hou, X. *et al.* Analysis of the Repertoire Features of TCR Beta Chain CDR3 in Human by High-Throughput Sequencing. *Cell. Physiol. Biochem.* **39**, 651–667 (2016).
31. Pielou, E. C. The measurement of diversity in different types of biological collections. *J. Theor. Biol.* **13**, 131–144 (1966).
32. Greiff, V. *et al.* A bioinformatic framework for immune repertoire diversity profiling enables detection of immunological status. *Genome Med.* **7**, 49 (2015).
33. Mason, D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol. Today* **19**, 395–404 (1998).
34. Fonseca, V. R. *et al.* Human blood Tfr cells are indicators of ongoing humoral activity not fully licensed with suppressive function. *Sci. Immunol.* **2**, (2017).



35. Sage, P. T., Alvarez, D., Godec, J., Andrian, U. H. von & Sharpe, A. H. Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. *J. Clin. Invest.* **124**, 5191–5204 (2014).
36. Nurieva, R. I. *et al.* Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. *Science* **325**, 1001–1005 (2009).
37. Johnston, R. J. *et al.* Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science* **325**, 1006–1010 (2009).
38. Jordan, M. S. *et al.* Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* **2**, 301–306 (2001).
39. Ribot, J., Romagnoli, P. & van Meerwijk, J. P. M. Agonist ligands expressed by thymic epithelium enhance positive selection of regulatory T lymphocytes from precursors with a normally diverse TCR repertoire. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 1101–1107 (2006).
40. O’Connell, A. E. *et al.* Next Generation Sequencing Reveals Skewing of the T and B Cell Receptor Repertoires in Patients with Wiskott–Aldrich Syndrome. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
41. Plessy, C., Mariotti-Ferrandiz, E., Manabe, R.-I. & Hori, S. clonotypeR--high throughput analysis of T cell antigen receptor sequences. *bioRxiv* 028696 (2015). doi:10.1101/028696
42. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis | Lê | Journal of Statistical Software. doi:10.18637/jss.v025.i01
43. Horn, H. S. Measurement of ‘Overlap’ in Comparative Ecological Studies. *Am. Nat.* **100**, 419–424 (1966).
44. Bergot, A.-S. *et al.* TCR sequences and tissue distribution discriminate the subsets of naïve and activated/memory Treg cells in mice. *Eur. J. Immunol.* **45**, 1524–1534 (2015).

## Figure Legends

**Fig. 1: Tfol cells display a lower diversity than non-Tfol cells, yet are polyclonal.** (A) Representative rarefaction curves displaying the number of clonotypes as a function of the number of reads (sample size) were computed for two samples of each T cell subset randomly selected from OVA-immunized mice. For a sample size of 100 000 (vertical line), the number of unique clonotypes is higher in Treg and Teff cells than in Tfr and Tfh cells ( $p=0.0079$ , Mann-Whitney U). (B-C) D50 (B) and Pielou's evenness (C) indices were calculated for all the samples of each T cell subset (see **Supplemental Table 1** for details) and compared by the Mann-Whitney U test (\* $p<0.05$  ; \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ ). (D) Cumulative frequencies of the 1% predominant clonotypes for each of the 4 T cell subsets were calculated. One histogram bar represents one sample and one coloured line one clonotype.

**Fig. 2: TRBV gene usage separates Tfol from non-Tfol cells.** (A-C) PCA of the four subsets is plotted according to the first two components for the TRBV usage (A), TRBJ usage (B) or TRBVBJ usage (C) of the samples. (D) Hierarchical clustering heatmap of Morisita-Horn similarity index values for all pairs of samples according to the indicated colour scale. (E) Hierarchical clustering of TRBVBJ frequencies across samples. (F-G) Same analyses as D but for individuals immunized with OVA (F) or INS (G). (H) Bar plot showing TRBV gene usage for four representative samples of the four T cell subsets. (I) Bar plot showing the TRBV31 usage among all non-Tfol vs. Tfol samples.

**Fig. 3: Clonotype composition distinguishes Tfr from Tfh cells.** (A-C) PCA is plotted according to the first two components for the predominant clonotypes shared by at least five samples for the Tfr, Tfh, Treg and Teff cells (A), Tfr and Tfh cells (B) and Treg and Teff cells (C).

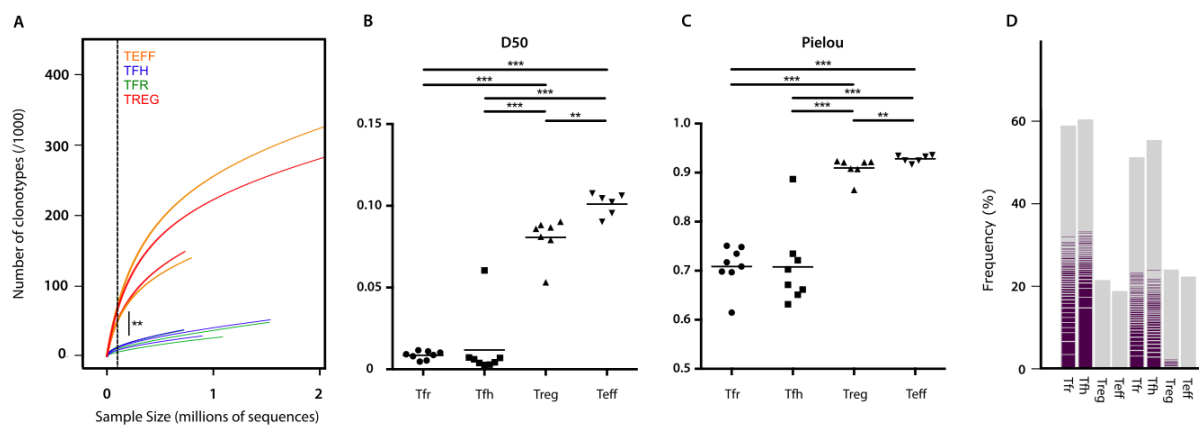
**Fig. 4: Tfr- and Tfh-cell predominant clonotypes are unique to each subset.** (A-B) Plots showing the average of the predominant Tfr-cell clonotypes among Tfr- and Tfh-cells samples of the other seven

individuals (A), and of predominant Tfh-cell clonotypes among Tfr- and Tfh-cell samples of the other seven individuals (B). (C-D) Histograms showing the sharing of predominant Tfh-cell clonotypes (C) or Tfr-cell clonotypes (D) by Tfr cells (C) or Tfh cells (D) of the same individual. Each bar represents one sample. Each coloured line represents a clonotype.

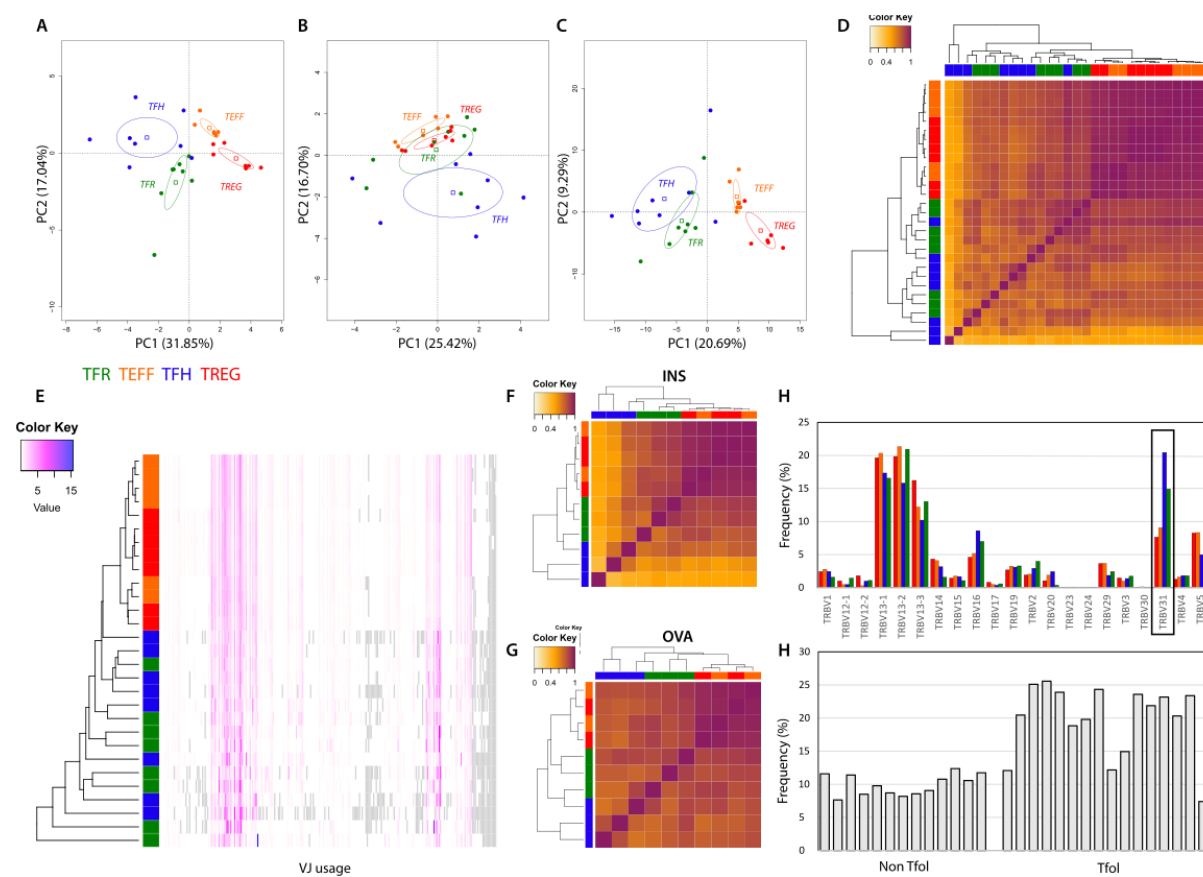
**Fig. 5: Tfr-cell repertoire is independent of the immunizing antigen.** (A-D) Histograms showing the sharing of predominant clonotypes shared by at least two Tfh-cell subsets across all subsets from mice immunized with INS (A) or OVA (B), or shared by at least two Tfr subsets across all subsets from mice immunized with INS (C) or OVA (D).

**Fig. 6: Tfr-cell repertoire supports a Treg-cell origin.** (A) Venn diagram showing the 1% predominant clonotypes of Tfh, Tfr, Treg and Teff cells and their respective sharing with other subsets. (B) Histograms showing the sharing of predominant Treg clonotypes of Tfr and Tfh cells. (C) Histograms showing the sharing of predominant Tfr clonotypes of Treg and Teff cells. (D-E) Statistical analysis of the histograms shown in B (D) and C (E) (Mann-Whitney U, \*:  $p < 0.05$  ; \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

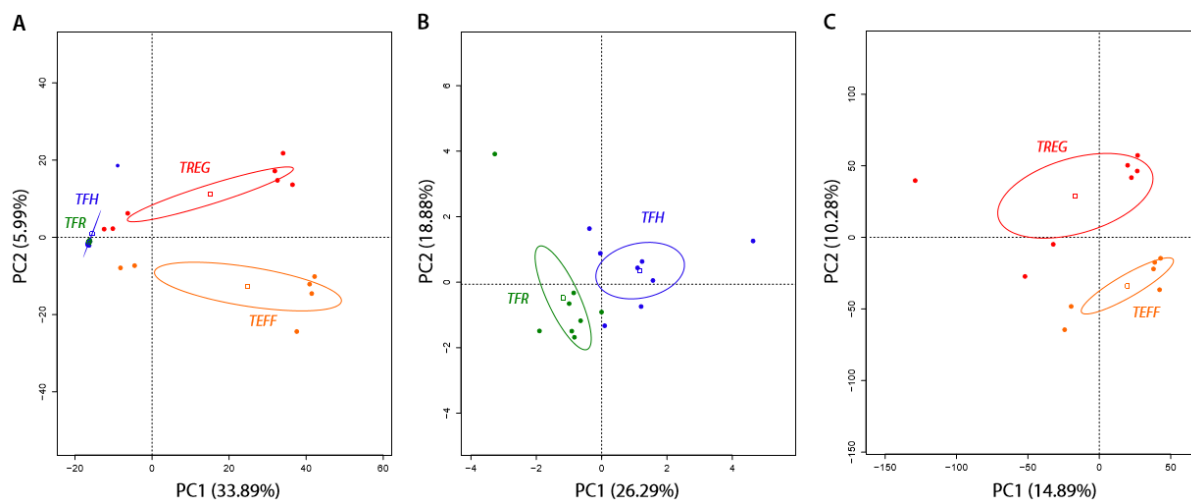
**Fig. 1**



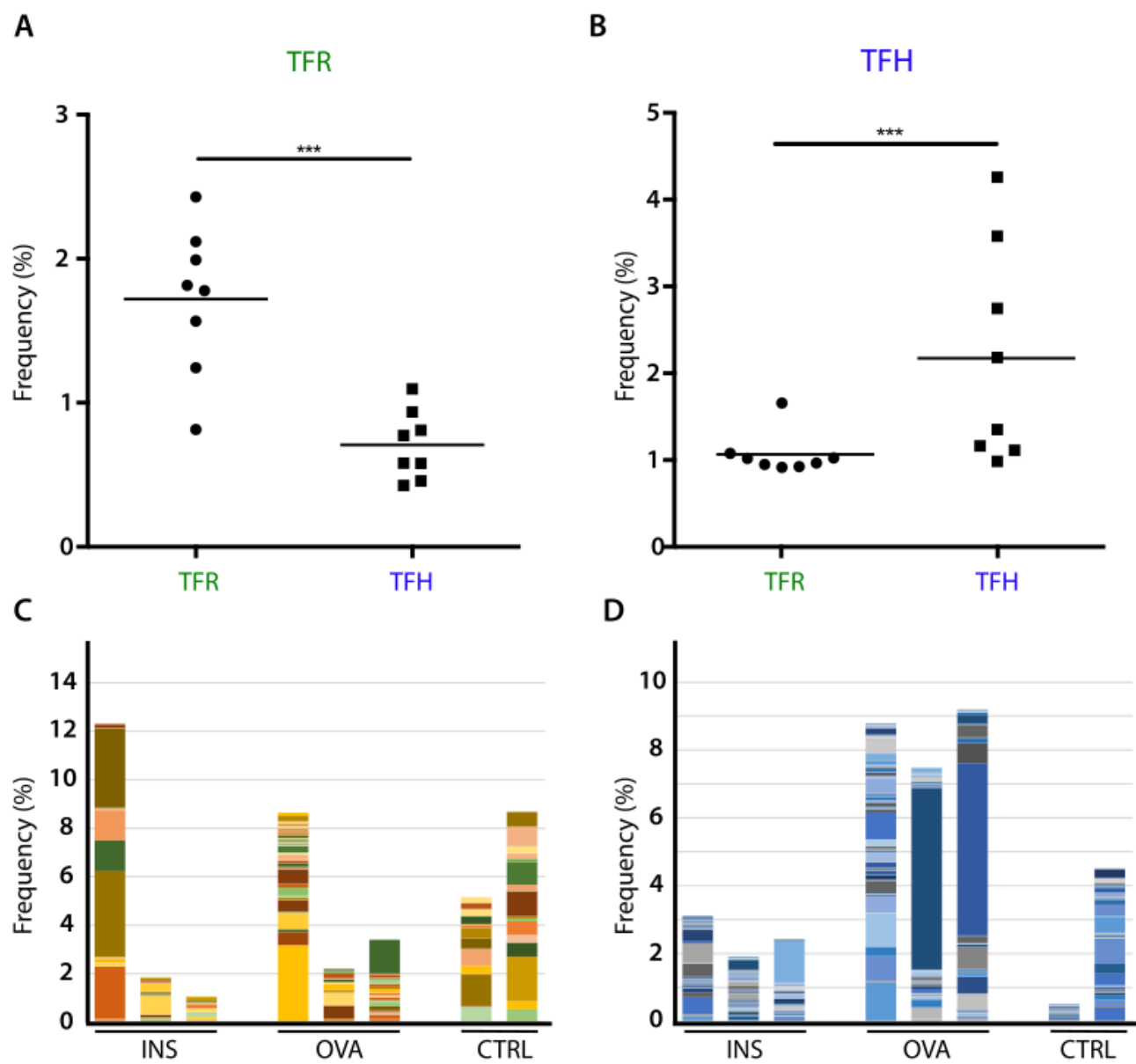
**Fig. 2**



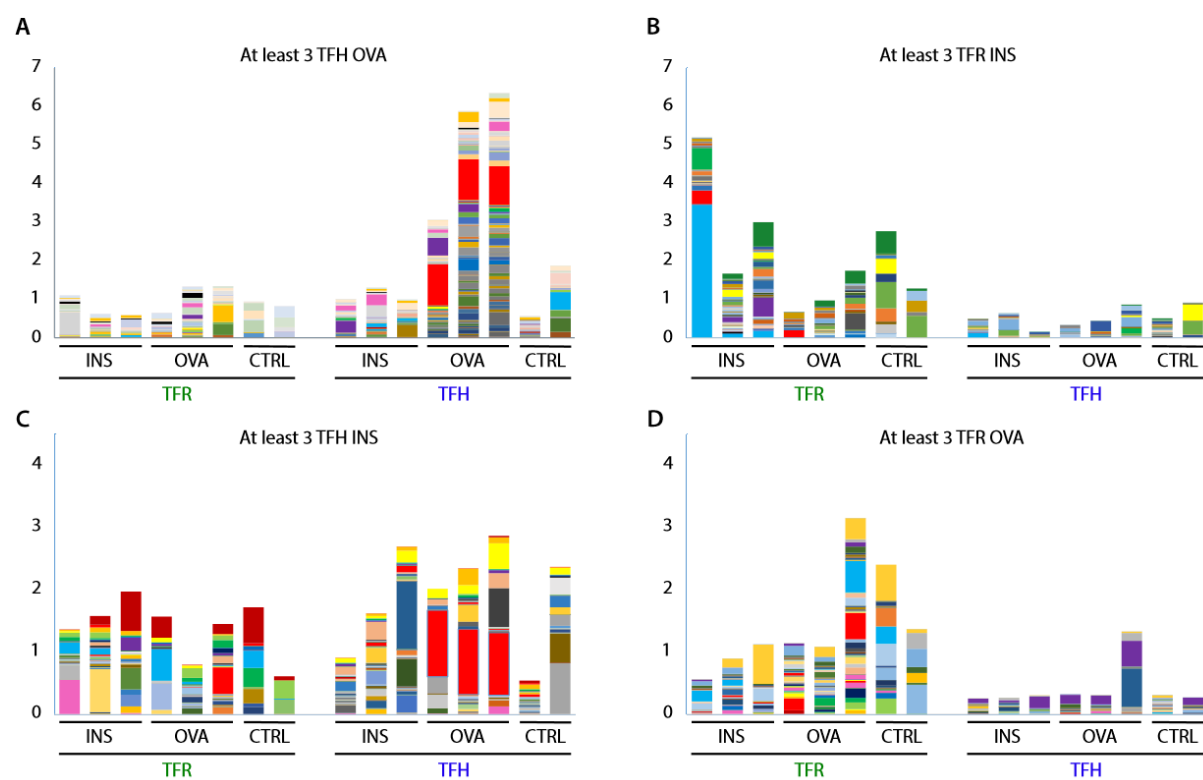
**Fig. 3**



**Fig. 4**

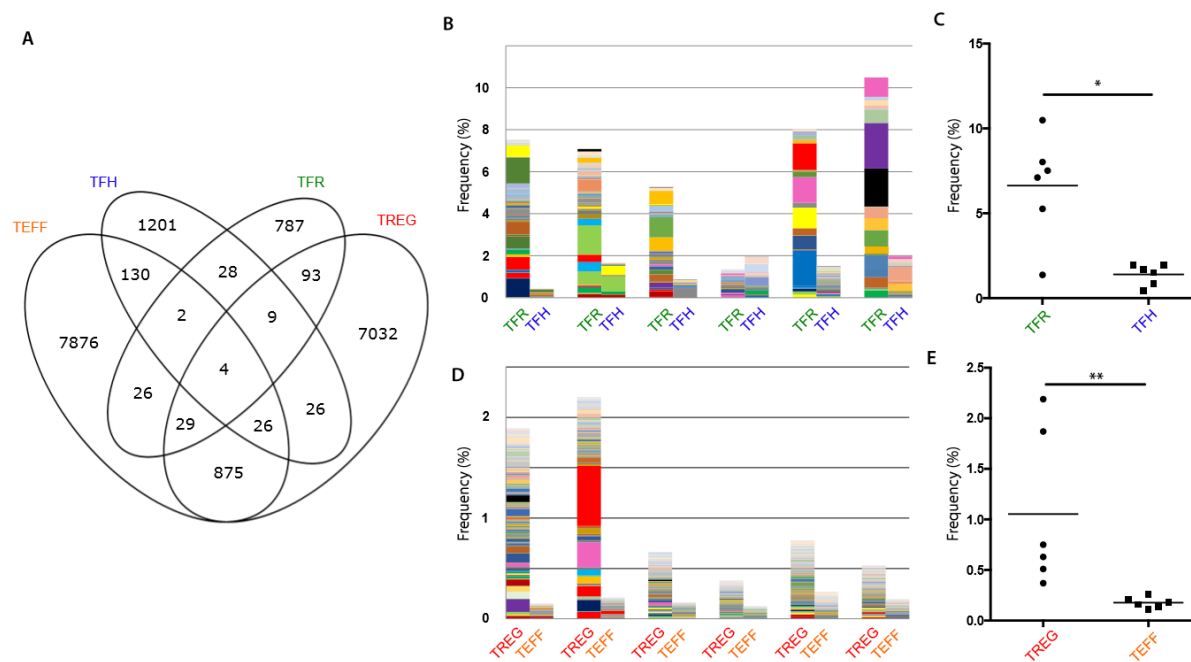


**Fig. 5**





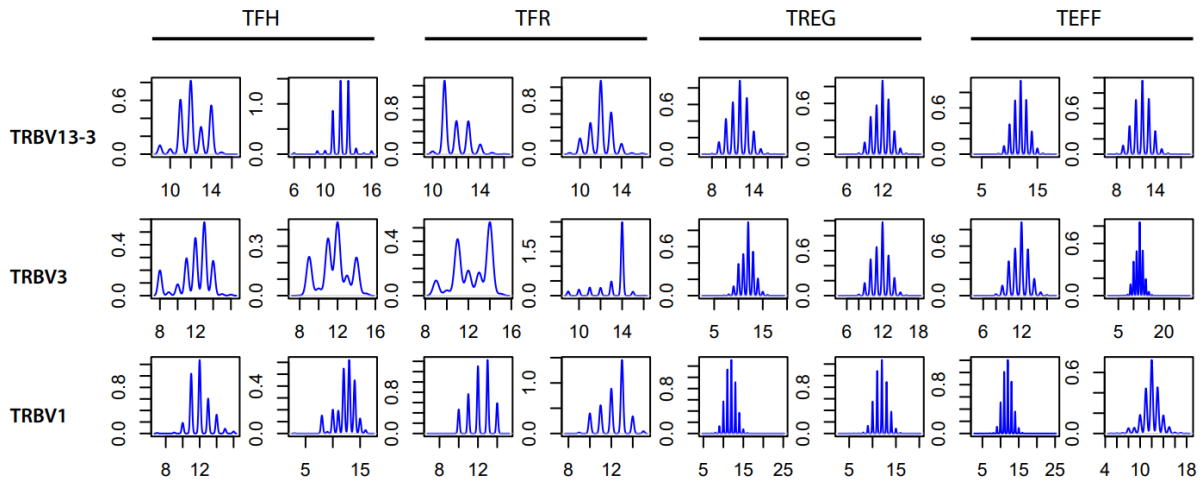
**Fig. 6**



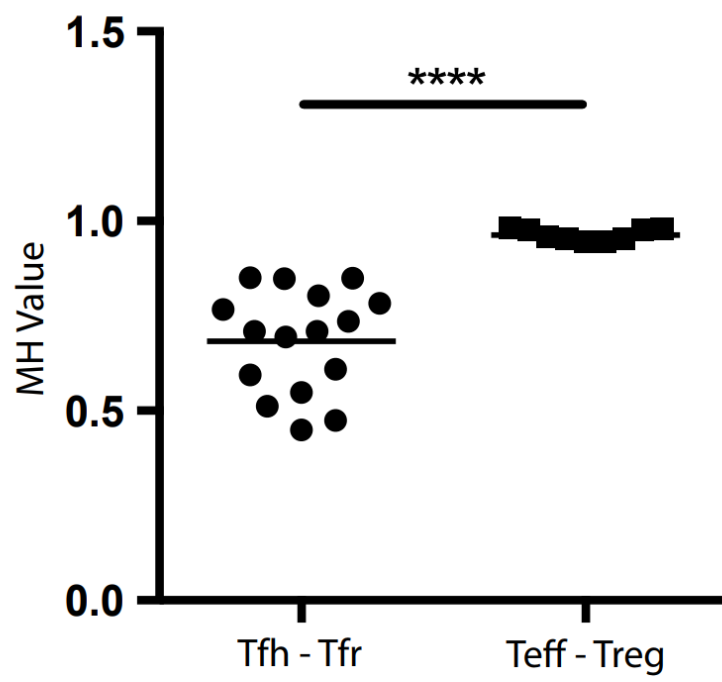
**Supplementary Materials:**

| Sample name | #sequences | #clonotypes | D50   | Pielou |
|-------------|------------|-------------|-------|--------|
| TFR INS 1   | 805 920    | 33 668      | 0,005 | 0,709  |
| TFH INS 1   | 752 138    | 34 585      | 0,004 | 0,671  |
| TREG INS 1  | 823 101    | 97 136      | 0,079 | 0,907  |
| TEFF INS 1  | 1 019 408  | 149 509     | 0,105 | 0,925  |
| TFR OVA 1   | 755 632    | 37 193      | 0,009 | 0,751  |
| TFH OVA 1   | 757 996    | 37 899      | 0,007 | 0,735  |
| TREG OVA 1  | 765 508    | 149 111     | 0,081 | 0,908  |
| TEFF OVA 1  | 833 754    | 140 059     | 0,09  | 0,917  |
| TFR INS 2   | 2 303 752  | 59 186      | 0,01  | 0,735  |
| TFH INS 2   | 3 542 093  | 68 814      | 0,003 | 0,662  |
| TREG INS 2  | 1 920 184  | 80 715      | 0,053 | 0,865  |
| TFR OVA 2   | 1 592 878  | 48 508      | 0,012 | 0,748  |
| TFH OVA 2   | 1 598 741  | 52 102      | 0,007 | 0,721  |
| TFR INS 3   | 1 150 699  | 27 633      | 0,008 | 0,697  |
| TFH INS 3   | 921 866    | 20 718      | 0,003 | 0,632  |
| TREG INS 3  | 4 785 305  | 381 534     | 0,086 | 0,921  |
| TEFF INS 3  | 4 863 988  | 334 304     | 0,095 | 0,924  |
| TFR OVA 3   | 1 142 892  | 27 840      | 0,011 | 0,717  |
| TFH OVA 3   | 929 425    | 29 167      | 0,006 | 0,703  |
| TREG OVA 3  | 6 021 241  | 412 997     | 0,087 | 0,921  |
| TEFF OVA 3  | 4 984 294  | 434 267     | 0,106 | 0,934  |
| TFR CTRL 1  | 713 507    | 17 997      | 0,009 | 0,698  |
| TFH CTRL 1  | 1 636 577  | 92 373      | 0,061 | 0,887  |
| TREG CTRL 1 | 5 053 330  | 365 548     | 0,088 | 0,922  |
| TEFF CTRL 1 | 5 097 005  | 453 263     | 0,102 | 0,933  |
| TFR CTRL 2  | 1 309 592  | 17 239      | 0,005 | 0,615  |
| TFH CTRL 2  | 970 792    | 20 562      | 0,004 | 0,651  |
| TREG CTRL 2 | 5 134 319  | 380 839     | 0,09  | 0,923  |
| TEFF CTRL 2 | 4 666 990  | 426 567     | 0,108 | 0,936  |

**Table S1:** Summary of samples analyzed



**Fig. S1:** Immunoscope CDR3 length distribution reconstruction from high-throughput sequence data for different cell subsets (in columns) and three representative TRBV (in lines).



**Fig. S2:** MH index calculated between Tfr and Tfh (Tfr-Tfh) and between Treg and Teff (Treg-Teff).

**Acknowledgments:** We are grateful to B. Gouritin and F. Brimaud for help in cell sorting and to G. Churlaud for help in experiments. We thank V Kuchroo for the mice provided.

**Funding:** PGR is an “Ecole de l’Inserm Liliane Bettencourt” doctoral fellow and is sponsored by Servier. The work of DK, EMF, AS, BB and WC is funded by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, INSERM, Sorbonne Université – UPMC, the LabEx Transimmunom (ANR-11-IDEX-0004-02) and ERC Advanced TRiPoD (322856) grants.

**Author contributions:** PGR and BB performed the mouse experiments. PGR analyzed all the mouse data. PGR, EMF and DK conceived the experiments. WC conceived the workflow of analysis. PGR, EMF, AS and DK wrote the manuscript with input from all authors. DK conceived, supervised and obtained funding for the entire study.

**Competing interests:** The authors declare no conflict of interest.

**Data and materials availability:** All the data can be made available upon request.

# *Discussion*

Du plus fondamental au plus clinique, trois points centraux me semblent importants à discuter. Peu est connu des cellules Tfr et ces travaux – entre autres – apportent leur pierre à l'édifice pour élucider l'énigme de la nature et de l'origine des Tfr (I), leur mode d'action (II) et dans une perspective plus lointaine l'utilisation de ces cellules en thérapie (III).

## *I - Origine et nature des Tfr*

### *Ab origine fidelis*

Trancher le nœud Gordien. C'est par cette allusion à l'empereur Alexandre que la littérature scientifique s'est emparée du problème de l'origine des Tfr (Amiezer and Phan, 2016). Entre Treg et Tfh, cette population est en effet difficile à séparer tant de l'une – par son activité régulatrice (A) – que de l'autre – par sa localisation et sa fonction en relation avec les centres germinatifs (B). Pourtant, la question de l'origine des Tfr est, à plusieurs échelles, cruciale.

#### *A. Tu es né Treg et tu redeviendras Treg, l'origine non assumée*

De nombreux travaux tendent à montrer que les Tfr sont originaires des Treg. Au vu de l'hétérogénéité de cette grande population que sont Treg, on pourrait même se demander si les Tfr ne seraient pas une sous-catégorie de Treg. C'est le postulat initial de nombreuses équipes qui se rendirent compte en leur temps de la présence de cellules régulatrices dans les centres germinatifs. Quelques pistes semblent montrer l'origine régulatrice des Tfr tant d'un point de vue fonctionnel et phénotypique (1) que de leur répertoire (2) malgré une divergence fondamentale à l'origine de ce travail de thèse (3).

Un des facteurs de cette catégorisation est l'expression du facteur de transcription Foxp3. D'un point de vue du répertoire, nous et d'autres équipes avons pu montrer une plus grande proximité entre les cellules Tfr et les Treg. Grâce à la nouvelle catégorisation que nous avons faite de ces cellules, nos résultats affinent les précédents en se basant sur une population dépourvue de contamination par des « vrais » Treg.

#### *1. Origine régulatrice des Tfr – Phénotypique*

Les Treg et les Tfr expriment toutes deux le facteur de transcription Foxp3. Ou plutôt, si le facteur de transcription Foxp3 est exprimé, ces cellules peuvent être et être appelées Treg ou Tfr en fonction d'autres marqueurs. Il serait simpliste de se baser sur ce seul indice pour donner une idée de l'origine de nos cellules.

Certes, le facteur de transcription Foxp3 chez l'humain comme chez la souris a pour cible quelques milliers de gènes (Sadlon et al., 2010), dont 700 seraient différenciellement exprimés chez les cellules régulatrices en comparaison avec des cellules qui ne le sont pas.

Certes, c'est ce facteur de transcription qui est responsable de tout le programme transcriptionnel relatif à l'activité immunosuppressive des cellules régulatrices.

Mais justement, si par la seule activation d'un facteur de transcription une myriade de gènes s'active en cascade, il est bien « simple » pour une cellule de ressembler à une autre. Rappelons en effet que les Tfr expriment également le facteur de transcription Bcl6 qui, en tant que répresseur transcriptionnel, va lui aussi contrôler l'expression de nombreux gènes et est indispensable à la formation du centre germinatif. On pourrait dans ce cas rapprocher également leur origine des Tfh, et on ne répondrait pas à la question posée.

La littérature n'a jamais – à ma connaissance – utilisé cet argument hasardeux pour préciser la filiation des Tfr. Avant leur découverte, les cellules régulatrices présentes dans les centres germinatifs étaient qualifiées de Treg non par un raccourci dû à l'expression de Foxp3 mais tout simplement car l'expression de cette molécule était suffisante pour dire que ces cellules étaient des Treg. Depuis leur découverte en 2011 sur laquelle nous nous sommes arrêtés dans l'introduction de ce manuscrit, les expériences de transfert menées semblent prouver que les cellules ont bien une origine régulatrice. Absentes du thymus, ces cellules ne deviennent Tfr qu'à partir de cellules régulatrices. Mais – critique générale qui peut être faite à tout modèle dans lesquels on pousse la nature dans ses retranchements – il a également été montré que sous certaines conditions, ces cellules pouvaient venir de Tfh. Il existe donc des présomptions fortes et concordantes d'une origine régulatrice de ces cellules. Un nouveau moyen de confirmer ces présomptions pourrait cependant être proposé : la comparaison des répertoires.

## *2. Origine régulatrice des Tfr – Répertoire*

L'analyse du répertoire est en plein essor. Néanmoins, depuis l'avènement de nouvelles techniques de séquençage à haut débit il y a une dizaine d'années et l'adaptation de ces techniques à l'analyse hautement spécifique des répertoires immunitaires (Six et al., 2013), seules quelques analyses du répertoire T ont été publiées. Malgré l'hétérogénéité des techniques d'analyse et l'absence de base de données à l'aune des outils existant pour la transcriptomique, cet aspect de la biologie des Tfr a un intérêt du point de vue notamment de l'origine de ces dernières. Nous l'avons vu pour *Foxp3* : une molécule vous manque et vous n'êtes plus régulateur, un seul gène peut métamorphoser une cellule. Difficile de dire si son expression était originelle ou est arrivée pas la suite. Il me semble en revanche que le répertoire ne peut tricher. Tant de clonotypes différents peuvent le composer : il y a fort à parier que si les Tfr et les Treg partagent une partie de leur répertoire plus conséquente que ne le font les Tfr avec les Tfh, leur origine se trouve plutôt proche des premières que des secondes. Il est en effet plus difficile de « mimer » un répertoire tant la tâche est ardue. Il



serait donc possible de trouver en l'analyse de répertoire une méthode plus robuste pour découvrir l'ontogénie des Tfr. Cette méthode reste à exploiter même si nous avons commencé à l'utiliser dans la partie II de nos résultats.

Les indices sont concordants : le répertoire, l'expression de Foxp3, l'activité régulatrice et les expériences de transfert rapprochent ces cellules Tfr des cellules Treg dans leur origine et dans leur phénotype. Il y a toutefois une ombre au tableau, et de taille : ces cellules n'expriment pas le CD25.

### *3. Origine régulatrice des Tfr – Casus belli*

Et si les Tfr n'exprimaient pas le CD25 ? Cette observation est un cas d'école de sérendipité. Réfléchissant devant un marquage Tfh réalisé sur des souris Foxp3-GFP, j'ai tout à fait par hasard glissé ma souris sur les cellules Foxp3 positives et donc régulatrices, et regardé l'effet du continuum CXCR5-PD-1 (caractéristique des T folliculaires) sur l'expression CD25. Etonné par l'absence de ce marqueur sur la population en haut à droite de mon cadran, censée contenir les Tfr, j'ai d'abord pensé à une erreur technique. Puis refait cette expérience plusieurs fois avec d'autres marquages, d'ailleurs présentés dans la partie I de la section résultats.

Pourtant, l'ensemble de la littérature (certes circonscrite à quelques équipes) semble s'accorder sur la positivité du CD25 sur les Tfr. C'est d'ailleurs ce postulat qui est utilisé pour leur étude, les analyses les concernant et parfois même les tris réalisés sur cette population pour les tests fonctionnels ou les analyses de répertoire. A contre-courant, nous nous sommes lancés dans une nouvelle caractérisation de ces cellules en vérifiant pas à pas que notre caractérisation correspondait bien à une réalité. Nous avons d'ailleurs été confortés en cela par l'observation faite par l'équipe de S. Sakaguchi, quelques semaines après la nôtre (Wing et al., 2017). Une nouvelle perspective s'ouvrait : (re)définir ces cellules et par cette classification plus stricte trouver ce que d'autres n'ont pu déceler du fait de l'impureté de leurs échantillons (cf Discussion partie II).

Quoi qu'il en soit, cette absence de CD25 a pour conséquence la non-réponse de ces cellules à l'IL-2. En opposition directe avec les Treg « classiques » qui sont répondeurs à cette molécule même à de très faibles doses. Cette caractéristique est l'un des piliers du rapprochement que nous opérons entre Tfh et Tfr.

### **B. La voie folliculaire, famille d'adoption**

Si la question de l'origine des Tfr semble donc réglée au vu de tous les points ciblés par la partie A, il reste néanmoins de nombreux points communs qui rassemblent Tfh et Tfr sous leur appellation de T folliculaires. Le facteur de répression Bcl6 semble ainsi jouer pour

beaucoup dans l'apparition du marqueur CXCR5 qui permet à ces cellules d'évoluer en terre étrangère, chez les cellules B et leurs follicules.

Mais de la même façon que les Tfr, les Tfh n'expriment pas eux non plus Bcl6 dès leur sortie du thymus. Dire que les cellules Tfr dériveraient des cellules Tfh reviendrait indirectement à affirmer que les cellules Tfr dérivent des cellules T naïves non régulatrices. Car c'est bien de ces cellules T naïves que proviennent les Tfh après leur première rencontre avec l'antigène et un contexte cytokinique favorable. Tout comme les Tfr elles se mettent à exprimer le facteur Bcl6 puis se transforment en cellules capables de se rendre en zone B et de les aider à la production efficace d'anticorps.

La dichotomie observée hors du ganglion entre Teff et Treg serait donc retrouvée dans les centres germinatifs, après que chacune de ces cellules respectivement a reçu des signaux (connus pour les Tfh, moins précisément pour les Tfr) et surexprimé Bcl6. L'expression de Blimp-1, antagoniste de Bcl6 (Johnston et al., 2009), et de Foxp3 semblent expliquer le fonctionnement opposé des cellules folliculaires, sur le même terrain (la zone B).

Le rapprochement des Tfr et des Tfh, bien qu'opposés dans leur fonctionnement, s'opère donc au stade mature de ces cellules. L'absence de CD25 sur les deux populations nous invite à repenser le fonctionnement de ces dernières et a permis de dévoiler un mode d'action central pour leur efficacité.

## *II – Mode d'action*

Inconnue, rare, mais fondamentale. Trois caractéristiques communes à la population Tfr dont l'implication en pathologie commence tout juste à être soulevée mais tend à se préciser (introduction partie III). Bien que l'effet de leur action ne soit pas tout à fait compris (A), ces cellules semblent avoir des mécanismes d'action communs aux Treg (B) mais agissent principalement selon un mécanisme qui leur est propre (C).

### *A. Les Tfr contrôlent la production d'anticorps*

Se poser la question du contrôle de l'action des Tfh revient à se demander de quoi l'organisme a « peur » dans leur mode de fonctionnement. Plusieurs modèles murins ont été élaborés ces dernières années pour observer au mieux l'effet de l'absence de Tfr (1). Du fait des observations combinées du phénotype de ces souris et de celles faites en pathologie humaine, on peut supputer que les contrôles peuvent intervenir dans trois axes (2)

#### *1. Modèles murins*

Plusieurs solutions ont été produites afin d'évaluer l'effet de la perte de Tfr sur un organisme murin.

#### a. La déplétion liée à l'expression de Foxp3

La déplétion de l'ensemble des cellules régulatrices de l'organisme grâce à des souris Foxp3<sup>DTR</sup> ou DEREK (souris exprimant le récepteur à la toxine diphtérique DTR sous promoteur de Foxp3 dans lesquelles une injection de toxine diphtérique conduit à la déplétion de l'ensemble des cellules de l'organisme) est l'une d'entre elles. Cette technique cependant n'est que peu spécifique puisque déplete tous les lymphocytes T régulateurs de la souris et amène à un phénotype très altéré mélangeant les problèmes liés à l'absence de Treg à ceux liés à l'absence de Tfr (Linterman et al., 2011).

Des modèles de reconstitution de système immunitaire de souris avec des moelles osseuses de souris *Sh2d1a*<sup>-/-</sup>:Foxp3<sup>DTR</sup> ou *Sh2d1a*<sup>-/-</sup>:Foxp3<sup>-/-</sup> (*Sh2d1a* codant pour SAP, molécule importante dans les Tfol impliquée dans la stabilité des liaisons B-T) (Linterman et al., 2011) ont pu apporter quelques réponses et une déplétion spécifique des Tfr mais on s'éloigne encore plus de l'homéostasie de l'organisme avec ces expériences de transfert et ces techniques sont complexes à mettre en place.

#### b. La déplétion liée aux gènes folliculaires

Une autre solution trouvée fût de reconstituer un système immunitaire en injectant des cellules T à une souris déficiente, dont des Treg de souris *Bcl6*<sup>-/-</sup> ou *Cxcr5*<sup>-/-</sup> (Chung et al., 2011). Mais à nouveau l'homéostasie de l'organisme est brisée et les souris transférées présentent de nombreuses anomalies – notamment du contexte cytokinique et de l'organisation structurelle des organes lymphoïdes – empêchant des conclusions claires.

#### c. Le modèle « idéal »

Le modèle le plus conforme à une étude précise du rôle des Tfr a été créé par une équipe américaine et utilise le fameux modèle cre/lox. Les cellules expriment sous le promoteur de Foxp3 une recombinaison (*Cre*) qui coupera dans les cellules dans lesquelles elle est exprimée le gène situé entre les séquences « lox », en l'occurrence le *Bcl6*. Les souris *Bcl6*<sup>fl/fl</sup>:Foxp3<sup>Cre</sup> permettent de façon simple de supprimer chez les souris l'expression des Tfr spécifiquement sans créer de troubles disproportionnés. Une critique néanmoins réside en le fait que cette suppression n'est pas inductible. Les souris se sont donc développées avec cette déficience en Tfr et on ne connaît pas l'impact sur la maturation du système immunitaire.

#### d. La pathologie, meilleur modèle ?

Malgré les avancées apportées par les nombreux modèles de souris KO ou transgéniques - je ne peux m'empêcher de penser au concept d'*auto-immunité catastrophique* provoquée par

l'absence de *Foxp3* dans des souris tel que montré en 2007 par l'équipe d'A. Rudensky (Kim et al., 2007) – je reste toujours circonspect face à l'utilisation de ces outils pour rendre des conclusions scientifiques. D'autant plus qu'avec les Tfr nous ne sommes pas en présence – pour poursuivre avec mon exemple de souris *Foxp3* KO – d'une population « majoritaire » dont l'absence est difficilement polluée par d'autres mécanismes, mais d'une minuscule population pour laquelle le moindre changement autre que celui que nous observons peut briser les conclusions apportées. Un des remèdes à cette réticence qui m'est propre sera sûrement l'étude de la pathologie qui – et c'est paradoxal – est bien plus physiologique. Là aussi le phénotype observé pourra dépendre de la concordance de plusieurs mécanismes, défaillances ou autres mutations mais correspondront toujours à une réalité non pas créée mais existante en soi. Ce point de vue est néanmoins personnel et ne repose que sur de minces expériences en la matière. Dans tous les cas, l'étude de l'implication des Tfr dans la pathologie humaine devrait se développer dans les années futures et il y a fort à parier qu'elle aidera en beaucoup à la compréhension de la physiologie de ces cellules.

Malgré les critiques que l'on a pu en faire, l'étude des modèles murins mais aussi de la physiologie des Tfh a pu faire émerger trois potentiels débordements de la fonction des Tfh qui pourraient être canalisés par la grâce des Tfr.

## *2. Les trois grâces*

Trois effets de contrôles pourraient concerner les Tfr : le contrôle de la quantité d'anticorps (1), de leur cible (2) et de leur qualité (3).

### *a. Trop d'anticorps*

Un excès de production d'anticorps peut être néfaste. Si ce dernier intervient contre un pathogène il semblerait qu'il soit facilement circonscrit et pas forcément dangereux. Mais les réactions d'hypersensibilité de type 3, causées par des dépôts de complexes immuns (complexes antigènes-anticorps) dans certains tissus, provoquant inflammations et lésions, pourraient être en cause. Il semble cependant qu'il s'agisse plus d'un problème d'élimination que de production de ces anticorps qui soit ici en cause (Charles A Janeway et al., 2001).

### *b. De dangereux anticorps*

Une production d'anticorps contre le soi a été relevée dans de nombreuses maladies auto-immunes (introduction section III). Ces phénomènes nécessitent une double rupture de tolérance, de la part des lymphocytes B ET des lymphocytes T mais ces processus sont fréquents. Si les Tfr agissent de façon analogue aux Treg, ils sont des patrouilleurs du soi capables d'intervenir en cas d'agression auto-immune. Néanmoins la caractérisation du

défaut qualitatif ou quantitatif quasi-systématique des Treg dans la plupart des maladies auto-immunes humaines et murines n'a pas encore son pendant du côté des Tfr.

### c. De mauvais anticorps

Un mauvais fonctionnement de la maturation d'affinité. Il a été décrit dans un modèle de souris KO pour les cellules Tfr spécifiquement que les souris en questions produisaient des quantités élevées d'anticorps mais avec une classe différente (plutôt des IgA que des IgG) et d'une affinité moindre pour la cible. Les Tfr joueraient donc un rôle important dans la commutation de classe et dans la maturation d'affinité des anticorps, toutes étapes ayant lieu dans le centre germinatifs dans lequel elles se localisent. Chez ces souris néanmoins la quantité de Tfh et de B du CG ont été relevées comme normales semblant indiquer que les Tfr n'ont pas d'effet direct sur la taille des populations (Wu et al., 2016b).

### B. Le mode d'action commun aux Treg

*Qualis pater, talis filius* pourrait-on dire. Si les Tfr ont pour origine les Treg avant de marquer leurs différences avec ces dernières, leurs modes d'actions respectifs ont quelques points communs. L'utilisation de CTLA-4 par exemple, détaillée dans l'introduction, a été montrée comme étant similaire à celle des Treg. Il semble somme toute logique que sur les milliers de gènes contrôlés par Foxp3 certains d'entre eux aient trait à la suppression et que certains de ces mécanismes soient utiles également dans le centre germinatif. Il s'agit en effet de contrôler des cellules tout comme ce que font les Treg en périphérie dans le contrôle des cellules T et de l'inflammation. Elles le font grâce à des molécules – nous avons parlé de CTLA-4 dans l'introduction qui est pour l'instant le seul mécanisme de contrôle formellement identifié chez les Tfr – mais également grâce à un contexte cytokinique suppressor ou encore à la privation de ressources.

Privation de ressources, justement. L'un des modes d'action des Treg caractérisé et devenu par la même occasion cible thérapeutique est leur faculté à capter avec plus d'affinité l'IL-2 par leur expression de CD25. Avec cette molécule, elles peuvent former à leur surface le récepteur de haute affinité (trimère composé de trois chaînes dont CD25 fait partie), mécanisme dont sont incapables les Teff non activés. Les Treg captent donc l'IL-2 et privent les autres cellules des signaux apportés par cette cytokine. Mais les Tfr n'expriment pas le marqueur CD25, c'est d'ailleurs ce qui nous a poussé à les étudier. La question d'un mécanisme analogue mais pour d'autres molécules se pose alors, et plus généralement de la régulation cytokinique du centre germinatif. L'IL-2 est en effet une cytokine fondamentale dans le fonctionnement du système immunitaire comme en atteste son « numéro », témoignant de sa découverte précoce. Mais elle ne semble pas affecter les populations du

centre germinatif. Les Tfh et les Tfr n'expriment pas de CD25 voire même seraient négativement régulées par l'IL-2. Cette observation a donc ouvert la voie à la découverte d'un système de régulation spécifique aux centres germinatifs et par là même d'un mécanisme de contrôle de ces derniers.

### C. Le mode d'action spécifique aux Tfr

La redéfinition précise des Tfr nous a permis de mener de nouvelles études transcriptomiques sur une population purifiée et dénuée de contaminations majeures par d'autres cellules régulatrices. Ainsi, des molécules qui ont pu passer inaperçues car à l'expression diminuée dans des analyses plus anciennes ont pu être identifiées sur nos analyses. Il a en effet été très étonnant de remarquer la présence opposée du récepteur agoniste à l'IL-1, IL-1R1, sur les Tfh alors que les Tfr exprimaient de grandes quantités d'IL-1R2 (récepteur leurre de l'IL-1, à sa fixation aucun signal n'est généré) et d'IL-1Ra (antagoniste du récepteur à l'IL-1). Et si finalement les Tfr agissaient bien comme les Treg, mais avec une cytokine différente ? Le schéma présenté en Figure 12 synthétise nos propos.

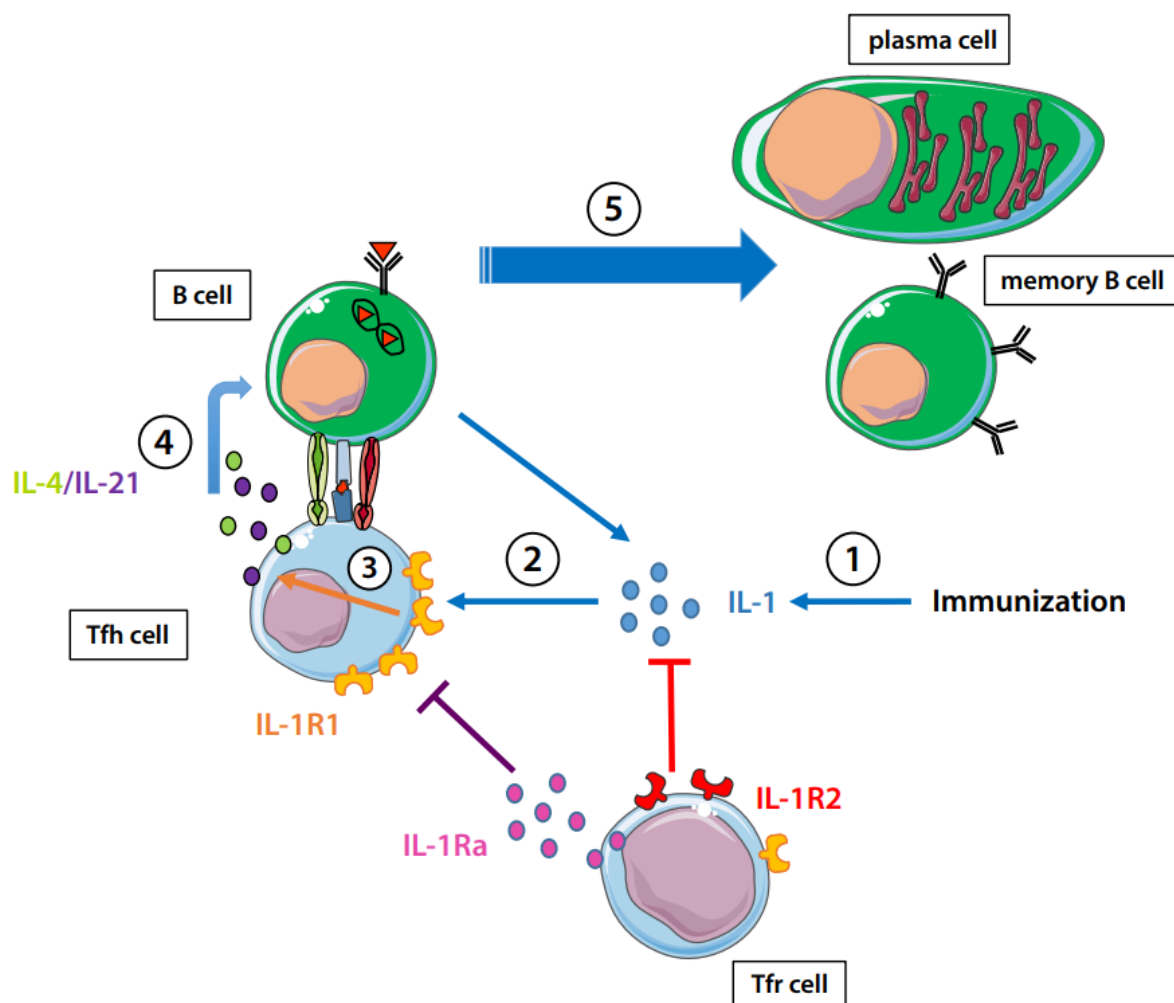


Figure 14 : Régulation de l'activité folliculaire par l'IL-1

Nous avons pu rattacher ces phénomènes à d'anciennes observations réalisées sur des souris génétiquement mutées n'exprimant pas l'IL-1 chez qui la production d'anticorps spécifiques post-immunisation était altérée voire abolie. Inversement les souris IL-1Ra KO présentaient un excès dans cette production d'anticorps.

L'IL-1 jusque-là identifiée comme molécule de l'inflammation provoquant la production d'IL-6 sur ses cibles (mais là aussi il y a un lien avec les Tfh puisqu'on sait la nécessité de l'expression de cette cytokine par la cellule dendritique lorsqu'elle active un T naïf pour qu'il devienne Tfh). Nous avons maintenant pu montrer l'importance de cette molécule tant son effet est majeur aussi bien *in vivo* sur la prolifération des Tfh ou d'anticorps spécifiques à l'antigène injecté en parallèle qu'*in vitro* sur la production par les Tfh d'IL-4 et d'IL-21, cytokines essentielles à l'aide du lymphocyte B. Le lien est également à faire avec l'effet des adjuvants. On sait que ces derniers servent à fournir les signaux d'inflammation nécessaire aux cellules dendritiques afin que ces dernières puissent s'activer et activer par là même les lymphocytes T. Mais d'anciennes études montrent que l'injection de différents types d'adjuvants a aussi pour effet la production d'IL-1 par l'organisme et appuie donc l'effet de la vaccination de façon indirecte.

Le contrôle du centre germinatif passerait donc par une fine régulation cytokinique impliquant l'IL-1 et ses puissants effets. Le rôle des Tfr pourrait donc être majoritairement lié à sa capacité à capter l'IL-1 et à en abolir les effets sur les Tfh comme nous avons pu le montrer *in vitro*. Cette nouvelle dichotomie dévoilée entre la régulation hors centre germinatif par l'IL-2 et dans le centre germinatif par l'IL-1 ouvre – entre autres – des perspectives dans l'utilisation thérapeutique des Tfr et dans une compréhension encore plus fine de la régulation du centre germinatif.

### *III – Perspectives : physiologie et thérapie*

L'utilisation et le contrôle de l'immunologie en clinique en est à ses débuts et ouvre des perspectives inespérées dans la maîtrise de nombreuses pathologies. Déjà en 2013 la revue Science décernait à l'immunothérapie (dans le domaine du cancer) le titre de « Breakthrough of the year » (Couzin-Frankel, 2013). D'autres exemples plus proches de notre domaine peuvent être cités.

L'utilisation des Treg ou le contrôle de ces cellules sont par exemple des enjeux majeurs dans la maîtrise des maladies auto-immunes. Diverses initiatives comme l'utilisation de l'IL-2 à faible dose pour une action spécifique sur les Treg (Klatzmann and Abbas, 2015; Rosenzweig et al., 2015) ou même des cellules autologues du patient d'abord extraites, mises en expansion et réinjectées (Bluestone et al., 2015a; Inc, 2017) laissent à penser que des développements similaires pourraient intervenir dans le domaine de la régulation humorale. Néanmoins ces

perspectives sont intervenues après une caractérisation très précise de la physiologie de ces Treg et nous sommes loin à ce jour d'en être à un tel niveau de compréhension de la physiologie des Tfr.

#### A. Utilisation de la voie de l'IL-1

Dans notre cas, le contrôle pourrait intervenir dans les deux sens.

Sur la régulation **positive** de l'immunité humorale : l'IL-1 a d'importants effets sur l'aide aux cellules B et les stratégies vaccinales pourraient utiliser cet effet afin de rendre encore plus puissant la réponse humorale contre les pathogènes. On imagine que l'utilisation d'IL-1 en complément des adjuvants utilisés pourrait faire l'objet d'études futures dans l'amélioration des stratégies contre les bactéries ou virus cibles des vaccins. Mais l'effet inflammatoire de l'IL-1 pourrait se révéler néfaste pour l'organisme et réduire le spectre de cette stratégie à des patients pour lesquels les traitements vaccinaux classiques échouent à contrôler le développement de certaines pathologies comme l'infection par le VIH.

Sur la régulation **négative** de l'immunité humorale, le blocage de la voie de l'IL-1 pourrait se révéler être une stratégie fructueuse dans le contrôle de la production d'auto-anticorps ou de la production excessive d'anticorps. La plupart des stratégies actuelles visent dans ces situations

- soit à limiter l'inflammation quand la pathologie est associée à de tels phénomènes
- soit à limiter la co-stimulation, phénomène nécessaire dans l'activation cellulaire T comme par exemple les molécules chimériques couplant des IgG1 humaines et le CTLA-4 (Abatacept) qui se sont montrées efficaces dans plusieurs pathologies comme la polyarthrite rhumatoïde (Maxwell and Singh, 2010)
- soit à limiter la quantité de cellules B de l'organisme notamment par l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CD20 comme le Rituximab. On peut donner l'exemple de son utilisation dans le lupus (Thatayatikom and White, 2006) ou la polyarthrite rhumatoïde (Mok, 2013)

Ces stratégies peuvent être combinées et présentent toutes des inconvénients plus ou moins importants. Les critères du traitement « parfait » contre la maladie auto-immune résumés par A. Abbas et son équipe (Rosenblum et al., 2012), sont les suivants :

- le traitement cible spécifiquement les cellules pathologiques et permet au système immunitaire de fonctionner normalement
- le traitement établit à nouveau une tolérance immunitaire stable sans que soit nécessaire un traitement au long cours
- basse toxicité et peu d'effets secondaires
- bas coût comparativement aux approches alternatives



Nous remarquons tout de suite que le Rituximab par la déplétion de l'ensemble des cellules B affecte l'homéostasie du système immunitaire. De même la production d'anticorps de fusion comme l'Abatacept procède d'une technique coûteuse. L'utilisation d'autres molécules bloquant spécifiquement la voie de l'IL-1 pourrait s'avérer utile, moins coûteuse et plus spécifique pour le traitement des maladies auto-immunes ayant pour cause principale la génération d'auto-anticorps.

## B. Utilisation directe des Tfr

Il est également à envisager d'utiliser – à l'aune de ce qui est fait pour les Treg – les cellules Tfr elles-mêmes en thérapie. Cela permettrait une thérapie ciblée et efficace mais plusieurs questions à la fois techniques et pratiques restent en suspens. Les utilisations actuelles et dans un futur proche des Treg sont en large expansion et certaines de ces stratégies ont été synthétisées récemment (Bluestone et al., 2015b). La Figure 13 tirée de cet ouvrage présente les principales méthodes et l'on comprend ainsi pourquoi ces thérapies ne sont pour l'instant pas envisagées pour les Tfr.

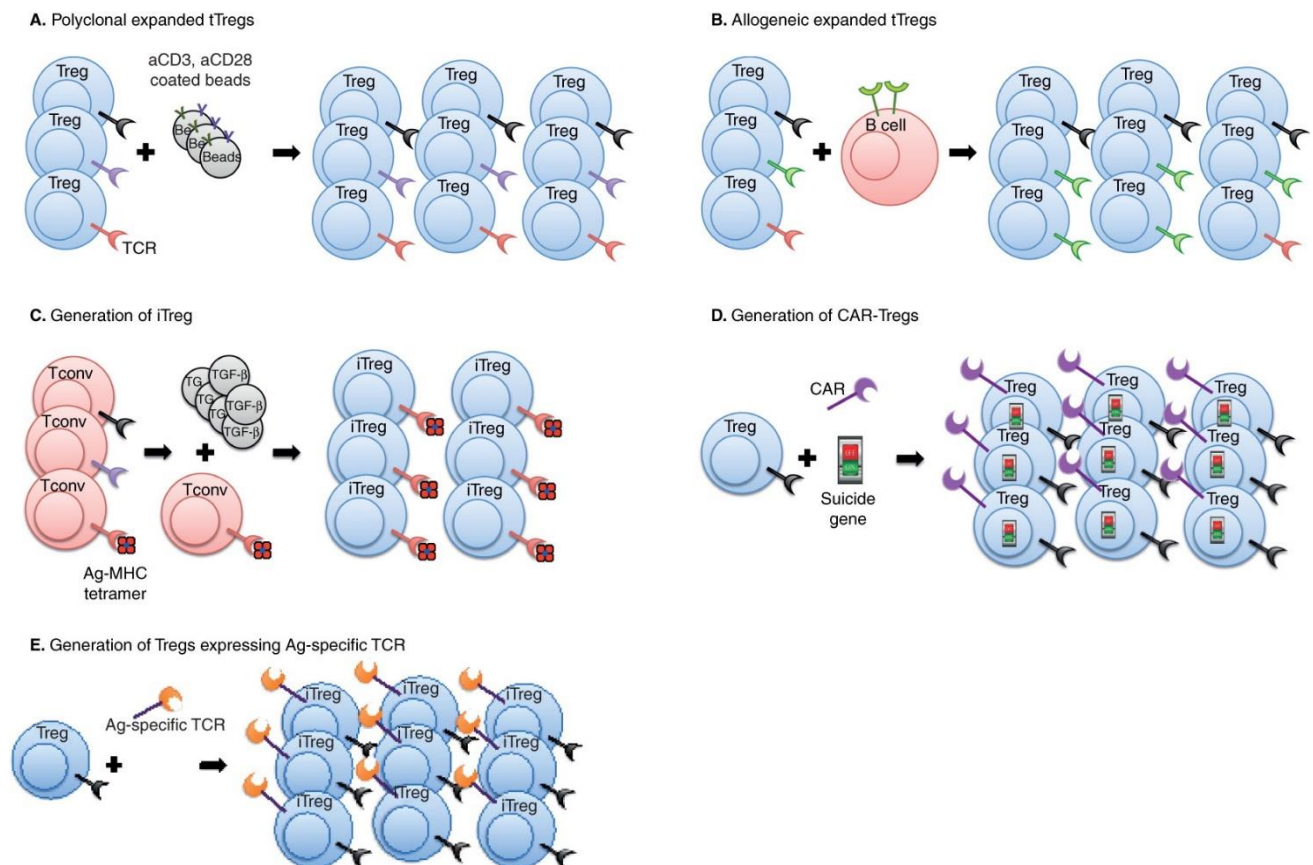


Figure 15: Stratégies thérapeutiques actuelles et futures utilisant les Treg, Bluestone JA., 2015.

Il est en effet pour l'instant impossible de différencier ces cellules *in vitro* à partir de précurseurs (qu'ils soient Treg ou Tfh) et l'obtention de cellules de patients semble être

complexe. Ces cellules ont leur place dans les centres germinatifs et donc dans les OLS. Bien que certaines équipes qualifient de Tfr certaines cellules circulant dans le sang périphérique, le consensus n'existe pas encore à ce sujet.

Une fois les cellules Tfr obtenues – par exemple d'OLS murins – une nouvelle question se pose quant à leur prolifération *in vitro*. Les méthodes nécessaires ne sont pas encore mises au point et il est impossible de faire augmenter la quantité de Tfr comme c'est le cas pour les Treg avec des protocoles utilisant des billes de stimulation de l'IL-2.

Enfin, et c'est la principale question qui se pose, rien n'est su sur le devenir du Tfr dans l'organisme qu'il s'agisse de cellules circulantes ou non. Une fois le protocole de différenciation et de prolifération établi pour ces cellules, que deviendront-elles une fois injectées dans le circuit immunitaire ? Il faudrait en effet établir de nombreux contrôles afin de vérifier que ces cellules se localisent bien à nouveau dans les centres germinatifs, et qu'elles permettent de limiter les réactions immunitaires non-voulues (par exemple contre le soi) tout en n'altérant pas ou peu la fonction immunitaire normale. De plus, l'incertitude pesant sur leur spécificité (que nous avons contribué à ouvrir du fait de la grande diversité observée dans le répertoire de ces cellules) doit également être levée avant d'envisager d'utiliser ces cellules comme thérapie.

Je pense néanmoins que ces barrières techniques ne doivent pas arrêter les recherches en ce sens. En effet, il me semble que l'utilisation de populations très homogènes d'un point de vue physiologique comme fonctionnel représente un enjeu et une sécurité pour l'immunothérapie moderne. Le petit nombre de ces cellules ne doit pas arrêter les études sur leur potentiel thérapeutique, *Pauca Sed Bona*. Ces cellules sont un puissant levier dans le contrôle de l'immunité humorale au vu de ce petit nombre et du grand impact de leur absence dans un organisme. Les méthodes d'analyse et de manipulation de ces populations rares en font de nouveaux atouts pour la compréhension et le contrôle du système immunitaire. L'homogénéité de cette population me fait penser qu'une fois dans l'organisme les Tfr se cantonneront à leur rôle et n'iront pas agir sur d'autres pans de l'immunité. C'est à mon sens une différence fondamentale avec l'injection d'autres populations cellulaires certes efficaces sur l'inflammation ou la maladie en cours mais qui du fait d'une plus grande hétérogénéité aurait aussi des effets secondaires non négligeables. Les Tfr devraient être capables de ne toucher sélectivement que l'immunité humorale.

C'est d'ailleurs pour ces raisons et dans cette logique de petite population très homogène / effet circonscrit, puissant et contrôlé / sécurité thérapeutique qu'au cours de ces travaux de thèse je me suis également intéressé à une population cellulaire tout aussi rare et dont le rôle

reste méconnu : les CD8 Treg dont l'étude a fait l'objet d'un projet (Annexe 1) actuellement en cours.

*Si je devais conclure ces 3 années et exprimer en quelques mots la vision de l'avenir du couple médecine/recherche dont j'espère être l'un des acteurs, je dirais qu'il se trouve désormais au cœur d'un paradoxe : celui entre l'immense (l'analyse de données toujours plus lourdes comme ce que nous avons pu voir pour le répertoire ou le transcriptome, méthodes de recherche et de diagnostic d'avenir), faisant émerger des données sur le minuscule (des populations restreintes mais puissantes et aux effets homogènes) qui constituent des piliers de la thérapie de demain.*

## Références Bibliographiques

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). The Generation of Antibody Diversity.
- Alexander, C.-M., Tygrett, L.T., Boyden, A.W., Wolniak, K.L., Legge, K.L., and Waldschmidt, T.J. (2011). T regulatory cells participate in the control of germinal centre reactions. *Immunology* 133, 452–468.
- Allen, C.D.C., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., and Cyster, J.G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat. Immunol.* 5, 943–952.
- Allen, R.C., Armitage, R.J., Conley, M.E., Rosenblatt, H., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bedell, M.A., Edelhoff, S., Distech, C.M., and Simoneaux, D.K. (1993). CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 259, 990–993.
- Aloulou, M., Carr, E.J., Gador, M., Bignon, A., Liblau, R.S., Fazilleau, N., and Linterman, M.A. (2016). Follicular regulatory T cells can be specific for the immunizing antigen and derive from naive T cells. *Nat. Commun.* 7, 10579.
- Amiezer, M., and Phan, T.G. (2016). Disentangling Tfr cells from Treg cells and Tfh cells: How to untie the Gordian knot. *Eur. J. Immunol.* 46, 1101–1104.
- Aruffo, A., Farrington, M., Hollenbaugh, D., Li, X., Milatovich, A., Nonoyama, S., Bajorath, J., Grosmaire, L.S., Stenkamp, R., and Neubauer, M. (1993). The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 72, 291–300.
- Ballesteros-Tato, A., León, B., Graf, B.A., Moquin, A., Adams, P.S., Lund, F.E., and Randall, T.D. (2012). Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper differentiation. *Immunity* 36, 847–856.
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Brière, F., Galizzi, J.P., van Kooten, C., Liu, Y.J., Rousset, F., and Saeland, S. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 881–922.
- Barish, G.D., Yu, R.T., Karunasiri, M., Ocampo, C.B., Dixon, J., Benner, C., Dent, A.L., Tangirala, R.K., and Evans, R.M. (2010). Bcl-6 and NF- $\kappa$ B cistromes mediate opposing regulation of the innate immune response. *Genes Dev.* 24, 2760–2765.
- Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2012). Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol. Rev.* 247, 172–183.
- Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 15–27.
- Batista, F.D., Iber, D., and Neuberger, M.S. (2001). B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 411, 489–494.
- Baumjohann, D., Preite, S., Reboldi, A., Ronchi, F., Ansel, K.M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2013). Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity* 38, 596–605.

- Bauquet, A.T., Jin, H., Paterson, A.M., Mitsdoerffer, M., Ho, I.-C., Sharpe, A.H., and Kuchroo, V.K. (2009). The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat. Immunol.* *10*, 167–175.
- Bentebibel, S.-E., Lopez, S., Obermoser, G., Schmitt, N., Mueller, C., Harrod, C., Flano, E., Mejias, A., Albrecht, R.A., Blankenship, D., et al. (2013). Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci. Transl. Med.* *5*, 176ra32.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A.C., Angell, H., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Berger, A., et al. (2013). Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* *39*, 782–795.
- Bluestone, J.A., Buckner, J.H., Fitch, M., Gitelman, S.E., Gupta, S., Hellerstein, M.K., Herold, K.C., Lares, A., Lee, M.R., Li, K., et al. (2015a). Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* *7*, 315ra189.
- Bluestone, J.A., Trotta, E., and Xu, D. (2015b). The therapeutic potential of regulatory T cells for the treatment of autoimmune disease. *Expert Opin. Ther. Targets* *19*, 1091–1103.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Förster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.* *192*, 1545–1552.
- 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. *J. Exp. Med.* *203*, 1551–1565.
- Casamayor-Palleja, M., Feuillard, J., Ball, J., Drew, M., and MacLennan, I.C. (1996). Centrocytes rapidly adopt a memory B cell phenotype on co-culture with autologous germinal centre T cell-enriched preparations. *Int. Immunol.* *8*, 737–744.
- Chakarov, S., and Fazilleau, N. (2014). Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation. *EMBO Mol. Med.* *6*, 590–603.
- Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001). Hypersensitivity diseases.
- Chavele, K.-M., Merry, E., and Ehrenstein, M.R. (2015). Cutting edge: circulating plasmablasts induce the differentiation of human T follicular helper cells via IL-6 production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 2482–2485.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of Peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Naïve T Cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor *Foxp3*. *J. Exp. Med.* *198*, 1875–1886.
- Chen, W.H., Cross, A.S., Edelman, R., Sztein, M.B., Blackwelder, W.C., and Pasetti, M.F. (2011). Antibody and Th1-type cell-mediated immune responses in elderly and young adults immunized with the standard or a high dose influenza vaccine. *Vaccine* *29*, 2865–2873.
- Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* *34*, 932–946.

- Choi, Y.S., Eto, D., Yang, J.A., Lao, C., and Crotty, S. (2013a). Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 3049–3053.
- Choi, Y.S., Yang, J.A., Yusuf, I., Johnston, R.J., Greenbaum, J., Peters, B., and Crotty, S. (2013b). Bcl6 expressing follicular helper CD4 T cells are fate committed early and have the capacity to form memory. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 4014–4026.
- 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 68–78.
- Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Y.-H., Lim, H.Y., Reynolds, J.M., Zhou, X., et al. (2011). Follicular regulatory T (Tfr) cells with dual Foxp3 and Bcl6 expression suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* **17**, 983–988.
- Colineau, L., Rouers, A., Yamamoto, T., Xu, Y., Urrutia, A., Pham, H.-P., Cardinaud, S., Samri, A., Dorgham, K., Coulon, P.-G., et al. (2015). HIV-Infected Spleens Present Altered Follicular Helper T Cell (Tfh) Subsets and Skewed B Cell Maturation. *PLOS ONE* **10**, e0140978.
- Cory, S., Webb, E., Gough, J., and Adams, J.M. (1981). Recombination events near the immunoglobulin Cmu gene join variable and constant region genes, switch heavy-chain expression, or inactivate the locus. *Biochemistry (Mosc.)* **20**, 2662–2671.
- Couzin-Frankel, J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* **342**, 1432–1433.
- Cretney, E., Xin, A., Shi, W., Minnich, M., Masson, F., Miasari, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Busslinger, M., Nutt, S.L., et al. (2011). The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **12**, 304–311.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 621–663.
- Crotty, S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* **41**, 529–542.
- Crotty, S. (2015). A brief history of T cell help to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 185–189.
- Cubas, R.A., Mudd, J.C., Savoye, A.-L., Perreau, M., van Grevenynghe, J., Metcalf, T., Connick, E., Meditz, A., Freeman, G.J., Abesada-Terk, G., et al. (2013). Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat. Med.* **19**, 494–499.
- Curotto de Lafaille, M.A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., and Lafaille, J.J. (2008). Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* **29**, 114–126.
- Dave, S.S., Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Gascoyne, R.D., Chan, W.C., Fisher, R.I., Braziel, R.M., Rimsza, L.M., Grogan, T.M., et al. (2004). Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2159–2169.
- De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 137–148.

- Dhaeze, T., Peelen, E., Hombrouck, A., Peeters, L., Van Wijmeersch, B., Lemkens, N., Lemkens, P., Somers, V., Lucas, S., Broux, B., et al. (2015). Circulating Follicular Regulatory T Cells Are Defective in Multiple Sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *195*, 832–840.
- DiSanto, J.P., Bonnefoy, J.Y., Gauchat, J.F., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (1993). CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* *361*, 541–543.
- Edholm, E.-S., Bengten, E., and Wilson, M. (2011). Insights into the function of IgD. *Dev. Comp. Immunol.* *35*, 1309–1316.
- Ehrenstein, M.R., and Notley, C.A. (2010). The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 778–786.
- Eto, D., Lao, C., DiToro, D., Barnett, B., Escobar, T.C., Kageyama, R., Yusuf, I., and Crotty, S. (2011). IL-21 and IL-6 Are Critical for Different Aspects of B Cell Immunity and Redundantly Induce Optimal Follicular Helper CD4 T Cell (Tfh) Differentiation. *PLOS ONE* *6*, e17739.
- Facchetti, F., Appiani, C., Salvi, L., Levy, J., and Notarangelo, L.D. (1995). Immunohistologic analysis of ineffective CD40-CD40 ligand interaction in lymphoid tissues from patients with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Abortive germinal center cell reaction and severe depletion of follicular dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *154*, 6624–6633.
- Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2007). Local development of effector and memory T helper cells. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 259–267.
- 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.
- Ferguson, S.E., Han, S., Kelsoe, G., and Thompson, C.B. (1996). CD28 is required for germinal center formation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *156*, 4576–4581.
- Fields, M.L., Hondowicz, B.D., Metzgar, M.H., Nish, S.A., Wharton, G.N., Picca, C.C., Caton, A.J., and Erikson, J. (2005). CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibit the maturation but not the initiation of an autoantibody response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 4255–4264.
- Fife, B.T., Pauken, K.E., Eagar, T.N., Obu, T., Wu, J., Tang, Q., Azuma, M., Krummel, M.F., and Bluestone, J.A. (2009). Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat. Immunol.* *10*, 1185–1192.
- Fonseca, V.R., Agua-Doce, A., Maceiras, A.R., Pierson, W., Ribeiro, F., Romão, V.C., Pires, A.R., da Silva, S.L., Fonseca, J.E., Sousa, A.E., et al. (2017). Human blood Tfr cells are indicators of ongoing humoral activity not fully licensed with suppressive function. *Sci. Immunol.* *2*.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 330–336.
- Foy, T.M., Laman, J.D., Ledbetter, J.A., Aruffo, A., Claassen, E., and Noelle, R.J. (1994a). gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J. Exp. Med.* *180*, 157–163.
- Foy, T.M., Durie, F.H., and Noelle, R.J. (1994b). The expansive role of CD40 and its ligand, gp39, in immunity. *Semin. Immunol.* *6*, 259–266.

- Francisco, L.M., Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.* 236, 219–242.
- Fu, W., Ergun, A., Lu, T., Hill, J.A., Haxhinasto, S., Fassett, M.S., Gazit, R., Adoro, S., Glimcher, L., Chan, S., et al. (2012). A multiple redundant genetic switch locks in the transcriptional signature of T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 13, 972–980.
- Galli, S.J., and Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nat. Med.* 18, 693–704.
- Gavin, M.A., Rasmussen, J.P., Fontenot, J.D., Vasta, V., Manganiello, V.C., Beavo, J.A., and Rudensky, A.Y. (2007). Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445, 771–775.
- Gerner, M.Y., Torabi-Parizi, P., and Germain, R.N. (2015). Strategically localized dendritic cells promote rapid T cell responses to lymph-borne particulate antigens. *Immunity* 42, 172–185.
- Glas, A.M., Knoop, L., Delahaye, L., Kersten, M.J., Kibbelaar, R.E., Wessels, L.A., van Laar, R., van Krieken, J.H.J.M., Baars, J.W., Raemaekers, J., et al. (2007). Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 390–398.
- Godfrey, V.L., Wilkinson, J.E., and Russell, L.B. (1991). X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am. J. Pathol.* 138, 1379–1387.
- Goenka, R., Barnett, L.G., Silver, J.S., O'Neill, P.J., Hunter, C.A., Cancro, M.P., and Laufer, T.M. (2011). Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 1091–1095.
- Good-Jacobson, K.L., Szumilas, C.G., Chen, L., Sharpe, A.H., Tomayko, M.M., and Shlomchik, M.J. (2010). PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat. Immunol.* 11, 535–542.
- de Graaf, G.N., Dieterich, M., Hesselink, D.A., Boer, K., Claassen-van Groningen, M.C., Kraaijeveld, R., Litjens, N.H.R., Bouamar, R., Vanderlocht, J., Tilanus, M., et al. (2015). Follicular T helper cells and humoral reactivity in kidney transplant patients. *Clin. Exp. Immunol.* 180, 329–340.
- Grusby, M.J. (1997). Stat4- and Stat6-deficient mice as models for manipulating T helper cell responses. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 359–360.
- Guo, Z., Liang, H., Xu, Y., Liu, L., Ren, X., Zhang, S., Wei, S., and Xu, P. (2017). The Role of Circulating T Follicular Helper Cells and Regulatory Cells in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Scand. J. Immunol.* 86, 107–112.
- Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., Wind, A. de, Ravoet, M., Buanec, H.L., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., et al. (2013). CD4<sup>+</sup> follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* 123, 2873–2892.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6, 1123–1132.



- Hatzi, K., Nance, J.P., Kroenke, M.A., Bothwell, M., Haddad, E.K., Melnick, A., and Crotty, S. (2015). BCL6 orchestrates Tfh cell differentiation via multiple distinct mechanisms. *J. Exp. Med.* 212, 539–553.
- Haynes, N.M., Allen, C.D.C., Lesley, R., Ansel, K.M., Killeen, N., and Cyster, J.G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 5099–5108.
- Hill, J.A., Feuerer, M., Tash, K., Haxhinasto, S., Perez, J., Melamed, R., Mathis, D., and Benoist, C. (2007). Foxp3 Transcription-Factor-Dependent and -Independent Regulation of the Regulatory T Cell Transcriptional Signature. *Immunity* 27, 786–800.
- Holland, S.M., DeLeo, F.R., Elloumi, H.Z., Hsu, A.P., Uzel, G., Brodsky, N., Freeman, A.F., Demidowich, A., Davis, J., Turner, M.L., et al. (2007). STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N. Engl. J. Med.* 357, 1608–1619.
- 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. *J. Exp. Med.* 155, 914–923.
- Hron, J.D., Caplan, L., Gerth, A.J., Schwartzberg, P.L., and Peng, S.L. (2004). SH2D1A regulates T-dependent humoral autoimmunity. *J. Exp. Med.* 200, 261–266.
- Hu, J., Havenar-Daughton, C., and Crotty, S. (2013). Modulation of SAP dependent T:B cell interactions as a strategy to improve vaccination. *Curr. Opin. Virol.* 3, 363–370.
- Inc, C.B. (2017). Caladrius Biosciences Announces that 50% of Subjects Have Been Treated in the Phase 2 Clinical Trial of CLBS03 for Type 1 Diabetes.
- Jandl, C., Liu, S.M., Cañete, P.F., Warren, J., Hughes, W.E., Vogelzang, A., Webster, K., Craig, M.E., Uzel, G., Dent, A., et al. (2017). IL-21 restricts T follicular regulatory T cell proliferation through Bcl-6 mediated inhibition of responsiveness to IL-2. *Nat. Commun.* 8, 14647.
- Jerne, N.K. (1955). THE NATURAL-SELECTION THEORY OF ANTIBODY FORMATION. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 41, 849–857.
- 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.
- Kasturi, S.P., Skountzou, I., Albrecht, R.A., Koutsonanos, D., Hua, T., Nakaya, H.I., Ravindran, R., Stewart, S., Alam, M., Kwissa, M., et al. (2011). Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 470, 543–547.
- Kawamoto, S., Tran, T.H., Maruya, M., Suzuki, K., Doi, Y., Tsutsui, Y., Kato, L.M., and Fagarasan, S. (2012). The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science* 336, 485–489.

- Kerfoot, S.M., Yaari, G., Patel, J.R., Johnson, K.L., Gonzalez, D.G., Kleinstein, S.H., and Haberman, A.M. (2011). Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* 34, 947–960.
- Keşmir, C., and De Boer, R.J. (1999). A mathematical model on germinal center kinetics and termination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 2463–2469.
- Kim, E.J., Kwun, J., Gibby, A.C., Hong, J.J., Farris, A.B., Iwakoshi, N.N., Villinger, F., Kirk, A.D., and Knechtle, S.J. (2014). Costimulation blockade alters germinal center responses and prevents antibody-mediated rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 14, 59–69.
- Kim, J.M., Rasmussen, J.P., and Rudensky, A.Y. (2007). Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* 8, 191–197.
- Kinter, A.L., Godbout, E.J., McNally, J.P., Sereti, I., Roby, G.A., O’Shea, M.A., and Fauci, A.S. (2008). The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 6738–6746.
- Klatzmann, D., and Abbas, A.K. (2015). The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 283–294.
- Klatzmann, D., Barré-Sinoussi, F., Nugeyre, M.T., Danquet, C., Vilmer, E., Griscelli, C., Brun-Veziret, F., Rouzioux, C., Gluckman, J.C., and Chermann, J.C. (1984). Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science* 225, 59–63.
- Kopf, M., Le Gros, G., Coyle, A.J., Kosco-Vilbois, M., and Brombacher, F. (1995). Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6 deficient mice. *Immunol. Rev.* 148, 45–69.
- Lampasona, V., Passerini, L., Barzaghi, F., Lombardoni, C., Bazzigaluppi, E., Brigatti, C., Bacchetta, R., and Bosi, E. (2013). Autoantibodies to harmonin and villin are diagnostic markers in children with IPEX syndrome. *PloS One* 8, e78664.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 201, 233–240.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 268–274.
- Leddon, S.A., and Sant, A.J. (2012). The Peptide Specificity of the Endogenous T Follicular Helper Cell Repertoire Generated after Protein Immunization. *PLoS ONE* 7.
- Lee, A.M., Clear, A.J., Calaminici, M., Davies, A.J., Jordan, S., MacDougall, F., Matthews, J., Norton, A.J., Gribben, J.G., Lister, T.A., et al. (2006). Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 5052–5059.
- de Leval, L., Rickman, D.S., Thielen, C., Reynies, A. de, Huang, Y.-L., Delsol, G., Lamant, L., Leroy, K., Brière, J., Molina, T., et al. (2007). The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood* 109, 4952–4963.

- Lim, H.W., Hillsamer, P., and Kim, C.H. (2004). Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *J. Clin. Invest.* **114**, 1640–1649.
- Lim, H.W., Hillsamer, P., Banham, A.H., and Kim, C.H. (2005). Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 4180–4183.
- Lindqvist, M., van Lunzen, J., Soghoian, D.Z., Kuhl, B.D., Ranasinghe, S., Kranias, G., Flanders, M.D., Cutler, S., Yudanin, N., Muller, M.I., et al. (2012). Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J. Clin. Invest.* **122**, 3271–3280.
- Linterman, M.A., and Hill, D.L. (2016). Can follicular helper T cells be targeted to improve vaccine efficacy? *F1000Research* **5**.
- Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3<sup>+</sup> follicular regulatory T cells control T follicular helper cells and the germinal center response. *Nat. Med.* **17**, 975–982.
- Linterman, M.A., Denton, A.E., Divekar, D.P., Zvetkova, I., Kane, L., Ferreira, C., Veldhoen, M., Clare, S., Dougan, G., Espéli, M., et al. (2014). CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *eLife* **3**.
- 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., Lu, H., Chen, T., Nallaparaju, K.C., Yan, X., Tanaka, S., Ichiyama, K., Zhang, X., Zhang, L., Wen, X., et al. (2016). Genome-wide analysis identifies Bcl6-controlled regulatory networks during T follicular helper (Tfh) cell differentiation. *Cell Rep.* **14**, 1735–1747.
- Liu, Y.J., Joshua, D.E., Williams, G.T., Smith, C.A., Gordon, J., and MacLennan, I.C. (1989). Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* **342**, 929–931.
- Lu, L., Barbi, J., and Pan, F. (2017). The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat. Rev. Immunol.*
- Ludwig, R.J., Vanhoorelbeke, K., Leypoldt, F., Kaya, Z., Bieber, K., McLachlan, S.M., Komorowski, L., Luo, J., Cabral-Marques, O., Hammers, C.M., et al. (2017). Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology. *Front. Immunol.* **8**.
- Ma, C.S. (2016). Human T Follicular Helper Cells in Primary Immunodeficiency: Quality Just as Important as Quantity. *J. Clin. Immunol.* **36**, 40–47.
- Ma, C.S., and Deenick, E.K. (2014). Human T follicular helper (Tfh) cells and disease. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 64–71.
- Ma, C.S., Nichols, K.E., and Tangye, S.G. (2007). Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 337–379.
- Ma, J., Zhu, C., Ma, B., Tian, J., Baidoo, S.E., Mao, C., Wu, W., Chen, J., Tong, J., Yang, M., et al. (2012). Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 827480.

- Maceiras, A.R., and Graca, L. (2015). Identification of Foxp3<sup>+</sup> T follicular regulatory (Tfr) cells by flow cytometry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1291, 143–150.
- Maceiras, A.R., Almeida, S.C.P., Mariotti-Ferrandiz, E., Chaara, W., Jebbawi, F., Six, A., Hori, S., Klatzmann, D., Faro, J., and Graca, L. (2017a). T follicular helper and T follicular regulatory cells have different TCR specificity. *Nat. Commun.* 8, ncomms15067.
- Maceiras, A.R., Fonseca, V.R., Agua-Doce, A., and Graca, L. (2017b). T follicular regulatory cells in mice and men. *Immunology* 152, 25–35.
- MacLennan, I.C. (1994). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 117–139.
- Mandel, T.E., Phipps, R.P., Abbot, A., and Tew, J.G. (1980). The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol. Rev.* 53, 29–59.
- Manser, T. (2004). Textbook Germinal Centers? *J. Immunol.* 172, 3369–3375.
- Matthews, A.J., Zheng, S., DiMenna, L.J., and Chaudhuri, J. (2014). Regulation of Immunoglobulin Class-Switch Recombination: Choreography of Noncoding Transcription, Targeted DNA Deamination, and Long-Range DNA Repair. *Adv. Immunol.* 122, 1–57.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 991–1045.
- Maxwell, L.J., and Singh, J.A. (2010). Abatacept for rheumatoid arthritis: a Cochrane systematic review. *J. Rheumatol.* 37, 234–245.
- McCarron, M.J., and Marie, J.C. (2014). TGF- $\beta$  prevents T follicular helper cell accumulation and B cell autoreactivity. *J. Clin. Invest.* 124, 4375–4386.
- McCausland, M.M., Yusuf, I., Tran, H., Ono, N., Yanagi, Y., and Crotty, S. (2007). SAP regulation of follicular helper CD4 T cell development and humoral immunity is independent of SLAM and Fyn kinase. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 817–828.
- McGonagle, D., Savic, S., and McDermott, M.F. (2007). The NLR network and the immunological disease continuum of adaptive and innate immune-mediated inflammation against self. *Semin. Immunopathol.* 29, 303–313.
- McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2005). Antigen-specific memory B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 487–513.
- McHeyzer-Williams, L.J., Malherbe, L.P., and McHeyzer-Williams, M.G. (2006). Checkpoints in memory B-cell evolution. *Immunol. Rev.* 211, 255–268.
- Miller, J.F., and Mitchell, G.F. (1968). Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* 128, 801–820.
- Minegishi, Y., Saito, M., Tsuchiya, S., Tsuge, I., Takada, H., Hara, T., Kawamura, N., Ariga, T., Pasic, S., Stojkovic, O., et al. (2007). Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 448, 1058–1062.

- Mitchell, G.F., and Miller, J.F. (1968). Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* 128, 821–837.
- Moir, S., and Fauci, A.S. (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 235–245.
- Mok, C.C. (2013). Rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis: an update. *Drug Des. Devel. Ther.* 8, 87–100.
- Moon, J.J., Suh, H., Li, A.V., Ockenhouse, C.F., Yadava, A., and Irvine, D.J. (2012). Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines that expand Tfh cells and promote germinal center induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 1080–1085.
- Moschovakis, G.L., Bubke, A., Friedrichsen, M., Falk, C.S., Feederle, R., and Förster, R. (2017). T cell specific Cxcr5 deficiency prevents rheumatoid arthritis. *Sci. Rep.* 7, 8933.
- 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 136, 2348–2357.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18470–18476.
- Nieuwenhuis, P., and Opstelten, D. (1984). Functional anatomy of germinal centers. *Am. J. Anat.* 170, 421–435.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., et al. (2008). Generation of follicular helper T cells is mediated by IL-21 but independent of TH1, TH2 or TH17 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'Connor, B.P., Vogel, L.A., Zhang, W., Loo, W., Shnider, D., Lind, E.F., Ratliff, M., Noelle, R.J., and Erickson, L.D. (2006). Imprinting the fate of antigen-reactive B cells through the affinity of the B cell receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 7723–7732.
- Ohkura, N., Hamaguchi, M., Morikawa, H., Sugimura, K., Tanaka, A., Ito, Y., Osaki, M., Tanaka, Y., Yamashita, R., Nakano, N., et al. (2012). T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* 37, 785–799.
- Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C.G., Qi, C.-F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H.C., Liu, C., Schwartzberg, P.L., and Leonard, W.J. (2002). A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298, 1630–1634.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., et al. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6, 1133–1141.

- Parrish-Novak, J., Foster, D.C., Holly, R.D., and Clegg, C.H. (2002). Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J. Leukoc. Biol.* 72, 856–863.
- Paus, D., Phan, T.G., Chan, T.D., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. (2006). Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J. Exp. Med.* 203, 1081–1091.
- Perreau, M., Savoye, A.-L., De Crignis, E., Corpataux, J.-M., Cubas, R., Haddad, E.K., De Leval, L., Graziosi, C., and Pantaleo, G. (2013). Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J. Exp. Med.* 210, 143–156.
- Pesenacker, A.M., Cook, L., and Levings, M.K. (2016). The role of FOXP3 in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 43, 16–23.
- Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 959–971.
- Powell, B.R., Buist, N.R., and Stenzel, P. (1982). An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J. Pediatr.* 100, 731–737.
- Raff, M.C. (1970). Role of thymus-derived lymphocytes in the secondary humoral immune response in mice. *Nature* 226, 1257–1258.
- Rajewsky, K., Forster, I., and Cumano, A. (1987). Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science* 238, 1088–1094.
- Redecke, V., Häcker, H., Datta, S.K., Fermin, A., Pitha, P.M., Broide, D.H., and Raz, E. (2004). Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 2739–2743.
- Reif, K., Ekland, E.H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Förster, R., and Cyster, J.G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 416, 94–99.
- Rodriguez-Barbosa, J.-I., Fernandez-Renedo, C., Moral, A.M.B., Bühler, L., and Del Rio, M.-L. (2017). T follicular helper expansion and humoral-mediated rejection are independent of the HVEM/BTLA pathway. *Cell. Mol. Immunol.* 14, 497–510.
- Rolf, J., Bell, S.E., Kovesdi, D., Janas, M.L., Soond, D.R., Webb, L.M.C., Santinelli, S., Saunders, T., Hebeis, B., Killeen, N., et al. (2010). Phosphoinositide 3-kinase activity in T cells regulates the magnitude of the germinal center reaction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 4042–4052.
- Roncador, G., García Verdes-Montenegro, J.-F., Tedoldi, S., Paterson, J.C., Klapper, W., Ballabio, E., Maestre, L., Pileri, S., Hansmann, M.-L., Piris, M.A., et al. (2007). Expression of two markers of germinal center T cells (SAP and PD-1) in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica* 92, 1059–1066.
- Rookhuizen, D.C., and DeFranco, A.L. (2014). Toll-like receptor 9 signaling acts on multiple elements of the germinal center to enhance antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E3224–3233.
- Rose, N.R., and Bona, C. (1993). Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol. Today* 14, 426–430.

- Rosenblum, M.D., Gratz, I.K., Paw, J.S., and Abbas, A.K. (2012). Treating Human Autoimmunity: Current Practice and Future Prospects. *Sci. Transl. Med.* *4*, 125sr1.
- Rosenzweig, M., Churlaud, G., Mallone, R., Six, A., Dérian, N., Chaara, W., Lorenzon, R., Long, S.A., Buckner, J.H., Afonso, G., et al. (2015). Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. *J. Autoimmun.* *58*, 48–58.
- Ruffin, N., Hani, L., and Seddiki, N. (2017). From dendritic cells to B cells dysfunctions during HIV-1 infection: T follicular helper cells at the crossroads. *Immunology* *151*, 137–145.
- Sacquin, A., Gador, M., and Fazilleau, N. (2017). The strength of BCR signaling shapes terminal development of follicular helper T cells in mice. *Eur. J. Immunol.* *47*, 1295–1304.
- Sadlon, T.J., Wilkinson, B.G., Pederson, S., Brown, C.Y., Bresatz, S., Gargett, T., Melville, E.L., Peng, K., D’Andrea, R.J., Glonek, G.G., et al. (2010). Genome-wide identification of human FOXP3 target genes in natural regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 1071–1081.
- Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2015). T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends Immunol.* *36*, 410–418.
- Sage, P.T., Francisco, L.M., Carman, C.V., and Sharpe, A.H. (2013). The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat. Immunol.* *14*, 152–161.
- Sage, P.T., Alvarez, D., Godec, J., Andrian, U.H. von, and Sharpe, A.H. (2014a). Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. *J. Clin. Invest.* *124*, 5191–5204.
- Sage, P.T., Paterson, A.M., Lovitch, S.B., and Sharpe, A.H. (2014b). The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity* *41*, 1026–1039.
- Sage, P.T., Tan, C.L., Freeman, G.J., Haigis, M., and Sharpe, A.H. (2015). Defective TFH Cell Function and Increased TFR Cells Contribute to Defective Antibody Production in Aging. *Cell Rep.* *12*, 163–171.
- Sage, P.T., Ron-Harel, N., Juneja, V.R., Sen, D.R., Maleri, S., Sunghak, W., Kuchroo, V.K., Haining, W.N., Chevrier, N., Haigis, M., et al. (2016). Suppression by TFR cells leads to durable and selective inhibition of B cell effector function. *Nat. Immunol.* *17*, 1436–1446.
- Saito, R., Onodera, H., Tago, H., Suzuki, Y., Shimizu, M., Matsumura, Y., Kondo, T., and Itoyama, Y. (2005). Altered expression of chemokine receptor CXCR5 on T cells of myasthenia gravis patients. *J. Neuroimmunol.* *170*, 172–178.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *155*, 1151–1164.
- Salomonsson, S., Larsson, P., Tengnér, P., Mellquist, E., Hjelmström, P., and Wahren-Herlenius, M. (2002). Expression of the B cell-attracting chemokine CXCL13 in the target organ and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in the chronic inflammatory disease Sjögren’s syndrome. *Scand. J. Immunol.* *55*, 336–342.

- Santana, M.A., and Esquivel-Guadarrama, F. (2006). Cell biology of T cell activation and differentiation. *Int. Rev. Cytol.* 250, 217–274.
- Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A.B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J. Exp. Med.* 192, 1553–1562.
- Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41–52.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., et al. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* 203, 1693–1700.
- Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltnane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., et al. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51–62.
- Shan, Y., Qi, C., Zhao, J., Liu, Y., Gao, H., Zhao, D., Ding, F., Wang, J., and Jiang, Y. (2015). Higher frequency of peripheral blood follicular regulatory T cells in patients with new onset ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 42, 154–161.
- Shi, J., Xu, X., Luo, F., Shi, Q., He, X., and Xia, Y. (2017). Differences in Tfh Cell Response Between the Graft and Spleen With Chronic Allograft Nephropathy. *Cell Transplant.* 26, 95–102.
- Shi, W., Li, X., Cha, Z., Sun, S., Wang, L., Jiao, S., Yang, B., Shi, Y., Wang, Z., Wu, Z., et al. (2014). Dysregulation of circulating follicular helper T cells in nonsmall cell lung cancer. *DNA Cell Biol.* 33, 355–360.
- Shulman, Z., Gitlin, A.D., Targ, S., Jankovic, M., Pasqual, G., Nussenzweig, M.C., and Victora, G.D. (2013). T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science* 341, 673–677.
- Simpson, N., Gatenby, P.A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., Manku, H., Vyse, T.J., Roncador, G., Huttley, G.A., et al. (2010). Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 62, 234–244.
- Six, A., Mariotti-Ferrandiz, M.E., Chaara, W., Magadan, S., Pham, H.-P., Lefranc, M.-P., Mora, T., Thomas-Vaslin, V., Walczak, A.M., and Boudinot, P. (2013). The Past, Present, and Future of Immune Repertoire Biology – The Rise of Next-Generation Repertoire Analysis. *Front. Immunol.* 4.
- Stein, J.V., and Nombela-Arrieta, C. (2005). Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology* 116, 1–12.
- Stone, E.L., Pepper, M., Katayama, C.D., Kerdiles, Y.M., Lai, C.-Y., Emslie, E., Lin, Y.C., Yang, E., Goldrath, A.W., Li, M.O., et al. (2015). ICOS coreceptor signaling inactivates the transcription factor FOXO1 to promote Tfh cell differentiation. *Immunity* 42, 239–251.
- Tackenberg, B., Kruth, J., Bartholomaeus, J.E., Schlegel, K., Oertel, W.H., Willcox, N., Hemmer, B., and Sommer, N. (2007). Clonal expansions of CD4+ B helper T cells in autoimmune myasthenia gravis. *Eur. J. Immunol.* 37, 849–863.



- Tarlinton, D.M. (2008). Evolution in miniature: selection, survival and distribution of antigen reactive cells in the germinal centre. *Immunol. Cell Biol.* 86, 133–138.
- Thatayatikom, A., and White, A.J. (2006). Rituximab: a promising therapy in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* 5, 18–24.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581.
- Tsuda, M., Torgerson, T.R., Selmi, C., Gambineri, E., Carneiro-Sampaio, M., Mannurita, S.C., Leung, P.S.C., Norman, G.L., and Gershwin, M.E. (2010). The spectrum of autoantibodies in IPEX syndrome is broad and includes anti-mitochondrial autoantibodies. *J. Autoimmun.* 35, 265–268.
- Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S., and Fagarasan, S. (2009). Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3<sup>+</sup> T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323, 1488–1492.
- Tubo, N.J., Pagán, A.J., Taylor, J.J., Nelson, R.W., Linehan, J.L., Ertelt, J.M., Huseby, E.S., Way, S.S., and Jenkins, M.K. (2013). Single naive CD4<sup>+</sup> T cells from a diverse repertoire produce different effector cell types during infection. *Cell* 153, 785–796.
- Tunaypin, C., Shaffer, A.L., Angelin-Duclos, C.D., Yu, X., Staudt, L.M., and Calame, K.L. (2004). Direct Repression of *prdm1* by Bcl-6 Inhibits Plasmacytic Differentiation. *J. Immunol.* 173, 1158–1165.
- Vanderleyden, I., Linterman, M.A., and Smith, K.G.C. (2014). Regulatory T cells and control of the germinal centre response. *Arthritis Res. Ther.* 16, 471.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* 5, 520.
- Ville, S., Poirier, N., Branchereau, J., Charpy, V., Pengam, S., Nerriere-Daguin, V., Le Bas-Bernardet, S., Coulon, F., Mary, C., Chenouard, A., et al. (2016). Anti-CD28 Antibody and Belatacept Exert Differential Effects on Mechanisms of Renal Allograft Rejection. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 27, 3577–3588.
- Vinuesa, C.G., Tangye, S.G., Moser, B., and Mackay, C.R. (2005). Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 853–865.
- Walker, L.S.K., and Sansom, D.M. (2011). The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 852–863.
- Wang, C.J., Heuts, F., Ovcinnikovs, V., Wardzinski, L., Bowers, C., Schmidt, E.M., Kogimtzis, A., Kenefeck, R., Sansom, D.M., and Walker, L.S.K. (2015). CTLA-4 controls follicular helper T-cell differentiation by regulating the strength of CD28 engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 524–529.
- Wang, Z., Wang, Z., Diao, Y., Qian, X., Zhu, N., and Dong, W. (2014). Circulating follicular helper T cells in Crohn's disease (CD) and CD-associated colorectal cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 35, 9355–9359.
- Weber, J.P., Fuhrmann, F., Feist, R.K., Lahmann, A., Baz, M.S.A., Gentz, L.-J., Van, D.V., Mages, H.W., Haftmann, C., Riedel, R., et al. (2015). ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2. *J. Exp. Med.* 212, 217–233.

- Wen, Y., Yang, B., Lu, J., Zhang, J., Yang, H., and Li, J. (2016). Imbalance of circulating CD4(+)CXCR5(+)FOXP3(+) Tfr-like cells and CD4(+)CXCR5(+)FOXP3(-) Tfh-like cells in myasthenia gravis. *Neurosci. Lett.* *630*, 176–182.
- Wing, J.B., Ise, W., Kurosaki, T., and Sakaguchi, S. (2014). Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4. *Immunity* *41*, 1013–1025.
- 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<sup>+</sup> T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201705551.
- Wollenberg, I., Agua-Doce, A., Hernández, A., Almeida, C., Oliveira, V.G., Faro, J., and Graca, L. (2011). Regulation of the germinal center reaction by Foxp3<sup>+</sup> follicular regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *187*, 4553–4560.
- Wong, C.K., Wong, P.T.Y., Tam, L.S., Li, E.K., Chen, D.P., and Lam, C.W.K. (2010). Elevated production of B cell chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity. *J. Clin. Immunol.* *30*, 45–52.
- Woyach, J.A., Johnson, A.J., and Byrd, J.C. (2012). The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* *120*, 1175–1184.
- Wu, H., Xie, M.M., Liu, H., and Dent, A.L. (2016a). Stat3 Is Important for Follicular Regulatory T Cell Differentiation. *PLoS ONE* *11*.
- Wu, H., Chen, Y., Liu, H., Xu, L.-L., Teuscher, P., Wang, S., Lu, S., and Dent, A.L. (2016b). Follicular regulatory T cells repress cytokine production by follicular helper T cells and optimize IgG responses in mice. *Eur. J. Immunol.* *46*, 1152–1161.
- Xie, M.M., Koh, B.-H., Hollister, K., Wu, H., Sun, J., Kaplan, M.H., and Dent, A.L. (2017). Bcl6 promotes follicular helper T-cell differentiation and PD-1 expression in a Blimp1-independent manner in mice. *Eur. J. Immunol.* *47*, 1136–1141.
- Xu, X., Han, Y., Wang, Q., Cai, M., Qian, Y., Wang, X., Huang, H., Xu, L., Xiao, L., and Shi, B. (2016). Characterisation of Tertiary Lymphoid Organs in Explanted Rejected Donor Kidneys. *Immunol. Invest.* *45*, 38–51.
- Xu, Y., Weatherall, C., Bailey, M., Alcantara, S., De Rose, R., Estaquier, J., Wilson, K., Suzuki, K., Corbeil, J., Cooper, D.A., et al. (2013). Simian immunodeficiency virus infects follicular helper CD4 T cells in lymphoid tissues during pathogenic infection of pigtail macaques. *J. Virol.* *87*, 3760–3773.
- Yang, G., Yang, X., Zhang, J., Li, G., Zheng, D., Peng, A., Hu, J., Xu, L., Yang, B., Yang, H., et al. (2017). Transcriptional repressor Blimp1 regulates follicular regulatory T cells homeostasis and function. *Immunology*.
- Yoshino, T., Kondo, E., Cao, L., Takahashi, K., Hayashi, K., Nomura, S., and Akagi, T. (1994). Inverse expression of bcl-2 protein and Fas antigen in lymphoblasts in peripheral lymph nodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes. *Blood* *83*, 1856–1861.

- 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.
- Zheng, Y., Josefowicz, S.Z., Kas, A., Chu, T.-T., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2007). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445, 936–940.
- (1993). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3- nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 178, 1293–1307.

# *Annexes*

## *Demande de financement*

-----

En réponse à un appel d'offre du Département Hospitalo-Universitaire (DHU)  
I2B visant à financer l'amorçage de projets collaboratifs en recherche  
translationnelle.

Projet financé à hauteur de 15 000€

Paul-Gydéon Ritvo – Guillaume Churlaud

5 major publications: on CD4/CD8 Tregs and IL-2

1. Churlaud G, Pitoiset F, Lorenzon R, Bellier B, Rosenzweig M, Klatzmann D. Human and mouse CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells at steady state and during IL-2 therapy. *Frontiers in Immunology*. 2015
2. Rosenzweig M, Churlaud G, Mallone R, Six A, Chaara W, Lorenzon R, Long A, Buckner J, Afonso G, Pham HP, Hartemann A, Yu A, Pugliese A, Malek TR and Klatzmann D. Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu. *Journal of Autoimmunity*. 2015
3. Rosenzweig M, Churlaud G, Hartemann A, Klatzmann D. Interleukin-2 in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. *Current Diabetes reports*. 2014 dec ; 14 (12) : 55.
4. Churlaud G, Jimenez V, Ruberte J, Amadoudji Zin M, Fourcade G, Gottrand G, Casana E, Lambrecht B, Bellier B, Piaggio E, Bosch F, Klatzmann D. Sustained stimulation and expansion of Tregs by IL2 control autoimmunity without impairing immune responses to infection, vaccination and cancer. *Clinical Immunology*. 2014; 151 (2): 114-26
5. Chen T, Darrasse-Jèze G, Bergot AS, Courau T, Churlaud G, Valdivia K, Strominger JL, Ruocco MG, Chaouat G, Klatzmann D. Self-specific memory regulatory T cells protects embryos at implantation in mice. *Journal of Immunology*. 2013; 191 (5): 2273-81

#### Project Title

**Titre (Français) :** Etude du rôle des lymphocytes T CD8 régulateurs dans la physiopathologie des maladies auto-immunes et sous traitement interleukine-2 à faible dose.

**Title (English):** Study of the pathophysiological role of CD8 regulatory T cells in autoimmunity and under low-dose interleukin-2 treatment.

## Summary of the proposal (0.5 page max.)

Context: Autoimmune and inflammatory diseases are characterized by an immune dysregulation, and notably an imbalance between effector T cells (Teff) and regulatory T cells (Treg). Most treatments of these diseases are aimed at decreasing immunity. Recently, the therapeutic research has been focused on the activation and expansion of regulatory cells, particularly with the use of interleukin-2 (IL-2) that has been effective for the expansion of CD4 Treg and improvement of clinical signs in some autoimmune diseases (AIDs) (vasculitis and GVHD).

Rational: Other regulatory cell populations have now received attention, and notably CD8 Treg for which evidence that they are involved in AIDs is growing. However, CD8 Treg are less well characterized than CD4 Treg.

Objectives: We sought to deeply characterize CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg in healthy donors (HD) and under pathological conditions (Rheumatoid Arthritis (RA) and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) patients) at steady state and under low-dose IL-2 treatment.

Methodology: TRANSREG is a clinical trial performed in Pitié-Salpêtrière hospital. The aim of TRANSREG is the induction of Treg by low-dose IL-2 in AIDs. 10 mL of blood from 4 untreated HD and from 4 RA and 4 SLE patients (recruited in TRANSREG) before and after IL-2 treatment will be collected. CD8 Treg will be fully phenotyped by flow cytometry, purified by sorting and transcriptomic analysis will be performed.

Expected results: The phenotypic and transcriptomic analysis of CD8 Treg in AIDs and under IL-2 treatment will provide us a better knowledge of their role in the development of AIDs, and of their mechanisms of suppression.

## i2B teams involved (0.5 page max.)

**Team 1: Immunology – Immunopathology – Immunotherapy (I<sup>3</sup>) laboratory, biotherapies department (Pitié-Salpêtrière hospital)**

Expertise in translational research in immunology and systems biology approaches. Contacts for the project: Dr. G. Churlaud ([guillaume.churlaud@aphp.fr](mailto:guillaume.churlaud@aphp.fr)) and PG. Ritvo ([paulgydeon.ritvo@gmail.com](mailto:paulgydeon.ritvo@gmail.com)).

**Team 2: Clinical Investigation Center in Biotherapy and Immunology (CIC-BTi) and Internal medicine and Clinical Immunology Department (Pitié-Salpêtrière hospital)**

This team has an expertise in the management of patients suffering from systemic lupus erythematosus and in managing the TRANSREG clinical trial. Contact for the project: Dr. R. Lorenzon ([rolorenzon@gmail.com](mailto:rolorenzon@gmail.com)).

**Team 3: Rheumatology Department (Saint-Antoine hospital)**

Expertise in the management of patients suffering from rheumatoid arthritis. Contact for the project: Pr. J. Sellam ([jeremie.sellam@aphp.fr](mailto:jeremie.sellam@aphp.fr)).

## **1. CONTEXT, RATIONALE AND OBJECTIVES OF THE PROPOSAL**

### **1.1 CONTEXT**

Autoimmune diseases (AIDs), all pathologies considered, represent the third cause of morbidity in developed countries, and therefore represent a major public health issue. AIDs, including auto-inflammatory diseases may be considered as a set of conditions arising from a similar pathophysiology involving immune dysregulation characterized by an abnormal balance between effector T cells (Teff) and regulatory T cells (Treg)<sup>1</sup>.

T cell development in the thymus comprises the positive selection of functional T cells capable of supporting adaptive immunity and the elimination of highly self-reactive T cells. The latter process is leaky and some autoreactive Teff escape into the periphery where they are normally regulated by peripheral tolerance mechanisms. Multiple cell subsets with immunoregulatory properties, among CD4 and CD8 T cell or B cell populations, control these potentially harmful Teff. The best characterized of such regulatory cell populations are the natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> thymic-derived regulatory T cells (CD4 Treg)<sup>2</sup>. Their major role in the maintenance of immunological self-tolerance and immune homeostasis is illustrated by the rapid development of AIDs in normal mice upon their depletion and also by the occurrence of severe AIDs, allergy, and immunopathology in humans with a mutated FOXP3 gene<sup>3</sup>. CD4 Treg biology has dominated research on regulatory cells in AIDs. More recently, other regulatory cell populations have received attention, and notably regulatory CD8 T cells (CD8 Treg) for which evidence that they are involved in AIDs is growing. In patients suffering from AIDs, a dysregulation, even coming from Teff, from Treg or from another immune cell subsets<sup>4</sup>, is present and is triggering the disease.

The therapeutic approach of inflammatory and autoimmune diseases is aimed at elimination or attenuation of immune and inflammatory response (immunosuppressant drugs, corticosteroids, NSAID Drugs), and is thus targeting more or less effector immune cells. Now are emerging biological agents genetically engineered with the aim to decrease inflammation by interfering with various biological substances identified in the inflammatory cascade (anti-TNF drugs for example). However, these therapies have limitations in terms of efficacy and tolerance (increased risk of infection and multi-system toxicity). Many research teams have now decided not to directly target the effector immune cells or mediators of inflammation any more, but rather to try to influence the regulatory immune cells. Low-dose interleukin-2 (IL-2) now appears to specifically expand and activate CD4 Treg and CD8 Treg, and thus could represent a new class of immunoregulatory drug. Thus low-dose IL-2 is now assessed in many clinical trials on autoimmune and inflammatory diseases, as IL-2 can modify the Teff/Treg balance.

### **1.2 RATIONALE**

CD8 Treg are functionally defined populations of CD8 T cells endowed with immunosuppressive functions<sup>5</sup>. Their suppressive activity in AIDs of CD8 Treg was first demonstrated in CD8-depleted mice, and begins now to be demonstrated in AIDs patients. Notably, in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid



arthritis (RA), inflammatory bowel disease or multiple sclerosis defective functions and/or reduced numbers of CD8 Treg have been reported (Table 1).

| AID                        | ROLE OF CD8 TREG IN THE PATHOLOGY                                                                                                                       | REFERENCES |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Multiple sclerosis         | Defective suppressive functions in exacerbation of MS                                                                                                   | 6          |
| Multiple sclerosis         | Direct kill of CD4 T cells                                                                                                                              | 7          |
| Multiple sclerosis         | ↘ % of CD127 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> in MS patients compared to HD                                           | 8          |
| Inflammatory bowel disease | Defective suppressive functions of CD8 T cells from lamina propria in IBD                                                                               | 9          |
| RA                         | High level of IL-10 secreting CD8 T cells in synovial fluid                                                                                             | 10         |
| RA                         | ↗ CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> and ↘ CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> in RA patients compared to HD                         | 11         |
| RA                         | More induction in RA patients compared to HD                                                                                                            | 12         |
| Type 1 diabetes            | Defect of recognition of HLA-E/Hsp60sp                                                                                                                  | 13         |
| Type 1 diabetes            | ↗ only in clinical responders to an anti CD3 therapy                                                                                                    | 14         |
| SLE                        | Impairment of CD8 Treg suppressive function after generation of CD8 Treg in vitro                                                                       | 15         |
| SLE                        | ↘ % in SLE patients than in HD                                                                                                                          | 16         |
| SLE                        | ↗ % CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup> in SLE remission | 17         |
| Primary biliary cirrhosis  | Phenotypic and functional alterations                                                                                                                   | 18         |

**Table 1: Reported roles of CD8 Treg in the pathophysiology of AIDs.**

Abbreviations: multiple sclerosis (MS), systemic lupus erythematosus (SLE), inflammatory bowel disease (IBD), healthy donors (HD), Type 1 diabetes (T1D), Rheumatoid arthritis (RA)

Althought CD8 Treg subsets are multiply involved in the pathophysiology of different AIDs in humans, CD8 Treg biology is less well known than that of CD4 Treg, due in part to their small numbers<sup>5</sup>, which render functional studies difficult. Furthermore, several subpopulations of CD8 Treg have been described based on the expression of different cell surface markers making it a very heterogeneous population of cells<sup>5</sup>, but a subpopulation described as CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> really showed very important suppressive activities<sup>5,19</sup>. Many groups suggest that FOXP3 expression might represent a good indicator of a bona fide suppressive function of CD8 Treg. CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg could therefore have an important role in the pathophysiology of AIDs, and this role needs to be studied.

Furthermore, our laboratory<sup>5,20,21</sup> showed that as CD8 Treg express CD25, these cells were highly sensible to IL-2. Like CD4 Treg, CD8 Treg expand in response to IL-2 treatment, as we previously showed in clinical trials using low dose IL-2 in hepatitis C virus-induced vasculitis<sup>20</sup> and type 1 diabetes (DF-IL2 trial, NCT01353833). Thus these cells could participate to the beneficial clinical effects of IL-2 on autoimmunity<sup>20,22</sup>.

We are currently conducting a clinical trial using low-dose IL-2 in autoimmune and inflammatory diseases (TRANSREG, NCT01988506). This clinical trial TRANSREG aims to assess the safety and biological efficacy of low-dose IL-2 as a Treg inducer in a set of autoimmune and auto-inflammatory diseases. We intend to study the CD8 Treg in two pathologies where the impact of CD8 Treg in the pathophysiology has already been glimpsed: RA and SLE (table 1). RA is a chronic multisystem inflammatory disease causing progressive joint destruction. This is the most common inflammatory joint disease, affecting 0.3 to 0.5 % of the french population. The disease is systemic because it can affect several organs (dermis, lung, eyes). RA is the result of a complex interaction between synovial cells and lymphocytic infiltration. Joint damage is caused by local production of

immunoglobulin with macrophage activation and production of inflammatory cytokines. Very few publications have studied the role of CD8 Treg in RA (Table 1) and the results are contradictory: Ellis showed an increase in CD8 induced Treg in RA<sup>12</sup>, while Sempere-Ortells shows a decrease in CD8 regulatory cells<sup>11</sup>.

SLE is an AID characterized by the production of antibodies against components of the cell nucleus, causing a wide range of clinical manifestations. Its prevalence in France is from 12 to 40 per 100 000 inhabitants per year. This disease can affect any organ. Nearly 90 % of SLE patients have musculoskeletal symptoms as arthralgia. The main clinical manifestations are related to inflammation, vasculitis, the deposits of immune complexes, and vasculopathy. Many studies have shown diminution of CD4 Treg in patients with SLE. Publications reported in Table 1 also show an impaired number<sup>15</sup> or function<sup>16</sup> of CD8 Treg in SLE patients.

These diseases have a high prevalence in self antibodies, and it was also shown that CD8 Treg could have a role on T follicular helper cells (Tfh)<sup>21,23</sup>. Tfh cells are needed to maintain the germinal centers and to regulate germinal center B cell differentiation into plasma cells and memory B cells. CD8 Treg could regulate this Tfh-B cell axis; this should be of importance in the protection against auto-antibodies mediated AIDs.

### **1.3 OBJECTIVES**

#### 1.3.1 General objective:

We sought to deeply characterize CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg in HD and under pathological conditions (RA and SLE patients) at steady state and under IL-2 treatment. We want to assess and confirm the central position of CD8 Treg in the protection against autoimmunity especially in auto-antibodies mediated AIDs.

#### 1.3.2 Specific objectives:

- To compare the transcriptomic status of CD8 Treg between RA and SLE patients and HD;
- To compare the transcriptomic status of CD8 Treg between RA and SLE patients before and after IL-2 treatment;
- To study their phenotype (surface and nuclear markers expression) and functionality upon
  - Perforin/Granzyme expression
  - suppressive assays
  - STAT5 phosphorylation upon IL-2 stimulation

## 2 PROJECT ORGANISATION AND TASKS SCHEDULE

### 2.1 PROJECT ORGANISATION

#### 2.1.1 Scientific aspects

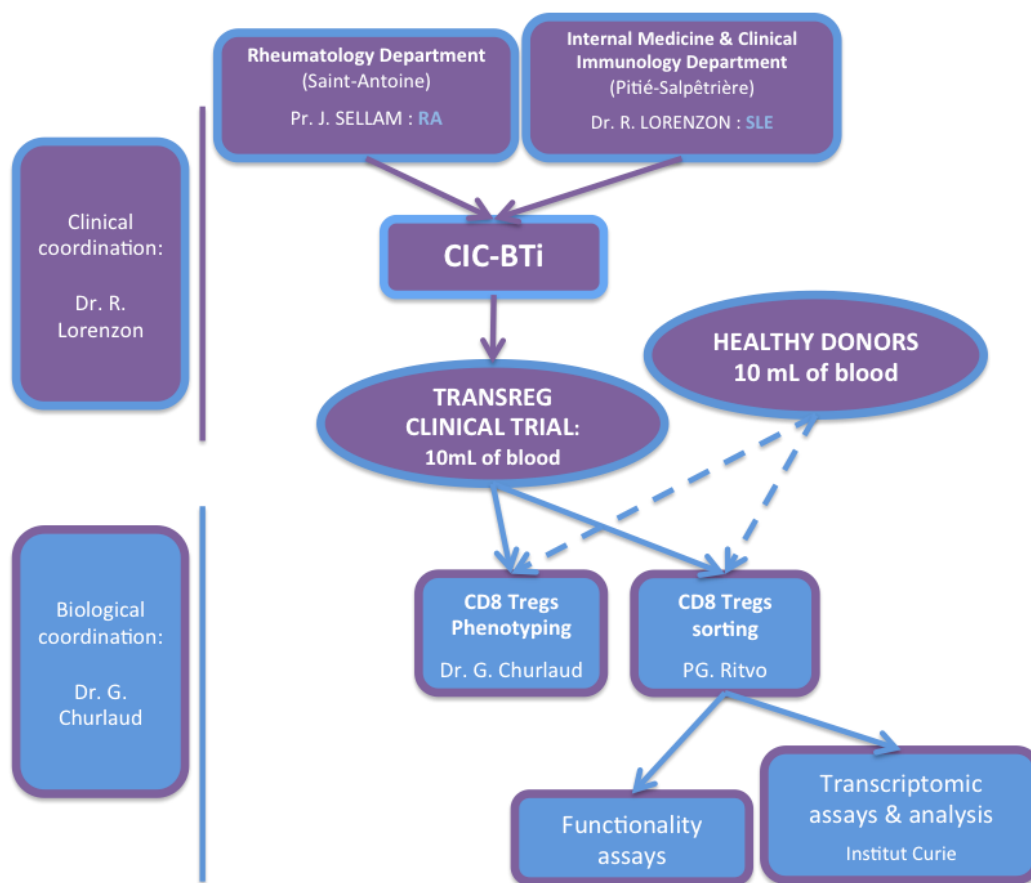


Figure 1: Scheme of samples collection and processing

#### 2.1.2 Technical aspects

##### Blood samples

Samples will be collected from the Etablissement Français du Sang (EFS) of the Pitié-Salpêtrière hospital for HD. As the total amount of blood collected for HD will be 10 mL, no authorization from people protection committee will be mandatory.

Patients with confirmed SLE or RA will be recruited for the clinical trial TRANSREG (inclusion and exclusion criteria can be found on <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01988506?term=transreg&rank=1>). Blood samples from these patients will be obtained at Visit 0 (before IL-2 treatment) and at Visit 6 (Day 8, i.e. 3 days after the 5 days IL-2 course). 40 mL of blood are collected at those visits for ancillary studies. We will take 10 mL of this collected blood to do our study, so an amendment to the TRANSREG trial will not be necessary.

##### CD8 Treg phenotyping

300µL of blood will be needed to perform CD8 Treg function phenotyping and naïve / memory CD8 Treg phenotyping. Flow cytometry panels used are described in Table 2.

|              | FITC   | PE   | ECD    | PC5.5 | PC7    | APC   | AA700 | AA750 | PB  | KrOr |
|--------------|--------|------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-----|------|
| Activation   | Helios | CD25 |        | Ki67  | CTLA-4 | Foxp3 | CD3   | CD127 | CD4 | CD8  |
| Function     | LAP    | GITR | CD25   | CD39  | CD45RA | Foxp3 | CD3   | CD127 | CD4 | CD8  |
| Naive/Memory | CD95   | CCR7 | HLA-DR | CD25  | CD45RA | Foxp3 | CD3   | CD127 | CD4 | CD8  |

Table 2: Flow cytometry panels to characterize CD8 Treg

## Cell purification and sorting

CD8 positive cells will be isolated using the **Rosettesep human CD8<sup>+</sup> T cell enrichment cocktail** (Stem Cell) followed by a ficoll using the **sepmate** technology (Stem cell). The recovery of this technique is 40 % with a purity of CD8<sup>+</sup> T cells of 95 %. CD8<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup> regulatory T cells will be sorted using an **Aria II** (BD) after a cell surface staining with anti human antibodies **CD8 APC AlexaFluor 750, CD25 PE, CD127 FITC**. The recovery of an ARIA cell sorting is usually 50 %.

CD8 Treg can be found at a quantity of 1 cell per  $\mu\text{L}$  of blood<sup>5</sup>. We will use 10 mL of peripheral blood per patient, allowing us to obtain an average of 10 000 cells per sample. With a total recovery of 20 % (= 40 % x 50 %), we will obtain 2 000 CD8 Treg 99 % pure.

## CD8 Treg functionality assays

100 000 CD8<sup>+</sup> T cells (after the Rosettesep / sepmate steps) will be plated with PMA/iono and golgi plug for 4h, perforin/granzyme and intracellular cytokines (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-17...) will be stained.

## Transcriptomic analysis

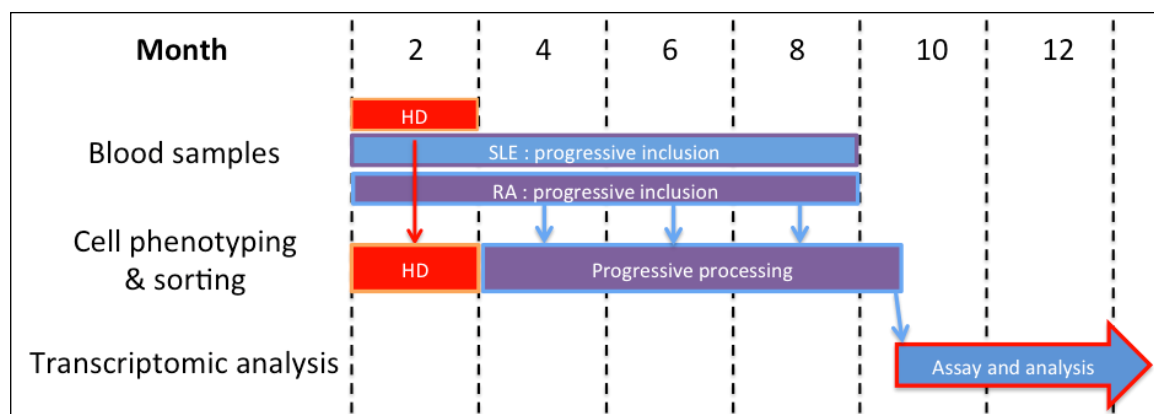
RNA extraction and transcriptomic analysis will be performed by the Genomic Platform, Translational research Department, Institut Curie, using Affymetrix data controlled and human Gene HTA2.0 array, with external controls. This analysis can be used for very small RNA quantities (minimum of 1 000 cells) that totally fits with our isolation protocol.

### 2.1.3 Methodological aspects

Patient's recruitment per pathology: for now, in TRANSREG clinical trial, 6 SLE and 3 RA patients have been recruited in 12 months. 6 SLE patients and 9 RA patients remain to be recruited to finish the TRANSREG trial. We consider that 4 SLE and 4 RA patients will be recruited in 8 months. This is the minimum of samples needed for each condition to perform statistical analysis on transcriptomic data, according to the Genomic Platform. Patients included in TRANSREG trial will receive repeated administrations of low-dose IL-2 (1 Million International Units MIU/day, subcutaneously) during 5 consecutive days (induction period) and then 1 MIU of IL-2 once every 15 days for 6 months (maintenance period).

## 2.2 TASKS SCHEDULE

Figure 2: Main tasks of the project described in an overall Gantt chart



### **3. PROJECT COORDINATION MODALITIES AND ADDED VALUE FOR THE COLLABORATION**

#### **3.1. PROJECT COORDINATION MODALITIES**

**Clinical coordination:** Our project on CD8 Treg will be integrated as an ancillary study of the TRANSREG clinical trial. Patients will be recruited from our collaborator's departments (Rheumatology Department at Saint-Antoine hospital and Internal Medicine & Clinical Immunology at Pitié-Salpêtrière hospital) under the clinical coordination performed by Dr. R. Lorenzon. Pr. J. Sellam already collaborates closely with Dr. Lorenzon as part of TRANSREG and other clinical trials. All TRANSREG included patients are clinically followed by Dr. R. Lorenzon who is previously notified by phone or email for every patient enrolment.

**Biological coordination:** The collected blood will be transferred by pneumatic (station 722) from Dr. R. Lorenzon (CIC-BTi) to the I<sup>3</sup> laboratory for processing and analysis. Blood samples will be received by the team of technicians of the laboratory and given either to Dr. G. Churlaud or to PG Ritvo.

**Financial coordination:** Dr G. Churlaud will coordinate the financial aspects of the research with the secretaries of the Department.

**Meetings:** There will be a monthly meeting with the 4 main protagonists of the project in order to discuss the results and to see whether the tasks schedule is followed. Results will be discussed by both biologists and clinicians to confront our views on the effect of IL-2 on the population of CD8 Treg.

#### **3.2. ADDED VALUE FOR THE COLLABORATION**

The organization of the project described in section 2.1.1. and 3.1. will allow us to introduce a technique at the cutting edge of biotechnology (transcriptomic assays on a little amount of RNA) to a field of major interest for the study of AIDs, CD8 Treg.

We are truly translational and have a focus on SLE and RA for which our laboratory is currently conducting breakthrough clinical trials, in association with the departments we will work with. This bed to benchside step is made possible by both the experience of our clinical collaborators and their patients, the regulatory structures sponsoring the clinical trial TRANSREG (CIC-BTi) and the clinical trial itself, the skills of our biologists in the fields of fundamental immunology upon a large panel of biological assays and the platform of excellence that will realize and analyze our transcriptomic assays.

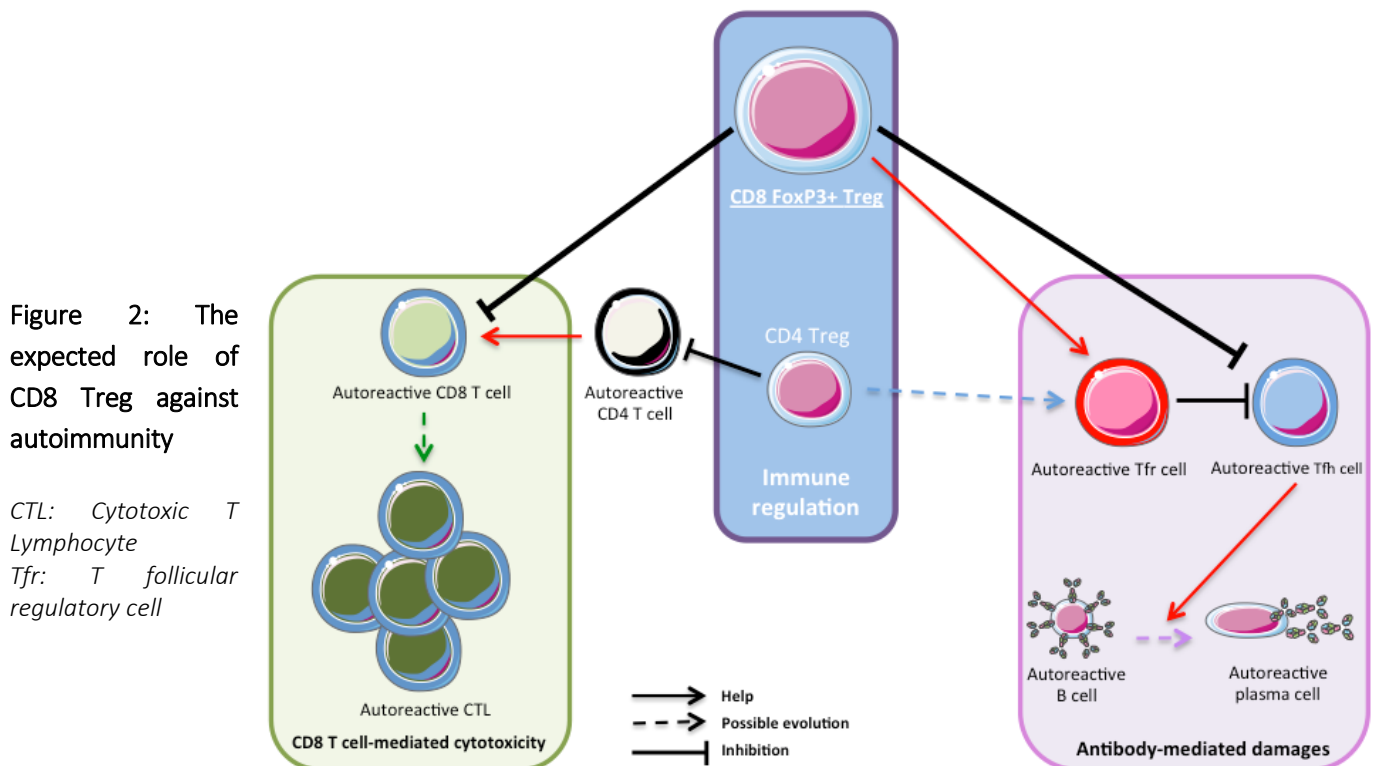
This kind of collaboration have already been tested in another project currently ongoing, TRANSIMMUNOM, which aims to study different immunological subsets like CD4 Treg in the context of AIDs. We hereby introduce the effect of IL-2 on a small subset (moreover recently discovered) of immunological cells, CD8 Treg cells.

Eventually, the feasibility of our project is largely supported by our proven expertise and records attested by publications in the relevant fields of past and current clinical trials investigating low-dose IL-2 in AIDs.

## 4. EXPECTED RESULTS

As teams combining expertise in AIDs and Treg biology, we are uniquely positioned to use a broad range of analysis to improve our understanding of Treg function and to translate this knowledge to the management of AIDs.

The transcriptomic analysis of CD8 Treg in different conditions will provide us a good picture of this subset function and allow us to find new possible interactions between CD8 Treg and immunological populations such as Tfh cells, and new molecular mechanisms of CD8 Treg-mediated cell suppression. We will be able to confirm the expected role of this subset in various phases of protection against autoimmunity as shown below in Figure 2.



Our various analysis will allow us to identify new genetic factors in autoinflammatory diseases, and to identify new pathways in organ-specific (RA) or systemic (SLE) inflammation. We will also be able to investigate the role of the CD8 Treg subset in the well-known Treg/Teff balance.

For SLE and RA, we believe that we will discover impaired function or frequency of CD8 Treg compared to HD. We hope that CD8 Treg counting and phenotyping could be a novel biomarker for diagnosis and for monitoring of disease progression that could be extremely helpful for their management. We are currently involved in evaluating low-dose IL-2 as a Treg inducer in various AIDs. To guide IL-2 treatment, it will be extremely important to find biomarkers that can predict disease progression or evaluate the efficacy of treatment. The characterization of the possible status of this subset will also allow us to refine the biological phenotype of patients.

## 5. EXPECTED OUTCOMES FOR i2B

On the one hand, i2B participates to TRANSREG clinical trial and the results of our study will be fully part of this trial, bringing a new mode of analysis upon a new immunological subset.

On the other hand, the role of CD8 Treg is still misunderstood. If we manage to establish a modification in CD8 Treg phenotype and functionality and to make a link between those observations and the physiopathology of the two AIDs studied, this work could be extended to all DHU collaborators consulting patients with AIDs. The analysis of CD8 Treg could become part of the common panel of investigations in clinical trials analyzing AIDs. Eventually and wider, defining the role of CD8 Treg (or of their absence) among the physiopathology of AIDs could help us to bring new ideas of biomarkers for diagnosis and/or prognosis, combined biotherapies and new targets, fields among which i2B rallies experts in different teams.

## 6. BIBLIOGRAPHY

1. McGonagle, D. & McDermott, M. F. A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Med.* **3**, e297 (2006).
2. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 531–562 (2004).
3. Bennett, C. L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **27**, 20–21 (2001).
4. Bluestone, J. A. The yin and yang of interleukin-2-mediated immunotherapy. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2129–2131 (2011).
5. Churlaud, G. *et al.* Human and Mouse CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Front. Immunol.* **6**, 171 (2015).
6. Baughman, E. J. *et al.* Neuroantigen-specific CD8<sup>+</sup> regulatory T-cell function is deficient during acute exacerbation of multiple sclerosis. *J. Autoimmun.* **36**, 115–124 (2011).
7. Tennakoon, D. K. *et al.* Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 7119–7129 (2006).
8. Kreft, K. L., Verbraak, E., Wierenga-Wolf, A. F., Laman, J. D. & Hintzen, R. Q. Role of CD8 regulatory T-cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **69**, 593; author reply 593–594 (2011).
9. Brimnes, J. *et al.* Defects in CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 5814–5822 (2005).
10. Cho, B.-A. *et al.* Characterization of effector memory CD8<sup>+</sup> T cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Immunol.* **32**, 709–720 (2012).
11. Sempere-Ortells, J. M. *et al.* Quantification and phenotype of regulatory T cells in rheumatoid arthritis according to disease activity score-28. *Autoimmunity* **42**, 636–645 (2009).
12. Ellis, S. D. P. *et al.* Induced CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg Cells in Rheumatoid Arthritis Are Modulated by p38 Phosphorylation and Monocytes Expressing Membrane Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and CD86. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**, 2694–2705 (2014).
13. Jiang, H. *et al.* HLA-E-restricted regulatory CD8<sup>+</sup> T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. *J. Clin. Invest.* **120**, 3641–3650 (2010).
14. Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J., Bluestone, J. A. & Herold, K. C. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8<sup>+</sup> T cell population and induces CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs. *J. Clin. Invest.* **115**, 2904–2913 (2005).
15. Filaci, G. *et al.* Impairment of CD8<sup>+</sup> T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 6452–6457 (2001).
16. Tulunay, A., Yavuz, S., Direskeneli, H. & Eksioğlu-Demiralp, E. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, suppressive T cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **17**, 630–637 (2008).
17. Zhang, L., Bertucci, A. M., Ramsey-Goldman, R., Burt, R. K. & Datta, S. K. Regulatory T cell (Treg) subsets return in patients with refractory lupus following stem cell transplantation, and TGF- $\beta$ -producing CD8<sup>+</sup> Treg cells are associated with immunological remission of lupus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 6346–6358 (2009).
18. Bernuzzi, F. *et al.* Phenotypical and functional alterations of CD8 regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmun.* **35**, 176–180 (2010).
19. Chaput, N. *et al.* Identification of CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* **58**, 520–529 (2009).
20. Saadoun, D. *et al.* Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2067–2077 (2011).
21. Klatzmann, D. & Abbas, A. K. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 283–294 (2015).
22. Koreth, J. *et al.* Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2055–2066 (2011).
23. Kim, H.-J., Verbrinnen, B., Tang, X., Lu, L. & Cantor, H. Inhibition of follicular T-helper cells by CD8<sup>+</sup> regulatory T cells is essential for self tolerance. *Nature* **467**, 328–332 (2010).

**Justification of budget requested (1 page max.)**

*Please fill in the table below and briefly describe the funding requested by each team. If global cost exceeds 15 000€, please specify complementary funding already obtained.*

|                               | Team 1                                                                                                                                        | Teams 2 and 3 |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Operating costs (consumables) | - Blood from EFS: 20,72<br>- CD8+ T cell enrichment (sepmate + rosettesep) : 922,32<br>- Flow cytometry Antibodies for cell sorting : 1264,92 |               |
| Mission expenses              |                                                                                                                                               |               |
| Outsourcing                   | RNA extraction and Transcriptomic analysis: 12729                                                                                             |               |
| <b>Total (€)</b>              | 14936,96 euros                                                                                                                                | 0             |

Flow cytometry antibodies for phenotypical characterization and functional assays will be kindly given by Dr Michelle Rosenzweig (Biotherapy department, Pitié-Salpêtrière hospital).



## Remerciements

Mes premiers et vifs remerciements vont tout naturellement au Pr D. Klatzmann pour son implication dans mes travaux de thèse, sa porte qui m'a toujours été ouverte, la confiance qu'il m'a apportée. Merci de m'avoir aidé à occuper mes samedis. Merci pour tout, David.

Je remercie les Prs. Marie-Paule Lefranc et Philippe Kourilsky pour leurs conseils au cours de mes trois années de thèse ainsi que – pour le Pr. Lefranc – d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, c'est un honneur.

Je remercie chaleureusement le Dr Nabila Seddiki et le Dr Nicolas Fazilleau d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que le Pr. Patrick Blanco et le Dr. Benoît Salomon d'avoir consenti à faire partie de ce jury.

\*\*\*

Quant aux autres, libre à eux de se reconnaître dans les quelques scènes de vie qui vont suivre. A toutes fins utiles, un toi peut désigner plusieurs personnes.

Longtemps, je me suis levé de bonne heure. Et j'ai écouté de la musique. Et fait des *blind tests*. Alors à toi qui a joué, supporté, écouté mes sifflements, chants, musiques,

A toi qui a toujours couru après les petites cuillères, me regardant d'un air menaçant jour après jour, n'ayant de preuve formelle que j'étais responsable de la chasse au trésor, obligé de mélanger le sucre au fond de ton breuvage avec une immense cuillère à soupe, ou de manger ton yaourt à la fourchette,

A toi qui m'a prêté (sans forcément le vouloir) ton bureau, et à toi qui n'a jamais compris pourquoi mon (« vrai ») bureau demeurerait inoccupé,

A toi qui m'a aidé à passer en revue l'ensemble de la palette gastronomique Monoprixienne

A toi avec qui nous avons découvert les cryptomonnaies, from F to B ou from B to F, toi qui a créé une technique et toi qui en a créé une autre, et vous qui avec échoué, on a bien ri. Mais on est toujours au point O,

A toi que j'aurai le plaisir de ne plus revoir,

A toi qui m'a escorté à l'Opéra, aux Français ou bien ailleurs, toi qui a pu t'étouffer pendant une pièce ou bien t'endormir devant un Ballet,

A toi qui m'a accompagné pour de folles soirées au B., chez C. ou ailleurs,

A toi qui m'a aidé dans le travail, qui m'a appris à lire des étiquettes sur des cages, qui m'a enseigné que les milieux de culture devaient être stériles, que le rebord de poubelle servait de limite implicite à son remplissage, que l'ARN n'aimait pas la chaleur, que la première étape d'un ELISA était le *coating* ou encore qu'un bidon de fluide pour cytomètre n'était pas le tonneau des Danaïdes,

A toi qui à lu, relu, re-relu, re-re-relu mes différents manuscrits, travaux, écrits (mais qui n'aura pas eu ces remerciements en avant-première),

A toi qui aura tant bien que mal tenté de répondre à la question du midi et à toi qui aura fait la vaisselle quelques dizaines de fois indirectement par ma faute,

A toi avec qui j'aurai bu des litres de café qu'il ait été « gratuit », « G. » ou bien sorti d'un fond de boîte Nespresso,

A toi qui va te dire que comme mes phrases ne finissent pas par des points, j'aurais pu mettre des a minuscules en début de ligne, ce qui m'aurait permis de mettre un accent sur ce dernier,

A toi pour qui l'intermède signifie plus houblon et bulles que quelques notes de musique,

A vous tous, j'ai grandi dans ce laboratoire, avec vous. Ma vie d'adulte a commencé avec vous. Je n'oublierai aucun de vous. Merci.

\*\*\*

Enfin, il manque quelques pensées pour ceux qui ne liront sûrement jamais ces remerciements mais qui – sans le savoir – ont permis à ces trois années d'avoir un visage différent :

Patrick C. et Léa S., pour la stimulation quotidienne qu'ils m'ont apportée,

Shane C., Michelle L., et quelques autres de m'avoir mâché le travail et fait gagner quelques années,

Jean E. et Guillaume M. pour leurs styles tout à fait différents qui m'ont aidé dans la rédaction de ce manuscrit,

Stanley K., Martin S., Quentin T., Jean-Luc G., Woody A., Roman P., Pedro A., Wes A., Nanni M., et tant d'autres que j'ai pu découvrir ces dernières années, qui m'ont invité à m'évader de mes analyses quelques soirs,

Violetta, Almaviva, Bartholo, Figaro, Platée, la Reine de la Nuit, Zarastro notamment pour leur délicieuses prestations,

Dmitri, Ivan et Alexei qui m'auront tenu la jambe pendant quelques semaines, tout autant que Solal et Ariane, sans oublier Mme Rosa,

Messieurs Bigot de Préameneu, Poralis, Tronchet, Maleville pour leur beau travail de synthèse que j'ai su apprécier à sa juste valeur.

\*\*\*

A tous mes proches et ceux qui continueront l'aventure à mes côtés, je vous adresse des remerciements infinis. Mais je tiens à vous prévenir : la route est encore longue, et je compte bien sur vous pour la faire avec moi !