

Université de Montréal

**Immunogénétique et développement des lymphocytes T
CD4-CD8- immunorégulateurs chez la souris**

par Roxanne Collin

Département de Microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de Ph.D
en Microbiologie et immunologie

Août 2018

© Roxanne Collin, 2018

Résumé

Le système immunitaire a pour rôle essentiel de nous défendre contre les pathogènes, tout en demeurant tolérant au soi. Lorsque la tolérance au soi est rompue, le système immunitaire attaque les antigènes du soi, menant au développement de maladies auto-immunes comme le diabète de type 1. Afin de maintenir une bonne tolérance, et d'ainsi prévenir l'auto-immunité, plusieurs types de cellules T régulatrices sont générées et patrouillent le corps. Parmi ces cellules T, les cellules $CD4^+CD8^-TCR\beta^+$ T (DN T) retrouvées dans les organes lymphoïde périphériques sont particulièrement intéressants considérant leurs uniques fonctions immunorégulatrices antigène-spécifiques. Effectivement, les cellules DN T jouent un rôle important dans l'induction de la tolérance immune, et découvrir de nouvelles façons de moduler leur nombre pourrait aider à prévenir l'auto-immunité. Le but de cette thèse est donc de mieux comprendre les mécanismes régulant l'homéostasie des cellules DN T *in vivo*, et de définir leur voie de développement.

Premièrement, la souris NOD, un modèle de diabète auto-immun spontané, possède un faible nombre de cellules DN T en comparaison à des souris résistantes au diabète auto-immun. Il s'agissait donc d'un modèle de choix pour des études immunogénétiques visant à l'identification des variations génétiques régulant la proportion de cellules DN T. Via l'exploitation de la souris NOD, nous avons déterminé que des locus modulant la proportion de cellules DN T sont inclus dans des locus de susceptibilité au diabète, dont *Idd2* et *Idd13*. Nous avons montré que des variations génétiques présentes dans ces deux locus influencent individuellement la proportion de cellules DN T, et que leur combinaison peu avoir un effet additif sur la proportion des cellules DN T. Ces variations génétiques étaient également associées à une diminution de l'incidence de diabète, suggérant que la modulation de la proportion de cellules DN T est associée à la résistance au diabète auto-immun.

Deuxièmement, nous nous sommes intéressés à l'identification de la voie de développement des cellules DN T. Grâce à l'utilisation de modèles de souris rapporteuses, nous avons déterminé que la majorité des cellules DN T proviennent directement du thymus et y

possèdent un précurseur immature $CD4^+CD8^+$ (DP). Nous avons aussi montré que les cellules DN T sont sélectionnées par un fort signal TCR dans le thymus, un processus connu sous le terme de « sélection agoniste » et associé au développement de cellules T immunorégulatrices. En opposition à d'autres types de cellules T, il est intrigant de noter que les cellules DN T peuvent se développer en absence de molécules du CMH. Ces propriétés uniques pourraient influencer la fonction et la spécificité des cellules DN T.

En conclusion, les résultats de cette thèse montrent que les cellules DN T sont régulées par des locus associés à la résistance au diabète et se présentent avec des aspects de différenciation uniques en comparaison aux autres types de cellules T. Ensemble, nos découvertes mènent à une meilleure compréhension de l'homéostasie et du développement des cellules DN T et pourraient contribuer au développement de futures approches immuno-thérapeutiques.

Mots-clés : cellules DN T, diabète auto-immun, sélection thymique, *Idd2*, auto-anticorps

Abstract

The immune system has the crucial role of defending us against pathogens, while remaining tolerant to self. When self-tolerance is broken, the immune system attacks self-antigens resulting in autoimmune diseases such as type 1 diabetes. To maintain self-tolerance and thereby prevent the development of autoimmunity, several regulatory T cell subsets are generated and patrol our different tissues. Of these, CD4⁺CD8⁻TCRβ⁺ T (DN T) cells found in the peripheral lymphoid organs are particularly interesting due to their unique antigen-specific immunoregulatory functions. Indeed, DN T cells play an important role in the induction of immune tolerance in various pathological settings. Finding new means to modulate the number of DN T cells could help prevent autoimmunity. As such, a better knowledge of the factors modulating DN T cell number is a first necessary step. This thesis is therefore aimed at understanding the mechanisms that regulate DN T cell homeostasis in vivo, as well as defining their developmental pathway.

Firstly, the NOD mouse strain, which spontaneously develops autoimmune diabetes, was shown to exhibit a low number of DN T cells relative to diabetes-resistant strains. It was thus a model of choice to perform immunogenetic studies for identifying genetic variants determining the proportion of DN T cells. By exploiting NOD mice, we determined that some loci contributing to the modulation of DN T cells overlap with diabetes susceptibility loci, including *Idd2* and *Idd13*. We showed that genetic variants in each of these two loci influenced DN T cell proportion, and that their combination can have an additive effect in defining the number and proportion of DN T cells. Interestingly, the diabetes-resistant genetic variants at both the *Idd2* and *Idd13* loci were also associated with a decrease in diabetes incidence in NOD mice *Idd2* and/or *Idd13* congenic strains. This suggests that the regulation of DN T cell proportion is associated with autoimmune diabetes resistance.

Secondly, we aimed to determine the differentiation pathway of DN T cells. Using various reporter mouse models, we find that the majority of DN T cells originate directly from the thymus, specifically by transiting through the immature CD4⁺CD8⁺ (DP) thymocyte stage. We

also show that DN T cells are selected by strong TCR signals in the thymus, a process referred to as agonist selection and associated with the development of other immunoregulatory T cells. Intriguingly, we also observed that, as opposed to other T cell subsets, DN T cells can develop in absence of MHC molecules. These unique properties may influence DN T cell regulatory function and specificity.

In summary, the results presented in this thesis show that DN T cells are regulated by diabetes-associated genetic loci and display unique differentiation properties relative to other T cell subsets. Together our findings provide a better understanding of the homeostasis and differentiation of immunoregulatory DN T cells, which is essential for the development of future immune therapy approaches.

Keywords : DN T cells, autoimmune diabetes, thymic selection, *Idd2*, auto-antibodies

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures	x
Liste des sigles	xi
Remerciements.....	xv
1.0 Le système immunitaire - Généralités	1
1.1 Les mécanismes de tolérance.....	3
1.1.1 La tolérance centrale des cellules T	3
1.1.1.1 La sélection thymique.....	3
1.1.1.2 La présentation antigénique propre au thymus	8
1.1.2 La tolérance périphérique	11
1.2 Les maladies auto-immunes.....	15
1.2.1 L'auto-immunité - généralités et similitudes entre ses manifestations.....	15
1.2.2 Le diabète auto-immun	17
1.2.2.1 Le rôle du système immunitaire.....	19
1.2.2.2 Les facteurs de prédisposition.....	22
1.2.2.3 Les modèles de diabète auto-immun.....	24
1.3 Les analyses d'association génétique.....	31
1.3.1 Principes et considérations.....	32
1.3.2 Les différents types d'analyse d'association génétique	33
1.3.2.1 Les GWAS chez l'humain	33
1.3.2.2 Les études murines à deux lignées parentales : F2 et Backcross.....	35
1.3.2.3 Le Collaborative Cross	37
1.3.3 L'identification et la validation des gènes candidats	38
1.3.3.1 Les souris congéniques	39
1.3.3.2 Les modèles ko et ko conditionnels	40
1.4 Les cellules DN T immunorégulatrices	42

1.4.1 Les cellules DN T dans la tolérance immune	42
1.4.2 La modulation du nombre de cellules DN T	43
1.4.3 L'origine des cellules DN T	45
1.4.3.1 Les étapes du développement thymique	45
1.4.3.2 Positionner les cellules DN T dans le développement thymique.....	50
1.4.4 Les différents types de cellules T CD4-CD8-.....	51
1.5 Raisonnement, hypothèse et objectifs.....	55
Chapitre 2 : Article 1.....	56
2.1 The mouse <i>Idd2</i> locus is linked to the proportion of immunoregulatory double negative T cells, a trait associated with autoimmune diabetes resistance	56
2.2 Abstract	58
2.3 Introduction.....	59
2.4 Materials and Methods.....	61
2.5 Results.....	65
2.6 Discussion	71
2.7 References.....	75
2.8 Figures.....	80
Chapitre 3 : Article 2.....	90
3.1 Genetic interaction between two insulin-dependent diabetes susceptibility loci, <i>Idd2</i> and <i>Idd13</i> , in determining immunoregulatory DN T cell proportion	90
3.2 Abstract	92
3.3 Introduction.....	92
3.4 Materials and Methods.....	96
3.5 Results.....	102
3.6 Discussion.....	109
3.7 References.....	113
3.8 Figures.....	118
Chapitre 4 : Article 3.....	131
4.1 Autoimmunity and antibody affinity maturation are modulated by genetic variants on mouse chromosome 12	131
4.1 Abstract.....	133

4.2 Introduction.....	134
4.3 Material and methods.....	136
4.4 Results.....	140
4.4.1 A locus on mouse chromosome 12 impacts diabetes incidence	140
4.4.2 Reduced autoantibody levels in congenic mice	141
4.4.3 Autoantibody affinity is decreased in 3A9 TCR:iHEL NOD ^k - <i>Chr12</i> congenic mice	142
4.4.4 The decrease in autoantibody levels conferred by the <i>Chr12</i> locus is not limited to the 3A9 TCR:iHEL transgenic model.....	143
4.4.5 The <i>Chr12</i> locus affects antibody affinity maturation upon immunization.....	144
4.5 Discussion.....	145
4.6 References.....	150
4.7 Figures.....	154
Chapitre 5 : Article 4.....	162
5.1 Elucidating the origin of peripheral immunoregulatory CD4-CD8- T cells.....	162
5.2 Abstract.....	164
5.3 Introduction.....	165
5.4 Material and methods.....	167
5.5 Results.....	169
5.5.1 Immunoregulatory pDN T cells from the periphery exhibit a polyclonal repertoire and an activated phenotype.....	169
5.5.2 pDN T cells originate in the thymus	169
5.5.3 Thymic DN T cells directly derive from DP progenitors	171
5.5.4 DN T cells undergo agonist selection during their thymic differentiation	172
5.5.5 MHC-restriction of immunoregulatory DN T cells influences their phenotype and function	173
5.6 Discussion.....	175
5.7 References.....	177
5.8 Figures.....	181
Chapitre 6 : Discussion.....	193
6.1 Le contrôle génétique des cellules DN T et la modulation de leur nombre.....	193

6.1.1 La modulation des cellules DN T par les locus <i>Idd2</i> et <i>Idd13</i>	193
6.1.2 La combinaison de locus dans la modulation des cellules DN T	196
6.1.3 La modulation du nombre de cellules DN T thymiques	198
6.1.4 Exploitation du Collaborative Cross	199
6.1.5 Les variations des cellules DN T chez l'humain	201
6.2 Le développement de cellules DN T.....	203
6.2.1 Pourquoi s'intéresser au développement des cellules DNT.....	203
6.2.2 La sélection thymique des DN T	204
6.2.2.1 Signal TCR et restriction au CMH.....	204
6.2.2.2 Sélection des cellules DN T sur cellules hématopoïétiques.....	206
6.2.3 Une origine DP vs TN des cellules DN T thymiques	207
6.2.4 Les similarités avec les cellules T CD8, une origine SP.....	208
6.2.5 Impact de la voie de développement sur la fonction des cellules DN T.....	209
6.2.6 Parallèles entre les cellules DN T et les cellules mémoires.....	211
6.3 Les modèles d'étude des cellules DN T.....	214
6.3.1 Interférer avec l'apoptose	214
6.3.3.1 Le modèle lpr	214
6.3.3.2 Les souris Bim ko	216
6.3.2 Les modèles TCR transgéniques : interférer avec le répertoire TCR	216
6.3.3 Le modèle CD1d ko : interférer avec le développement des NKT	218
6.4 La quête d'un marqueur unique aux cellules DN T	220
Conclusion et perspectives.....	222
Bibliographie.....	ii
Annexe 1	xxxii
Annexe 2	xxxiii
Annexe 3	xxxiv
Annexe 4	xxxvi
Annexe 5	xxxvii
Annexe 6	lxv
Annexe 7	lxvi
Annexe 8	lxvii

Annexe 9	lxviii
Annexe 10	lxix
Annexe 11	lxxi
Annexe 12	lxxii
Annexe 13	lxxiv
Annexe 14	lxxv
Annexe 15	lxxvi
Autres contributions.....	lxxvii

Liste des figures

Figure 1.	La force du signal TCR et la sélection thymique.....	7
Figure 2.	Rôle des APC thymiques dans l'induction de la tolérance centrale.	9
Figure 3.	Locus associés à l'auto-immunité.....	17
Figure 4.	Comparaison des approches de croisement par lignée F2 et par lignées recombinautes inbred.....	36
Figure 5.	Différenciation des thymocytes vers un stade TCR $\alpha\beta$ conventionnel.....	47
Figure 6.	Facteurs influençant le choix de différenciation CD4/CD8.	49

Liste des sigles

ADN : acide désoxyribonucléique

AIRE : *Autoimmune Regulator*, régulateur de l'auto-immunité

APC : *antigen presenting cell*, cellule présentatrice d'antigène

APECED : *Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy*

B6 : C57BL/6

BB : Rat *BioBreeding*

BC1 : *Backcross*

Bcl-2 : *B cell leukemia/lymphoma 2*

Bcl2l11 : *BCL2 Like 11*

BCR : *B cell receptor*, Récepteur de cellule B

BIM : *Bcl-2 homology 3-only*

CC : *Collaborative Cross*

CDR3 : *Complementary-Determining Region 3*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNV : *Copy Number Variation*, variation du nombre de copies

cTEC : *Cortical Thymic Epithelial Cells*, cellule thymique épithéliale du cortex

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4

DC : *Dendritic cell*, Cellule dendritique

DN T : Cellules T CD4-CD8- double négatives

DN1 : stade thymique DN_i CD44+CD25-

DN2 : stade thymique DN_i CD44+CD25+

DN3 : stade thymique DN_i CD44-CD25+

DN4 : stade thymique DN_i CD44-CD25-

DN_i : Double négatif immature

DP : CD4+CD8+ double positifs

ETP : *Early Thymic Progenitor*

Eomes : *Eomesodermin*

F1 : Filiale 1

F2 : Filiale 2

FOXP3 : *Forkhead Box P3*

GAD : *Glutamic Acid Decarboxylase*

GAD65 : *65-kDa isoform of GAD*

GVH : *Graft Versus Host Disease*, maladie du greffon contre l'hôte

GWAS : *Genome-wide association study*

HEL : *Hen Egg Lysozyme*, lysozyme d'œuf de poule

IA-2 : *Islet Antigen-2*

Idd : *Insulin-Dependent Diabetes*

IDDM : *Insulin Dependent Diabetes Mellitus*

IEL : *Intraepithelial lymphocytes*, lymphocytes T intraépithéliaux

IFIH-1 : *Interferon-Induced Helicase-1*

IFN γ : Interféron Gamma

IL-10 : Interleukine 10

iNKT : *invariant NKT*, NKT invariants

IPEX : Syndrome d'immunodérégulation, polyendocrinopathie, entéropathie auto-immune lié au chromosome X

ko : *knocked out*, déficiente

LADA : *Latent Autoimmune Diabetes in Adults*

LCK : *Lymphocyte Protein Tyrosine Kinase*

LOD : *Logarithm of the Odds*

MAIT : *Mucosal Associated Invariant T*

MAS : *Multiple Autoimmune Syndrome*

MLR : *Mixed Lymphocyte Reaction*, réaction lymphocytaire mixte

mTEC : *Medullary Thymic Epithelial Cells*

NK : *Natural Killer*

NKT : *Natural Killer T*

NLR : *NOD-Like Receptor*

NOD : *Non-obese diabetic*

NOD.Scid : NOD ayant un syndrome combiné d'immunodéficience sévère

NZO : *New Zealand obese*

OVA : Ovalbumine
PAMPS : *Pathogen Associated Molecular Patterns*
PCR : *Polymerase Chain Reaction*, amplification en chaîne par polymérase
pDC : *plasmactoid DC*, DC plasmacytoïdes
pIEL : *IEL precursors*, précurseurs thymiques des IEL
PLZF : *Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger*
pTreg : *peripheral Treg*, Treg induit et périphérie
QTL : *Quantitative Trait Loci*, locus de trait quantitatifs
RAG : *Recombination Associated Genes*
RLG : *RIG-I-like receptor*
RNA-seq : *Ribonucleic Acid Sequencing*, séquençage d'acide ribonucléique
Runx3 : *Runt Related Transcription Factor 3*
siRNA: Petits ARN interférants
Sirp α : *Signal Regulatory Protein Alpha*
SLAM : *Signaling Lymphocytic Activation Molecule*
SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*
STZ : Streptozotocine
TCR : *T Cell Receptor*, récepteur de cellule B
TdT : *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*
TFH : *T Follicular Helper*
TFR : *T Follicular Regulator*
TGF β : *Transforming Growth Factor Beta*
TLR : *Toll-Like Receptor*
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor Alpha*
Treg : cellules T régulatrices
TSA : *Tissue-Specific Antigen*, antigène tissu-spécifique
tTreg : *Thymic Treg*, Treg d'origine thymique
Zbtb7b : *Zinc Finger and BTB Domain Containing 7B*
 α -GalCer : *Alpha-Galactosylceramide*

À ces rêves qui n'attendent que d'être vécus

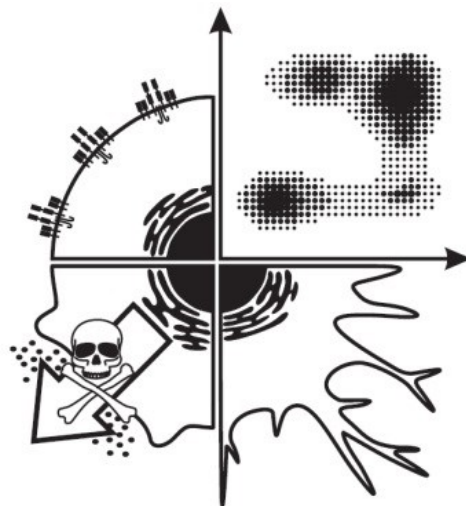
Remerciements

Je tiens d'abord à remercier ma directrice de recherche, Dre Sylvie Lesage, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire lorsque j'étais étudiante au baccalauréat. De cette première expérience à temps partiel jusqu'à ce qui s'est finalement poursuivi en études doctorales, j'ai énormément appris sous ta tutelle. Pendant ces années dans ton laboratoire, j'ai pu découvrir la passion de la recherche, celle qui pousse à tester les « et si » et à éclairer les « on ne sait pas encore ». Et puis, merci de m'avoir permis de travailler sur le meilleur organe du monde, le thymus.

Une grande partie du plaisir que j'ai pris à mes études vient de tous ces extraordinaires collègues que j'ai eu la chance de côtoyer, que ce soit quelques mois ou quelques années. J'ai appris quelque chose de chacun d'entre vous. Un merci particulier à Geneviève, qui a été là pour m'encadrer, et à Véro pour m'avoir transmis son projet de génétique des DN T et ses lignées congéniques. Je dois aussi un immense merci à Adam, qui m'a appris à utiliser R et à avoir moins peur de « la matrice ». Au-delà du support scientifique, tu as été un collègue génial avec ta musique métal, ton extravagance et ton support moral. À ces amis qui ont marqué mon parcours à HMR, vous êtes plus précieux que n'importe quel titre ou diplôme. En particulier Lorie, Cindy et Victor, je vous dois d'avoir vu autre chose au labo (et hors du labo) que seulement la science. Même le meilleur des projets n'aurait pas été pareil sans vous.

La cytométrie ayant été la pierre angulaire de mon doctorat, je dois un immense merci à Martine. Merci pour ton support, tant pour les tris et les trucs pour déboucher les cytomètres que pour m'avoir écouté ressasser les hauts et les bas de mes projets et de la vie en général, et pour avoir été là à parfois scruter les écrans avec moi en attendant de voir LE dot de cellules injectées apparaître. Je vais toujours me souvenir de ton bureau comme d'un havre de paix. Merci également au personnel de l'animalerie d'avoir pris soin de toutes mes souris, si essentielles à la complétion de ce Ph.D.

Enfin, je n'en serais pas où j'en suis aujourd'hui sans le support inconditionnel que mes parents ont toujours apporté. Même lorsque je n'y croyais plus, vous étiez là à m'encourager à continuer. Quelques lignes dans une thèse ne rendent pas justice à ce que vous avez fait pour moi, mais des paragraphes n'y arriveraient pas non plus. Alors merci d'avoir été là, avec le premier livre et le premier microscope, à nourrir mon intérêt pour la science. Merci d'avoir été là depuis le tout début.



Introduction

1.0 Le système immunitaire - Généralités

Le système immunitaire a pour rôle principal la protection contre les agents pathogènes et les cancers. Il peut être divisé en deux composantes : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. La composante innée du système immunitaire inclut des barrières physiques, des substances solubles et des populations cellulaires telles que les macrophages, les neutrophiles, les cellules *Natural Killer*, (NK) et les cellules dendritiques (DC) [1]. Les DC, grâce à leur rôle de cellules présentatrices d'antigène spécialisées, font un excellent lien avec la composante adaptative, qui inclut les lymphocytes T et les lymphocytes B [1, 2]. Les deux composantes du système immunitaire reconnaissent les agents pathogènes grâce à des mécanismes différents. Ainsi, les cellules du système immunitaire inné possèdent des récepteurs, tels que les *Toll-Like Receptor* (TLR), *NOD-Like Receptor* (NLR) et *RIG-I-like receptor* (RLR), reconnaissant des patrons moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) [3]. L'expression de différentes combinaisons de récepteurs par les sous-types cellulaires participe à leur spécialisation dans le combat contre divers agents infectieux, par exemple via la production de cytokines et l'activation du système adaptatif [4]. Les cellules NK possèdent aussi une multitude de récepteurs activateurs et inhibiteurs, dont la balance de signaux peut mener à l'activation de la cellule NK [5]. Notamment, des défauts d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I sont particulièrement associés à l'activation des cellules NK, et ont mené à l'hypothèse du « soi manquant » [6, 7].

Le système immunitaire adaptatif repose, quant à lui, sur le principe de récepteurs spécifique à un antigène, les récepteurs de cellules T (TCR) et les récepteurs de cellules B (BCR). Ces récepteurs sont sélectionnés durant le développement du lymphocyte B dans la moelle ou durant le développement du lymphocyte T dans le thymus. Les BCR et TCR sont issus de réarrangements géniques faits au hasard, et connus en tant que recombinaison V(D)J [8]. Ce processus mène à un répertoire de récepteurs hautement diversifiés qui peuvent reconnaître une multitude d'antigènes. Les lymphocytes B, qui produisent les anticorps, possèdent aussi une caractéristique additionnelle et peuvent modifier leur BCR suite à l'encontre de leur

antigène, menant à une meilleure affinité pour l'antigène (hypermutation somatique) et à une spécialisation du type de récepteur et d'anticorps produit (commutation de classe) [9, 10]. La nature des antigènes reconnus par les récepteurs TCR et BCR diffère également. Spécifiquement, alors que le BCR reconnaît des protéines qui seront internalisées et dégradées [11], le TCR reconnaît plutôt des fragments peptidiques uniquement lorsqu'ils sont présentés par les molécules du CMH [12].

Lorsqu'une cellule T ou une cellule B rencontre son antigène spécifique et reçoit des signaux d'activation, elle peut proliférer et ainsi augmenter le nombre de cellules combattant l'agent cible. En particulier, l'activation des cellules T du système adaptatif repose sur plusieurs signaux, soit la détection via le TCR de son peptide spécifique, présenté dans le contexte du CMH par une cellule présentatrice d'antigène (APC), un signal de costimulation par l'APC, et la présence de cytokines dirigeant la différenciation [13]. L'une des particularités importantes du système adaptatif est cette capacité à générer des cellules T et des cellules B mémoires spécifiques de l'antigène qui persisteront pour une longue période. Les anticorps produits par les cellules B suite à une réaction immunitaire générant de la mémoire peuvent également persister dans le sang [14-18]. Ainsi, après une lente première réponse à un antigène, le système adaptatif répond plus rapidement et plus efficacement à une seconde exposition, même des années plus tard, et protège l'hôte contre les pathogènes déjà rencontrés [14, 19]. C'est ce principe de mémoire immunitaire qui constitue la base du processus de vaccination.

Plusieurs types cellulaires immunitaires, incluant les DC, les cellules T, les cellules B et les macrophages, peuvent être divisés en sous-types possédant des fonctions spécialisées qui peuvent être orientées vers la régulation ou l'inflammation. L'interaction entre les composantes innées et adaptatives du système immunitaire contribue au final à monter des réponses complexes, adaptées à la situation et aux antigènes rencontrés.

1.1 Les mécanismes de tolérance

Le système immunitaire a pour tâche de nous protéger contre les infections et tumeurs, mais il demeure tout de même crucial qu'il puisse également reconnaître et tolérer le soi. La balance entre une réponse immune effectrice et la tolérance au soi ou à la flore commensale nous permet de demeurer en bonne santé. Des défauts de l'un ou l'autre de ces processus, menant à l'immunodéficience, à l'auto-immunité ou à des maladies inflammatoires, peuvent avoir de graves conséquences [20-23].

Alors que l'activation ou la non-activation des cellules immunitaires du système inné repose sur la reconnaissance de PAMPs ou cellules du soi modifiées, les cellules du système adaptatif possèdent des récepteurs antigène-spécifique générés de façon aléatoire et peuvent former une mémoire immunitaire. Ces récepteurs peuvent reconnaître une grande diversité d'antigènes du soi ou du non-soi. La différenciation et l'activation des cellules T et les cellules B se doivent donc d'être soigneusement contrôlée, au risque de favoriser la formation de cellules spécifiquement programmées pour détruire le soi.

1.1.1 La tolérance centrale des cellules T

1.1.1.1 La sélection thymique

Les lymphocytes T peuvent être divisés en deux groupes basé sur le type de récepteur utilisé : les cellules T $\gamma\delta$ et les cellules T $\alpha\beta$. Ces dernières représentent la majorité des cellules T chez l'adulte et expriment principalement un de deux co-récepteurs, soit CD4 ou CD8. Le rôle des cellules T est intimement lié à la spécificité de leur TCR et à son affinité pour les complexes MHC:peptides reconnus.

La présente section de cette thèse se concentre surtout sur les lymphocytes portant le TCR $\alpha\beta$. Ce récepteur est généré lors du développement de la cellule T grâce aux *Recombination-Activating Genes* (RAG) par recombinaison aléatoire des gènes VDJ de la chaîne β du TCR et des gènes VJ de la chaîne α [24]. La recombinaison VDJ est couplée à des insertions aléatoires de nucléotides par la *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* (TdT) qui contribue grandement

à augmenter la diversité du répertoire des cellules T [25-27]. Le processus de réarrangement du TCR a pour avantage de générer une grande diversité de récepteurs, qui permettent de reconnaître une multitude d'antigènes présentés par les molécules de CMH. Or, ce processus aléatoire peut aussi engendrer des réarrangements non-productifs, des récepteurs incapables de reconnaître des peptides présentés par les molécules de CMH, ou encore des récepteurs reconnaissant des peptides du soi avec une trop grande affinité, pouvant mener à l'auto-immunité. Des mécanismes de sélection du répertoire TCR sont heureusement en place afin d'assurer la présence d'un répertoire de cellules T utiles (sélection positive) et non-pathogéniques (sélection négative).

La sélection des cellules T a lieu dans le thymus, un organe qui peut être divisé en deux régions histologiques : le cortex et la médulla [28]. Le cortex est le siège de la sélection positive du TCR, ainsi que d'une première vague de sélection négative [29, 30]. La médulla est quant à elle principalement associée à la sélection négative et à la tolérance centrale [31]. Les thymocytes sélectionnés positivement migrent du cortex à la médulla et y demeurent quelques jours avant d'être exportés vers la périphérie [32].

La maturation des cellules T, abordée plus en détails dans la section 1.4.3.1, peut être sommairement suivie grâce à l'expression séquentielle des co-récepteurs CD4 et CD8. Ainsi, les thymocytes les plus immatures possèdent un phénotype CD4-CD8- (Double Négatif immature, DN_i), puis passent à un stade CD4+CD8+ (Double positif, DP), avant de pouvoir devenir une cellule T CD4+ ou une cellule T CD8+. De tous les précurseurs entrant le processus de sélection thymique, peu en ressortent en tant que cellules T matures. Effectivement, au stade DP, les thymocytes sont testés pour la capacité de leur TCR $\alpha\beta$ à reconnaître des peptides du soi dans le contexte du CMH. Les cellules présentant les peptides du soi à cette étape sont typiquement les cellules thymiques épithéliales du cortex cTECs, qui expriment les CMH de classe I et de classe II, mais des cellules hématopoïétiques peuvent aussi mener à la sélection de cellules T non-conventionnelles [33-37]. À cette étape DP, la majorité des thymocytes soumis à la sélection positive meurt par apoptose suite à un signal TCR trop faible, ou mort par « négligence » [31, 38-40]. Ce processus permet d'éliminer les cellules T inutiles du répertoire. Effectivement, l'interaction avec le CMH est nécessaire à la survie des cellules T en périphérie, et les cellules T, particulièrement les cellules T naives,

doivent donc être aptes à reconnaître le soi lorsque les antigènes en sont présentés par les molécules du CMH [41-46].

Les mécanismes de tolérance centrale thymique permettent de mesurer le degré d'auto-réactivité du TCR des cellules T ayant été sélectionnées positivement. Alors que des cellules T incapables de reconnaître le soi sont éliminées, il importe toutefois que cette interaction entre le TCR et le soi demeure de faible affinité en comparaison à l'interaction avec des peptides du non-soi. L'export de cellules T réagissant fortement au soi pourrait en effet mener à leur activation inappropriée et à la formation d'une réponse auto-immune. Suite à la sélection positive, les cellules T CD4 et T CD8 migrent vers la médulla, où elles interagissent à nouveau avec diverses APC présentant des peptides du soi dans le contexte des molécules de CMH [31]. Selon la force de l'interaction de leur TCR avec les complexes peptide-CMH présentés par les APC thymiques, les cellules T subissent différents sorts, afin de favoriser l'export d'un répertoire TCR non-pathogénique [47]. Les cellules T ayant une trop forte affinité pour le soi peuvent entrer en apoptose et être éliminées (délétion clonale) par le processus de sélection négative. L'anergie ou l'édition du récepteur font aussi partie des mécanismes de tolérance permettant d'éviter que des cellules auto-réactives n'attaquent le soi [48-51]. Le terme «auto-réactives» référerait ici aux cellules T réagissant très fortement au soi et étant potentiellement pathogéniques, en distinction avec la spécificité pour le soi intrinsèque aux cellules T.

Il peut aussi arriver qu'une cellule T se présente avec une affinité pour le soi supérieure au seuil normalement associé à la sélection positive, mais légèrement inférieur à la sélection négative. Ce type de sélection, appelé sélection agoniste, est particulièrement associée à la génération des cellules T régulatrices (Treg) exprimant le facteur de transcription *Forkhead Box P3 (Foxp3)*. Un fort signal TCR n'est toutefois pas suffisant pour générer une population de cellules Treg. Le développement thymique des Treg requiert également un signal de costimulation via l'interaction entre CD28 et B7 [52, 53]. La présence de la cytokine IL-2, ou encore d'IL-15, permet ensuite aux précurseurs possédant un phénotype CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ de devenir des cellules FoxP3⁺ grâce à l'activation de STAT5 [54-56]. La nécessité de l'une ou l'autre de ces cytokines dans le développement thymique des Treg est aussi supportée par la diminution de Treg dans le thymus de souris déficientes pour IL-2R β , la chaîne commune aux

récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15, bien que l'effet soit modeste dans les souris déficientes pour l'IL-2R α (CD25) [57].

Dans le thymus, certaines APC, comme les cellules B et les cellules thymiques épithéliales de la médulla (mTECs) favorisent la génération de cellules Tregs et la sélection agoniste plutôt que seulement la déletion [58]. De plus, alors que des antigènes exprimés de façon ubiquitaire induiront la tolérance par déletion clonale lors de la sélection négative, les antigènes présentant un patron d'expression limité semblent plutôt favoriser la production de Tregs [59]. La sélection agoniste et la génération de Treg thymique s'ajoute donc aux mécanismes de tolérance induite dans le thymus.

En plus des Treg, d'autres types cellulaires se développent par sélection agoniste, tels les *Natural Killer T* (NKT), les *natural T-Helper-17* (nTh17) et les lymphocytes T intraépithéliaux (IELs) CD8 $\alpha\alpha$ (Figure 1) [60-66]. Ces 4 types cellulaires ont en commun un fort signal TCR lors de la sélection thymique. À la suite de la réception de ce fort signal TCR, il a aussi été montré que la présence de TGF- β facilite la survie des NKT, Treg, nTh17 et des précurseurs de cellules IEL CD8 $\alpha\alpha$ [66-70]. Les facteurs de transcription importants dirigeant la différenciation de ces types cellulaires incluent PLZF pour les NKT, Foxp3 pour les Treg et ROR γ t pour les nTh17 [61, 71, 72]. Les NKT, en plus de nécessiter un signal de costimulation comme les cellules Treg, sont dépendants d'interactions avec les cellules hématopoïétiques via les molécules *Signaling Lymphocytic Activation Molecule* (SLAM) et la tyrosine kinase Fyn [73-77].

Le rôle tolérogène ou effecteur des cellules T sélectionnées de façon agoniste se joue principalement en périphérie, même si les Tregs comme les NKT présents dans le thymus y influencent le développement d'autres thymocytes [78, 79].

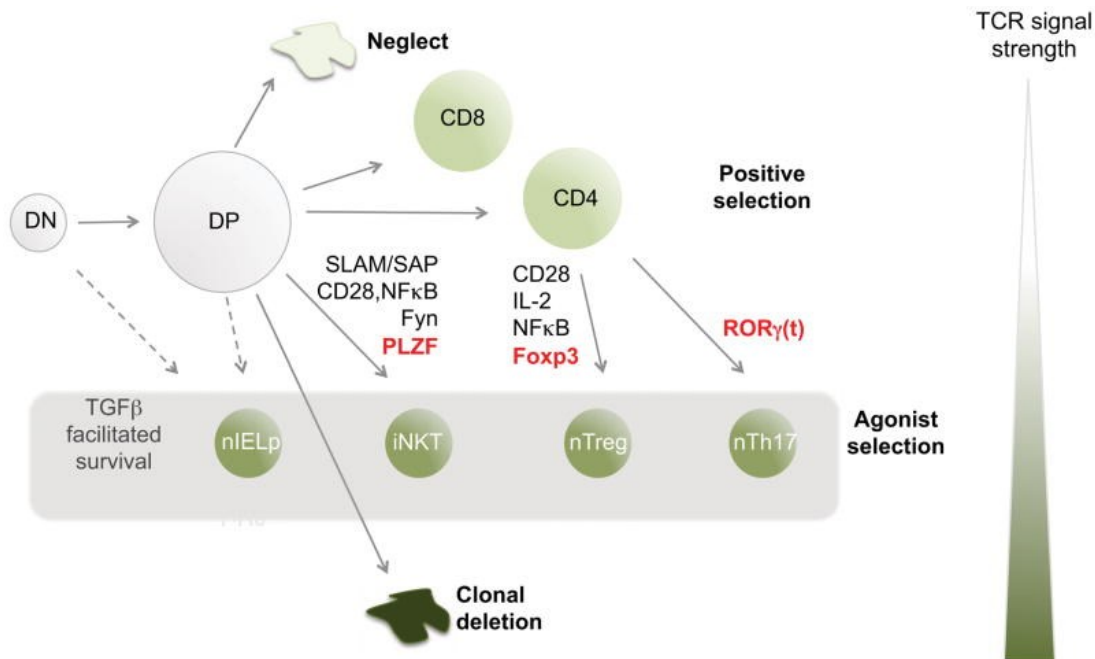


Figure 1. La force du signal TCR et la sélection thymique. Association entre la force du signal TCR reçu par les thymocytes et le résultat de leur différenciation. Un fort signal TCR (agoniste) est associé à la différenciation des cellules pIEL, NKT, Treg et nTh17 dans le thymus, comparativement au signal TCR menant à la sélection positive des cellules T CD4 et T CD8. Tiré de [61].

Les cellules T sélectionnées de façon agoniste possèdent une signature particulière reflétant leur réception d'un fort signal TCR. Notamment, le marqueur CD5 est exprimé à la surface des cellules T, et son niveau d'expression semble refléter directement la force du signal TCR reçu lors de la sélection thymique [80-82]. Spécifiquement, ce marqueur est exprimé plus fortement sur les cellules sélectionnées positivement que sur les thymocytes immatures n'ayant pas reçu de signal TCR [80]. CD5 est d'ailleurs connu comme étant plus fortement exprimé à la surface des cellules Treg, en comparaison aux cellules CD4 T [83, 84]. De façon similaire à CD5, Nur77 est aussi induit spécifiquement par un signal TCR et est fortement présent dans les cellules Treg du thymus, de même que dans les précurseurs de NKT et dans les NKT ayant rencontré l'un de leurs antigènes agonistes, l'alpha-galactosylceramide (α -GalCer) [85]. De potentiels précurseurs thymiques des IEL CD8 $\alpha\alpha$ (pIEL) expriment aussi de hauts niveaux de Nur77 [86], suggérant une sélection par fort signal TCR. L'expression des marqueurs d'activation CD69 et CD44 par les cellules sélectionnées de façon agoniste est aussi rapportée [61, 87]. Toutefois, il est à noter que CD69 est également exprimé par les

cellules CD4 et CD8 ayant reçu un signal de sélection positive et ne peut donc à lui seul indiquer une sélection agoniste [88, 89]. Ensemble, la signature des Treg, NKT et pIEL, définie par une plus forte expression des marqueurs CD5, Nur77, CD69 et CD44 que les cellules T sélectionnées positivement, indique qu'elles ont rencontré l'antigène pour lequel elles sont fortement spécifiques, mais ne sont pas devenues anergiques.

1.1.1.2 La présentation antigénique propre au thymus

Puisque le thymus est le centre d'induction de la tolérance envers les antigènes du soi qui seront rencontrés en périphérie par les cellules T, il importe que cet organe lymphoïde primaire puisse mettre les cellules T en présence d'une grande diversité d'antigènes du soi. Ce but est atteint via la collaboration des différents types d'APC, incluant des DC, des cTECs, des mTECs et des cellules B, alliées à une machinerie transcriptionnelle particulière au thymus.

Tout d'abord, les mécanismes de préparation des peptides antigéniques dans le thymus possèdent des particularités qui permettent la présentation d'antigènes distincts de ceux retrouvés en périphérie. En périphérie, la présentation d'antigènes par le CMH de classe II facilite la présentation d'antigènes extracellulaires internalisés grâce aux mécanismes de phagocytose, endocytose ou macropinocytose [90]. Dans le thymus toutefois, les peptides présentés par le CMH de classe II peuvent aussi être issus de la macroautophagie, permettant une présentation aux cellules T CD4 d'un répertoire distinct d'antigènes en comparaison avec les antigènes rencontrés en périphérie [31, 91].

Les cellules thymiques exprimant les molécules de CMH peuvent donc présenter une variété de peptides du soi aux cellules T CD4 via le CMH de classe II et aux cellules T CD8 via le CMH de classe I. Des antigènes du soi importés de la périphérie peuvent également être présentés dans le thymus par les DC, les cTECs et les mTECS [92-94].

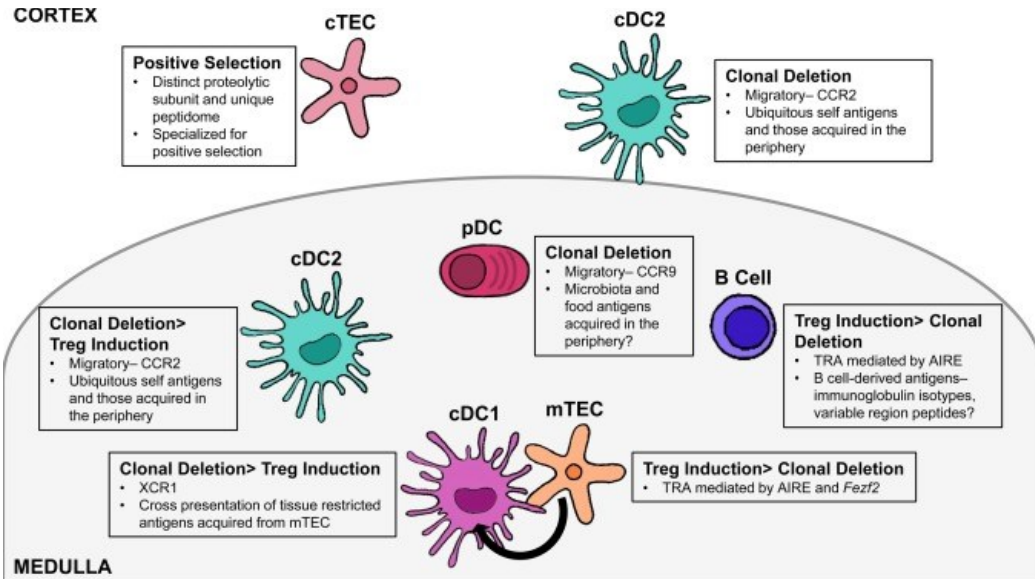


Figure 2. Rôle des APC thymiques dans l'induction de la tolérance centrale. Dans le cortex, les cTECs participent à la sélection positives des cellules T CD4 et T CD8, alors que les cDC2 présentent des antigènes ubiquitaire ou acquis en périphérie et peuvent induire la sélection négative. Les APC de la médulla peuvent induire la délétion clonale ou induire la différenciation de Treg, selon leur mécanisme de présentation de l'antigène. Tiré de [58].

Les différents types d'APC du thymus participent chacune à leur façon à la sélection des cellules T et à l'induction de la tolérance, tel que représenté dans la Figure 2 et discuté ci-après. Spécifiquement, les cTECs participent à la sélection positive dans le cortex et peuvent présenter les auto-antigènes via le CMH de classe I grâce à un protéasome unique au thymus, le thymoprotéasome contenant la sous-unité $\beta 5t$. Les antigènes présentés via le CMH de classe II par les cTECs peuvent quant à eux être apprêtés par la Cathepsine L et la *thymus-specific serine protease* (TSSP). L'utilisation des ces voies protéolytiques spécifiques au thymus et aux cTECs permet la génération d'un répertoire de peptides distinct de ceux qui seront rencontrés par la suite lors de la sélection négative ou une fois en périphérie. En particulier, le thymoprotéasome possède une activité catalytique particulière et produit des peptides possédant une partie C-terminale basique, composée surtout de lysines et d'arginines, et qui sont distincts des peptides à partie C-Terminale hydrophobe produits par les autres protéasomes [95-97]. L'importance du thymoprotéasome et de la Cathepsine L dans la sélection positive sont reflétés par les défauts observés dans les souris déficientes pour l'un ou l'autre, où les cellules T CD8 et T CD4 sont respectivement diminuées [95, 98-102].

Alors que la sélection positive repose sur la présentation de peptides uniques au thymus, la sélection négative a quant à elle pour but d'empêcher les cellules T de réagir de façon inappropriée aux antigènes rencontrés en périphérie. Alors que certains antigènes, dits tissus-spécifiques (TSA) sont connus pour être exprimés par des organes spécifiques, des mécanismes sont en place pour permettre l'expression de ces antigènes dans le thymus, particulièrement lors de la sélection négative qui a lieu dans la médulla. Les TSA incluent par exemple l'insuline, autrement spécifiquement produite par le pancréas [103, 104]. L'expression de l'insuline dans le thymus participe au maintien de la tolérance immune, tel que montré chez la souris par des expériences de délétion conditionnelle de l'insuline au niveau thymique [105], et par l'étude de l'autoreactivité des cellules T en fonction du niveau d'expression d'insuline thymique [106]. Bien que son rôle dans le système immunitaire ne se limite pas à ce seul aspect [107], le régulateur d'auto-immunité (AIRE) joue un rôle important dans l'induction de la tolérance envers les TSAs, puisqu'il permet leur expression dans le thymus par les mTEC [103]. Grâce à leur expression de AIRE, les mTECs sont des joueurs majeurs dans la sélection négative et l'induction de Treg [58, 108]. Classiquement associé aux mTECs, l'expression de AIRE a maintenant été démontrée pour d'autres types de cellules, dont des cellules B, des cellules myéloïdes et des cellules épithéliales, soit présentes dans le thymus [109], soit en périphérie [110-112].

Dans le contexte de AIRE, certains mécanismes, comme la présentation directe d'antigènes par les mTECs, peuvent permettre la sélection négative des cellules T CD8, mais non celle des cellules T CD4. D'un autre côté, les DC du thymus peuvent médier la sélection négative des cellules T CD4 et des T CD8 par présentation d'antigènes transférés des mTECs exprimant AIRE [48, 113]. De plus, un autre facteur de transcription, Fezf2, a aussi été récemment impliqué dans l'expression thymique de TSA. S'ajoutant à AIRE, ces deux facteurs de transcription semblent avoir un rôle non-redondant dans l'expression thymique de certains TSA [114, 115]. Le rôle critique de AIRE dans la tolérance centrale est révélé par l'impact important de mutations à divers endroits dans la séquence de son gène, qui sont associées au syndrome *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy* (APECED) chez l'humain [116]. Chez la souris, l'absence de AIRE mène à une infiltration lymphocytaire

d'organes périphériques tels le foie, le système reproducteur, les glandes salivaires, la rétine et l'estomac ainsi qu'à la production d'autoanticorps dirigés contre des antigènes de ces mêmes organes [103].

Outre les TECs et les DC thymiques, des cellules B jouent aussi un rôle dans la sélection négative des cellules T CD4 et l'induction de cellules Treg [109]. Finalement, des thymocytes DP, présentant des antigènes du soi aux cellules T CD8 via le CMH de classe I, ont été impliqués dans la délétion de cellules T CD8 auto-réactives [117].

1.1.2 La tolérance périphérique

Malgré les mécanismes de tolérance centrale en place, il arrive que des cellules auto-réactives soient exportées vers la périphérie [118]. Ainsi, même chez les individus sains, des clones auto-réactifs de cellules T et des auto-anticorps peuvent être détectés en périphérie autant chez l'humain [119, 120], que chez la souris transgénique [121] ou non-transgénique [122]. Heureusement, différents mécanismes permettent d'éviter l'activation pathogénique des cellules auto-réactives.

Puisque l'activation des cellules T nécessite un signal de costimulation provenant d'une APC, il importe que ce signal ne soit donné qu'à des cellules reconnaissant le non-soi. Les APC, dont les DC, jouent donc un rôle important dans le maintien de la tolérance périphérique. Par exemple, une DC activée par les PAMPs portera à sa surface les molécules de costimulation B7.1 et B7.2 (CD80 et CD86) nécessaires à l'activation des cellules T ayant reconnu l'antigène présenté par la DC. À l'état de base, les DC présentent tout de même des antigènes du milieu via leurs molécules de CMH, mais ne fourniront pas les signaux de costimulation nécessaires à l'activation. Les antigènes du soi n'induisent normalement pas l'activation des DC puisqu'ils ne sont pas reconnus par les récepteurs de l'immunité innée. La présentation d'un antigène du soi par une DC non activée n'induit donc pas l'activation des cellules T, et induira au contraire leur anergie ou leur délétion [123].

Les cellules Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ peuvent aussi contribuer au maintien de la tolérance envers les antigènes périphériques par inhibition directe et indirecte de l'activation de cellules

T auto-réactives [124, 125]. Spécifiquement, l'effet suppresseur des Treg sur les cellules T conventionnelles peut passer par l'inhibition de l'expression des molécules de costimulation sur les DC, par la diminution de la disponibilité de cytokines nécessaires aux cellules T, comme l'IL-2, par l'induction de l'apoptose des cellules T conventionnelles via la production de granzyme, et bien d'autres. Un effet inhibiteur direct des Treg sur les cellules T peut aussi être médié via la production de TGF β ou d'IL-10, des cytokines anti-inflammatoires, par la cellule Treg.

En plus des cellules Treg directement sélectionnées dans le thymus, des cellules T CD4 conventionnelles peuvent être converties en Treg une fois en périphérie, lorsque des conditions particulières sont remplies [126]. Ainsi, en présence de facteurs tels que le *Transforming growth factor beta* (TGF β), l'interleukine 10 (IL-10) et l'acide rétinoïque dans l'intestin, des cellules T CD4 peuvent adopter une fonction régulatrice et induire l'expression de FoxP3, le facteur de transcription associé aux Tregs [127]. Considérant que le TGF β est aussi impliqué dans la différenciation des CD4 T en Th17, un signal par la cytokine IL-2 est également nécessaire à l'induction de FoxP3 par le TGF β [128, 129]. L'IL-7 et l'IL-15 sont ensuite impliquées dans l'homéostasie périphérique des Treg [130].

Les Tregs induits et périphérie (pTreg) complète bien la population des Tregs d'origine thymique (tTreg), et ces deux types semblent avoir un impact tolérogène non-redondant dans des contextes incluant, sans s'y limiter, le diabète auto-immun [131], la tolérance materno-fœtale [132] et la colite [131, 133]. Différents sous-types de Treg semblent de plus pairés avec les différents sous-types de cellules T CD4, ajoutant une balance spécialisée aux divers aspects de la réaction immunitaire. Par exemple, des cellules Treg folliculaires (TFR) font balance aux cellules T CD4 « *Follicular Helper* » (TFH).

En plus des Treg exprimant FoxP3, une population de cellules T CD4 produisant de fortes quantités d'IL-10, nommée Tr1, peut se différencier en périphérie à partir des cellules T CD4 naives en présence d'IL-27 [134, 135], ou in vitro de façon dépendante à l'IL-10 [136, 137]. Ces cellules nécessitent aussi un signal par l'IL-10 via l'IL-10R pour maintenir leur fonction [138]. En comparaison aux tTreg et pTreg, les cellules Tr1 n'expriment que très peu FoxP3 [139, 140], et pourraient se différencier en son absence chez l'humain, tel qu'observé chez des patients atteints du syndrome d'immunodérégulation, polyendocrinopathie, entéropathie auto-

immune lié au chromosome X (IPEX) [141]. Ces cellules Tr1 modulent la réponse immunitaire surtout de manière indépendante de contact via leur production d'IL-10, alors que les Treg utilisent principalement des mécanismes contact-dépendants [142-145]. Les cellules Th3 sont également un type de cellules T CD4 possédant un rôle immunorégulateur induit en périphérie. Ces cellules peuvent être induites suites à une exposition orale à leur antigène [146, 147]. Ces cellules régulatrices produisent du TGF β et peuvent ainsi inhiber la réponse de cellules T CD4 Th1 et Th2 [147, 148]. Les cellules T régulatrices Treg, Tr1 et Th3 participent à la régulation des réponses auto-immunes, allergiques ou inflammatoires, mais la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF β peut en contrepartie favoriser les tumeurs et les pathogènes. Le maintien de la balance entre tolérance périphérique et réponse effectrice est donc crucial.

Il est aussi important de noter que la seconde composante du système immunitaire adaptatif, les cellules B, subit aussi des étapes de tolérance centrale dans la moelle osseuse [149]. De façon similaire aux cellules T, les réarrangements aléatoires du BCR peuvent en effet mener à la génération de clones auto-réactifs. Lors du développement de la cellule B dans la moelle osseuse, le BCR est testé pour sa réactivité au soi. Les antigènes du soi peuvent être reconnus à la surface des cellules de la moelle, ou bien se présenter sous forme d'antigènes solubles [150-153]. La tolérance des cellules B peut être médiée par la délétion clonale, l'édition du récepteur ou l'anergie [149].

De plus, les cellules B possèdent un mécanisme supplémentaire de diversification de la spécificité de leur BCR, l'hypermutation somatique [154, 155]. Ce processus a lieu dans les centres germinatifs après l'encontre d'un antigène ayant activé le système immunitaire adaptatif [156]. L'hypermutation somatique permet l'insertion de mutations dans les gènes encodant le BCR et est associée à la maturation de l'affinité des anticorps [157, 158]. Puisque de nouvelles mutations pourraient mener à une auto-réactivité nouvellement acquise, il importe que des mécanismes de tolérance au soi soient également en place lors de la réaction de centre germinatif afin d'éviter la dissémination de cellules B hautement auto-réactives [159]. Une tolérance centrale des cellules B a donc lieu dans la moelle osseuse lors de leur développement, mais des mécanismes de tolérance périphérique sont aussi en place en

périphérie [149, 150, 152, 153, 160-164]. De façon similaire aux cellules T, différents processus limitent l'export initial de cellules B auto-réactives, et leur persistance en périphérie.

1.2 Les maladies auto-immunes

1.2.1 L'auto-immunité - généralités et similitudes entre ses manifestations

La coopération des différents mécanismes de tolérance centrale et périphérique permet de limiter l'impact de défauts dans l'un ou l'autre des processus. Toutefois, lorsque la combinaison des mécanismes de tolérance centrale et de tolérance périphérique ne parvient pas à contrôler les cellules auto-réactives, ou lorsque ces mécanismes sont défectueux, des maladies auto-immunes peuvent se développer. Par exemple, des mutations dans les gènes *AIRE* ou *FoxP3*, d'importants régulateurs de la tolérance, sont associées à une forte réponse auto-immune [165, 166].

L'auto-immunité est, selon les cas, dirigé contre un organe spécifique, ou est plutôt systémique. Parmi les maladies auto-immunes organe spécifique, on compte entre autre le diabète auto-immun, qui s'attaque au pancréas, la maladie de Graves, qui s'attaque à la thyroïde, la myasthénie grave, qui s'attaque aux muscles, et bien d'autres. Les maladies auto-immunes systémiques incluent par exemple le lupus érythémateux disséminé, la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de Sjögren et la sclérodermie.

Des facteurs génétiques ou environnementaux peuvent influencer la nature de la cible d'une réaction auto-immune. Certaines maladies autoimmunes cibleront donc un organe spécifique, alors que d'autres cibleront un antigène systémique. Des défauts intrinsèques à un organe peuvent en effet contribuer à sa destruction, permettant le début et/ou l'entretien d'une réponse auto-immune. Ainsi, une fragilité des cellules bêta, reliée à la génétique ou à la diète, contribue à l'apoptose des cellules bêta et au développement du diabète chez la souris, et ceci même en absence d'auto-immunité [167]. La flore bactérienne intestinale et sa composition ont aussi été associés à une prédisposition à certaines formes d'auto-immunité [168, 169]. Par exemple, il a récemment été montré que le développement d'une maladie auto-immune systémique associée au Lupus peut être transféré chez la souris par la bactérie *Enterococcus gallinarum* [170].

Certains facteurs de susceptibilité sont partagés par différentes maladies auto-immunes, montrant un lien dans la susceptibilité à l'auto-immunité. Ainsi, le complexe majeur d'histocompatibilité est associé à la prédisposition à différentes maladies auto-immunes telles que le diabète de type 1, la sclérose en plaque, les maladies inflammatoires de l'intestin, le lupus érythémateux disséminé, etc. [171, 172]. Il est intéressant de noter que différents haplotypes du CMH sont associés à différentes maladies auto-immunes, suggérant un rôle de la structure de ces molécules de CMH dans la reconnaissance préférentielle de peptides spécifiques. Chez l'humain comme chez la souris, bien qu'il ne soit pas suffisant à lui seul, le CMH est le facteur génétique conférant la plus grande susceptibilité au diabète auto-immun [173-175].

Des régions génétiques autres que le CMH sont aussi associées à la prédisposition à plus d'une maladie auto-immune, chez la souris et l'humain [176-178]. La figure 3 présente certains de ces locus et les maladies leur étant associées chez l'humain. Plus concrètement, certains patients aux prises avec une maladie auto-immune peuvent présenter une co-occurrence d'autres maladies auto-immunes attaquant des cibles différentes. Lorsque 3 maladies auto-immunes ou plus sont présentes, cette condition est connue sous le terme de syndrome d'auto-immunité multiple (MAS) [179]. L'étude d'une maladie auto-immune et de ses mécanismes peut donc apporter des informations applicables à d'autres types de manifestations auto-immunes.

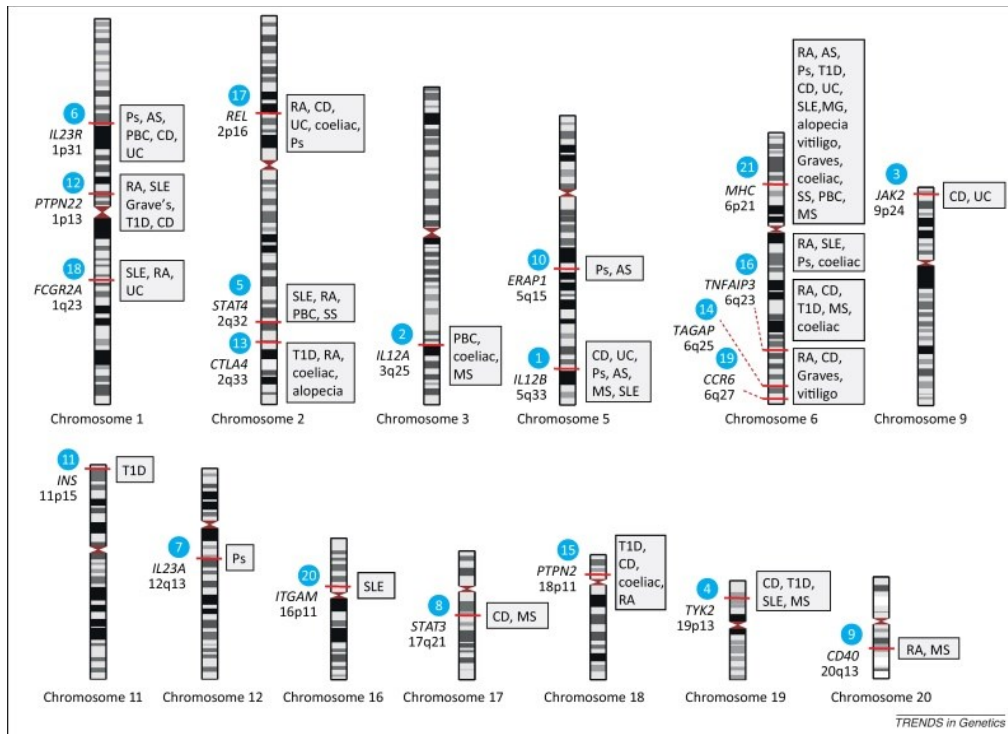


Figure 3. Locus associés à l’auto-immunité. Indication de la localisation de locus de susceptibilité à différentes maladies auto-immunes chez l’humain. Tiré de [176].

1.2.2 Le diabète auto-immun

L’insuline est une hormone produite par les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas. La liaison de l’insuline à ses récepteurs permet l’entrée du glucose, source d’énergie, dans les cellules. Lorsque ce mécanisme d’assimilation du glucose par les cellules est défectueux ou inefficace, le taux de glucose sanguin augmente, et du glucose peut même être anormalement détecté dans l’urine. Diabète est le nom donné à cette maladie chronique caractérisée par une incapacité à contrôler la glycémie. Deux formes principales de diabète sont observées : le diabète de type 1 résultant d’un déficit dans la production de l’insuline, et le diabète de type 2 résultant typiquement d’une résistance à l’insuline [180].

Le diabète de type 1, surtout diagnostiqué chez les enfants ou les jeunes adultes, est une forme auto-immune, où une attaque du système immunitaire mène à la destruction des cellules bêta productrices d’insuline qui se trouvent dans les îlots de Langerhans du pancréas. Chez les

individus atteints de diabète de type 1, il est estimé que 80-95% des cellules bêta sont détruites, mais aussi qu'une réduction moindre peut aussi entraîner de l'hyperglycémie [181]. Selon des données de 2013-2014, environ 3 millions de Canadiens étaient atteints de diabète, dont 90% de type 2 et 9 % de type 1 (Agence de la santé publique du Canada, Système canadien de surveillance des maladies chroniques). Le Canada se trouve parmi les pays avec le plus haut taux de diabète de type 1 [182]. Mondialement, l'incidence de diabète de type 1 est en hausse depuis les dernières années [183-185].

L'injection quotidienne d'insuline exogène permet aux patients atteints de diabète de type 1 de palier à leur défaut de production d'insuline et de contrôler leur niveau de glucose sanguin. Grâce à la recherche, de nouveaux types d'insulines ont été développés, et permettent de mieux contrôler la glycémie des patients atteints de diabète [186]. Le contrôle optimal de la glycémie permet de diminuer les complications liées à la maladie, incluant la rétinopathie diabétique, des maladies cardio-vasculaires et de la néphropathie [185]. La possibilité de transplantation d'ilots encapsulés afin de permettre l'indépendance aux injections quotidiennes d'insuline est également en cours de développement [187]. Toutefois, un traitement permettant de guérir le diabète auto-immun de façon permanente n'est toujours pas disponible. Bien que de plus en plus d'études s'intéressent au rôle de la génétique et de l'inflammation dans le diabète de type 2 [188-191], c'est plutôt du type 1 en tant qu'exemple de maladie auto-immune dont il sera question ici. Finalement, la classification du diabète en deux types, telle qu'utilisée dans cette thèse, est une façon simplifiée de diviser la maladie, et davantage de sous-types de diabète peuvent être identifiés basé sur des critères incluant l'âge au développement de la maladie, l'index de masse corporelle, la fonction des cellules bêta et la résistance à l'insuline et la présence d'auto-anticorps [192]. Ainsi, des études suggèrent que parmi les diagnostics de diabète de type 2 se trouvent des patients adultes plutôt atteints d'une forme auto-immune latente, le Latent Autoimmune Diabetes of the Adult (LADA), dans une proportion pouvant atteindre 12% [193].

1.2.2.1 Le rôle du système immunitaire

Bien avant que le pancréas soit devenu incapable de produire une quantité suffisante d'insuline dont le corps a besoin pour assimiler le glucose, une réaction immune a lieu dans les îlots de Langerhans. Ainsi, des cellules du système immunitaire, incluant des macrophages, des lymphocytes T et B, des cellules dendritiques et des neutrophiles vont progressivement infiltrer les îlots de Langerhans [194-197]. Il est important de noter que cette infiltration est non-uniforme d'un îlot à l'autre, chez l'humain [198] comme chez la souris *Non-Obese Diabetic* (NOD) [199]. Alors que l'infiltration du pancréas par les cellules immunitaires est rare chez les patients non-diabétiques, elle est présente dans un grand nombre d'îlots chez les individus nouvellement diagnostiqués [200, 201]. L'infiltration par le système immunitaire est aussi bien documenté dans la souris NOD, un modèle de diabète auto-immun spontané. Ainsi, alors que le diabète lui-même n'est détecté qu'autour de 12-14 semaines [202], des cellules immunitaires infiltrant le pancréas sont déjà détectées dans les souris NOD âgées de 4 semaines [202], et même aussi tôt que 2 semaines [197]. Les cellules infiltrant le pancréas interagissent ensemble dans la réaction auto-immune. Ainsi, il a été proposé qu'une interaction entre les DC plasmacytoïdes (pDC), les cellules B-1a et les neutrophiles participe à l'initiation du diabète chez la souris NOD, suivant une vague d'apoptose physiologique des cellules bêta qui survient chez les jeunes souris [197].

L'infiltration du pancréas par le système immunitaire constitue un défaut de tolérance, mais ne se solde pas toujours par le développement du diabète. Chez certains animaux, l'infiltration du pancréas est bien présente, mais diffère qualitativement de l'infiltration retrouvée dans des animaux diabétiques ou prédisposés au diabète [203]. D'autres étapes sont donc nécessaires à l'apparition de la maladie. Par exemple, la formation de centres germinatifs dans le pancréas est l'un des aspects associés à une infiltration pathogénique dans certains modèles [203, 204]. Les différents types cellulaires du système immunitaire inné, dont les cellules NK, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les macrophages, et du système adaptatif, dont les cellules T CD4, les cellules T CD8 et les cellules B, jouent un rôle dans la réaction auto-immune qu'est le diabète [197, 205-207]. De plus, les cellules d'îlots d'individus diabétiques possèdent des caractéristiques participant à l'initiation de la réponse immune dirigées contre elles, telle qu'une forte expression du CMH de classe I [208, 209].

Tout d'abord, les cellules T jouent un rôle clé dans l'induction du diabète [210]. L'investigation de la spécificité antigénique de cellules T provenant de souris ou d'humains diabétiques a révélé la présence de clones reconnaissant des antigènes des îlots pancréatiques [211]. La pathogénicité des cellules T dans le diabète est bien mise en valeur lors d'expériences de transfert adoptif de cellules T provenant de souris NOD vers des souris NOD ayant un syndrome combiné d'immunodéficience sévère (NOD.Scid) [212, 213]. Les cellules T CD4 comme les cellules T CD8 jouent toutes deux un rôle dans le développement de la maladie, et l'absence de l'un ou l'autre est associé à une diminution du diabète [214-216]. Ainsi, la co-injection de cellules T CD4 et CD8 s'avère plus efficace à induire le diabète dans les souris NOD.Scid que la seule injection de l'un ou l'autre des sous-types [213, 217, 218]. Les cellules T CD8 sont connues pour leur rôle cytotoxique, et des cellules T CD8 infiltrant le pancréas peuvent directement tuer les cellules β [219]. Les cellules T CD4, selon leur sous-type, produisent différentes cytokines dont les rôles varient d'inflammatoire à régulateur [220]. Par exemple, les cellules Th1 CD4+CD40+ de NOD peuvent induire le diabète lorsque transférés dans des souris NOD.scid, et bloquer la production d'IFN- γ associé aux Th1 peut avoir un effet protecteur chez la NOD [221, 222]. L'inhibition de la production d'IL-17 par les Th17 peut quant à elle protéger contre l'hyperglycémie dans des souris pré-diabétiques, suggérant un rôle pathogénique de l'IL-17 [223]. L'interaction des cellules T CD4 auto-réactives avec les cellules B favorise aussi la production d'auto-anticorps. D'un autre côté, le co-transfert de cellules CD4 Treg permet de protéger des souris ayant reçu des cellules T CD4 auto-réactives dans le modèle BDC2.5 [224].

Les cellules B jouent un rôle important dans le diabète, puisqu'elles peuvent reconnaître spécifiquement les antigènes dérivés des cellules bêta du pancréas, présenter ces antigènes aux cellules T auto-réactives et produire des auto-anticorps une fois activées [225, 226]. Le rôle des cellules B dans la pathogénèse du diabète semble toutefois davantage lié à leur rôle de cellule présentatrice d'antigène qu'à leur rôle de production d'anticorps [227, 228]. Ceci est particulièrement mis en valeur grâce à des expériences chez des souris pour lesquelles les cellules B ne possèdent pas de CMH II (présentation d'antigène altérée) [229], ou chez des souris pour lesquelles les cellules B sont absentes (souris I μ ko) [230]. L'absence de cellules B chez les souris NOD.I μ ko a un rôle protecteur, et diminue grandement l'incidence de

diabète, bien que certaines souris développent tout de même la maladie en présence de cellules T pathogéniques [231, 232]. Chez l'humain, le développement du diabète a aussi été observé dans un patient souffrant d'un déficit sévère en cellules B, l'aggamaglobulémie liée à l'X [233], montrant que ces lymphocytes ne sont pas essentiels au développement de la maladie.

D'un autre côté, les auto-anticorps à eux seuls ne sont généralement pas suffisants pour induire la maladie, et le transfert de sérum de souris NOD ne déclenche pas le diabète lorsqu'injecté à des souris déficientes en cellules B [227]. Toutefois, un rôle de la transmission mère-fœtus d'auto-anticorps a tout de même été observé [234]. De plus, les auto-anticorps dirigés contre les cellules d'ilots, l'insuline et d'autres antigènes pancréatiques conservent une valeur prédictive du développement du diabète chez l'humain, particulièrement lorsque plusieurs type d'auto-anticorps sont présents [235-240]. Finalement, même si les auto-anticorps ne sont pas suffisants pour induire la maladie, les souris NOD chez lesquelles des cellules B sont présentes mais incapables de sécréter des anticorps se présentent avec une incidence de diabète intermédiaire entre celles de souris NOD et de souris NOD.Igμ ko [228]. Comme le diabète est une maladie à trait complexe, il est important de considérer que l'étendue du rôle pathogénique des auto-anticorps peut varier selon le contexte.

Les cellules du système immunitaire inné jouent également un rôle important dans le développement du diabète [241]. Particulièrement, les APC comme les DC ont un rôle critique dans l'initiation de la réponse adaptative auto-immune ou le maintien de la tolérance [123, 242]. Alors que les DC conventionnelles induisent la tolérance des cellules T, d'autres sous-types, tels que les DC mérocytiques [243], participent au bris de la tolérance dans le diabète [123]. Les pDC semblent quant à elles participer à la phase initiale du diabète chez la souris NOD [197]. Toutefois, bien que leur nombre soit augmenté dans des souris NOD et NOD.RAG en comparaison à des souris C57BL/6 (B6) et B6.RAG, les variations dans le nombre de pDC ne sont pas suffisantes au développement du diabète [244]. Les macrophages semblent aussi jouer un rôle dans l'initiation du diabète, puisque ces cellules se retrouvent très tôt dans le pancréas de souris pré-diabétiques [245] et que la déplétion des macrophages chez des souris NOD prévient l'apparition de la maladie [246] [247].

1.2.2.2 Les facteurs de prédisposition

Les facteurs génétiques

Chez la souris comme chez l'humain, plusieurs locus de prédisposition au diabète ont été identifiés, et ont été nommés *Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM)* chez l'humain et *Insulin Dependent Diabetes (Idd)* chez la souris [248, 249]. Entre autre, le locus du CMH apporte la plus forte susceptibilité à cette maladie auto-immune chez la souris et l'humain et représente le premier locus de susceptibilité au diabète identifié dans les deux espèces, soit *IDDM1* chez l'humain et *Idd1* chez la souris) [174, 175] . Les haplotypes du CMH prédisposant au diabète auto-immun chez l'humain et la souris partagent d'ailleurs des similarités structurales. Spécifiquement, les allèles HLA-DQA1*0501–DQB1*0201/DQA1*0301–DQB1*0302 (HLA-DQ2/DQ8) du CMH de classe II chez l'humain, et l'haplotype H-2^{g7} chez la souris portent tous deux des modifications de séquence menant à un changement d'acide aminé non-aspartique à la position 57 de la chaîne β du CMH II [250, 251], un changement associé à la production de cellules auto-réactives [252]. Toutefois, d'autres locus sont nécessaires au développement du diabète, et le CMH à lui seul n'est pas suffisant pour induire la maladie en présence de la combinaison d'autres variations génétiques de résistance au diabète. Des polymorphismes dans le gène de l'insuline lui-même sont aussi impliqués dans la prédisposition au diabète chez l'humain, possiblement médiée par le niveau d'expression de l'insuline dans le thymus selon les allèles [253, 254]. Puisque les Treg sont très importantes dans la régulation de l'auto-immunité, il n'est donc pas surprenant que des polymorphismes affectant la fonction des Treg, soit dans le gène encodant la *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA-4)*, une molécule importante dans la médiation de la fonction des Treg [255] soient associés au diabète chez la souris et chez l'humain [256, 257]. Plus de 20 locus sont impliqués dans la susceptibilité au diabète, tant chez l'homme que chez la souris, et leur identification ainsi que l'identification des mécanismes qui leur sont liés apporte peu à peu davantage d'informations sur cette maladie génétiquement complexe [258, 259].

Les associations environnementales

Bien que la génétique joue un rôle important dans la prédisposition au diabète, et à l'auto-immunité en général, des facteurs environnementaux influenceront aussi le développement de la maladie. Ainsi, des études chez l'humain comparant l'incidence de diabète entre des jumeaux monozygotes (identiques) et des jumeaux dizygote (non-identiques), suggèrent fortement que la génétique, bien qu'importante, n'est pas le seul facteur influençant la prédisposition au diabète. Effectivement, la concordance dans l'incidence de diabète n'est pas de 100% entre des jumeaux identiques, qui partagent les mêmes variantes génétiques, mais est tout de même plus élevée que pour les jumeaux non-identiques, avec des taux de concordance par paires variant de 3% à 14% dans les jumeaux dizygotes et de 13% à 29% dans les jumeaux monozygotes alors que les taux de concordance lorsque l'un des deux jumeaux est atteint varie de 0% à 16 % dans les jumeaux dizygotes et de 23% à 45% dans les jumeaux monozygotes dans des cohortes Nord-Américaine, Italienne, Japonaise et Finlandaise [260-266].

La diète est l'un des facteurs pouvant potentiellement influencer le développement du diabète auto-immun. Chez l'humain, les résultats semblent mitigés, mais certaines études montrent un effet protecteur de la consommation de vitamine D, d'acides gras omégas 3 et d'une exposition tardive au gluten, alors que d'autres études rapportent une absence d'association [267, 268]. L'influence de la diète sur le développement du diabète auto-immune est aussi mise en valeur par des expériences chez la souris NOD, montrant qu'une diète pauvre en glycotoxines était associée à une diminution de l'incidence de diabète [269].

L'exposition à des pathogènes est un autre mécanisme pouvant contribuer au développement d'une réaction auto-immune. Par exemple, une exposition à des entérovirus, comme le virus coxsackie est potentiellement associée au développement du diabète auto-immun chez l'humain [267, 270, 271]. Toutefois, il a aussi été montré que l'exposition à ce virus dans de jeunes souris NOD avec une insulite limitée avait un rôle protecteur, mais que le même virus accélérât le diabète dans des souris possédant des niveaux plus élevés d'insulite [272, 273]. Un mécanisme proposé pour expliquer le lien entre des infections et l'augmentation de l'auto-immunité est le mimétisme moléculaire, c'est-à-dire que des peptides dérivés d'un pathogènes et ceux dérivés d'un antigène du soi pourraient être suffisamment similaires, ou même

identiques, pour être reconnus par les mêmes cellules T. Des cas de mimétisme moléculaire ont été observés envers des antigènes pancréatiques, notamment entre le *Islet antigen-2* (IA-2) ou le *Glutamic acid decarboxylase* (GAD) et des peptides dérivés de différents virus [274] et entre le cytomégalovirus et l'isoforme de 65 kDa de GAD (GAD65) [275]. Les infections virales, comme les entérovirus, peuvent aussi migrer au pancréas et affecter directement les cellules pancréatiques [276]. Le relâche d'auto-antigènes suite à des dommages et de l'inflammation induits par les virus pourrait contribuer au développement de l'auto-immunité [277]. Comme pour bien des aspects concernant l'effet environnemental sur le développement du diabète, les résultats d'associations entre les virus et la maladie sont controversés, et semblent pouvoir être protecteurs ou néfastes et dépendre du contexte [278, 279]. D'ailleurs, des polymorphismes de *l'Interferon-Induced Helicase-1* l'IFH1, impliqué dans la réponse virale, sont associés à la prédisposition au diabète, supportant un lien entre la réponse aux infections virales, le baggagé génétique et le développement du diabète [280-282].

1.2.2.3 Les modèles de diabète auto-immun

Le diabète auto-immun demeure à ce jour sans traitement curatif permanent. Il importe donc de poursuivre la recherche afin de mieux comprendre le développement de cette maladie et les moyens de la guérir. Comme le diabète est une maladie complexe, contrôlée à la fois par la génétique et l'environnement, les modèles animaux sont utiles pour simplifier l'étude des mécanismes associés à la maladie ou à son traitement.

1.2.2.3.1 La souris NOD

Bien que plusieurs modèles de diabète existent, la souris NOD est l'un des modèles couramment utilisé pour l'étude du diabète auto-immun. Initialement développée dans le contexte d'un modèle prédisposé aux cataractes, la souris NOD s'est en fait révélée posséder une forte prédisposition au diabète [202]. Contrairement à d'autres modèles murins ayant recours à des injections de produits détruisant les cellules productrices d'insuline, la souris NOD développe le diabète de façon spontanée. L'incidence de diabète atteint ainsi environ 80% chez les souris NOD femelles avant l'âge de 30 semaines (www.jax.org), mais peut

varier selon les études [202]. Le diabète chez la souris NOD constitue un modèle présentant plusieurs similarités avec la maladie se développant chez l'humain. Par exemple, il s'agit d'une maladie auto-immune, où le système immunitaire infiltre les îlots de Langerhans. La souris NOD développe aussi, à l'instar de l'humain, des auto-anticorps dirigés contre l'insuline, bien que ceux-ci ne soient pas directement pathogéniques en eux-mêmes [227]. Finalement, l'haplotype H-2^{g7} du CMH exprimé par la souris NOD présente des similarités avec l'haplotype du CMH prédisposant au diabète auto-immun chez l'humain [250, 251]. Ce modèle peut donc s'avérer utile lors de l'étude des mécanismes liés au rôle du CMH dans le développement du diabète auto-immun. Des variations dans le nombre ou la fonction de populations immunitaires de cellules T et de DC ont de plus été observées chez la souris NOD [248], dont certaines associées à des locus de prédisposition au diabète [290-293], montrant l'importance de chaque type cellulaire dans le contrôle génétique du maintien de la tolérance immune.

La souris NOD n'est toutefois pas un modèle parfait, et diffère de l'humain sur quelques points. Contrairement à une incidence relativement équivalente entre hommes et femmes chez l'humain, ou alors augmentée chez les hommes pour les adultes [294], l'incidence de diabète chez les souris NOD mâles est inférieure à celle observée chez les femelles [202]. Cette réduction dans la susceptibilité des souris mâles au diabète chez la souris NOD par rapport aux femelles a été attribuée à l'influence des hormones sexuelles et du microbiome [295]. Un autre aspect différenciant entre la souris et l'humain est la structure même des îlots de Langerhans : chez la souris les cellules bêta sont situées vers l'intérieur de l'îlot, entourées par une zone de cellules alpha ; chez l'humain, les cellules alpha et bêta sont distribuées plus aléatoirement dans l'ensemble de l'îlot, dans des motifs très différents de la souris [296, 297]. Des différences au niveau fonctionnel ont aussi été rapportées entre les cellules bêta de l'humain et de la souris [297]. Ainsi, des découvertes touchant à l'arrangement cellulaire des cellules bêta au sein des îlots pourraient ne pas être applicables à l'humain lorsque découvertes dans les modèles murins tels que la souris NOD. Finalement, la souris NOD développe le diabète après avoir atteint sa maturité sexuelle, alors que chez l'humain le diabète auto-immun peut se déclarer très tôt dans la vie d'un patient [294]. Cette différence dans l'âge d'apparition de la

maladie est aussi une limitation potentielle de la souris NOD à l'application chez l'humain de découvertes liées aux hormones et à leur rôle dans le déclenchement du diabète.

Si les thérapies mises au point chez la souris ne sont pas toujours un succès chez l'humain, par exemple anakinra (antagoniste du récepteur à l'IL-1) ou teplizumab (anti-CD3 monoclonal) qui ont échoués à se montrer efficace en essai clinique à but curatif [258, 298], la souris NOD et les lignées qui en sont dérivées se sont tout de même révélées comme des outils précieux dans l'étude des différences immunitaires associées au développement du diabète [258, 299]. L'étude du contrôle génétique du diabète auto-immun chez la souris NOD a d'ailleurs révélé plus de 20 locus de susceptibilité au diabète, nommés *Iddet* certains de ces locus s'avèrent orthologues à des locus de susceptibilité au diabète identifiés chez l'humain [248].

1.2.2.3.2 Le modèle TCR 3A9 :insHEL

Le développement du diabète dans la souris NOD est un trait complexe, dominé par le locus du CMH. L'utilisation d'un modèle où le CMH ne serait pas le facteur principal influençant le développement du diabète, mais qui préserverait à la fois les autres locus de susceptibilité au diabète de la souris NOD, permettrait possiblement l'identification de mécanismes reliés à ces autres facteurs de susceptibilité. Par exemple, l'haplotype H-2^k du locus du CMH ne prédispose pas au diabète lorsqu'introduit chez la souris NOD, alors nommée NOD.*B10-H2^k* et ici nommée par sa forme courte, NOD.*H2^k*. Toutefois, il est possible de favoriser le développement du diabète chez la souris NOD.*H2^k* en introduisant des cellules T auto-réactives sélectionnées spécifiquement par cet haplotype du CMH et spécifiques pour un antigène du pancréas [203].

Ceci peut être accompli grâce à l'insertion dans le génome de la souris de deux transgènes complémentaires : le TCR 3A9 permettant la production de cellules T spécifiques pour un peptide du lysozyme d'œuf de poule (HEL) présenté par le CMH de classe II ; et le transgène insHEL permettant l'expression de HEL sous le contrôle du promoteur de l'insuline. Ce modèle TCR 3A9:insHEL est donc permissif à la production de cellules T spécifiques pour un antigène exprimé dans le pancréas, ce qui peut mener à une destruction des cellules bêta.

Toutefois, le fond génétique de la souris chez laquelle ces deux transgènes sont introduits influence les mécanismes de tolérance, et l'introduction des deux transgènes dans différentes lignées de souris mène à des taux d'incidence de diabète auto-immun différents. Ainsi, la lignée B10.BR, dont le fond génétique est similaire à la lignée C57BL/6 (B6), est relativement résistante au diabète même lorsqu'elle possède les deux transgènes. La lignée TCR 3A9:insHEL NOD.*H2^k* est quant à elle fortement prédisposée au diabète, avec une incidence atteignant environ 80% [203]. Ce modèle a l'avantage de permettre l'étude de cellules T spécifiques à un antigène connu, et ceci en présence ou en absence dudit antigène, puisque les deux transgènes sont indépendants. En absence du transgène insHEL, les cellules portant le TCR 3A9 ne sont pas considérées comme auto-réactives, et il n'y a pas développement du diabète. Dans le thymus des souris TCR 3A9 :insHEL toutefois, la sélection négative des cellules T a lieu [203], puisque HEL, étant exprimé sous le contrôle du promoteur de l'insuline, est présent dans le thymus en tant qu'auto-antigène [300]. D'ailleurs, un défaut de la sélection négative chez la souris NOD a été observé dans ce modèle [203].

Dans le modèle TCR 3A9:insHEL, l'infiltration des cellules du système immunitaire dans le pancréas est quantitativement comparable entre la lignée TCR 3A9 :insHEL B10.BR résistante au diabète, et la lignée TCR 3A9 :insHEL NOD.*H2^k* prédisposée au diabète [203]. A l'opposé, les souris B6 non-transgéniques ne présentent pratiquement pas d'infiltration de lymphocytes dans leurs îlots pancréatiques, alors que la lignée NOD possède une forte infiltration [301]. D'ailleurs, la prévention de l'insulite chez la lignée NOD est l'un des facteurs participant à la protection au diabète par certains locus, comme le locus *Idd5* [202, 302, 303]. La présence des transgènes TCR 3A9 :insHEL favorise donc l'infiltration du système immunitaire dans le pancréas, mais la quantité de cellules infiltrant le pancréas n'y est pas associée au développement du diabète. Cette différence avec les lignées non-transgéniques NOD et B6 doit être prise en compte lors d'études d'incidence de diabète et d'analyses histologiques. Ainsi, bien que le degré d'infiltration soit similaire entre les lignées B10.BR et NOD.*H2^k* portant le même transgène TCR 3A9:insHEL, la nature de l'infiltration diffère entre les deux fonds génétiques et des centres germinatifs peuvent être retrouvés dans les îlots des souris transgéniques NOD.*H2^k* mais pas B10.BR [203]. Il est donc possible d'étudier, grâce à ce modèle transgénique, les paramètres génétiques et biologiques menant à une réaction auto-

immune pathologique au sein du pancréas, en comparaison à une réaction immune ne menant pas au diabète.

La comparaison du modèle transgénique à la littérature portant sur des lignées de souris non-transgéniques a aussi permis d'associer le rôle de différents locus *Idd* à la protection de l'infiltration initiale du pancréas par le système immunitaire, ou à la protection de la réaction pathogénique suite à l'infiltration [304].

L'une des autres particularités du modèle TCR3A9 :insHEL est la pathogénicité des auto-anticorps et le biais de sélection de cellules T CD4 auto-réactives [203, 305] . Cet aspect est important, puisque des locus génétiques impliqués dans la production d'auto-anticorps et l'activation subséquente des cellules T CD4 autoréactives peuvent être associés à la susceptibilité au diabète dans le modèle TCR 3A9 :insHEL, alors qu'ils ne le seraient potentiellement pas autant dans un contexte non-transgénique NOD. Finalement, il est connu que l'introduction d'un TCR transgénique modifie la sélection des cellules T, puisque le TCR transgénique est exprimé à un stade précoce du développement des cellules T. En plus de favoriser spécifiquement la production de cellules T CD4 dans ce modèle où le TCR 3A9 est restreint au CMH de classe II, la présence de TCR transgéniques mène à une augmentation de la production d'un sous-type cellulaire autrement rare dans les souris non-transgéniques : les cellules T CD4-CD8- double négatives (DN T). Ces cellules T sont très importantes dans la tolérance immune, et il en sera davantage question dans la section 1.4.

Ainsi, l'introduction des transgènes TCR 3A9 et insHEL permet de simplifier l'étude du diabète, et d'identifier les facteurs de susceptibilité associés à un contexte d'auto-réactivité des cellules T restreintes au CMH de classe II. Toutefois, vu les particularités du modèle, l'importance relative des mécanismes de tolérance chez les souris TCR 3A9 :insHEL peut différer de ce qui est observé chez la souris NOD.

1.2.2.3.3 Les autres modèles de diabète

Outre une attaque du pancréas par le système immunitaire, d'autres causes peuvent engendrer la destruction des cellules bêta du pancréas. Une destruction chimique, induite par des pathogènes ou encore une pancréatectomie peuvent ainsi permettre le développement du

diabète par défaut de production d'insuline. Lors d'études effectuées chez l'animal, le choix de modèle de diabète doit donc être choisi avec soin selon les objectifs de recherche, que ce soit d'investiguer les mécanismes menant au développement de la maladie, ou encore de développer de nouvelles thérapies.

Les modèles d'injection de streptozotocine (STZ) chez la souris prennent avantage de la sensibilité des cellules bêta aux radicaux libres pour détruire sélectivement les cellules productrices d'insuline et entraîner l'hyperglycémie. La STZ se lie aux transporteurs du glucose GLUT-2, et produit des dommages par radicaux libres dans les cellules bêta des îlots du pancréas [283, 284]. Le modèle d'induction du diabète par injections de STZ peut être divisé en deux, selon le dosage de la toxine. Le modèle à forte dose, où une seule dose de 100-200 mg/kg par souris est injectée, et le modèle de faible dose, où des doses de 20-50 mg/kg par souris par jour sont injectées sur une période de 5 jours (www.jax.org) [285, 286, 289]. Alors que le modèle à forte dose détruit rapidement les cellules bêta de façon chimique, le modèle à faible dose entraîne plutôt une destruction lente, dépendante de la production de cytokines par les cellules immunitaires incluant les macrophages, qui sont les premières cellules à infiltrer les îlots dans ce modèle [287]. Le modèle de STZ à faible dose est davantage intéressant d'un point de vue de l'étude des mécanismes de développement du diabète que le modèle à forte dose, puisque la destruction des cellules bêta peut être médiée par système immunitaire. Toutefois, les cellules T et les cellules B ne sont pas essentielles au développement de l'hyperglycémie induite par le traitement STZ, tel que démontré par le développement du diabète dans des souris SCID [288]. Ceci représente un inconvénient au modèle STZ dans le contexte de l'étude du diabète en tant que maladie auto-immune. Tout de même, le modèle STZ a pour avantage d'être relativement rapide à induire lorsque comparé à des modèles spontanés tels que la souris NOD. La susceptibilité à l'induction de l'hyperglycémie varie également selon la lignée de souris utilisée, faisant de ce modèle une approche pertinente pour l'étude des facteurs de prédisposition génétiques [289].

En plus de la souris, des modèles de diabète existent chez le rat. Les rats BioBreeding (BB), de façon similaire à la souris NOD, développent le diabète de façon spontanée. Les rats BB se présentent avec une lymphopénie caractérisée par un faible nombre de cellules T,

particulièrement les cellules T CD8, ce qui constitue un inconvénient lors de l'étude de la contribution des cellules T CD4 et CD8 au diabète [286]. Toutefois, le développement du diabète chez le rat BB ne diffère pas entre les mâles et femelles, ce qui constitue une ressemblance avantageuse avec l'humain [286]. Enfin, tel que mentionné dans la section 1.2.2.2, un rôle des infections virales dans le développement du diabète a été suggéré chez l'humain [267, 270, 271]. Les rats BB sont d'ailleurs susceptibles à l'induction du diabète après infection avec des virus comme parvovirus et cytomégalovirus [306].

Pour chacun des modèles, résumés dans le tableau 1, l'étude d'aspects spécifiques de la maladie peut être faite en utilisant des variations génétiques comme des lignées congéniques chez la souris NOD et le rat BB, des animaux ko ou des animaux transgéniques, ou simplement en variant les fonds génétiques dans les expériences de STZ et d'induction virale.

Tableau 1. Résumé des modèles murins de diabète

Modèle	Mécanisme	Avantages	Inconvénients
Souris NOD	Spontané	Modèle spontané de susceptibilité génétique Plusieurs homologues génétiques avec l'humain Diabète dépendant du système immunitaire	Biais du sexe dans la prédisposition au diabète; difficulté de maintenir les colonies
Induction chimique par STZ à haute dose	Destruction des cellules bêta par toxicité	Modèle rapide à mettre en place ; possible d'étudier la régénération des cellules bêta	N'est pas médié par le système immunitaire ; dommages possibles au foie en cas de dose inappropriée
Induction chimique par STZ à faible dose	Destruction initiale chimique, induction d'insulite par infiltration du système immunitaire et production de cytokines	Modèle rapide à mettre en place ; médié en partie par le système immunitaire ; composante de prédisposition génétique	Ne dépend pas des cellules T et B ; La dose nécessaire varie selon le sexe et le fond génétique ; Femelles moins susceptibles
Induction de la destruction des cellules bêta par virus	Destruction directe par le virus, ou indirecte par une réponse auto-immune		
Rat BB	Spontané	Parallèles génétiques avec l'humain ; susceptibles au diabète induit par virus ; diabète médié par le système immunitaire	Lymphopénie

1.3 Les analyses d'association génétique

Les variations génétiques entre individus sont une grande source de diversité dans l'expression de différents traits phénotypiques. La prédisposition aux maladies auto-immunes, la teinte de la peau, la grandeur, la couleur des yeux ou le nombre de cellules parmi certaines populations du système immunitaire ne sont que quelques exemples [307-312]. Bien que l'environnement soit de plus en plus reconnu pour son rôle dans certains phénotypes, la contribution du génome demeure un facteur important influençant le système immunitaire. De plus, certains paramètres immunitaires semblent davantage influencés par la génétique que par la composante environnementale [313-316].

Les polymorphismes génétiques et les mutations associés à différents traits peuvent apporter beaucoup d'information sur le mécanisme associé auxdits traits. L'identification de gènes associés à des défauts du système immunitaire a grandement aidé notre compréhension des mécanismes d'induction de la tolérance et de différenciation cellulaire. Par exemple, la découverte de mutations entraînant l'IPEX, a mené à l'identification du rôle crucial des cellules Treg, et à l'identification de *Foxp3* un des facteurs de transcription associé à la différenciation des Treg chez l'humain et la souris [72, 317-319]. Une observation similaire, où des souris dites « *helper T cell deficient* » présentaient un défaut de production de cellules T CD4, a mené à l'identification du gène *Zinc Finger and BTB Domain Containing 7B* (*zbtb7b*), aussi connu sous le nom de *Thpok*, comme régulateur maître des cellules T CD4 [320-322]. Le syndrome auto-immun *Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy* (APECED), causé par une mutation de *AIRE*, a participé à l'identification de cet important régulateur de la tolérance [323]. Sans nécessiter des mutations causales ayant un effet aussi drastique, il est possible d'étudier l'effet de polymorphismes naturellement présents dans les populations. L'une des méthodes permettant de révéler une association entre un polymorphisme génétique et un phénotype est de recourir à une analyse de liaison génétique.

Les analyses de liaison génétique peuvent apporter des informations qui se montrent utiles pour la compréhension de différents mécanismes, mais aussi pour une multitude d'aspects au

niveau clinique. Par exemple, les analyses de liaison génétique peuvent identifier les locus et *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) prédisposant à une maladie et déterminer l'étendue de leur impact sur la probabilité de développer cette maladie. Des outils de surveillance peuvent alors être mis en place afin d'assurer le suivi de patients hautement à risque, par exemple. L'identification de gènes associés à la réponse à un médicament peut également s'avérer utile dans la personnalisation d'approches thérapeutiques en fonction de la génétique des patients.

1.3.1 Principes et considérations

L'approche utilisée pour mener des analyses de liaison génétique varie selon le modèle utilisé, humain ou animal, mais le principe clé demeure le même. Les analyses de liaison génétique consistent donc en trois étapes principales. Tout d'abord, le phénotype des individus sélectionnés est étudié pour un trait donné, que ce soit la présence ou sévérité d'une maladie, la fréquence d'un certain type cellulaire, la réponse à un composé, etc. Des échantillons d'acide désoxyribonucléique (ADN) de tous les individus sont prélevés et analysés pour répertorier les différences génétiques. Finalement, des logiciels spécialisés facilitent l'analyse statistique d'association entre certaines variantes génétiques et les phénotypes étudiés. Les résultats finaux, exprimés en *logarithm of the odds* (LOD) *score*, représentent la probabilité qu'un polymorphisme donné soit associé à une différence de phénotype.

À chacune des étapes du processus, des considérations de conception de l'étude peuvent influencer les résultats. Tout d'abord, l'approche utilisée pour déterminer le génotype des individus peut influencer la précision de l'association entre génétique et phénotype. Ainsi, les études peuvent recourir au séquençage complet du génome ou à l'évaluation de SNP sélectifs distribués à intervalles plus ou moins rapprochés dans le génome (low-density, medium density, high density). L'évaluation de variations dans le nombre de copies (CNV) d'une région génétique est un autre paramètre qui peut être étudié lors des analyses de liaison génétique [324, 325].

Également, la similarité génétique entre les individus inclus dans une cohorte influencera les résultats, puisque seules les régions polymorphiques sont évaluées. Le degré d'héritabilité, la

stabilité dans le temps (âge des sujets) et la sensibilité de détection du phénotype étudié influenceront aussi le pouvoir d'association génétique de l'étude, ou guidera le choix des critères d'inclusion. Finalement, les analyses de liaison génétique utilisent typiquement des échantillons de grande taille, particulièrement chez l'humain. La nature du phénotype étudié en lui-même influencera aussi beaucoup la taille de l'échantillon. Par exemple, il sera plus difficile d'identifier toutes les composantes génétiques d'un trait hautement multigénique comparativement à un trait monogénique. Un échantillon de taille plus élevée sera nécessaire pour des traits multigéniques ou ayant une moindre pénétrance, c'est-à-dire dans les cas où un génotype a un effet variable sur l'expression d'un phénotype [326].

1.3.2 Les différents types d'analyse d'association génétique

Différentes approches d'analyse de liaison génétique existent basé sur la nature de l'échantillon étudié. Différents types seront décrits ici en mettant l'emphase sur les aspects spécifiques aux individus testés. Chez la souris, plusieurs croisements sont possibles afin d'étudier la contribution de polymorphismes génétiques [327]. Les types d'études murines seront donc ici divisés en deux parties, selon le nombre de lignées parentales utilisées lors de la génération de la cohorte étudiée. Indifféremment de l'approche, une étape d'analyse génétique par échantillon d'ADN et une étape d'association statistique seront incluses.

1.3.2.1 Les GWAS chez l'humain

Les études d'association génétiques de type *Genome-wide association study* (GWAS) chez l'humain ont mené lieu à l'identification de plusieurs facteurs de risque génétique pour diverses maladies, comme le diabète auto-immun [175], le diabète de type 2 [188] et bien d'autres [328]. Les études peuvent procéder par cohortes cas-contrôle, qui peuvent être davantage qualitatives, ou en utilisant les variations quantifiables de phénotypes au sein de la population étudiée. Le type d'effet génétique, soit dominant, co-dominant ou récessif, la fréquence et la force de l'effet des allèles associés aux variations de phénotypes, de même que le degré de multigénicité des traits sont tous des facteurs qui contribuent au pouvoir

statistiques d'une étude GWAS [329]. Les études de GWAS incluent typiquement un grand nombre d'individus puisque la population humaine est très diversifiée génétiquement, et étudient l'effet de plusieurs polymorphismes sur le phénotype étudié [329]. Toutefois, certaines populations, par exemple les populations isolées, comprennent des individus plus génétiquement similaires entre eux. Le choix de la population étudiée pour l'association génétique aura donc une influence sur les résultats, dépendant du degré de diversité génétique capturé [330]. Ainsi, dans des populations isolées ou consanguines, où la diversité génétique est limitée, la concentration de variantes génétiques autrement plus rares dans la population générale peut contribuer à l'identification du rôle de ces variantes [331, 332]. Les résultats obtenus d'une telle population ne concorderont toutefois par forcément avec une étude similaire menée dans une autre population isolée ou consanguine, puisque les facteurs génétiques sélectionnés peuvent être différents. Il est aussi possible d'identifier des facteurs de susceptibilité en procédant à des études GWAS sur des populations diversifiées [333, 334].

L'un des facteurs majeurs limitant les études chez l'humain est la variabilité induite par l'environnement, que ce soit l'exposition à des virus, la diète, le style de vie plus ou moins actif, le tabagisme, etc. Ces facteurs, qui s'ajoutent aux différences d'âge et de sexe en plus des variations génétiques, peuvent affecter les populations immunitaires, ou le développement de maladies [335-338]. La plus grande homogénéité environnementale de populations isolées participe aussi dans ces cas à diminuer la variabilité des phénotypes due à des facteurs non génétiques [331]. De plus, les résultats de GWAS chez l'humain, bien que pouvant identifier un grand nombre de variantes génétiques associées à un risque de développer une maladie, ne peuvent identifier l'ensemble des facteurs de risque. Effectivement, plusieurs maladies, comme le diabète, sont hautement multigéniques, et chaque facteur génétique pris individuellement contribue relativement peu à la susceptibilité. De plus, il convient de toujours se souvenir que les régions génétiques identifiées sont associées au trait étudié, et ne sont pas forcément causales [328].

Les études via les modèles murins pourront permettre de pallier à certaines des difficultés rencontrées lors des études d'association génétique chez l'humain, comme l'impact de l'environnement et la très grande diversité génétique nécessitant une grande taille d'échantillon.

1.3.2.2 Les études murines à deux lignées parentales : F2 et Backcross

La plupart des lignées de souris de laboratoire communément utilisées sont constituées d'individus « *inbred* », c'est-à-dire que les souris individuelles d'une même lignée sont pratiquement génétiquement identiques entre elles [339]. Lors d'études de liaison génétique chez la souris, il faut donc d'abord générer des individus génétiquement différents. La première étape consiste à choisir deux lignées parentales génétiquement et phénotypiquement différentes. Il importe de choisir les lignées parentales présentant le plus grand écart de phénotype possible. Par exemple, pour plusieurs phénotypes, les souris NOD et B6 s'avèrent différentes. Des lignées issues de ces fonds génétiques, incluant parfois un locus congénique, un transgène ou un KO, ont été utilisées comme lignées parentales lors d'analyses de liaison génétiques portant sur le contrôle génétique de populations immunitaires [244, 291, 340-343]. L'utilisation de lignées parentales congéniques pour un locus majeur influençant les traits étudiés s'avère par exemple très utile pour identifier des locus mineurs participant à l'autre fraction du contrôle génétique. Effectivement, lorsque les lignées parentales sont identiques à un locus génétique donné (congénique, ou naturellement non-polymorphique), mais présentent tout de même une différence importante de phénotype, les variations dans les phénotypes des descendants seront révélés pour les autres locus participant au contrôle de ces traits.

Le croisement initial des deux lignées parentales, les lignées A et B, est la génération filiale 1 (F1). Pour chaque région polymorphique entre les lignées parentales, les animaux F1 possèdent un génome hétérozygote, et chaque paire de chromosome compte une copie provenant de la femelle/lignée A et une autre du mâle/lignée B. Les études de liaison génétique par génération filiale 2 (F2) ou *backcross* (BC1) exploitent le phénomène d'enjambement chromosomique se produisant lors de la méiose dans les gamètes des souris F1. Lors de ce processus, des échanges de matériel génétique se produisent entre les régions homologues des chromosomes d'une même paire. Les souris F2, issues de l'intercroisement de souris F1 se présentent donc avec un patron de recombinaison aléatoires de segments chromosomiques d'origine A ou B, et ce sur chaque chromosome, tel que représenté à la figure 4. Trois génotypes différents sont donc possibles pour chaque région polymorphique d'une souris F2 : AA, AB ou BB. Les études de cohortes de BC1 procèdent différemment, et utilisent le rétrocroisement d'une souris F1 avec l'une des lignées parentales (e.g. lignée A).

Dans ces cas, seule une copie de chaque chromosome des descendants possède des patrons de recombinaison aléatoires des allèles provenant des deux lignées parentales, et les génotypes possibles sont AA et AB. Les études par cohorte F2 peuvent donc révéler l'effet de polymorphismes récessifs et dominants, alors que les cohortes par BC1 mettent en valeur les différences induites par des locus dominants. De plus, le double de souris BC1 est nécessaire comparativement à des souris F2 pour obtenir un nombre équivalent de recombinaisons. L'un des désavantages de l'utilisation de lignées F2 ou BC1 tient du fait que chaque souris générée est unique. Il est donc avantageux, lorsque possible, d'investiguer plus d'un phénotype pour chaque souris d'une même cohorte afin de maximiser la quantité de résultats tirés d'une étude. Toutefois, il demeure relativement aisé de générer de nouvelles souris F2 et BC1 lorsque nécessaire, puisque ces cohortes ne requièrent que deux générations de croisement.

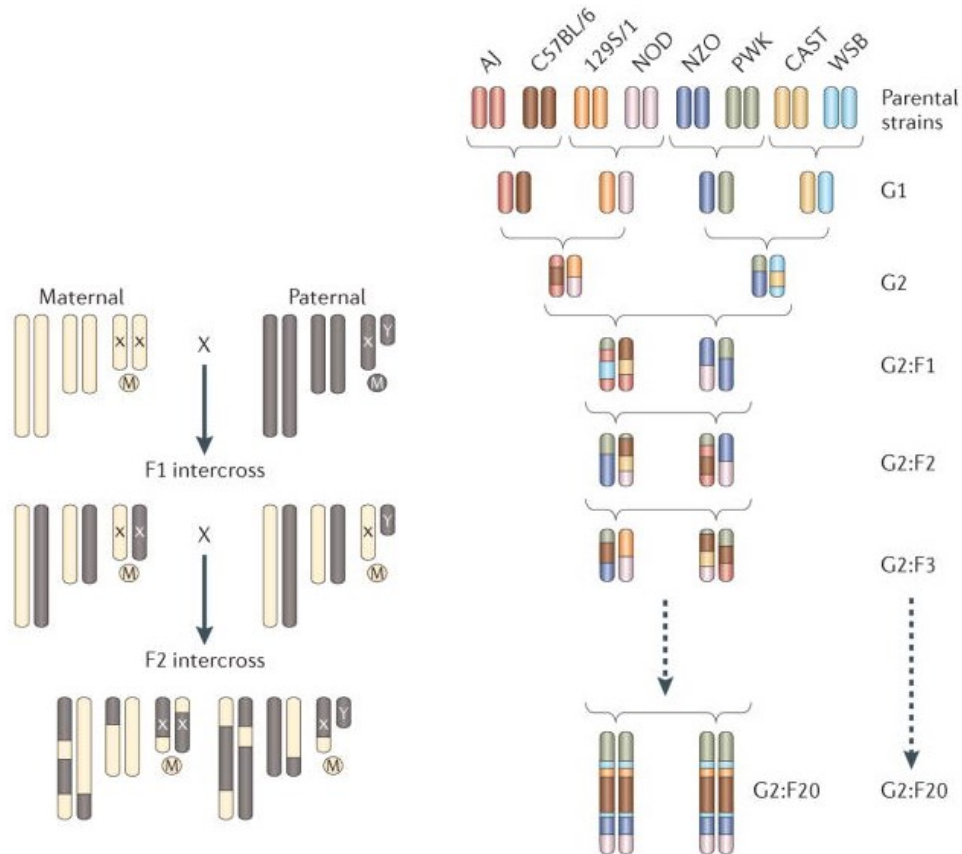


Figure 4. Comparaison des approches de croisement par lignée F2 et par lignées recombinantes inbred. Schéma de génération de souris F2 par intercroisement de deuxième génération (gauche) et des lignées du Collaborative Cross (droite). Tiré de [327].

1.3.2.3 Le Collaborative Cross

Le *Collaborative Cross* (CC) est né du besoin de générer une ressource murine présentant un haut degré de diversité génétique. Effectivement, les lignées de souris les plus communément utilisées en laboratoire sont très similaires entre elles au niveau génétique, et dérivent majoritairement de la même sous-espèce de mus *musculus*, représentée par la lignée WSB [344, 345]. Le CC constitue une ressource communautaire de lignées *inbred* recombinantes issues de 8 lignées fondatrices choisies avec soin. Celles-ci incluent 5 lignées communément utilisées en laboratoire, soit les lignées B6, NOD, A/J, 129 et *New Zealand Obese* (NZO), ainsi que 3 lignées dites « dérivées de sauvages », soit les lignées CAST, PWK et WSB. Les 8 lignées fondatrices ont été croisées selon une stratégie bien précise, illustrée à la figure 4, afin de générer des centaines de lignées *inbred*, qui capturent une grande part de la diversité du génome murin [346].

Alors que les études utilisant des souris F2 sont limitées aux polymorphismes de deux lignées parentales, le CC inclut un nombre beaucoup plus élevé de polymorphismes dérivés de 8 lignées parentales. À ceci s'ajoute l'accumulation de nouvelles mutations au fil des générations, menant à l'apparition de variantes autrement absentes des lignées parentales. Il devient donc possible, dans une même étude, d'identifier la contribution d'un plus grand nombre de polymorphismes. L'un des grands avantages du CC, ou d'autres ressources de lignées *inbred* recombinantes, est la reproductibilité des lignées et la nécessité de n'effectuer qu'une seule ronde d'analyse de génotype par lignée. Au contraire des cohortes F2 et BC1, il est alors possible d'inclure plusieurs individus pour chaque génotype afin de contrôler pour la variabilité expérimentale lors de l'analyse des phénotypes. Il est également possible d'étudier plusieurs cohortes identiques à des moments différents, et de sélectionner des animaux particulièrement intéressants pour des études subséquentes. La reproductibilité de cette ressource génétique ouvre la porte à l'établissement de corrélations entre des études indépendantes. Jusqu'à maintenant, le CC a été utilisé dans une vaste gamme d'études génétiques portant sur la composition du système immunitaire [347-349] et la réponse aux pathogènes [350-354], mais aussi sur le métabolisme de drogues [355], la tolérance au glucose [356], et bien d'autres phénotypes [357-359]. Non seulement le CC est-il utile pour révéler des gènes candidats impliqués dans différentes voies biologiques, mais il permet aussi de

développer de nouveaux modèles de maladies humaines. Effectivement, il arrive parfois qu'une lignée du CC se présente avec un phénotype drastiquement différent des autres lignées, que ce soit grâce à la combinaison unique des allèles, ou à cause d'une mutation apparue au fil du croisement. De tels phénotypes extrêmes ont donné lieu à de nouveaux modèles, par exemple dans les cas de la rétinopathie diabétique [360] et de la colite [361], qui pourront être utiles afin de tester de nouvelles thérapies ou de mieux comprendre les maladies.

La diversité génétique du CC constitue à la fois un avantage, puisqu'elle s'approche de l'humain sur cet aspect, et un inconvénient, puisque des polymorphismes ayant un effet moins marqué sur les phénotypes étudiés ne seront pas identifiés lors d'analyses de liaison génétique. De plus, contrairement à des croisements de type F2 ou BC1, les lignées recombinantes *inbred* requièrent plusieurs générations avant d'être utilisées lors d'expérimentations. Le coût initial de génération de ce type de lignée est donc beaucoup plus élevé. De plus, des problèmes de fertilité imprévus limitent la production de certaines lignées du CC [362], réduisant quelque peu l'étendue du pouvoir statistique de cette ressource et la facilité théorique d'accès à des centaines de lignées. Toutefois, l'étude de phénotypes sur un relativement faible nombre de lignées du CC s'avère tout de même informative [347, 352, 355, 357, 363]. Concrètement, pour des traits régulés par des locus majeurs, tel que la couleur du pelage, une cohorte de 50 lignées du CC pourrait être suffisante [364].

1.3.3 L'identification et la validation des gènes candidats

Dans les cas optimaux, les analyses de liaison génétique associeront le contrôle du phénotype étudié à une région réduite du génome, incluant un ou quelques gènes spécifiques. De là, on peut inférer l'effet des différents polymorphismes grâce à des outils informatiques, et réduire la liste aux gènes portant les polymorphismes les plus potentiellement intéressants. L'utilisation d'approches expérimentales permettant de déterminer les types cellulaires et voies biologiques impliquées dans un phénotype sont aussi une étape cruciale dans l'investigation de gènes candidats. Par exemple, des chimères hématopoïétiques et des analyses d'expression génique, par exemple le séquençage d'acide ribonucléique (RNA-seq) ou l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) peuvent apporter d'importants indices

quant aux mécanismes impliqués dans une différence de phénotype entre deux lignées de souris, ou encore dans le contrôle général d'une population cellulaire. De plus en plus d'outils informatiques permettent d'optimiser l'étape de recherche de gènes candidats en intégrant des données d'expression, d'interaction, etc. Toutefois, une validation biologique demeure nécessaire pour confirmer l'effet d'un ou plusieurs gènes ou polymorphismes. De nombreuses façons de procéder existent, de la validation d'un locus à la validation d'un gène ou même d'une mutation spécifique. Des méthodes de validation seraient également utilisées chez l'humain, mais il sera ici uniquement question de validation chez la souris, qui représente un modèle génétique plus malléable.

1.3.3.1 Les souris congéniques

Une première approche pouvant être utilisée suite à l'identification d'un locus régulant potentiellement un phénotype est de vérifier l'impact de ce locus dans son ensemble, sans limiter à un seul gène. Par exemple, chez la souris, il est possible de recourir à des lignées dites « congéniques », c'est-à-dire génétiquement identiques à une lignée parentale, à l'exception d'un locus d'intérêt dont le génotype provient d'une autre lignée de souris. De telles souris congéniques sont générées par rétrocroisement, sur plusieurs générations, d'une souris F1 avec la lignée parentale dont sera conservé le fond génétique. À chaque génération, seules les souris hétérozygotes au locus d'intérêt seront rétrocroisées à nouveau. Après plusieurs croisements de la sorte, les souris seront génétiquement identiques à la lignée parentale, à l'exception du locus d'intérêt qui sera hétérozygote. L'intercroisement des animaux hétérozygotes donnera finalement naissances à des individus homozygotes pour le locus congénique. L'étude de différences entre les souris des lignées parentales et de la lignée congénique permet d'évaluer la contribution du locus d'intérêt à différents phénotypes. Par exemple, la génération de souris B6 congéniques pour l'haplotype H-2^{g7} du CMH (B6.H-2^{g7}) et de souris NOD congéniques pour l'haplotype H-2^b du CMH (NOD.H-2^b) a permis de révéler que le CMH est nécessaire mais non suffisant au développement du diabète chez les souris [365]. D'ailleurs, plusieurs lignées de souris congéniques pour des locus *Idd* associés à la résistance au diabète ont été utilisées pour confirmer ou infirmer le rôle de ces locus dans

divers aspects du développement de la maladie [248]. Les régions congéniques contiennent souvent un nombre élevé de gènes. Afin de diminuer la liste de gènes candidats influençant les phénotypes étudiés, il est possible de réduire davantage les locus congéniques en générant des lignées sous-congéniques. Ces lignées sont essentiellement obtenues lors de l'établissement initial d'une lignée congénique en sélectionnant des individus présentant des recombinaisons différentes, ou grâce à des rétrocroisements supplémentaires d'une lignée déjà établie [366-368].

1.3.3.2 Les modèles ko et ko conditionnels

Un fois un gène candidat identifié, l'utilisation de souris déficientes (ko) pour ce gène peut permettre de mieux étudier son rôle dans la détermination des phénotypes d'intérêt. Toutefois, il importe de garder à l'esprit qu'une délétion complète d'un gène agira potentiellement différemment d'un polymorphisme naturellement présent. Des souris ko existent pour plusieurs gènes, et ont été générées grâce au remplacement desdits gènes par, typiquement, une cassette de résistance aux antibiotiques. Le remplacement du segment génique grâce au processus de recombinaison homologue produit des cellules possédant une copie non-fonctionnelle du gène. La sélection de cellules ayant intégré la mutation, leur insertion dans un embryon, et le croisement subséquent de souris portant la délétion du gène permet ultimement l'établissement de lignées de souris ko [369]. Comme la délétion de certains gènes est létale, des modèles de délétion conditionnelle existent également. Par exemple, le système cre-lox utilise l'expression transgénique de la recombinaise cre sous le contrôle d'un promoteur donné et l'introduction de séquences *loxP* (reconnues par la recombinaise cre) flanquant la séquence à supprimer [370]. Dans ce type de modèle, seules les cellules exprimant cre perdront l'expression du gène cible. Un tel modèle s'avère précieux lorsqu'une délétion du gène d'intérêt est létale durant le développement embryonnaire, ou pour étudier l'effet d'une délétion sélective à un type cellulaire ou à un stade particulier du développement.

Outre l'utilisation de souris ko, il est aussi possible d'utiliser des petits ARN interférants (siRNA) afin de cibler les gènes d'intérêt et en diminuer l'expression. La technologie CRISPR/Cas9 peut quant à elle s'avérer un outil précieux pour introduire des mutations spécifiques et tester l'effet de polymorphismes précis et pour augmenter ou diminuer l'expression d'un gène [371]. Ces deux technologies peuvent permettre de tester rapidement plusieurs gènes candidats in vivo, et l'introduction de mutations ciblées via CRISPR/Cas9 peut par exemple représenter plus physiologiquement qu'un modèle ko l'effet de polymorphismes présents dans des souris congéniques.

1.4 Les cellules DN T immunorégulatrices

Ayant couvert l'autoimmunité et la génétique dans les sections précédentes, nous discuterons maintenant des cellules centrales au présent projet de doctorat, soit les cellules DN T immunorégulatrices, pour lesquelles nous appliquerons des approches immunogénétiques (Chapitres 2 et 3) et tenteront de définir leur processus de différenciation (Chapitre 5).

Typiquement, les cellules T portant un TCR $\alpha\beta$ expriment à leur surface l'un des corécepteurs CD4 ou CD8. Toutefois, des cellules T TCR $\alpha\beta$ CD4-CD8- capables de supprimer une réaction lymphocytaire mixte (MLR) ont été identifiées [372]. Les lymphocytes DN T représentent environ 1-3 % des lymphocyte totaux chez la souris et chez l'humain [372-374]. Leur faible nombre est certainement un facteur de difficulté pour l'étude de ces cellules, mais diverses études se sont tout de même attaquées à la tâche de définir le rôle des cellules DN T et l'influence de leur nombre dans certaines maladies.

1.4.1 Les cellules DN T dans la tolérance immune

L'étude des cellules DN T dans différents modèles a révélé un rôle immunorégulateur de ces cellules dans plusieurs contextes. Particulièrement, l'injection de cellules DN T est associée à la tolérance de greffes, à l'inhibition du développement du diabète de type 1, à l'inhibition de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH), ainsi qu'à l'inhibition de la croissance tumorale [375]. Les cellules DN T semblent médier la tolérance de façon antigène-spécifique, c'est-à-dire envers des cellules présentant leur antigène, ou ayant la même spécificité antigénique dans le cas de cellules T [376, 377]. Outre leur injection, le nombre élevé de cellules DN T a aussi été associé à la protection contre le diabète autoimmun et la GVH. Ainsi, chez la souris, des lignées prédisposées au diabète auto-immun possèdent moins de cellules DN T que des souris protégées de cette maladie [378]. Chez l'humain, une corrélation inverse entre le nombre de cellules DN T et la sévérité de la GVH a quant à elle été observée [379].

La fonction immunorégulatrice des cellules DN T repose sur différents mécanismes selon le modèle étudié. La nature de la cible cellulaire (cellules T, cellules B, cellules dendritiques,

cellules NK), la restriction au CMH du TCR des cellules DN T, et la nature de l'antigène reconnu par le TCR influencent le mécanisme par lequel les cellules DN T médient leur rôle immunorégulateur [376]. La cytotoxicité des cellules DN T repose sur la production de perforine dans plusieurs modèles, transgéniques et non-transgéniques [376, 377, 380-383]. C'est le cas dans le modèle TCR 3A9 :insHEL, où les cellules DN T portant le TCR 3A9 éliminent uniquement les cellules B présentant l'antigène HEL, et non celles présentant un antigène du non-soi, en l'occurrence l'ovalbumine (OVA) [377]. Les voies impliquées dans l'apoptose de la cible des cellules DN T incluent aussi l'interaction Fas-FasL, où Fas se trouve à la surface de la cellule cible et FasL à la surface de la cellule DN T [376, 384, 385]. Les actions contact-dépendante et antigène-spécifique des cellules DN T en font des alliés particulièrement précieux dans la lutte contre l'auto-immunité.

En comparaison, les cellules Treg, dont le rôle immunorégulateur est crucial, ont aussi un rôle immunosupresseur. Les mécanismes d'action de Treg incluent la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, la compétition pour la disponibilité de l'IL-2, la lyse directe, l'inhibition des APC ou des cellules T exprimant CTLA-4 [386-388]. Malgré une reconnaissance spécifique de leur antigène via le TCR, l'action des Treg peut aussi influencer les cellules environnantes, de façon non-spécifique à l'antigène, par exemple via la sécrétion de facteurs solubles tels que les cytokines anti-inflammatoires TGF- β et IL-10 [389]. Ainsi, la présence d'une grande quantité de cellules Treg est associée à une meilleure survie de cellules tumorales [390, 391]. Bien que les études portant sur le rôle des cellules DN T dans le cancer soient limitées, les mécanismes d'action connus des cellules DN T, et surtout leur spécificité pour les auto-antigènes, suggèrent qu'ils ne favoriseraient pas particulièrement la survie des cellules tumorales [375].

1.4.2 La modulation du nombre de cellules DN T

Lorsque des cellules DN T provenant de souris résistantes au diabète sont comparées à des cellules DN T provenant de souris prédisposées à la maladie, il a été démontré que les cellules DN T des deux origines parviennent avec la même efficacité à éliminer une cible commune [377]. Cette expérience importante démontrait que la fonction des cellules DN T

n'était pas affectée dans les souris prédisposées au diabète et suggérait que les variations dans le nombre de DN T étaient plutôt le facteur associé à la résistance à l'auto-immunité dans ce modèle transgénique. La modulation du nombre de DN T pourrait avoir d'importants impacts dans la restauration de la tolérance immune, que ce soit par leur génération préférentielle à partir de progéniteurs, par une inhibition de leur apoptose ou par une augmentation de leur prolifération.

Jusqu'à présent, quelques facteurs ont été identifiés comme modulant le nombre de cellules DN T. Entre autre, la cytokine IL-10 semble avoir un effet néfaste sur ces cellules, et entrainer leur apoptose [377, 392]. Au niveau génétique, des travaux ont montré que la proportion de cellules DN T périphérique était entre autre contrôlée par CD47. Plus précisément, les souris déficientes pour CD47 possèdent moins de cellules DN T que la lignée contrôle correspondante, et sont aussi prédisposées au diabète autoimmun. Dans ce modèle CD47 ko, l'injection de cellules DN T parvenait à prévenir l'apparition du diabète, appuyant un rôle du nombre de ces cellules dans la restauration de la tolérance immune [378]. Le locus *Idd13*, encodant d'ailleurs le gène encodant la *Signal Regulatory Protein Alpha (Sirpa)*, un ligand de CD47, module quant à lui la proportion de cellules DN T dans des souris congéniques [290]. L'étude du locus *Idd13* grâce aux souris congéniques a révélé que sa contribution à la modulation des cellules DN T repose sur des facteurs moelle-intrinsèques, mais fort probablement extrinsèques aux cellules DN T elles-mêmes. Ainsi, l'identité du gène causal et la nature du mécanisme par lequel *Idd13* module les cellules DN T demeurent à élucider.

Des déficiences dans certains gènes liés à l'apoptose permettent aussi une augmentation marquée du nombre de cellules DN T. Par exemple, les souris $FAS^{lpr/lpr}$, dans lesquelles une mutation de perte de fonction de FAS est présente, développent un syndrome lymphoprolifératif autoimmun auto-immune. Ces souris possèdent une quantité particulièrement élevée de cellules DN T en périphérie [393], et il a été suggéré que l'apoptose des cellules DN T est dépendante de FAS, alors que celle des cellules T CD4 et CD8 peut procéder indépendamment de cette molécule [394]. Les souris déficientes pour le gène *BCL2 Like 11 (Bcl2l11)*, encodant *Bcl-2 homology 3-only (BIM)* possèdent aussi une forte augmentation de la proportion de cellules DN T dans la rate, alors que les cellules T CD4 et CD8 sont moindrement affectées [395]. BIM est d'ailleurs également un gène compris dans

l'intervalle *Idd13*, mais l'impact de polymorphismes dans ce gène sur le nombre de cellules DN T n'est pas clair. Considérant que la souris NOD possède un défaut dans l'induction de BIM [396], mais possède aussi moins de cellules DN T que les souris NOD.NOR-*Idd13*, et considérant que l'influence d'*Idd13* sur les cellules DN T semble être au niveau de la régulation périphérique, il est peu probable que BIM soit le gène candidat du locus *Idd13* influençant les cellules DN T [290].

1.4.3 L'origine des cellules DN T

1.4.3.1 Les étapes du développement thymique

Le développement des lymphocytes T se produit principalement dans le thymus, où les précurseurs pluripotents issus de la moelle osseuse se différencient progressivement en lymphocytes T grâce à des signaux moléculaires finement régulés [397], dont certains sont représentés dans la Figure 5 [398]. La maturation des cellules T peut être suivie grâce à différents marqueurs, dont l'expression des corécepteurs CD4 et CD8. Les précurseurs immatures sont caractérisés par l'absence de CD4 et CD8 et sont donc qualifiés de « double négatifs immature » (DNi) – à ne pas confondre avec la description des cellules DN T matures discutées à la section précédente. Le stade thymique DNi peut lui-même être divisé en 4 sous-types marquant des degrés de maturation croissants : CD44+CD25- (DN1), CD44+CD25+(DN2), CD44-CD25+ (DN3) et CD44-CD25- (DN4). Chacun de ces stades diffère dans son potentiel à générer différents types cellulaires, jusqu'à être commis à une différenciation de cellule T. Ainsi, même si le thymus est principalement le siège de la différenciation des lymphocytes T, les précurseurs plus immature DN1 et DN2 peuvent générer des cellules NK, des cellules B ou des DC en présence des signaux appropriés. L'un des facteurs critiques dans les étapes précoces du développement thymique des cellules T est la présence de Notch et de ses ligands. Effectivement, en absence de Notch, des expériences clé ont montré que les précurseurs DNi entrant dans le thymus deviennent plutôt des cellules B [399, 400]. Notch régule les voies de différenciation alternatives des thymocytes, par exemple en DC ou en cellule NK, et son signal participe à la différenciation des thymocytes jusqu'au stade DN3 [398, 401]. D'autres rôles de Notch ont enfin été rapportés dans les cellules T

matures, et l'impact de ce récepteur n'est donc pas limité à la maturation des précurseurs thymiques de cellules T [402-405].

GATA-3 est bien connu pour son rôle dans le choix de différenciation CD4 vs CD8, où il favorise la différenciation CD4, et dans la différenciation des cellules CD4 T périphériques en Th2. Toutefois, lors du développement des thymocytes DN1, aussi appelés *Early Thymic Progenitors* (ETP), GATA-3 permet aussi la transition vers le stade DN2 [406]. En absence de GATA-3, les thymocytes DN2 conservent le potentiel de devenir des cellules B [407]. TCF-1 participe aussi à cette étape pour enforcer le choix de différenciation en cellule T. Spécifiquement, TCF-1 permet notamment l'induction de gènes spécifiques aux cellules T, comme GATA-3 et BCL11b [408].

Passé le stade DN2, les thymocytes sont engagés dans la différenciation en cellule T et ont perdu le potentiel de devenir des cellules NK, DC ou ILC2 [398]. Le facteur de transcription BCL11B est cependant critique dans l'enforcement du choix de différenciation en cellule T $\alpha\beta$ au stade DN2 [409]. Il est également impliqué dans la sélection positive et la différenciation en CD4 et CD8 à partir du stade DP. Les souris possédant une délétion de BCL11b au stade DN2 présentent un thymus contenant surtout des cellules T $\gamma\delta$, alors que celles dont la délétion conditionnelle est effective entre les stades DN3 et DP possèdent peu de cellules T CD4 et CD8, suggérant une maturation bloquée au stade DP [410].

Au stade DN3, les événements de recombinaison de la chaîne β du TCR et de sa sélection ont lieu. Cette étape requiert l'expression en surface de la chaîne β couplée à une chaîne pré-TCR α . Un réarrangement productif mène à l'exclusion allélique du second brin d'ADN portant les gènes TCR β afin de prévenir l'expression de deux chaînes β sur une même cellule T. Un autre type de cellules T, utilisant les chaînes γ et δ du TCR, peut être généré aux stades DN2 et DN3 et diverge alors de la différenciation thymique des cellules T $\alpha\beta$ [411]. Les cellules possédant un réarrangement productif du TCR β prolifèrent et progressent vers un stade DP et coexpriment les corécepteurs CD4 et CD8. À ce stade DP, la sélection de la chaîne α du TCR a lieu. Le réarrangement de la chaîne α du TCR exclut l'expression de la chaîne delta du TCR, puisque le locus du TCR δ se trouve inclus dans le locus du TCR α [24]. La chaîne alpha du TCR, au contraire de la chaîne bêta, n'est pas soumise au processus d'exclusion allélique. Elle

peut donc être éditée grâce à des étapes de recombinaison supplémentaires pour favoriser une chaîne TCR qui sera sélectionnée de façon positive [24, 412, 413].

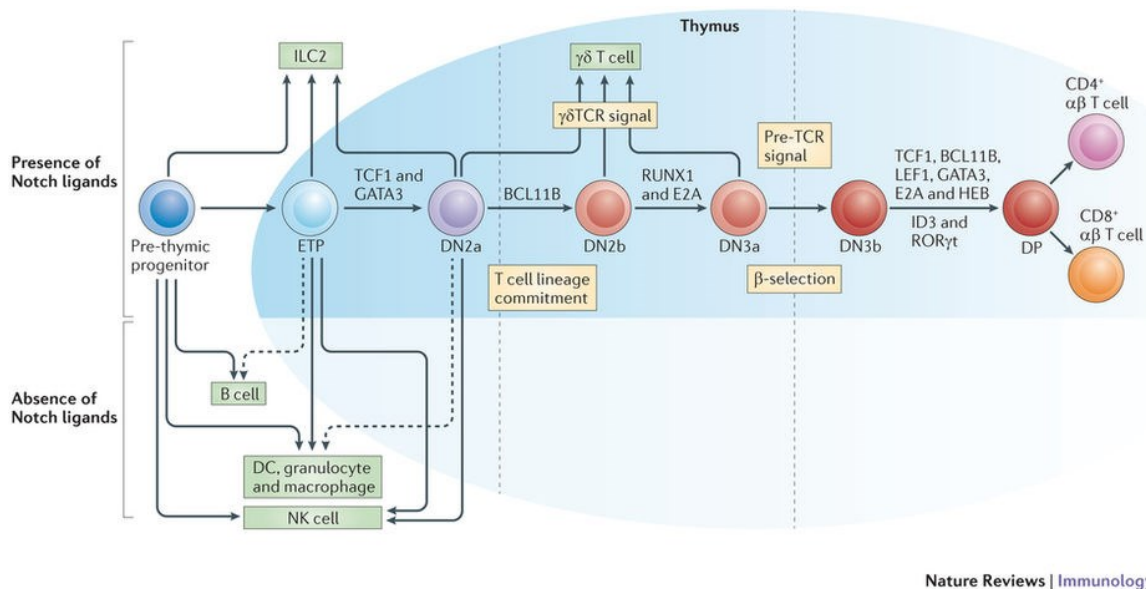


Figure 5. Différenciation des thymocytes vers un stade TCR $\alpha\beta$ conventionnel. Représentation étapes clés du développement thymique et des facteurs de transcription permettant d’enforcer le choix de différenciation TCR $\alpha\beta$. Tiré de [398]

Lors du processus de sélection du TCR, l’interaction entre le TCR et des peptides du soi présentés par les cTECs via le CMH de classe I ou le CMH de classe II est évaluée. Le répertoire de peptides présenté par les cTECs est unique, grâce à leur utilisation du thymoprotéasome et de la cathepsine L, tous deux spécifiques au thymus [31]. Une trop faible affinité du TCR pour les complexes CMH-peptide présentés mènera à une mort du thymocyte par « négligence », alors qu’une trop forte affinité mènera à la mort par sélection négative [414]. Les cellules T dont le TCR possède une affinité intermédiaire pour le soi présenté par le CMH de classe I deviennent généralement des lymphocytes T CD8, alors que ceux dont le TCR reconnaît plutôt des peptides dans le contexte du CMH de classe II deviennent typiquement des lymphocytes T CD4.

Plusieurs facteurs entrent en ligne de compte et guident le « choix » du maintien de l’expression de CD4 et CD8 après le stade DP dans le thymus. Il est à noter que même les thymocytes DP qui deviendront des cellules T CD8 diminuent leur expression de ce

corécepteur après le stade DP et deviennent CD4+CD8low [415]. Effectivement, l'expression de CD8 au stade DP est spécifiquement régulée par l'élément régulateur E8III, qui est réprimé lors de la progression vers les stades SP, que ce soit CD4 ou CD8. L'expression de CD8 par les cellules SP est quant à elle spécifiée par le promoteur E8I. Cette spécialisation des « enhancers » de CD8 est très utile lors d'études d'expression conditionnelle, qui peut être restreinte aux cellules T CD8 matures, ou dès le stade DP.

La restriction au CMH, la force et durée du signal TCR reçu par le thymocyte, la réception d'un signal de certaines cytokines et le recrutement de facteurs de transcription spécifiques influencent tous, à des degrés variés, le choix de différenciation en cellule T CD4 ou CD8. Par exemple, les facteurs de transcription Thpok et *Runt Related Transcription Tactor 3 (Runx3)* sont associés à l'expression respective de CD4 et CD8 par les thymocytes [415, 416]. L'expression de Thpok est d'ailleurs suffisante pour forcer l'expression de CD4 par les cellules restreintes au CMH de classe I [321]. GATA-3 intervient encore une fois dans les choix de différenciation thymique, et favorise la différenciation en cellules T CD4 [417]. Toutefois, la seule expression de GATA-3 n'est pas suffisante pour convertir en cellules T CD4 les cellules restreintes au CMH de classe I qui deviennent tout de même des cellules T CD8. Runx3 est quant à lui nécessaire au développement des cellules T CD8, et les souris déficientes pour Runx3 présentent une diminution des thymocytes T CD8 [418]. D'un autre côté, les souris transgéniques pour Runx3 présentent une augmentation des cellules T CD8, sans pour autant rediriger les cellules restreintes au CMH de classe II [419, 420]. La participation d'un signal via l'IL-7R a aussi été montrée comme important dans le choix de différenciation CD4/CD8, et un blocage du signal de l'IL7R diminue la production de cellules T CD8 dans le thymus [415, 421].

Un modèle intégrant certains des éléments clés du choix de différenciation CD4/CD4 est présenté à la figure 6. Il ne s'agit toutefois que de l'un des modèles proposés pour expliquer le choix de différenciation des cellules T CD4 et CD8, en incorporant des découvertes plus récentes au modèle de durée du signal TCR, selon lequel un signal TCR plus court favorise la différenciation en cellules T CD8 alors qu'un signal persistant dirige la cellule T vers un stade CD4. Des modèles classiques de différenciation incluent aussi le modèle de sélection

stochastique, les modèles instructionnels d'affinité du TCR ou de durée du signal [415, 422, 423].

Il est à noter qu'alors que la sélection positive des cellules T CD4 et CD8 conventionnelles repose sur la sélection par les cTECs, certains types de cellules T peuvent être sélectionnés par des cellules hématopoïétiques [34, 35, 79, 424-427]. Chez la souris, les thymocytes DP expriment le CMH de classe I, alors que chez l'humain l'expression de CMH de classe II a aussi été observée [428, 429]. Les thymocytes DP expriment aussi les molécules de CMH non classique CD1d et MR1, responsables de la sélection des NKT et des cellules *Mucosal Associated Invariant T* (MAIT), respectivement [36, 37, 76]. Suite à l'interaction de leur TCR avec leur molécule de CMH respective, les cellules T sélectionnées positivement dans le cortex passent ensuite vers la médulla, où des étapes additionnelles de maturation et de sélection négative ont lieu, telles que décrites plus en détails à la section 1.1.1.

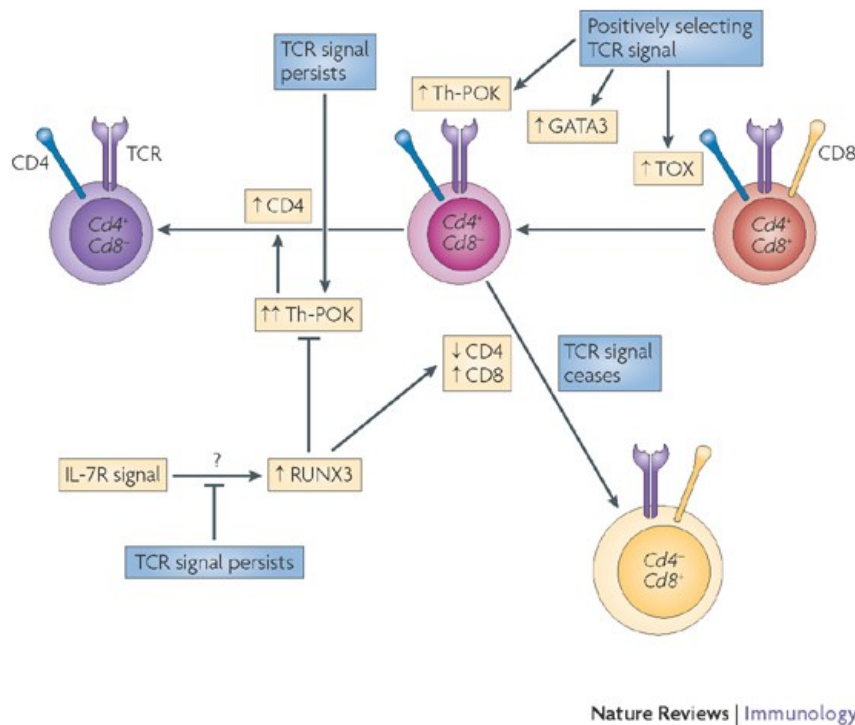


Figure 6. Facteurs influençant le choix de différenciation CD4/CD8. Modèle de durée du signal intégrant aussi la participation de facteurs de transcription et de cytokines dans la balance du choix CD4/CD8. Tiré de [415]

1.4.3.2 Positionner les cellules DN T dans le développement thymique

De par leur phénotype particulier impliquant l'absence de corécepteurs CD4 et CD8, l'origine des cellules DN exprimant le TCR $\alpha\beta$ porte à questionnement. Effectivement, lors du développement thymique les cellules T subissant la sélection de la chaîne α du TCR passent communément par un stade DP avant de devenir des cellules T CD4 ou T CD8. Or, les corécepteurs CD4 et CD8 participent au bon signalement du TCR par leur association au CMH et par le recrutement de la molécule de signalisation *Lymphocyte Protein Tyrosine Kinase* (LCK) [430-433].

Plusieurs possibilités pourraient expliquer le développement des cellules DN T dans le thymus : une différenciation avant le stade DP, de façon similaire aux cellules T portant le TCR $\gamma\delta$ qui n'expriment ni CD4 ni CD8 durant leur développement, une différenciation directement à partir du stade DP impliquant une diminution simultanée de CD4 et CD8, ou une différenciation à partir de cellules T CD4 ou CD8 matures. Il est aussi possible que les cellules DN T, à l'instar de certains Tregs, soient plutôt induits en périphérie par conversion de cellules T CD4 ou T CD8. Jusqu'à présent, chacune de ces hypothèses peut être supportée par des preuves plus ou moins directes, ou par des modèles murins modifiés, ayant chacun leur forces et faiblesses.

Le développement précoce de cellules DN T dans le thymus embryonnaire de souris TCR 3A9 transgéniques semble indiquer qu'elles ne transitent pas par le stade DP [434]. L'avantage des modèles transgéniques restreints aux CMH de classe I ou II est l'absence de NKT contaminant les populations de cellules DN T portant les TCR transgéniques [290], puisque ces cellules sont restreintes à la molécule CD1d. Toutefois, ce type de modèle est hautement artificiel, vu l'expression du TCR transgénique se produisant à un stade précoce. Des parallèles entre les cellules DN T et les cellules T TCR $\gamma\delta$ [435, 436] ou entre les cellules DN T et les cellules NK [437] semblent toutefois aussi appuyer une origine précoce des cellules DN T, avant le stade DP. Enfin, la découverte que des cellules NKT CD4-CD8- pourraient se développer avant le stade DP peut laisser croire que certaines cellules DN T non-NKT pourraient procéder de façon similaire [438].

D'un autre côté, plusieurs approches expérimentales suggèrent que les cellules DN T périphériques proviennent d'un intermédiaire DP. Par exemple, la méthylation de CD8 β dans les cellules DN T de souris transgéniques pour l'expression de *B cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2)* [439] indique un intermédiaire DP à leur différenciation. De même, des expériences de délétion conditionnelle de BIM, menant à une augmentation des cellules DN T lorsque supprimé à partir du stade DP précoce, mais non au stade DP tardif, indiquent que les cellules DN T échappant à l'apoptose médiée par BIM proviennent directement du stade DP [395]. Une étude sur les cellules DN T thymiques non-transgéniques relate également une origine DP de ces précurseurs [86].

La perte du corécepteur à la surface de cellules T matures est toutefois un phénomène rapporté dans certaines situations. D'ailleurs, les cellules NKT sont également connues pour exprimer d'abord le corécepteur CD4 dans le thymus, et peuvent ensuite devenir CD4-CD8-. Ainsi, des cellules DN T ont pu être générées à partir de cellules T CD4 après prolifération [381, 440] et à partir de cellules T CD8 auto-réactives [441] ou déficientes pour FAS ou FASL [442].

Alors que la restriction au CMH est habituellement typique d'un type de cellules T, la restriction au CMH des cellules DN T n'est que peu informative sur leur origine, puisque tous les types de restriction ont été observés, que ce soit restreint aux molécules de classe I classique, non-classique, aux molécules de classe II ou même indépendant des molécules de CMH. Ainsi, il a été montré qu'en absence des corécepteurs CD4 et CD8 des cellules DN T parviennent à se développer indépendamment du CMH [443-445]. Toutefois, ce ne sont pas toutes les cellules DN T qui sont indépendantes des molécules de CMH [446].

Investiguer dans le contexte des cellules DN T thymiques et périphérique les autres facteurs connus pour influencer ou refléter le choix CD4/CD8 pourrait donc apporter de nouveaux indices quant aux étapes nécessaires à la génération de cellules DN T immunorégulatrices.

1.4.4 Les différents types de cellules T CD4-CD8-

Outre les cellules DN T immunorégulatrices (ici simplement appelées DN T), quelques cellules T (CD3+) correspondent au phénotype CD4-CD8-. Il est donc important d'identifier

les facteurs permettant de différencier ces cellules des cellules DN T, mais aussi de comprendre leurs ressemblances, puisque celles-ci peuvent donner d'importants indices quant à la nature des cellules DN T et à leur voie de développement.

Tout d'abord, pouvant être distingués grâce à leurs chaînes TCR distinctes, les cellules T $\gamma\delta$ sont pour la plupart CD4-CD8-. Les cellules T $\gamma\delta$ divergent des autres cellules T avant le stade DP de la différenciation thymique, et recevraient de forts signaux TCR [398, 447, 448]. Ces cellules se distinguent aussi des autres cellules T par le fait qu'elle ne dépendent pas des molécules de CMH pour leur sélection [449, 450]. Le rôle des cellules T $\gamma\delta$ peut être protecteur ou pro-inflammatoire, selon la maladie et le contexte. Par exemple, des rôles protecteurs et/ou pathogéniques des T $\gamma\delta$ a été observé dans les maladies inflammatoires de l'intestin, dans le diabète auto-immun, la sclérose en plaque, l'arthrite rhumatoïde et quelques autres [451]. Le rôle des cellules T $\gamma\delta$ dans la réponse immune est tout aussi diversifiée, et inclus une réponse contre les virus, les bactéries et les tumeurs [452, 453]

Parmi les cellules T $\alpha\beta$ CD4-CD8-, les NKT sont possiblement le type cellulaire ressemblant le plus aux cellules DN T, et jusqu'à présent aucun marqueur ne permet de les distinguer entièrement. Les NKT ont la particularité d'être restreintes au CMH de classe I non classique, CD1d et sont présentes chez la souris et chez l'humain [454-458]. Les NKT peuvent être divisés en deux catégories, les NKT de type I, ou NKT invariants (iNKT), et les NKT de type II. Alors que les NKT de type II ont un répertoire de TCR polyclonal, les iNKT portent les chaînes V α 14J α 18 chez la souris ou V α 24J α 18 chez l'humain [459]. Les iNKT peuvent être identifiés grâce à des tétramères de CD1d chargés avec des glycolipides comme α -GalCer et des analogues synthétiques tels que PBS-57 et OCH9 [460, 461]. Les iNKT expriment la chaîne V α 14 du TCR et ont une séquence *Complementary-Determining Region 3* (CDR3) de 15 acides aminés peu diversifiée, d'où leur appellation de NKT invariants [462]. Couplé à leur TCR α monoclonal, les iNKT utilisent plus fréquemment les chaînes V β 8.2, V β 2et V β 7 du TCR β , qui contribuent à la bonne reconnaissance des antigènes présentés par CD1d, comme α -GalCer [459, 463] qui se présente quant à lui avec diverses séquences CDR3 [464]. Les NKT de type II, et possèdent un répertoire TCR oligoclonal plus varié que les iNKT . Les antigènes reconnus par les NKT sont diversifiés, et plusieurs ligands des iNKT et NKT type II ont été identifiés, que ce soit naturels, endogènes ou artificiels [465-471]. Les NKT procèdent par le

stade DP lors de la différenciation thymique, mais sont sélectionnées via des interactions DP-DP, au contraire des cellules T CD4 et CD8 conventionnelles qui sont sélectionnées via des interactions DP-cTEC. Ces interactions DP-DP menant au développement des NKT nécessite la présence des molécules de surface *Signaling Lymphocytic Activation Molecule* (SLAM) [74, 472]. Le développement des NKT implique le facteur de transcription *Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger* (PLZF), et possiblement un fort signal TCR associé à la sélection agoniste [61, 71, 85, 472].

Les NKT sont impliqués dans la réponse contre virus, bactéries et parasites [473] et leur rôle dans les maladies auto-immunes peut être à la fois régulateur et pathogénique [474-476]. Chez la souris NOD, par exemple, une déficience en cellules NKT (CD1d ko) est associée à une augmentation du diabète [477]. Chez la souris, il est possible d'étudier les cellules DN T polyclonales de façon distincte des NKT grâce à des animaux déficients pour CD1d1/CD1d2 chez lesquels les NKT sont absents [478]. Chez l'humain, une population de cellules DN T peut être identifiée, mais il est actuellement impossible de discriminer les DN T de l'ensemble des cellules NKT CD4-CD8-.

Les cellules mucosal associated invariant T (MAIT) sont un autre type de cellules T invariantes CD4-CD8-. De façon similaire aux NKT, elles sont restreintes à une molécule de CMH non classique, dans ce cas-ci MR1 [479, 480], possèdent un répertoire TCR limité et conservé à travers l'évolution [481, 482], et peuvent donc être distinguées des cellules T polyclonales sur la base de leur chaîne du TCR. Leur voie de développement implique aussi un intermédiaire DP, une sélection par des cellules hématopoïétiques, et l'expression du facteur de transcription PLZF à certains stades [36, 481, 483]. De plus, l'absence de flore commensale dans des souris « germ-free » mène à une diminution des cellules MAIT dans le thymus et en périphérie [481], impliquant un rôle important du microbiome dans la génération de ces cellules. Les cellules MAIT reconnaissent des métabolites de vitamines et sont impliquées dans diverses réponses aux pathogènes [479, 484]. Leur rôle dans les maladies auto-immunes et inflammatoires commence toutefois à être étudié [485]. Plus spécifiquement, il a récemment été suggéré que les cellules MAIT auraient entre autre un rôle protecteur dans le diabète auto-immun, tel que montré par des altérations dans le nombre et la fonction des

MAIT dans des individus diabétiques, dans le nombre réduit de MAIT chez la souris NOD et la prédisposition accrue au diabète chez les souris NOD.MR1 ko [486, 487].

Les cellules IEL CD8 $\alpha\alpha$ exprimant le TCR $\alpha\beta$, retrouvées principalement dans l'intestin, sont aussi très similaires aux cellules DN T, et représentent peut-être même un sous-type de DN T activés ayant migré vers l'intestin, puisque CD8 α peut être exprimé suite à l'activation des cellules T [488]. L'expression de CD8 $\alpha\alpha$, ainsi que la localisation à l'intestin, permet d'exclure ce type cellulaire des analyses s'intéressant spécifiquement aux cellules DN T dans les organes lymphoïdes secondaires. Mettant en valeur le possible lien entre ces deux populations, les cellules T CD8 $\alpha\alpha$ de l'intestin peuvent dériver de cellules DN T thymiques, tel que démontré par leur injection dans des souris RAG ko [86, 439], ou dans des transferts adoptifs de cellules DN T thymiques provenant de souris BIM ko et injectées dans des souris lympho-suffisantes [395]. La population thymique de cellules DN T contenant de potentiels précurseurs des cellules CD8 $\alpha\alpha$ peuvent provenir d'un intermédiaire thymique DP et semblent restreints à différentes molécules de CMH, dont le CMH de classe I et CD1d [86]. Dans cette étude de Rusher *et al*, une fraction des cellules DN T étudiées incluait donc une population de NKT de type II. Le rôle de cellules CD8 $\alpha\alpha$ IELs, bien que peu clair, semble être immunorégulateur malgré leur spécificité autoréactive [488]. D'autres types de cellules IEL existent, incluant de cellules T $\gamma\delta$, des cellules T CD4 et des cellules T CD8 $\alpha\beta$, et pourraient avoir des rôles distincts des cellules IEL T CD8 $\alpha\alpha$ [488, 489].

Ainsi, les cellules ressemblant le plus aux cellules DN T ont en commun une fonction régulatrice, et une voie de développement associé à un fort signal TCR. Vu la fonction immunorégulatrice des cellules DN T, une sélection de type agoniste demeure plausible, mais n'a pas été explorée en absence des autres populations similaire. De la même façon, la non-exclusion des NKT dans la plupart des études précédentes, il est difficile de déterminer la nature du précurseur des cellules DN T. À des fins de simplification, le terme DN T réfère dans la présente thèse aux cellules TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8 α - indépendantes de la molécule de CMH non classique CD1d. Ces cellules sont polyclonales dans le cas de souris non-transgéniques, ou portent un TCR spécifique dans le cas de souris transgéniques telle que les souris TCR 3A9.

1.5 Raisonnement, hypothèse et objectifs

Les cellules DN T possèdent un important rôle immunorégulateur, et des variations dans leur nombre sont associées à la résistance à l'auto-immunité. Au moins un locus de susceptibilité au diabète auto-immun, *Idd13*, est associé au contrôle génétique de la proportion de cellules DN T chez la souris. Toutefois, les autres facteurs génétiques affectant les variations dans le nombre de cellules DN T sont inconnus. De plus, considérant leur faible nombre et leur importante ressemblance avec les NKT, les cellules DN T et leur développement n'ont été que peu étudiés en contexte physiologique. Lors des étapes de différenciation, les cellules T reçoivent et répondent à des signaux qui modulent leurs rôles et leurs phénotypes. Considérant le rôle des cellules DN T dans la tolérance immune, l'identification de leur voie de différenciation et des signaux nécessaires à leur maintien sont des facettes importantes à étudier pour comprendre ce qui rend ces cellules si uniques et ce qui influence leurs fonctions.

Nous posons donc l'hypothèse que les facteurs génétiques et biologiques modulant le nombre de cellules immunorégulatrices DN T peuvent être associés à la résistance à l'auto-immunité.

Les objectifs spécifiques de cette thèse sont donc :

1. Déterminer quels sont les facteurs génétiques régulant la fréquence et le nombre de cellules DN T
2. Investiguer le rôle des locus modulant les cellules DN T dans la prédisposition à l'auto-immunité.
3. Déterminer la voie de développement des cellules DN T et les facteurs nécessaires à la génération d'un nombre physiologique de cellules DN T

Chapitre 2 : Article 1

2.1 The mouse *Idd2* locus is linked to the proportion of immunoregulatory double negative T cells, a trait associated with autoimmune diabetes resistance

Roxanne Collin, Véronique Dugas, Adam-Nicolas Pelletier, Geneviève Chabot-Roy, Sylvie Lesage

Cet article a été publié dans *Journal of Immunology* Vol 193(7): 3503-3512 (2014)

Ma contribution à cet article est majeure. À l'exception des manipulations techniques concernant les souris F2 (effectuées par Adam-Nicolas Pelletier et Véronique Dugas), j'ai effectué toutes les expériences des résultats présentés et généré les figures associées. J'ai effectué l'ensemble des analyses, avec l'aide d'Adam-Nicolas Pelletier pour l'analyse des souris F2 das Rqtl. La conception du manuscrit, la réponse aux demandes de révision et leur intégration dans le manuscrit ont été faits conjointement avec Dre Sylvie Lesage.

Cette étude répond directement aux objectifs 1 et 2 de cette thèse, et identifie de multiples régions génétiques pouvant réguler la proportion de cellules DN T dans le modèle transgénique TCR 3A9. Nous validons également l'impact de l'un des locus identifiés sur la proportion de cellules DN T et l'incidence de diabète.

The mouse *Idd2* locus is linked to the proportion of immunoregulatory double negative T cells, a trait associated with autoimmune diabetes resistance¹

Running title: *Idd2* is linked to double negative T cells

Roxanne Collin^{*,†}, Véronique Dugas ^{*,†,2}, Adam-Nicolas Pelletier^{*,†}, Geneviève Chabot-Roy^{*}, Sylvie Lesage ^{*,†,‡}.

* Division of Immunology-oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Research Center, Montréal, Québec, H1T 2M4, Canada

† Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

‡ Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montréal, Québec, H3A 0G4, Canada

Corresponding author:

Sylvie Lesage

Research Center

Maisonneuve-Rosemont Hospital

5415 l'Assomption Blvd

Montréal, Québec

Canada, H1T 2M4

Phone number 1-514-252-3400 x 4649

Fax number 1-514-252-3430

2.2 Abstract

Autoimmune diseases result from a break in immune tolerance. Various mechanisms of peripheral tolerance can protect against autoimmunity, including immunoregulatory CD4-CD8- double negative (DN) T cells. Indeed, we have previously shown that diabetes-prone mouse strains exhibit a low proportion of DN T cells relative to that of diabetes-resistant mice and that a single autologous transfer of DN T cells can impede autoimmune diabetes development, at least in the 3A9 TCR transgenic setting. Herein, we aim to understand the genetic basis for the difference in DN T cell proportion between diabetes-resistant and diabetes-prone mice. We thus perform an unbiased linkage analysis in 3A9 TCR F2 (NOD.*H2^k* x B10.BR) mice and reveal that a locus on chromosome 9, which coincides with *Idd2*, is linked to the proportion of DN T cells in the lymph nodes. We generate two NOD.B10.BR-Chr9 congenic mouse strains and validate the role of this genetic interval in defining the proportion of DN T cells. Moreover, we find that the increased proportion of DN T cells in lymphoid organs is associated with a decrease in both diabetes incidence and serum IgG antibody levels. Together, the data suggest that *Idd2* is linked to DN T cell proportion and that a physiological increase in DN T cell number may be sufficient to confer resistance to autoimmune diabetes. Altogether, these findings could help identify new candidate genes for the development of therapeutic avenues aimed at modulating DN T cell number for the prevention of autoimmune diseases.

2.3 Introduction

Autoimmunity results from a break in immune tolerance that leads to the destruction of healthy organs, glands, joints or the central nervous system. The triggers that cause lymphocytes to aberrantly recognize and mount an immune response against self-antigens remain to be fully elucidated. A prominent role in the prevention of autoimmunity has been attributed to the number and function of regulatory cell subsets. Indeed, several immunoregulatory T cell subsets carry the ability to inhibit inadequate immune responses and promote peripheral tolerance, including $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ naturally occurring T cells, IL-10-producing $CD4^+$ Tr1 cells, TGF- β -producing $CD4^+$ Th3 cells, $CD8^+CD28^-$ T cells, $CD4^-CD8^-$ double negative (DN) T cells³, $CD4^+CD8^+$ T cells, and NKT cells (1-10). The specific contribution of these respective cell subtypes to the proper control of immune tolerance and prevention of autoimmune disease remains to be defined. Their diverse antigenic specificity and/or distinct mode of action provide strong hints that each of these cell subsets contribute differently to peripheral tolerance (1). Hence, there is a need to further examine the contribution of various T cell subsets to autoimmune predisposition.

Of these regulatory T cell subsets, DN T cells are of particular interest as they carry immunoregulatory properties in various pathological settings, including autoimmunity and transplantation (11). Indeed, regulatory DN T cells have been shown to promote allo- and xeno-graft tolerance (12-17), limit the incidence of graft vs host disease (17-20) as well as to provide resistance to autoimmune diabetes development in different animal models (21-23). Specifically, autoimmune-prone mice carry fewer DN T cells and injection of DN T cells has been shown to be sufficient to reduce the incidence of autoimmune diabetes in two distinct TCR transgenic mouse models (21, 22). Importantly, a low DN T cell proportion, rather than defects in DN T cell function, associates with diabetes susceptibility (22-24). Together, these observations suggest that variations in DN T cell proportion correlate with susceptibility to autoimmune diabetes. Therefore, identification of the genetic determinants defining the

proportion of DN T cells may unravel key molecular targets to increase DN T cells in lymphoid organs and thereby permit an increase in immune tolerance.

NOD mice spontaneously develops autoimmune diabetes and this inbred strain has been a key tool to investigate the aetiology of this disease (25, 26). In addition, NOD congenic mice have proved useful in defining genetic loci linked to autoimmune diabetes susceptibility (27). To that effect, we have recently shown that the NOD.NOR-*Idd13* congenic mice, which are resistant to diabetes progression (28), show a modest increase in DN T cell number relative to NOD mice, but that neither *Idd3*, *Idd5* nor *Idd9* contribute to this trait (24). Notably, the genetic determinants from the *Idd13* locus only partially restored DN T cell number, strongly suggesting that other genetic loci also contribute towards defining the proportion of DN T cells.

Herein, we take advantage of the 3A9 TCR transgenic mouse model, in which the TCR recognizes a peptide from hen egg lysozyme (HEL) in the context of I-A^k (29), allowing to investigate the genetic regulation of the proportion of DN T cells in secondary lymphoid organs. As we have previously demonstrated that the proportion of 3A9 DN T cells is significantly different in the lymph nodes of 3A9 TCR B10.BR and 3A9 TCR NOD.*H2^k* mice (22), we perform an unbiased linkage analysis on an F2 outcross from these two parental strains. We establish that the proportion of DN T cells is a complex trait, where the locus exhibiting the highest logarithm of odds (LOD) score is located on chromosome 9 and coincides with the *Idd2* locus. In line with our previous findings, the distal region of chromosome 2, which encompasses the *Idd13* locus, also shows a suggestive linkage to 3A9 DN T cell proportion (24). We develop congenic mice to validate the contribution of the chromosome 9 locus in defining the proportion of DN T cells in peripheral lymphoid organs and explore the role of this locus in conferring resistance to autoimmune diabetes.

2.4 Materials and Methods

Mice

3A9 TCR transgenic and HEL transgenic mice, where HEL is expressed under the rat insulin promoter (iHEL), on B10.BR and NOD.*H2^k* backgrounds have been previously described (30). The congenic strains were obtained by backcrossing B10.BR x NOD.*H2^k* F1 mice with the 3A9 TCR NOD.*H2^k* parental strain for 6 generations. All congenic mice were used at the 6th generation backcross. Mice were genotyped by PCR at markers D9Mit129 and D9Mit328, and mice bearing at least one B10.BR allele at both markers were backcrossed to 3A9 TCR NOD.*H2^k* mice. The iHEL transgene was introduced at the 5th generation backcross. At the 6th generation, a recombination event occurred between the D9Mit129 and D9Mit328 markers, where one of the mice presented with a B10.BR allele only at D9Mit129 marker. This mouse was the founder of the NOD.*H2^k*.Chr9S congenic strain, while the other mice, bearing B10.BR alleles at both D9Mit129 and D9Mit328 markers, were founders for the NOD.*H2^k*.Chr9L congenic strain. An Illumina medium density linkage, serviced through The Centre for Applied Genomics at the Hospital for Sick Children, was performed on the tail DNA from congenic mice to delimit the boundaries of the B10.BR congenic interval. The 3A9 TCR F2 (B10.BR x NOD.*H2^k*) mice were obtained by intercrossing F1 mice, with one of the parents bearing the 3A9 TCR transgene. All of the mouse strains were maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal house facility (Montreal, Canada). The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee, overseen by the Canadian Council for Animal Protection approved the experimental procedures.

Flow cytometry

7 to 15 week old non-diabetic mice (diastix negative) were analysed. Lymph nodes and spleen were pressed through a 70µm cell strainer (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada). Spleen cell suspensions were treated with NH₄Cl to lyse red blood cells. Single cell suspensions were stained with different combinations of the following antibodies to quantify 3A9 DN T cells; CD3ε-FITC (145-2C11; Biolegend, San Diego, CA, USA), CD4-PE (GK1.5;

Biolegend), CD8 α -PerCP (53-6.7; Biolegend), CD19-PerCP (6D5; Biolegend) and anti-clonotypic 1G12 (homemade)(31) antibody followed by detection with IgG1-allophycocyanin (RMG1-1; Biolegend). Data were collected on a FACSCalibur (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada) and analyzed with FlowJo software (Treestar, Ashland, OR, USA).

Linkage analysis

Genomic DNA was isolated from the tails of the 171 3A9 TCR transgenic F2 (B10.BR x NOD.*H2^k*) male and female mice aged between 7 to 15 weeks by using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Toronto, Ontario, Canada). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were then detected from the F2 mice using the Illumina mouse low-density linkage panel serviced through The Centre for Applied Genomics at the Hospital for Sick Children. Additional genetic markers were used to delimit the interval on mouse chromosome 9, namely *D9Mit328* (41.7Mb), *D9Mit330* (46.9Mb), *D9Mit4* (51.9Mb), *D9Mit21* (57.3 Mb), *D9Mit232* (58.2 Mb) and *D9Mit302* (67.0 Mb). DNA from 3A9 TCR B10.BR, 3A9 TCR NOD.*H2^k* and 3A9 TCR F1 (B10.BR x NOD.*H2^k*) mice were used as controls. Marker location (in Mb) was determined using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Build m37. The logarithm of odds (LOD) scores were obtained through a single quantitative trait locus model using the R/qtl package (32) for the R software (version 2.11.1). To increase SNP resolution, the Haley-Knott algorithm was applied (33). LOD scores higher than 3.5 were significant for single-dimensional analysis according to permutation tests (n=10 000, $p= 0.05$), and LOD scores between 2.09 and 3.5 were considered suggestive. A Pearson's χ^2 for allele frequencies was applied and SNPs distributions that deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium were removed. Notably, as the 3A9 TCR transgene is located on chromosome 5, we excluded the chromosome 5 data from our analysis.

Diabetes incidence study

Diabetes incidence was monitored daily in female 3A9 TCR:iHEL mice for overt signs of diabetes (wet cage, hunched posture) and every two weeks for urine glucose levels using

Diastix (Bayer, Toronto, Ontario, Canada) starting at 8 to 12 weeks of age. After two successive positive Diastix tests, overt diabetes was confirmed by blood glucose levels higher than 17 mmol/L. The age of diabetes onset is set at the first detection of elevated urine glucose levels. The mice were sacrificed within one week of detection of high blood glucose or when they reached more than 34 weeks of age. At culling, tail DNA was collected to verify the genotype of the mouse. Also, the serum was collected and the pancreas was conserved in formalin for at least 48 hours at room temperature before being sent for paraffin inclusion. The 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k* female mice included in the diabetes incidence study are littermate controls from either 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k*-Chr9L or 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k*-Chr9S congenic mice that carried homozygous NOD alleles at both D9Mit129 and D9Mit328 markers.

Histology

H&E staining was performed on 5 to 7 μ m pancreas cuts from paraffin blocks, for 2 to 4 non-successive cuts per slide with one slide per mouse (Tables 1 and 2). H&E slides were scored for infiltration as previously described (34), and according to the following scale: 0 = no infiltration, 1 = peri-insulinitis, 2 = infiltration <50%, 3 = infiltration > 50%, 4=complete infiltration.

ELISA

Total IgG was measured by ELISA according to the manufacturer's protocol (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA). Serum anti-HEL IgG, IgM and IgG1 levels were measured by ELISA on Nunc Maxisorp plates (Thermo Fisher Scientific) coated with 100 μ g/ml HEL prepared in NaHCO₃ at pH-9.5, developed with goat anti-mouse IgG-HRP (Biolegend, clone poly4053), goat anti-mouse IgM-HRP (VWR) or rat anti-mouse IgG1-biotin (Biolegend, clone RMG1-1) followed by avidin-HRP (Biolegend). A reference pool of sera from diabetic and non-diabetic TCR:iHEL mice was set to contain 1 arbitrary unit.

Statistics

Data for the various experiments were tested for significance using a non-parametric Mann–Whitney U test with a minimal threshold of 0.05. Estimation of the interval coordinates on chromosome 9 was obtained using a 95% Bayes interval test. Significance for the F2 genotype distribution differences was tested with a one way ANOVA test. Statistical significance of the differences between the diabetes incidence curves was determined with the Mantel-Cox log rank test with a minimal threshold of 0.05. All statistical analyses and the F2 distribution were obtained using the SPSS 19.0 software (IBM, Montreal, Québec, Canada).

2.5 Results

In non-transgenic mice, immunoregulatory DN T cells compose approximately 1-3% of total T cells (22, 35-37). The low number of these cells not only presents a challenge for their isolation and characterization, but limits the sensitivity in detection necessary to perform a linkage analysis. In addition, the specific characterization of immunoregulatory DN T cells is further complicated by the fact that DN T cells share the $CD4^+CD8^-TCR_{\alpha\beta}^+$ phenotype with a subset of NKT cells (37, 38), which would need to be carefully excluded from our analyses. Because of these challenges, we instead opted to take advantage of the 3A9 TCR transgenic mouse model, in which the TCR recognizes a peptide from hen egg lysozyme (HEL) in the context of I-A^k (29), allowing to investigate the genetic regulation of the proportion of DN T cells in secondary lymphoid organs. Indeed, as for other TCR transgenic systems (15, 38-43), the 3A9 TCR transgenes enhances the proportion of DN T cells in peripheral lymphoid organs and precludes the differentiation of potentially contaminating NKT cells, increasing the sensitivity of detection of DN T cells (22-24). We thus performed an F2 outcross of the 3A9 TCR B10.BR and 3A9 TCR NOD.*H2^k* parental strains, as they exhibit a significant difference in the proportion of 3A9 DN T cells in the lymph nodes (22).

We analyzed the proportion of 3A9 DN T cells in the lymph nodes of 171 3A9 TCR F2 (B10.BR x NOD.*H2^k*) mice, where 3A9 TCR+ cells are detected with the 1G12 monoclonal antibody. The 3A9 TCR+ cells are electronically gated to select for all 3A9 TCR+ T cells (Figure 1a, left). The proportion of CD4+, CD8+ and CD4-CD8- T cells is shown among 3A9 TCR+ T cells (Figure 1a, right). In this example, the total proportion of 3A9 DN T cells in lymph nodes is 18%, where we find 44.2% of CD4-CD8- cells among 40.6% of 3A9 TCR+ cells (44.2% x 40.6% = 18.0%). The proportion of 3A9 DN T cells in the 171 3A9 TCR+F2 (B10.BR x NOD.*H2^k*) mice varies from 5 to 34% and presents with a Gaussian distribution (Figure 1b). In agreement with our previous finding that the *Idd13* locus only partially restores DN T cell proportion in NOD mice (24), the normal distribution suggests that more than one locus contribute towards defining the proportion of 3A9 DN T cells in the lymph nodes.

For the linkage analyses, we subjected the DNA of the 171 F2 mice to the Illumina Golden Gate low-density platform and performed a genome-wide SNP genotyping. Of note, as the 3A9 TCR transgene is located on chromosome 5 (44), and that we select for 3A9 TCR positive mice for analysis, the data for chromosome 5 could not be included in the linkage analysis. The linkage of the genotypes to the phenotypes demonstrated that a locus on chromosome 9 is tightly linked to the proportion of 3A9 TCR DN T cells in the lymph nodes, presenting with a maximal LOD score above 4 (Figure 2). Interestingly, this region of chromosome 9 is comprised within the *Idd2* diabetes-resistance locus. As we have previously shown that 3A9 DN T cells can confer resistance to diabetes (22), it is tempting to suggest that the regulation of DN T cell proportion contributes to the diabetes-resistant trait conferred by the *Idd2* locus. Moreover, the distal region of chromosome 2, which encompasses the *Idd13* locus known to partially restores DN T cell number (24), exceeded the suggestive threshold along with five other genetic regions, namely on chromosomes 1, 4, 12 as well as two regions on chromosome 6 (Figure 2). As for the loci on chromosomes 2 and 9, three of the five other intervals reaching the suggestive threshold also coincide with known autoimmune susceptibility loci, namely the *Idd9* locus on chromosome 4, the *Idd6* and *Idd19* loci on distal chromosome 6 and the *Nbwal* quantitative trait locus on chromosome 12 (Figure 3). Together, these data suggest that the proportion of 3A9 DN T cells is associated with more than one locus which are linked to autoimmune susceptibility loci.

The most significant linkage for 3A9 DN T cell proportion was observed on chromosome 9. Although we have previously shown that the proportion of 3A9 CD4⁺ and CD8⁺ T cells are similar between both 3A9 TCR B10.Br and 3A9 TCR NOD.*H2^k* parental strains (24, 30), this does not discount the possibility that the variation in 3A9 DN T cell proportion in the F2 mice results from secondary variations in either 3A9 CD4⁺ or CD8⁺ T cells. Therefore, to validate that this linkage was indeed specific to 3A9 DN T cells, we plotted the linkage analysis for both 3A9 CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 4). We find that both 3A9 CD4⁺ T cells and 3A9 CD8⁺ T cells are respectively associated with significant linkages on chromosomes 7 and 3, but not on chromosome 9, demonstrating that the locus on chromosome 9 is linked to 3A9 DN T cell proportion and not to variations in other 3A9 T cell populations.

To better define the genetic interval on chromosome 9 linked to 3A9 DN T cell proportion, we generated a higher resolution map by including 6 additional genetic markers, namely *D9Mit328*, *D9Mit330*, *D9Mit4*, *D9Mit21*, *D9Mit232* and *D9Mit302* (Figure 5a). We find that 5 of these markers exceed the significance threshold. To determine the extent of the contribution of this locus towards determining the proportion of 3A9 DN T cells in the lymph nodes, we segregated the 171 F2 mice according to their genotype at the *D9Mit232* marker, exhibiting the highest LOD score of 4.27. F2 mice carrying the homozygous B10.BR allele at the *D9Mit232* marker presented with a proportion of 3A9 DN T cells ranging from 5 to 29% with an average of 17% (Figure 5b). However, F2 mice homozygous for the NOD allele at that marker showed a significantly reduced proportion of 3A9 DN T cells, with an average of 12% (Figure 5b). This result suggests that the B10.BR alleles on chromosome 9 near the *D9Mit232* marker contribute towards increasing the proportion of 3A9 DN T cells in the lymph nodes. Finally, F2 mice carrying a heterozygous genotype for the B10.BR/NOD allele at that marker showed a proportion of 3A9 DN T cells varying from 4 to 34% with an average of 15%, not significantly different from mice that bear the B10.BR homozygous genotype (Figure 5b). This result suggests that the B10.BR alleles, in relation to the NOD alleles at or near the *D9Mit232* marker, act either in a dominant or co-dominant fashion for defining the proportion of 3A9 DN T cells in the lymph nodes.

Together, the above results strongly suggest that the genetic determinants near the *D9Mit232* marker on mouse chromosome 9 contributes towards defining the proportion of 3A9 DN T cells. To validate this result, we generated 3A9 TCR NOD.*H2^k* congenic mice bearing B10.BR alleles on chromosome 9. We performed 6 backcrosses to the 3A9 TCR NOD.*H2^k* background by genotyping for B10.BR alleles at *D9Mit129* and *D9Mit328* at each generation, where both markers were found near the highest LOD score in the preliminary linkage analysis composed of 93 F2 mice (not shown). We obtained 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9L congenic mice, where L stands for “long”. During the 6th backcross, we also obtained a recombinant mouse which bore B10.BR alleles only at the *D9Mit129* marker. We named this strain 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9S, where S stands for “short”.

We crossed the mice bearing a heterozygous genotype at either the Chr9L or the Chr9S loci to obtain homozygous mice at each locus. The purity of the genetic background of the homozygous mice from both strains was interrogated using the Illumina Golden Gate medium-density platform to perform a genome-wide SNP genotyping. Apart from the chromosome 9 genetic locus, both strains showed more than 99% homology to the NOD.*H2^k* parental strain, where none of the potentially B10.BR contaminating DNA was located within known *Idd* loci (data not shown). We did observe 0.3% of B10.Br alleles in both congenic strains, which were located on chromosome 15 in an interval not linked to the proportion of 3A9 DN T cells (Figure 2 and data not shown). With this genome-wide genotyping analysis, we also delimited the B10.BR congenic intervals in both chromosome 9 congenic lines as depicted on Figure 6. Note that both the Chr9L and the Chr9S intervals at least partly coincide with a segment of the *Idd2* diabetes-resistance locus.

With our newly generated 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9L and 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9S congenic mice, we determined the contribution of these loci in defining the proportion of 3A9 DN T cells (Figure 7a). Importantly, we observed no difference in the proportion of 3A9 DN T cells between the parental 3A9 TCR NOD.*H2^k* and the 3A9 TCR NOD.*H2^k* congenic littermate controls bearing homozygous NOD alleles at both D9Mit129 and D9Mit328, suggesting that B10.Br alleles on chromosome 15 do not significantly contribute to the phenotype (not shown). In comparison with 3A9 TCR NOD.*H2^k* mice, both 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9L and 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9S congenic strains exhibited a higher proportion of 3A9 DN T cells in the spleen and lymph nodes (Figure 7b). Specifically, both congenic strains exhibited an average of 2% and 6% of 3A9 DN T cells in the spleen and lymph nodes, respectively, representing almost a two-fold increase over that of 3A9 TCR NOD.*H2^k* mice (Figure 7b). Expectedly, as the proportion of 3A9 DN T cells is regulated by more than one locus and that the linkage analysis explains only 9.8% of the variance, the proportion of 3A9 DN T cells was only partially restored in both the 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9L and 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9S congenic strains relative to that of 3A9 TCR B10.BR mice, where 3A9 TCR B10.BR mice present with approximately 8% and 30% of 3A9 DN T cells in the spleen and lymph nodes, respectively (Figure 7b). Still, as both the Chr9L

and Chr9S genetic intervals from the B10.BR strain demonstrate an equivalent potential to partially restore the proportion of 3A9 DN T cells in 3A9 TCR NOD. $H2^k$ mice, this suggests that the genetic determinants defining the proportion of 3A9 DN T cells are likely to be encoded within the shorter Chr9S interval. Taken together, these data demonstrate that the Chr9S locus is sufficient to partially restore the proportion of 3A9 DN T cells in 3A9 TCR NOD. $H2^k$ mice.

As the *Idd2* locus partially coincides with both the Chr9L and the Chr9S loci, we opted to define whether the complete Chr9L or the shorter Chr9S locus would contribute to autoimmune diabetes resistance. To address this, we took advantage of the fact that 3A9 TCR:iHEL NOD. $H2^k$ mice are highly susceptible to autoimmune diabetes, whereas the 3A9 TCR:iHEL B10.BR mice are rather resistant (30). We thus bred both 3A9 TCR NOD. $H2^k$ -Chr9L and 3A9 TCR NOD. $H2^k$ -Chr9S mice to iHEL NOD. $H2^k$ mice to generate 3A9 TCR:iHEL NOD. $H2^k$ -Chr9L and 3A9 TCR:iHEL NOD. $H2^k$ -Chr9S mice. In these double transgenic mice, we again observed a partial restoration of 3A9 DN T cell number in both the spleen and lymph nodes relative to that of 3A9 TCR:iHEL NOD. $H2^k$ mice (Figure 7b). However, the 3A9 TCR:iHEL NOD. $H2^k$ -Chr9L congenic mice exhibited a higher proportion of 3A9 DN T cells relative to the 3A9 TCR:iHEL NOD. $H2^k$ -Chr9S congenic mice (Figure 7b). The presence of a self-ligand in this 3A9 TCR transgenic mouse model thus revealed that at least two genes within the Chr9L interval define the proportion of 3A9 DN T cells in the lymph nodes, where at least one of these genes is located within the Chr9S interval.

We have previously shown that elevated proportions of 3A9 DN T cells in secondary lymphoid organs correlate with diabetes susceptibility. We thus expected that 3A9 TCR:iHEL NOD. $H2^k$ -Chr9L mice, which exhibit a higher proportion of 3A9 DN T cells, would be more resistant to autoimmune diabetes than both 3A9 TCR:iHEL NOD. $H2^k$ and 3A9 TCR:iHEL NOD. $H2^k$ -Chr9S mice. Indeed, by monitoring the diabetes incidence, we found that, similar to the 3A9 TCR:insHEL B10.BR mice, only 25% of 3A9 TCR:iHEL NOD. $H2^k$ -Chr9L female mice progressed towards overt diabetes within 34 weeks (Figure 8a). However, although 3A9

TCR:iHEL NOD.*H2^k*-Chr9S mice seemed to exhibit a lower diabetes incidence than 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k* mice, this did not reach statistical significance in our relatively small cohort (Figure 8a). Expectedly, as a greater proportion of 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k* mice progressed to overt diabetes, the degree of lymphocytic infiltration in mice from the diabetes incidence study was slightly more severe in this strain relative to the other strains (Figure 8b). Altogether, these data support the view that elevated 3A9 DN T cell number correlate with autoimmune diabetes resistance and that at least two genes within the Chr9L interval define DN T cell number. Moreover, these data show that the Chr9L interval is sufficient to confer diabetes resistance in the 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k* mouse model.

As for the non-transgenic NOD mice (45, 46), the progression to overt diabetes in the 3A9 TCR:iHEL model is associated with auto-antibody production (47). In addition, we have shown that transfer of 3A9 DN T cells in 3A9 TCR:iHEL diabetes-prone mice leads to a reduction in autoantibody levels, likely due to the elimination of activated B cells (22, 23). We thus assessed whether the increased proportion of 3A9 DN T cells in the 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k*-Chr9L and 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k*-Chr9S mice lead to a concomitant decrease in autoantibody levels. Indeed, both congenic strains presented with lower levels of HEL-specific IgG and IgG1 antibodies, but not HEL specific IgM antibodies relative to 3A9 TCR NOD.*H2^k* mice (Figure 9a). Interestingly, the decrease in HEL-specific IgG antibodies in the 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k*-Chr9L and 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k*-Chr9S mice was not limited to HEL-specificity, as total IgG levels were also reduced in these mice (Figure 9a). In addition, a comparable degree of lymphocytic infiltration in the islets of these euglycemic mice was observed (Figure 9b), demonstrating that the decrease in IgG levels was not due to a decrease in the autoimmune response towards islet antigens. It is rather likely attributed to the nature of this response. Together, these findings suggest that genetic determinants within the Chr9L locus leads to an increase in DN T cell number accompanied by a parallel decrease IgG serum levels and a significant decrease in diabetes progression.

2.6 Discussion

Immunoregulatory DN T cells contribute to immune tolerance in various pathological settings, including autoimmune diabetes (11, 15, 21, 22, 37). The elevated proportion of DN T cells in autoimmune-resistant relative to autoimmune-prone mice has allowed us to perform a linkage analysis and uncover that the proportion of DN T cells is a complex trait. Importantly, we show that the diabetes-resistance locus, *Idd2*, is linked to this trait. In addition, we develop two congenic lines bearing B10.BR alleles on chromosome 9, in a locus which partially encompasses *Idd2*. Using these congenic lines we demonstrate that the locus on mouse chromosome 9 impacts the proportion of 3A9 DN T cells, the IgG serum levels and contributes to diabetes resistance in the 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k* mouse model. By comparing the strains bearing the B10.BR alleles in Chr9L and Chr9S strains, we also find that at least two genetic determinants contribute to these traits. Taken together, our data support the view that the mouse *Idd2* locus is linked to the proportion of immunoregulatory DN T cells, a trait associated with autoimmune diabetes resistance.

The *Idd2* locus was initially linked to diabetes resistance in a NOD to NON outcross (48, 49). Interestingly, the NON strain exhibits a low proportion of total CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and *Tlf* (for T lymphocyte frequency) coincides with *Idd2* (50, 51). Using the B10.BR to NOD.*H2^k* outcross, we find that *Idd2* is linked to the proportion of a T cells subset, namely DN T cells, for which the NOD background now exhibits the lower proportion of cells. However, we do not find that *Idd2* is linked to the proportion of CD4⁺ or CD8⁺ T cells in the F2 outcross. The reason for the discrepancy between these results is likely due to the different parental strains used, as B10.BR mice, in contrast with NON mice, do not present with a low T cell proportion.

Initial studies attempting to generate NOD.NON-*Idd2* congenic lines unfortunately lost the diabetes resistance trait due to a high frequency of recombination events between the original

linkage and the trait (52). We have now successfully generated NOD.B10-Chr9L congenic mice, which are able to confer diabetes resistance at least in the 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k* mouse model. To our knowledge, this is the first demonstration that NOD congenic mouse strain for a genetic interval coinciding with the *Idd2* locus that is protected from diabetes onset. As the Chr9L interval coincides at least in part with the *Idd2* locus, we propose that genetic determinants encoded within the Chr9L interval define *Idd2*. The relevant genetic determinants would most likely be encoded outside of the Chr9S interval, which only confers very modest diabetes resistance in the 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k* mouse model. Alternatively, genetic interactions between genes encoded with both the Chr9L and the Chr9S intervals could contribute to the diabetes resistance trait. To evaluate these hypotheses, additional congenic mice will need to be generated. Additionally, we are currently performing an outcross of the 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k*-Chr9L to NOD mice, to ultimately generate non-transgenic NOD.B10-Chr9L mice, in which we will be able to validate the contribution of this interval to diabetes resistance in the non-transgenic mice bearing the *H2^{g7}* MHC susceptibility locus.

As mentioned above the proportion of DN T cells is defined by a complex trait, including *Idd2*, *Idd13* and potentially five other suggestive loci. Using congenic mice, we have validated that both *Idd2* and *Idd13* partially contribute towards defining the proportion of DN T cells. Additional congenic mice will need to be generated to determine the contribution of the other genetic loci in defining the proportion of DN T cells. Moreover, to establish whether each locus independently or synergistically contributes to the trait, double congenic mice will need to be generated. To that effect, we are currently intercrossing 3A9 TCR NOD.*H2^k*-*Idd13* mice to 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9L mice. This experiment will allow us to establish the potential genetic interactions between these two loci in defining the proportion of 3A9 DN T cells and conferring resistance to autoimmune diabetes.

By comparing the data from our two congenic strains, namely 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k*-Chr9L and 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k*-Chr9S mice, we find that the proportion of DN T cells,

the serum IgG levels and the resistance to diabetes are likely to be defined by at least two genetic determinants within the Chr9L interval, where at least one is encoded within and one outside of the Chr9S interval. Indeed, although 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9S mice exhibit the same proportion of 3A9 DN T cells to the 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9L mice, the Chr9S interval only partially contributes to the phenotypes in the 3A9 TCR:iHEL double transgenic setting. Interestingly, of the genes encoded within the Chr9S interval we find genes of the CD3 complex, which could potentially contribute to the homeostatic regulation of DN T cells. *Thy1* and *Cbl*, among many others also present as likely candidate genes for influencing the proportion of DN T cells. However, these genes have also been associated with autoimmune phenotype (52-56) and 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9S mice congenic mice exhibit little if any resistance to autoimmune diabetes, suggesting that the gene contributing to the DN T cell phenotype in the Chr9S interval is likely to be distinct from these. Still, it is possible that the Chr9S interval would contribute to diabetes resistance in a setting other than in the 3A9 TCR transgenic model, such that these candidate genes cannot be readily discarded. Nevertheless, *Il10ra*, also included within the Chr9S interval, has particularly grabbed our attention for defining the proportion of DN T cells. Indeed, we have previously shown that IL-10 limits the expansion of 3A9 DN T cells in vitro. We are currently attempting to define whether the *Il10ra* B10.BR gene explains the increased DN T cell number in the 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9S congenic mice. Among the candidate genes present within the Chr9L interval but not in the Chr9S interval we find *Crtam*, which has been associated with diabetes induction in a mouse model of induced autoimmune diabetes and is expressed on some T cell populations (57). *Esam*, involved in hematopoiesis (58), is also of interest considering that DN T cell proportion is regulated by bone marrow intrinsic factors (24). *Tirap* and *Tbrg1* are two other genes within the Chr9L interval known to play significant roles in the immune system, which could be candidate genes for defining the proportion of DN T cells and susceptibility to diabetes.

In summary, studying the genetic underpinnings of immunoregulatory DN T cells has revealed that, as for susceptibility to autoimmune diabetes, it is a complex trait. Interestingly, at least two *Idd* susceptibility loci are linked to the proportion of DN T cells, emphasizing their

relevance in contributing to autoimmune diabetes resistance. Identifying the genetic determinants defining the proportion of DN T cells may unravel key molecular targets to increase DN T cells in lymphoid organs and thereby permit an increase in immune tolerance to prevent autoimmune disease onset. The congenic mice developed herein are important tools that will serve towards this goal.

Acknowledgments:

We thank Dr. Edward Leiter for providing a critical review of the manuscript.

Disclosures:

The authors have no financial conflicts of interest.

Footnotes:

1 This work was supported by a grant to S.L. from the Canadian Diabetes Association OG-3-13-4018. R.C. and A.N.P hold scholarships from Diabète Québec and the Université de Montréal. V.D held a scholarship from the Fonds de recherche en santé du Québec. S.L. holds a New Investigator award from the Canadian Institutes of Health Research.

2 Current address: Mitacs, Centre de recherche informatique de Montréal, Montréal, Québec, H3N 1M3, Canada

3 Abbreviations: CD4-CD8- double negative T cells, DN T cells; hen egg lysozyme, HEL; HEL expressed under the rat-insulin promoter, iHEL; single nucleotide polymorphisms, SNPs; logarithm of odds, LOD.

2.7 References

1. Shevach, E. M. 2006. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25: 195-201.
2. Qin, H. Y., R. Mukherjee, E. Lee-Chan, C. Ewen, R. C. Bleackley, and B. Singh. 2006. A novel mechanism of regulatory T cell-mediated down-regulation of autoimmunity. *Int Immunol* 18: 1001-1015.
3. Godfrey, D. I., K. J. Hammond, L. D. Poulton, M. J. Smyth, and A. G. Baxter. 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 21: 573-583.
4. Astier, A. L., and D. A. Hafler. 2007. Abnormal Tr1 differentiation in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 191: 70-78.
5. Hall, A. M., F. J. Ward, M. A. Vickers, L. M. Stott, S. J. Urbaniak, and R. N. Barker. 2002. Interleukin-10-mediated regulatory T-cell responses to epitopes on a human red blood cell autoantigen. *Blood* 100: 4529-4536.
6. Battaglia, M., A. Stabilini, E. Draghici, B. Migliavacca, S. Gregori, E. Bonifacio, and M. G. Roncarolo. 2006. Induction of Tolerance in Type 1 Diabetes via Both CD4+CD25+ T Regulatory Cells and T Regulatory Type 1 Cells. *Diabetes* 55: 1571-1580.
7. Singh, R. P., A. La Cava, M. Wong, F. Ebling, and B. H. Hahn. 2007. CD8+ T cell-mediated suppression of autoimmunity in a murine lupus model of peptide-induced immune tolerance depends on Foxp3 expression. *J Immunol* 178: 7649-7657.
8. Filaci, G., S. Bacilieri, M. Fravega, M. Monetti, P. Contini, M. Ghio, M. Setti, F. Puppo, and F. Indiveri. 2001. Impairment of CD8+ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 166: 6452-6457.
9. Zhang, B., X. Zhang, F. Tang, L. Zhu, and Y. Liu. 2008. Reduction of forkhead box P3 levels in CD4+CD25high T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology* 153: 182-187.
10. Long, S. A., K. Cerosaletti, P. L. Bollyky, M. Tatum, H. Shilling, S. Zhang, Z. Y. Zhang, C. Pihoker, S. Sanda, C. Greenbaum, and J. H. Buckner. Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes* 59: 407-415.
11. Hillhouse, E. E., J. S. Delisle, and S. Lesage. 2013. Immunoregulatory CD4(-)CD8(-) T cells as a potential therapeutic tool for transplantation, autoimmunity, and cancer. *Frontiers in immunology* 4: 6.
12. Chen, W., M. S. Ford, K. J. Young, M. I. Cybulsky, and L. Zhang. 2003. Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival. *J Immunol* 170: 1846-1853.

13. Chen, W., M. S. Ford, K. J. Young, and L. Zhang. 2003. Infusion of in vitro-generated DN T regulatory cells induces permanent cardiac allograft survival in mice. *Transplant Proc* 35: 2479-2480.
14. Chen, W., D. Zhou, J. R. Torrealba, T. K. Waddell, D. Grant, and L. Zhang. 2005. Donor lymphocyte infusion induces long-term donor-specific cardiac xenograft survival through activation of recipient double-negative regulatory T cells. *J Immunol* 175: 3409-3416.
15. Zhang, Z. X., L. Yang, K. J. Young, B. DuTemple, and L. Zhang. 2000. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 6: 782-789.
16. Ford, M. S., K. J. Young, Z. Zhang, P. S. Ohashi, and L. Zhang. 2002. The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 196: 261-267.
17. Young, K. J., L. Yang, M. J. Phillips, and L. Zhang. 2002. Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood* 100: 3408-3414.
18. Young, K. J., B. DuTemple, M. J. Phillips, and L. Zhang. 2003. Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells. *J Immunol* 171: 134-141.
19. He, K. M., Y. Ma, S. Wang, W. P. Min, R. Zhong, A. Jevnikar, and Z. X. Zhang. 2007. Donor double-negative Treg promote allogeneic mixed chimerism and tolerance. *Eur J Immunol* 37: 3455-3466.
20. McIver, Z., B. Serio, A. Dunbar, C. L. O'Keefe, J. Powers, M. Wlodarski, T. Jin, R. Sobecks, B. Bolwell, and J. P. Maciejewski. 2008. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 141: 170-178.
21. Ford, M. S., W. Chen, S. Wong, C. Li, R. Vanama, A. R. Elford, S. L. Asa, P. S. Ohashi, and L. Zhang. 2007. Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development. *Eur J Immunol* 37: 2234-2241.
22. Dugas, V., C. Beauchamp, G. Chabot-Roy, E. E. Hillhouse, and S. Lesage. 2010. Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes. *J Autoimmun* 35: 23-32.
23. Hillhouse, E. E., C. Beauchamp, G. Chabot-Roy, V. Dugas, and S. Lesage. 2010. Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. *Immunol Cell Biol* 88: 771-780.
24. Dugas, V., A. Liston, E. E. Hillhouse, R. Collin, G. Chabot-Roy, A. N. Pelletier, C. Beauchamp, K. Hardy, and S. Lesage. 2014. Idd13 is involved in determining immunoregulatory DN T-cell number in NOD mice. *Genes Immun* 15: 82-87.
25. Anderson, M. S., and J. A. Bluestone. 2005. THE NOD MOUSE: A Model of Immune Dysregulation. *Annu Rev Immunol* 23: 447-485.

26. Driver, J. P., D. V. Serreze, and Y. G. Chen. 2011. Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin Immunopathol* 33: 67-87.
27. Wicker, L. S., J. A. Todd, and L. B. Peterson. 1995. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol* 13: 179-200.
28. Serreze, D. V., M. Prochazka, P. C. Reifsnyder, M. M. Bridgett, and E. H. Leiter. 1994. Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene. *J Exp Med* 180: 1553-1558.
29. Allen, P. M., G. R. Matsueda, R. J. Evans, J. B. Dunbar, Jr., G. R. Marshall, and E. R. Unanue. 1987. Identification of the T-cell and Ia contact residues of a T-cell antigenic epitope. *Nature* 327: 713-715.
30. Lesage, S., S. B. Hartley, S. Akkaraju, J. Wilson, M. Townsend, and C. C. Goodnow. 2002. Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes. *J Exp Med* 196: 1175-1188.
31. Peterson, D. A., R. J. DiPaolo, O. Kanagawa, and E. R. Unanue. 1999. Quantitative analysis of the T cell repertoire that escapes negative selection. *Immunity* 11: 453-462.
32. Broman, K. W., H. Wu, S. Sen, and G. A. Churchill. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889-890.
33. Haley, C. S., and S. A. Knott. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69: 315-324.
34. Hillhouse, E. E., R. Collin, G. Chabot-Roy, M. J. Guyon, N. Tessier, M. Boulay, P. Liscourt, and S. Lesage. 2013. Nearby Construction Impedes the Progression to Overt Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Journal of diabetes research* 2013: 620313.
35. Abraham, V. S., D. H. Sachs, and M. Sykes. 1992. Mechanism of protection from graft-versus-host disease mortality by IL-2. III. Early reductions in donor T cell subsets and expansion of a CD3+CD4-CD8- cell population. *J Immunol* 148: 3746-3752.
36. Strober, S., S. Dejbachsh-Jones, P. Van Vlasselaer, G. Duwe, S. Salimi, and J. P. Allison. 1989. Cloned natural suppressor cell lines express the CD3+CD4-CD8- surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor. *J Immunol* 143: 1118-1122.
37. Hillhouse, E. E., and S. Lesage. 2013. A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells. *J Autoimmun* 40: 58-65.
38. Bendelac, A., M. N. Rivera, S. H. Park, and J. H. Roark. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 15: 535-562.
39. Egawa, T., T. Kreslavsky, D. R. Littman, and H. von Boehmer. 2008. Lineage diversion of T cell receptor transgenic thymocytes revealed by lineage fate mapping. *PLoS ONE* 3: e1512.
40. Viret, C., and C. A. Janeway, Jr. 2003. Self-specific MHC class II-restricted CD4-CD8- T cells that escape deletion and lack regulatory activity. *J Immunol* 170: 201-209.

41. Illes, Z., H. Waldner, J. Reddy, A. C. Anderson, R. A. Sobel, and V. K. Kuchroo. 2007. Modulation of CD4 co-receptor limits spontaneous autoimmunity when high-affinity transgenic TCR specific for self-antigen is expressed on a genetically resistant background. *Int Immunol* 19: 1235-1248.
42. Fritsch, M., A. Andersson, K. Petersson, and F. Ivars. 1998. A TCR alpha chain transgene induces maturation of CD4- CD8- alpha beta+ T cells from gamma delta T cell precursors. *Eur J Immunol* 28: 828-837.
43. Priatel, J. J., O. Utting, and H. S. Teh. 2001. TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J Immunol* 167: 6188-6194.
44. Liston, A., S. Lesage, D. H. Gray, L. A. O'Reilly, A. Strasser, A. M. Fahrner, R. L. Boyd, J. Wilson, A. G. Baxter, E. M. Gallo, G. R. Crabtree, K. Peng, S. R. Wilson, and C. C. Goodnow. 2004. Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity* 21: 817-830.
45. Melanitou, E., D. Devendra, E. Liu, D. Miao, and G. S. Eisenbarth. 2004. Early and quantal (by litter) expression of insulin autoantibodies in the nonobese diabetic mice predict early diabetes onset. *J Immunol* 173: 6603-6610.
46. Yu, L., D. T. Robles, N. Abiru, P. Kaur, M. Rewers, K. Kelemen, and G. S. Eisenbarth. 2000. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1701-1706.
47. Silva, D. G., S. R. Daley, J. Hogan, S. K. Lee, C. E. Teh, D. Y. Hu, K. P. Lam, C. C. Goodnow, and C. G. Vinuesa. 2011. Anti-islet autoantibodies trigger autoimmune diabetes in the presence of an increased frequency of islet-reactive CD4 T cells. *Diabetes* 60: 2102-2111.
48. McAleer, M. A., P. Reifsnnyder, S. M. Palmer, M. Prochazka, J. M. Love, J. B. Copeman, E. E. Powell, N. R. Rodrigues, J. B. Prins, D. V. Serreze, and et al. 1995. Crosses of NOD mice with the related NON strain. A polygenic model for IDDM. *Diabetes* 44: 1186-1195.
49. Prochazka, M., E. H. Leiter, D. V. Serreze, and D. L. Coleman. 1987. Three recessive loci required for insulin-dependent diabetes in nonobese diabetic mice. *Science* 237: 286-289.
50. Pearce, R. B., B. Formby, K. Healy, and C. M. Peterson. 1995. Association of an androgen-responsive T cell phenotype with murine diabetes and Idd2. *Autoimmunity* 20: 247-258.
51. Pearce, R. B. 1998. Fine-mapping of the mouse T lymphocyte fraction (Tlf) locus on chromosome 9: association with autoimmune diabetes. *Autoimmunity* 28: 31-45.
52. Prochazka, M., D. V. Serreze, S. M. Worthen, and E. H. Leiter. 1989. Genetic control of diabetogenesis in NOD/Lt mice. Development and analysis of congenic stocks. *Diabetes* 38: 1446-1455.

53. Rudd, C. E., and H. Schneider. 2000. Lymphocyte signaling: Cbl sets the threshold for autoimmunity. *Current biology : CB* 10: R344-347.
54. Manjarrez-Orduno, N., E. Marasco, S. A. Chung, M. S. Katz, J. F. Kiridly, K. R. Simpfendorfer, J. Freudenberg, D. H. Ballard, E. Nashi, T. J. Hopkins, D. S. Cunninghame Graham, A. T. Lee, M. J. Coenen, B. Franke, D. W. Swinkels, R. R. Graham, R. P. Kimberly, P. M. Gaffney, T. J. Vyse, T. W. Behrens, L. A. Criswell, B. Diamond, and P. K. Gregersen. 2012. CSK regulatory polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus and influences B-cell signaling and activation. *Nat Genet* 44: 1227-1230.
55. Martin, J. E., J. C. Broen, F. D. Carmona, M. Teruel, C. P. Simeon, M. C. Vonk, R. van 't Slot, L. Rodriguez-Rodriguez, E. Vicente, V. Fonollosa, N. Ortego-Centeno, M. A. Gonzalez-Gay, F. J. Garcia-Hernandez, P. G. de la Pena, P. Carreira, G. Spanish Scleroderma, A. E. Voskuyl, A. J. Schuerwegh, P. L. van Riel, A. Kreuter, T. Witte, G. Riemekasten, P. Airo, R. Scorza, C. Lunardi, N. Hunzelmann, J. H. Distler, L. Beretta, J. van Laar, M. M. Chee, J. Worthington, A. Herrick, C. Denton, F. K. Tan, F. C. Arnett, S. Assassi, C. Fonseca, M. D. Mayes, T. R. Radstake, B. P. Koeleman, and J. Martin. 2012. Identification of CSK as a systemic sclerosis genetic risk factor through Genome Wide Association Study follow-up. *Hum Mol Genet* 21: 2825-2835.
56. Novick, D., S. Kim, G. Kaplanski, and C. A. Dinarello. 2013. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Semin Immunol* 25: 439-448.
57. Takeuchi, A., Y. Itoh, A. Takumi, C. Ishihara, N. Arase, T. Yokosuka, H. Koseki, S. Yamasaki, Y. Takai, J. Miyoshi, K. Ogasawara, and T. Saito. 2009. CRTAM confers late-stage activation of CD8⁺ T cells to regulate retention within lymph node. *J Immunol* 183: 4220-4228.
58. Sudo, T., T. Yokota, K. Oritani, Y. Satoh, T. Sugiyama, T. Ishida, H. Shibayama, S. Ezoe, N. Fujita, H. Tanaka, T. Maeda, T. Nagasawa, and Y. Kanakura. 2012. The endothelial antigen ESAM monitors hematopoietic stem cell status between quiescence and self-renewal. *J Immunol* 189: 200-210.
59. Smink, L. J., E. M. Helton, B. C. Healy, C. C. Cavnor, A. C. Lam, D. Flamez, O. S. Burren, Y. Wang, G. E. Dolman, D. B. Burdick, V. H. Everett, G. Glusman, D. Laneri, L. Rowen, H. Schuilenburg, N. M. Walker, J. Mychaleckyj, L. S. Wicker, D. L. Eizirik, J. A. Todd, and N. Goodman. 2005. T1DBase, a community web-based resource for type 1 diabetes research. *Nucleic Acids Res* 33: D544-549.

2.8 Figures

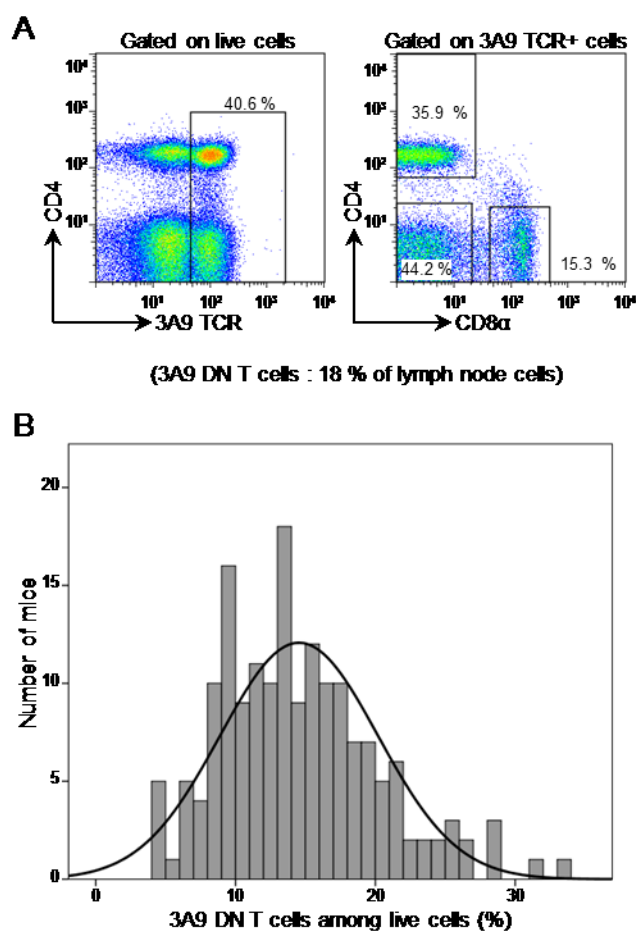


Figure 1: The proportion of 3A9 DN T cells is regulated by a complex trait. (A) Representative flow cytometry profiles for determining the proportion of 3A9 DN T cells in the lymph nodes of 3A9 TCR F2 (B10.BR x NOD.*H2^k*) mice. The left panel shows CD4 vs 3A9 TCR on total live lymphocytes, where the 3A9 TCR is detected with the 1G12 clonotypic antibody. All of the 3A9 TCR+ cells are electronically gated to display CD4 vs CD8 profile, where the percentage of CD4-CD8- T cells among 3A9 TCR+ cells is shown (right). The percentage of 3A9 DN T cells is calculated by multiplying the percentage of 3A9 TCR+ cells (left panel) to the percentage of CD4-CD8- T cells among 3A9 TCR+ cells (right panel). (B) The distribution of the F2 cohort (171 3A9 F2 mice aged from 7 to 15 weeks) relative to the total proportion of 3A9 DN T cells in lymph nodes is shown.

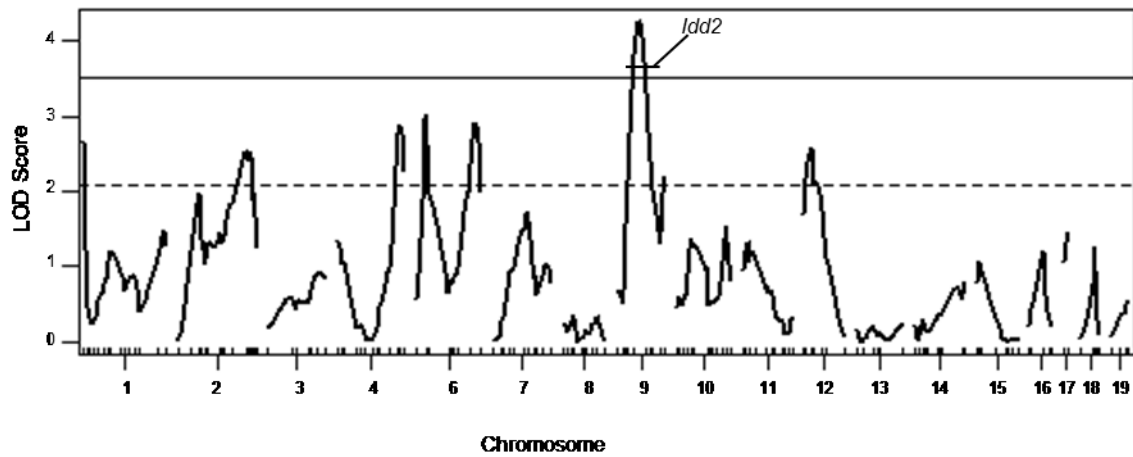


Figure 2. Genome-wide linkage analysis for the proportion of 3A9 DN T cells. Genome-wide LOD score plot (R/Qtl) for the proportion of 3A9 DN T cells in the 171 F2 cohort is shown. The approximate position of the *Idd2* locus is depicted. The full and dotted lines respectively indicate the significance threshold of $p < 0.05$ and the suggestive threshold.

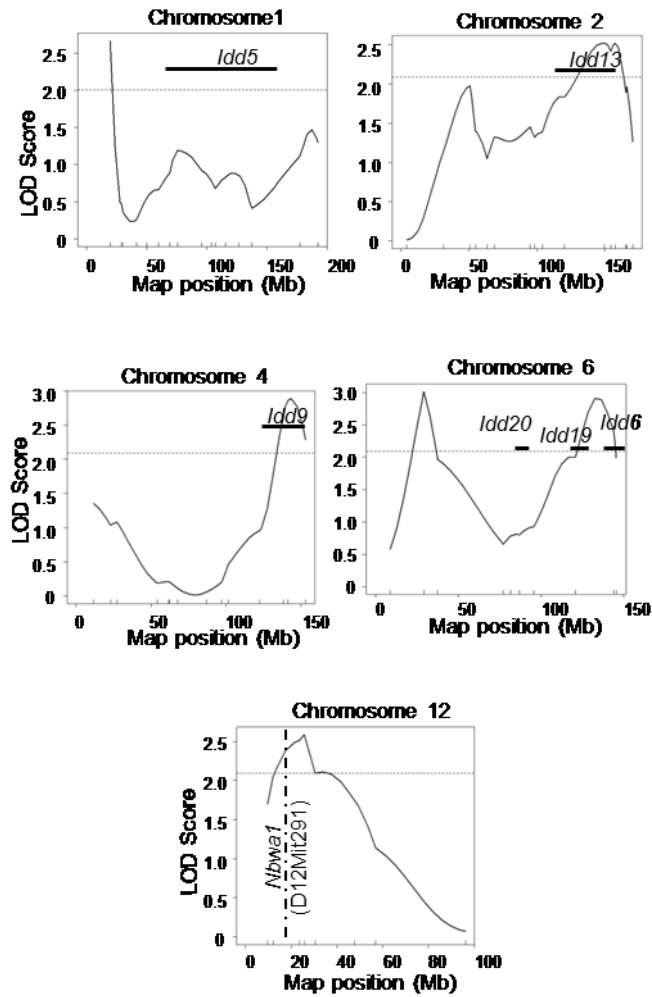


Figure 3. Some suggestive linkages for 3A9 DN T cell proportion coincide with autoimmune susceptibility loci. High resolution map of the suggestive loci linked to 3A9 DN T cell proportion. Known *Idd* loci are depicted for each of these chromosomes. The position are based on the T1D database (www.t1Dbase.org)(59). The dotted lines indicate the suggestive threshold.

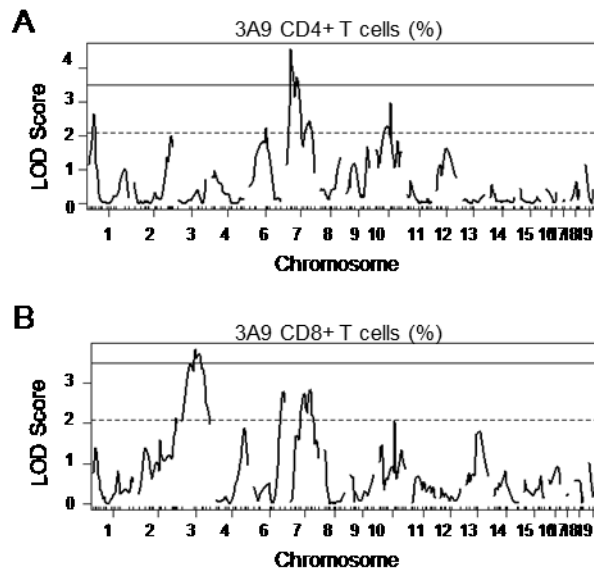


Figure 4. Genome-wide linkage analysis for the proportion of 3A9 CD4+ T cells and 3A9 CD8+ T cells. Genome-wide LOD score plot (R/Qtl) for the proportion of (A) 3A9 CD4+ T cells and (B) 3A9 CD8+ T cells in the 171 F2 cohort is shown. The full and dotted lines respectively indicate the significance threshold of $p < 0.05$ and the suggestive threshold.

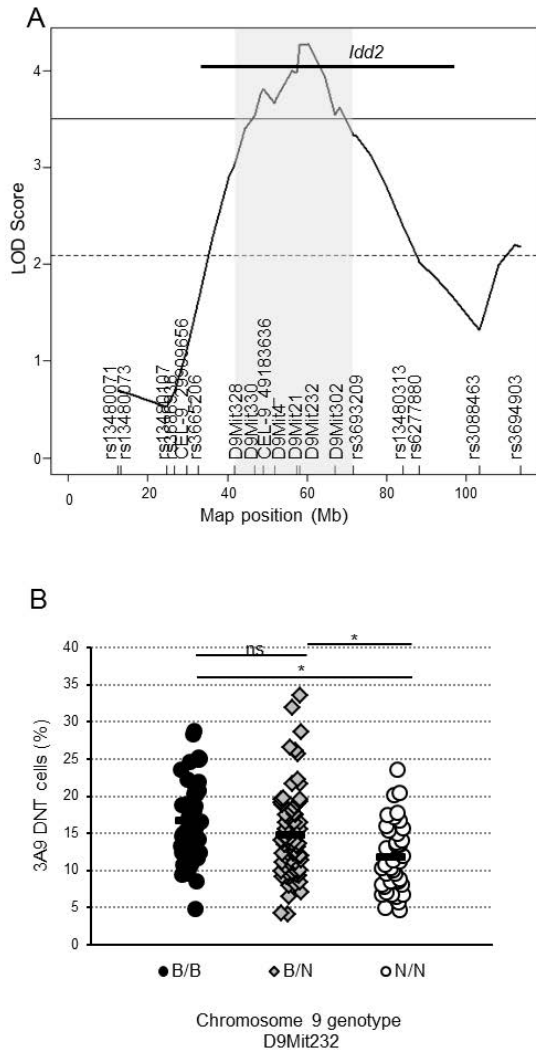


Figure 5. Chromosome 9 is significantly linked to the proportion of 3A9 DN T cells. (A) High resolution maps of the 3A9 DN T cell linkage to chromosome 9 in the cohort of 171 male and female F2 mice from 7-15 weeks old. Shaded area represents the Bayes confidence interval. The *Idd2* resistance locus is depicted based on the T1D database (www.t1Dbase.org)(59). (B) 3A9 DN T proportion in F2 mice segregated according to the genotype for the D9Mit232 marker on chromosome 9. B/B mice, homozygous for B10.BR alleles (black circles); B/N, heterozygous for B10.BR and NOD.H2k alleles (grey diamonds); N/N, homozygous for NOD.H2k alleles (empty circles). Each dot represents data for an individual mouse. p value, * <0.05 , ns = non-significant.

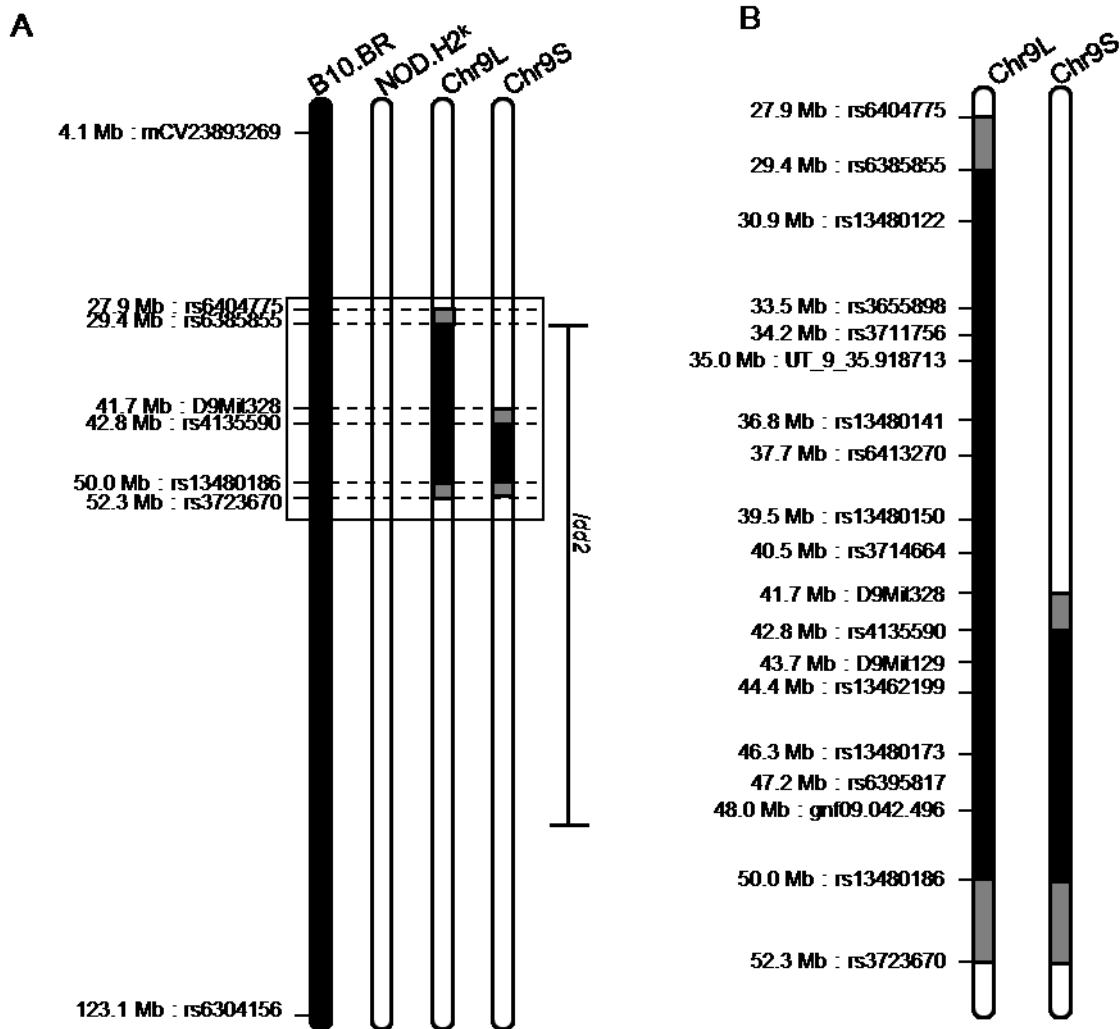


Figure 6. Delimitation of the B10.BR interval from the two congenic lines. The B10.BR congenic intervals in the 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9L and 3A9 TCR NOD.*H2^k*-Chr9S strains are shown, based on a medium density linkage analysis. (A) The chromosome 9 is fully depicted for all strains. (B) High resolution of the boxed interval in panel A to represent the Chr9 congenic intervals. Marker position is based on NCBI build m37. The D9Mit129 and D9Mit328 markers, used for genotyping the mice for the backcross are also included on the map.

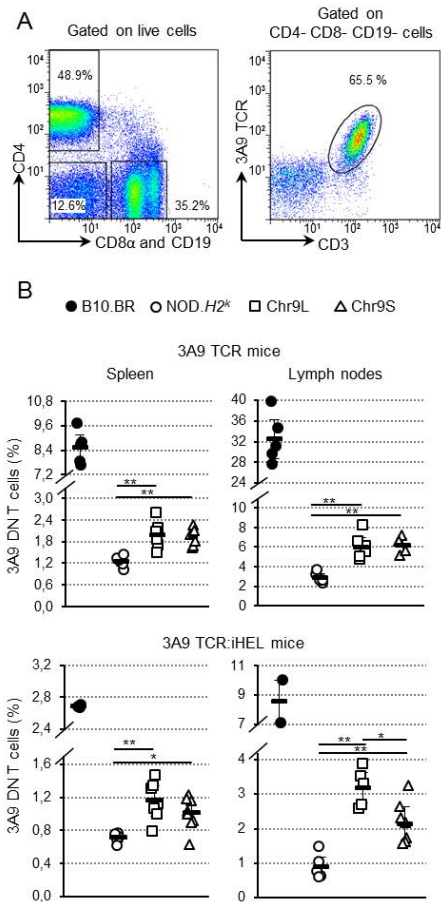


Figure 7. 3A9 TCR NOD.H2^k-Chr9L and 3A9 TCR NOD.H2^k-Chr9S congenic mice exhibit an increase in the proportion of 3A9 DN T cells. (A) Representative flow cytometry profiles of 1G12+ (3A9 TCR) CD3+ cells among CD4-CD8-CD19- cells. The proportion of 3A9 DN T cells among live lymphocytes is calculated by multiplying the percentage of CD4-CD8-CD19- cells with the percentage of 1G12+ (3A9 TCR) CD3+ cells among CD4-CD8-CD19- cells. (B) The proportion of 3A9 DN T cells is shown for 3A9 TCR single transgenic (8-13 weeks old mice) (top) and 3A9 TCR:iHEL double transgenic (8-11 weeks old mice) (bottom) mice for the spleen (left) and skin draining lymph nodes (right). Each dot represents data for one mouse. B10.BR (filled circles), NOD.H2^k (empty circles), NOD.H2^k-Chr9L (squares), NOD.H2^k-Chr9S (triangles). Congenic mice are from the 6th generation backcross. *p* value, * <0.05 , ** <0.01

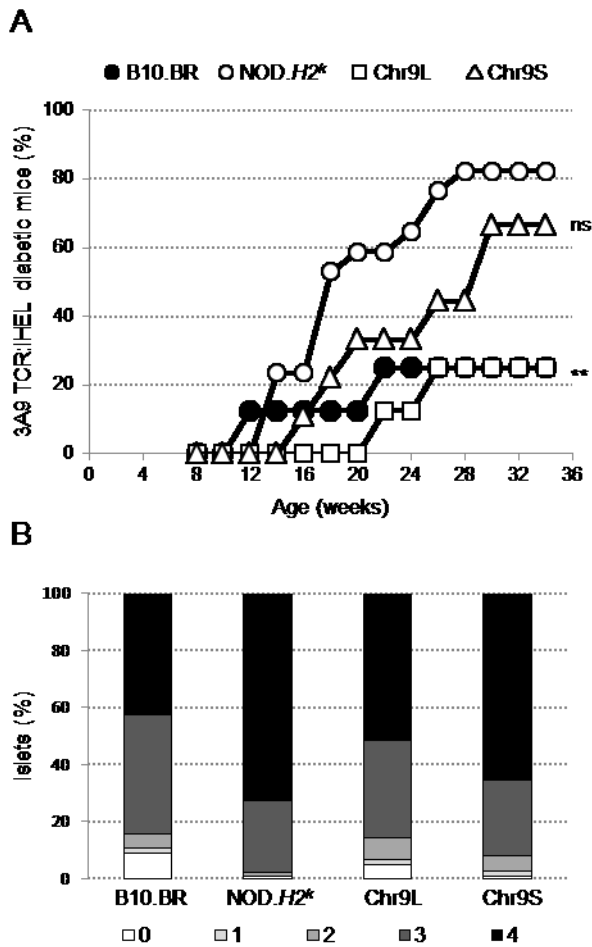


Figure 8: The Chr9L interval is sufficient to confer diabetes resistance. (A) Diabetes incidence is shown for female 3A9 TCR:iHEL NOD.H2^k-Chr9L (n=8) and 3A9 TCR:iHEL NOD.H2^k-Chr9S (n=9) congenic mice and for female 3A9 TCR:iHEL B10.BR (n=8) and 3A9 TCR:iHEL NOD.H2^k (n=17) control mice. Note that 3A9 TCR:iHEL NOD.H2^k female mice are littermate controls from either the 3A9 TCR:iHEL NOD.H2^k-Chr9L or the 3A9 TCR:iHEL NOD.H2^k-Chr9S congenic strain, where the genotype for the Chr9L or Chr9S interval was homozygous for NOD alleles. *p* value, **<0.01 according to Log-rank (Mantel-Cox) test, ns = non-significant. (B) The degree of islet infiltration is shown for mice included in the diabetes incidence study and was scored in non-diabetic mice older than 34 weeks, and in diabetic mice of various age, after confirmation of the diabetes status. The following number of mice was analyzed for islet infiltration: B10.BR n=6 ; NOD.H2k n=10 ; Chr9L n=8 ; Chr9S n=5.

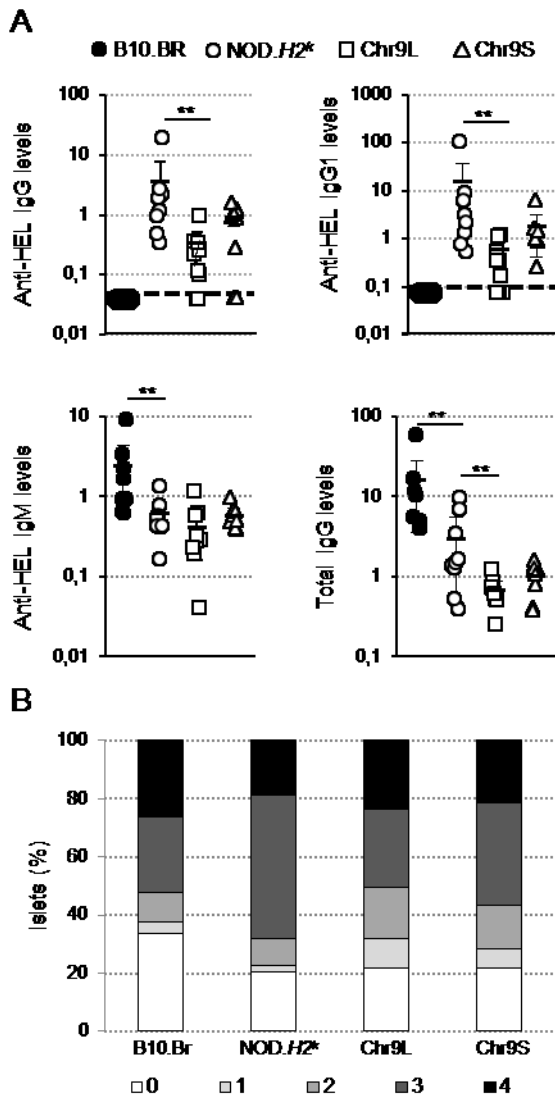


Figure 9. Reduced IgG serum antibody levels in 3A9 TCR:iHEL NOD.H2^k-Chr9L congenic mice. (A) Anti-HEL IgG, anti-HEL IgG1, anti-HEL IgM and total IgG levels in the serum of 9-18 weeks old male or female non-diabetic congenic and control mice are shown relative to a pool of serum from 3A9 TCR:iHEL NOD.H2^k mice which was set as a value of 1. Each dot represents data for one mouse. Data under detection threshold are excluded from the statistical tests. *p* value, **<0.01. (B) The degree of islet infiltration is shown for euglycemic male and female mice aged between 7 and 18 weeks. The following number of mice was analyzed for islet infiltration: B10.BR n=7 ; NOD.H2^k n=8 ; NOD.H2^k_Chr9L n=8 ; NOD.H2^k_Chr9S n=9.

Table I. Islet count details for Figure 8b

	B10.BR	NOD.H2*	NOD.H2* Chr9L	NOD.H2* Chr9S
Number of mice	6	10	8	5
Total islets counted per strain	170	171	173	107
Mean islets per cut	9.07	5.7	6.91	7.13

Table II. Islet count details for Figure 9b

	B10.BR	NOD.H2*	NOD.H2* Chr9L	NOD.H2* Chr9S
Number of mice	7	8	8	9
Total islets counted per strain	176	102	197	255
Mean islets per cut	8.38	4.96	8.33	9.2

Chapitre 3 : Article 2

3.1 Genetic interaction between two insulin-dependent diabetes susceptibility loci, *Idd2* and *Idd13*, in determining immunoregulatory DN T cell proportion

Roxanne Collin, Kathy Doyon, Victor Mullins-Dansereau, Martin Karam; Geneviève Chabot-Roy, Erin E Hillhouse, Alexandre Orthwein, Sylvie Lesage

Cet article a été publié dans la revue *Immunogenetics* Vol 70(8) : 495–509 (2018)

Il s'agit de la suite logique des découvertes de l'article 1 et de l'article publié par Dugas et al. [290], où nous avons identifié plusieurs locus contrôlant potentiellement la proportion de cellules DN T et validé le rôle des locus *Idd2* et *Idd13*. Suite à des analyses plus poussées des souris F2 nous avons testé l'hypothèse que les locus *Idd2* et *Idd13* pourraient interagir dans la détermination de la proportion de cellules DN T. Cet article apporte plusieurs réponses sur le contrôle génétique des cellules DN T par les locus individuels et combinés.

Pour cet article, j'ai réalisé la caractérisation initiale du phénotype des lignées congéniques NOD.*H2^k-Idd2/Idd13*, pour la proportion de cellules DN T, les niveaux d'auto-anticorps, l'histologie et l'incidence de diabète. J'ai généré les figures correspondantes et ai également participé à l'écriture de la première version du manuscrit. L'analyse bioinformatique, les expériences de validation de la voie de la mitose par analyse du cycle cellulaire et la validation de l'expression de RAD51 ont été réalisées par Kathy Doyon, Victor Mullins-Dansereau et Martin Karam.

Genetic interaction between two insulin-dependent diabetes susceptibility loci, *Idd2* and *Idd13*, in determining immunoregulatory DN T cell proportion

Running title : *Idd2* and *Idd13* interact to regulate DN T cells

Roxanne Collin^{1,2}, Kathy Doyon¹, Victor Mullins-Dansereau^{1,2}, Martin Karam^{3,4}, Geneviève Chabot-Roy¹, Erin E. Hillhouse¹, Alexandre Orthwein^{3,4,5*}, Sylvie Lesage^{1,2*}.

1 Division of Immunology-oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Research Center, Montréal, Québec, H1T 2M4, Canada

2 Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

3 Department of Medicine, McGill University, Montréal, Québec, H4A 3J1, Canada

4 Lady Davis Institute, Jewish General Hospital, Montréal, Québec, H3T 1E2, Canada

5 Department of Oncology, McGill University, Montréal, Québec, H4A 3J1, Canada

*Co-Corresponding authors:

Sylvie Lesage
Research Center
Maisonneuve-Rosemont Hospital
5415 l'Assomption Blvd
Montréal, Québec
Canada, H1T 2M4
Phone number 1-514-252-3400 x 4649
sylvie.lesage@umontreal.ca

Alexandre Orthwein
Lady Davis Institute
Jewish General Hospital
3755 Côte Ste-Catherine
Montréal, Québec
Canada, H3T 1E2
Phone number 1-514-340-8222 x 4252
alexandre.orthwein@mcgill.ca

3.2 Abstract

Several immune regulatory cell types participate in the protection against autoimmune diseases such as autoimmune diabetes. Of these immunoregulatory cells, we and others have shown that peripheral CD4⁺CD8⁻ double negative (DN) T cells can induce antigen-specific immune tolerance. Particularly, we have described that diabetes-prone mice exhibit a lower number of peripheral DN T cells compared to diabetes-resistant mice. Identifying the molecular pathways that influence the size of the DN T cell pool in peripheral lymphoid organs may thus be of interest for maintaining antigen-specific immune tolerance. Hence, through immunogenetic approaches, we found that two genetic loci linked to autoimmune diabetes susceptibility, namely *Idd2* and *Idd13*, independently contribute to the partial restoration of DN T cell proportion in secondary lymphoid organs. We now extend these findings to show an interaction between *Idd2* and *Idd13* in determining the number of DN T cells in secondary lymphoid organs. Using bioinformatics tools, we link potential biological pathways arising from interactions of genes encoded within the two loci. By focusing on cell cycle, we validate that both the *Idd2* and *Idd13* loci influence RAD51 expression as well as DN T cell progression through the cell cycle. Altogether, we find that genetic interactions between *Idd2* and *Idd13* loci modulate cell cycle progression, which contributes, at least in part, to defining the proportion of DN T cells in secondary lymphoid organs.

Keywords: double negative T cells, type 1 diabetes, transgenic mice, cell cycle

3.3 Introduction

A prominent role in the prevention of autoimmunity has been credited to various regulatory cell subsets, including peripheral immunoregulatory CD4⁺CD8⁻ double negative (DN) T cells. Indeed, DN T cells have been shown to inhibit immune responses in an antigen-specific manner (Zhang et al. 2006; Zhang et al. 2000). This has major implications since the use of DN T cells in immunotherapy should therefore lead to fewer side-effects and a decreased risk of infection, which remains a major concern in the application of broad

immunosuppressive regimens (Bluestone et al. 2010a). As a result, DN T cells have been studied in various disease models, revealing that DN T cells display a promising therapeutic potential in the induction of allo- and xenograft tolerance (Chen et al. 2003; Ma et al. 2008; Young et al. 2002; Zhang et al. 2000) and in the prevention of both graft-vs-host disease (He et al. 2007; McIver et al. 2008; Young et al. 2003; Young et al. 2002) and autoimmune diabetes (Dugas et al. 2010; Duncan et al. 2010; Ford et al. 2007; Zhang et al. 2011).

Using TCR transgenic models, our work has supported the contribution of DN T cells towards immune tolerance in autoimmune diabetes (Dugas et al. 2010). Specifically, we have demonstrated that TCR transgenic DN T cell proportion is low in autoimmune diabetes-susceptible mice (Dugas et al. 2010). However, the immunoregulatory function of TCR transgenic DN T cells remains unaltered in these mice (Hillhouse et al. 2010), demonstrating that a deficiency in DN T cell number, rather than function, contributes to autoimmune diabetes susceptibility. Correspondingly, the injection of DN T cells is sufficient to reduce the incidence of autoimmune diabetes in autoimmune diabetes-susceptible mice in the TCR transgenic setting (Dugas et al. 2010). These results highlight the importance of identifying the genetic determinants controlling DN T cell number as they may reveal key molecular targets to promote DN T cell development, thereby supporting immune tolerance.

As for most autoimmune diseases, susceptibility to autoimmune diabetes is a complex genetic trait (Bluestone et al. 2010b; Concannon et al. 2009). NOD (non-obese diabetic) mice, which spontaneously develop autoimmune diabetes, have facilitated the study of genetic factors underlying autoimmune diabetes susceptibility (Anderson and Bluestone 2005; Wicker et al. 2005). To date, more than 20 *Idd* (Insulin dependent diabetes) loci linked to diabetes predisposition have been identified in NOD mice (www.T1Dbase.org), and the concordance with human diabetes susceptibility has been demonstrated for some of these loci (Driver et al. 2011; Wicker et al. 2005). Subsequent analysis of NOD.*Idd* congenic mice has revealed *Idd* regions which are sufficient to reduce insulinitis and/or diabetes incidence (Ghosh et al. 1993; Lyons et al. 2000; McAleer et al. 1995; Serreze et al. 1994). Interestingly, we have also linked

certain *Idd* regions to the regulation of DN T cell number (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2014), where increased DN T cell number is associated with autoimmune diabetes resistance (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2010). More specifically, using a linkage analysis approach and congenic strain validation, we have shown that DN T cell proportion in peripheral lymphoid organs is a multigenic trait and that both *Idd2* and *Idd13* loci each contribute to the partial restoration of DN T cell numbers in the spleen and lymph nodes (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2014). These results suggest that *Idd2* and *Idd13* loci modulate diabetes development, at least in part, by influencing DN T cell number.

Idd2 and *Idd13*, located on chromosome 9 and 2 respectively, are two loci linked to autoimmune diabetes susceptibility, while *Idd2* is also linked to insulinitis (Ghosh et al. 1993; Prochazka et al. 1987; Serreze et al. 1998; Serreze et al. 1994; Wicker et al. 1995). Recently, our group has shown that, in contrast to *Idd13* (Hillhouse et al. 2016), the *Idd2* locus also protects NOD.*H2^k* mice from diabetes development and insulinitis in the 3A9 TCR:insHEL transgenic model (Collin et al. 2014). In addition to their role in DN T cell number modulation in the non-transgenic and/or TCR transgenic setting, both *Idd2* and *Idd13* loci are thought to play a role in the selection of diabetogenic T cells (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2014; Pearce et al. 1995; Serreze et al. 1998). Accordingly, the *Idd13* interval encodes for several candidate genes implicated in the negative selection of autoreactive T cells including the Mer tyrosine kinase (*Mertk*) gene as well as multiple apoptosis-associated genes (Liston et al. 2007; Liston et al. 2004; Serreze et al. 1998; Wallet et al. 2009; Zucchelli et al. 2005), and *Idd2* encodes for *Thy1*, *Cbl* and *Il10ra*, all likely contributors to T cell biology²³, (Lang and Bellgrau 2004; Prochazka et al. 1987). In addition to DN T cell numbers, the *Idd13* locus also influences the proportion of merocytic dendritic cells, another cell population associated with autoimmune diabetes susceptibility (Pelletier and Lesage 2013). Altogether, the *Idd2* and *Idd13* loci clearly play a role in autoimmune diabetes progression via different mechanisms, including the modulation of DN T cell number.

For our studies, we take advantage of a spontaneous autoimmune diabetes model, namely the 3A9 TCR:insHEL transgenic mouse model. In this model, the insHEL transgene promotes hen egg lysozyme (HEL) expression under the rat-insulin promoter, thus inducing pancreatic β cell specific expression, while the 3A9 TCR transgene yields T cells recognizing a HEL peptide presented in the context of I-A^k (Akkaraju et al. 1997; Ho et al. 1994). To allow for effective HEL peptide presentation on I-A^k, this pair of insHEL and 3A9 TCR transgenes was introduced onto B10.BR and NOD.*H2^k* genetic backgrounds, resulting in the diabetes-resistant 3A9 TCR:insHEL B10.BR and diabetes-susceptible 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k* mouse strains (Lesage et al. 2002). Importantly, 3A9 DN T cell proportion is decreased in secondary lymphoid organs of mice from the diabetes-susceptible NOD.*H2^k* background in comparison to the diabetes-resistant B10.BR background (Dugas et al. 2010), where this difference is partially restored by the presence of the *Idd2* or *Idd13* locus from the B10.BR background in NOD.*H2^k* congenic mice (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2014).

Herein, we investigated the interactions between genetic determinants encoded within the *Idd2* and *Idd13* loci and how they influence DN T cell proportion. To do so, we generated 3A9 TCR and 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice. Using the double congenic mice, we demonstrate an interaction between *Idd2* and *Idd13* loci in determining the number of DN T cells in secondary lymphoid organs, where DN T cell proportion is fully restored in the lymph nodes of 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice. By exploiting DAVID and STRING bioinformatics databases, we link potential biological pathways arising from interactions of genes encoded within the *Idd2* and *Idd13* loci. This *in silico* approach suggested that the *Idd2* and *Idd13* loci may regulate cell cycle progression. Using congenic mice, we validate that the *Idd2* and *Idd13* loci influence progression through S-phase and DN T cell proliferation. Moreover, we find that both the *Idd2* and *Idd13* loci modulate RAD51 expression. Together, the bioinformatics data, the cell cycle analysis, and the regulation of RAD51 expression, suggests that *Idd2* and *Idd13* loci modulate cell cycle progression, which likely contributes to defining the proportion of DN T cells in secondary lymphoid organs.

3.4 Materials and Methods

Mice

3A9 TCR transgenic and HEL transgenic mice, where HEL is expressed under the rat insulin promoter (insHEL), on B10.BR and NOD.H2^k backgrounds have been previously described (Lesage et al. 2002). The 3A9 TCR NOD.H2^k-Idd2 congenic strain bears B10.BR alleles on chromosome 9 between 29.4 and 50.0 Mb (corresponding to markers rs6385855 and rs13480186) at a locus included within Idd2 and was described elsewhere (Collin et al. 2014). Idd13 congenic mice were a gift of D.V. Serreze and were crossed to NOD.H2^k 3A9 TCR:insHEL background to introduce the transgenes (Dugas et al. 2014). The NOD.H2^k-Idd2/dd13 strain was obtained by an intercross between 3A9 TCR:insHEL NOD.H2^k-Idd2 mice and 3A9 TCR:insHEL NOD.H2^k-Idd13 mice. Offspring were genotyped using the markers D9Mit129, D9Mit328, D2Mit132, D2Mit48 and D2Mit338. Mice bearing B10.BR alleles at all of these markers were selected for further intercrosses. After 2 generations of homozygous mating, an Illumina medium density linkage, serviced through The Centre for Applied Genomics at the Hospital for Sick Children, was performed on the tail DNA from congenic mice to delimit the boundaries of both the Idd2 and Idd13 loci in the NOD.H2^k-Idd2/dd13 mice; Idd2 (chromosome 9:29.6 Mb-61.4 Mb) and Idd13 (chromosome 2:114.0-156.1 Mb) where positions are based on NCBI Build m38. All of the mouse strains were maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal house facility (Montreal, Canada).

Flow cytometry

8 to 12 week old non-diabetic mice (diastix negative) were analyzed. Spleen, lymph nodes and thymus were pressed through a 70µm cell strainer (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada). Spleen cell suspensions were treated with NH₄Cl to lyse red blood cells. Single cell suspensions were stained with the following antibodies to quantify 3A9 DN T cells; CD3 (17A2; Biolegend), TCRβ (H57-597, Biolegend), CD4 (GK1.5; Biolegend and eBioscience), CD8α (53-6.7; Biolegend), CD19 (6D5; Biolegend) and anti-clonotypic 1G12 (homemade) (Peterson et al. 1999) antibody followed by detection with IgG1 (RMG1-1; Biolegend). For

Ki-67, cells were subsequently permeabilized using the eBioscience FoxP3 staining kit according to the manufacturer's protocol. Following permeabilization, cells were incubated with either Ki-67 (B56, BD) or its isotype control (IgG1 κ ; BD) for 30 minutes at 4°C. For propidium iodide, single cell suspensions from the spleen were washed in PBS and thoroughly resuspended in cold 70% ethanol for at least 1 hour at 4°C. Cells were resuspended in 250 μ l of propidium iodide solution (40 μ g/ml propidium iodide, Invitrogen; 4 μ g/ml RNase, USBiological life sciences; diluted in PBS) per 1 million cells. Stained cells were kept on ice and rapidly processed on a flow cytometer. All data were collected either on a FACSCanto, LSRII, Fortessa x-20 or a BD FACSCalibur (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada). All data was analyzed with FlowJo software (Treestar, Ashland, OR, USA).

Histology

H&E staining was performed on 5 to 7 μ m pancreas cuts from paraffin blocks, for 2 to 3 non-successive cuts for each mouse. H&E slides were scored for infiltration as previously described (Hillhouse et al. 2013), and according to the following scale: 0 = no infiltration, 1 = peri-insulitis, 2 = infiltration <50%, 3 = infiltration > 50%, 4=complete infiltration.

ELISA

Total IgG was measured by ELISA according to the manufacturer's protocol (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA). Serum anti-HEL IgG and IgG1 levels were measured by ELISA on Nunc Maxisorp plates (Thermo Fisher Scientific) coated with 100 μ g/ml HEL prepared in NaHCO₃ at pH-9.5, developed with goat anti-mouse IgG-HRP (Biolegend, clone poly4053) or rat anti-mouse IgG1-biotin (Biolegend, clone RMG1-1) followed by avidin-HRP (Biolegend). A reference pool of sera from diabetic and non-diabetic TCR:iHEL mice was set to contain 100 arbitrary units for anti-HEL antibodies or 10 arbitrary units for total IgG antibodies.

Diabetes incidence study

Diabetes incidence was monitored daily in female 3A9 TCR:iHEL mice for overt signs of diabetes (wet cage, hunched posture) and every two weeks for urine glucose levels using Diastix (Bayer, Toronto, Ontario, Canada) starting at 8 to 12 weeks of age. After two successive positive Diastix tests, overt diabetes is confirmed by blood glucose levels higher than 17 mmol/L. The age of diabetes onset is set at the first detection of elevated urine glucose levels. The mice were sacrificed within one week of detection of high blood glucose or when they reached more than 28 weeks of age. At culling, tail DNA was collected to verify the genotype of the mouse. The serum was collected and the pancreas was conserved in formalin for at least 48 hours at room temperature before being sent for paraffin inclusion.

Pathway analysis

Genes lists (and MGI ID) from *Idd2* (chromosome 9:29.6 Mb-50.3 Mb) and *Idd13* (chromosome 2:114.0-156.1 Mb) were retrieved by the Genes and Markers Query search tool from MGI (Eppig et al. 2015). MGI ID were submitted to DAVID bioinformatics database (Huang da et al. 2009a; Huang da et al. 2009b). To rescue some unmapped genes (via MGI ID) that did not match with the DAVID database, we sent two lists of unmapped genes to DAVID to get their DAVID ID. MGI and DAVID ID lists were submitted to DAVID and were merged for each locus. *Mus musculus* genome was specified as background. A third list was built combining all genes from *Idd2* and *Idd13* (*Idd2/13*) loci. All olfactory genes (beginning with “Olf”) were removed from gene lists as they are expected to have little impact on immunological processes. Olfactory genes represent 21% of genes from *Idd2* locus. For these three gene lists (*Idd2* only, *Idd13* only, *Idd2* and *Idd13* combined), all categories from “disease”, “functional categories” and “pathways” were selected as well as the subcategories containing “all” from the “gene ontology” category. Functional annotation clustering was performed with default options except for three options: “similarity threshold”, “final group membership” and “EASE”. They were set to 0.4, 0.6 and 0.05 respectively. Each cluster made by each analysis were named based on the biological processes present in that cluster and compared to the other two analysis results. Highly similar clusters, in the same

and/or in different analysis, were grouped under the same biological process. Genes from each biological process produced with the Idd2/13 genes list were compiled separately and identified as located on chromosome 2 (Idd13) or 9 (Idd2). DAVID revealed a total of nine pathways for Idd2, five for Idd13 and fifteen for the combined list of Idd2/13. One biological process (transferase) present in Idd2/13 contained only genes from Idd13 and was excluded from further analysis. The metabolic process was too broad as it comprised almost all of the genes from both loci and this pathway was also discarded for STRING analysis.

STRING analysis

Gene (protein) lists of thirteen of the fifteen identified biological processes for Idd2/13 were submitted to STRING analysis individually (Szkarczyk et al. 2015). All associations made by STRING between the input list and their database were manually validated. Only “co-expression”, “experiments” and “databases” categories were selected for the active prediction methods. Confidence score was set to 0.15 to retrieve text file results and was set to 0.7 to retrieve pathway interactions images. Only links between genes from Idd2 and Idd13 loci were selected for further analysis. At least 50% of all links (between genes from the two loci) had to have a confidence score of at least 0.7 to be selected as a final biological process of interest (Table 5). Two different biological processes (sodium transport and peptides) did not show any interaction between genes from Idd2 and Idd13 and were excluded from further investigations.

Western blots

Dry pellets of homogenized spleen from B10.BR, NOD.H2^k, NOD.H2^k-Idd2, NOD.H2^k-Idd13 and NOD.H2^k-Idd2/13 were resuspended in NuPAGE® LDS Sample Buffer (106mM Tris-HCl, 141mM Tris Base, 2% lithium dodecyl sulfate, 10% Glycerol, 0.51Mm EDTA, 0.22mM SERVA Blue G250, 0.175mM Phenol Red) and sonicated at 30% intensity for ten seconds three times. Protein concentrations were acquired by NanoDrop Microvolume Spectrophotometer. The proteins were loaded on 12% NuPAGE® gels at 200V. Migrated proteins were transferred to PVDF membranes, blocked with 5% milk and 3% BSA in Tris

Buffered Saline with 0.1% tween 20 (TBS-T) for 1 hour at room temperature. Separate membranes were incubated overnight at 4°C with mouse anti- α Tubulin (Abcam, ab7291), rabbit anti-RAD51 (BioAcademia, 70-002) and anti-H2AX (Bethyl, A300-082A) antibodies. Following washes with TBS-T, the membranes were incubated with either anti-rabbit or anti-mouse-Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies for 1h at room temperature. Chemiluminescence was acquired on an Azure c600 (Azure Biosystems). Quantification and normalization of the protein bands was performed on ImageJ.

Statistical analysis

Statistical significance was determined using one-way ANOVA with Bonferroni post-HOC test for differences between more than 2 groups and a paired or unpaired Student t-test was used when testing for significant difference between 2 groups, as appropriate.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Canadian Diabetes Association (OG-3-13-4018) to SL. SL holds a Senior scholarship and RC holds studentship both from Fonds de recherche du Québec – Santé, and VMD holds a studentship from l'Université de Montréal. MK received a doctoral fellowship from the Cole Foundation. AO is the Canada Research Chair (Tier 2) in Genome Stability and Hematological Malignancies. Work in the AO laboratory was supported by a Transition Grant from the Cole Foundation and an internal Operating Fund from the Sir Mortimer B. Davis Foundation of the Jewish General Hospital.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

3.5 Results

The proportion of 3A9 DN T cells is significantly lower in the lymph nodes of 3A9 TCR NOD.*H2^k* mice in comparison to 3A9 TCR B10.BR mice, even in the absence of cognate antigen (Dugas et al. 2010). We previously performed a linkage analysis on an F2 outcross from these two parental strains and found that immunoregulatory DN T cell proportion is regulated by a multigenic trait in secondary lymphoid organs (Collin et al. 2014). By exploiting the 3A9 TCR transgenic mouse model, we subsequently demonstrated that both *Idd2* and *Idd13* loci independently contribute to defining the proportion and number of DN T cells in the spleen and lymph nodes (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2014). Still, 3A9 TCR NOD mice congenic for either of these loci presented with a modest increase in DN T cell number relative to mice bearing the B10.BR genetic background. As a result, we proposed that interactions between genetic determinants encoded within the *Idd2* and *Idd13* loci cooperate to define the proportion and number of immunoregulatory DN T cells. We segregated the F2 mice from our aforementioned linkage analysis (Collin et al. 2014) according to their genotype at the SNP with the highest LOD score on both chromosome 2 (*Idd13*) and chromosome 9 (*Idd2*), namely rs6193859 and D9Mit232 respectively, and plotted the proportion of 3A9 DN T cells from the skin-draining lymph nodes (Figure 1a, Table 1). F2 mice bearing NOD homozygous alleles at the *Idd2* locus present with a low proportion of DN T cells, which is not significantly influenced by the presence of either NOD or B10.BR alleles at the *Idd13* locus (Figure 1a, white circles). However, we find a significant increase in the proportion of DN T cells in F2 mice bearing homozygous B10.BR alleles at both loci (19.34 ± 1.42) when compared to mice bearing homozygous NOD alleles at *Idd2* (13.60 ± 1.10), at *Idd13* (13.65 ± 1.36), or at both loci (11.82 ± 2.05) (Table 1). This suggests that B10.BR alleles from both *Idd2* and *Idd13* loci may have an additive or synergistic effect in regulating DN T cell proportion.

To test this potential interaction between *Idd2* and *Idd13* loci, we generated 3A9 TCR NOD.*H2^k*-*Idd2/13* as well as 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice, where the limits of the intervals were determined by genotyping and medium density SNP

Illumina platform (Figure 1b). As previously reported, B10.BR mice present with a higher proportion of 3A9 DN T cells than NOD.*H2^k* mice in both the spleen and lymph nodes of either the 3A9 TCR single transgenic or 3A9 TCR:insHEL double transgenic mice (Figure 2) (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2010; Dugas et al. 2013; Dugas et al. 2014; Hillhouse et al. 2010). In addition, both the NOD.*H2^k*-*Idd2* and NOD.*H2^k*-*Idd13* single congenic mice show an increase in the proportion of 3A9 DN T cells relative to NOD.*H2^k* mice (Figure 2) (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2014). Although the proportion of 3A9 DN T cells was increased in the spleen of NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice relative to the parental NOD.*H2^k* strain, the proportion of 3A9 DN T cells of the double congenic mice did not exceed that of NOD.*H2^k*-*Idd13* single congenic mice in the spleen (Figure 2a). In contrast to the spleen, and in agreement with the F2 linkage data of 3A9 DN T cells in the lymph nodes (Figure 1), we observe a statistically significant increase in the proportion of 3A9 DN T cells of NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice compared to single congenic mice in the lymph nodes (Figure 2b). Importantly, the proportion of 3A9 DN T cells in the lymph nodes of 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice was comparable to that of the 3A9 TCR:insHEL B10.BR parental strain (Figure 2b). Notably, the increased proportion of 3A9 DN T cells in the lymph nodes of NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice relative to NOD.*H2^k*, although not as striking, is corroborated in absolute numbers (Figure 3), and is not the result of a decrease in the proportion of either CD4 or CD8 T cells (Table 2). Together, these data suggest that an interaction between *Idd2* and *Idd13* loci increases the proportion of 3A9 DN T cells in the NOD.*H2^k* transgenic mice.

The increased proportion of 3A9 DN T cells in secondary lymphoid organs of NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice relative to that of NOD.*H2^k* mice may potentially result from an increase in thymic selection in the 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice. We thus quantified the proportion of 3A9 DN T cells in the thymus of the various 3A9 TCR single transgenic and 3A9 TCR:insHEL double transgenic mice. As for the spleen and lymph nodes, we find a higher proportion and absolute number of 3A9 DN T cells in the thymus of B10.BR mice relative to NOD.*H2^k* mice, in both the 3A9 TCR single transgenic and 3A9 TCR:insHEL double transgenic mice (Figure 4). In addition, the NOD.*H2^k*-*Idd13* single congenic mice

show a modest increase in the proportion of 3A9 DN T cells relative to NOD. $H2^k$ mice, whereas the increase in 3A9 DN T cells for NOD. $H2^k$ -*Idd2* is only observed in the 3A9 TCR:insHEL double transgenic mice (Figure 4). Notably, although the proportion and absolute number of 3A9 DN T cells was modestly increased in the thymus of NOD. $H2^k$ -*Idd2/13* double congenic mice relative to NOD. $H2^k$ mice, this increase was comparable to that observed in the NOD. $H2^k$ -*Idd13* single congenic mice (Figure 4). This suggests the absence of an additive effect of the *Idd2* and *Idd13* loci in defining DN T cell number in the thymus. In line with our previous work showing that thymic DN T cell proportion in 3A9 TCR mice does not correlate with 3A9 DN T cell proportion in secondary lymphoid organs (Dugas et al. 2013), we find that the increased proportion of 3A9 DN T cells in the secondary lymphoid organs of NOD. $H2^k$ -*Idd2/13* double congenic mice relative to NOD. $H2^k$ mice is not a consequence of increased thymic differentiation towards the DN T cell lineage.

In the 3A9 TCR:insHEL B10.BR, BALB.K and NOD. $H2^k$ mice, we have previously shown that elevated numbers 3A9 DN T cells in secondary lymphoid organs correlate with a decrease in diabetes incidence and that injection of 3A9 DN T cells in the BALB.K setting is sufficient to prevent diabetes onset (Dugas et al. 2010). We have also shown that 3A9 TCR:insHEL NOD. $H2^k$ -*Idd2* mice exhibit an increase in 3A9 DN T cells and a lower incidence of diabetes relative to 3A9 TCR:insHEL NOD. $H2^k$ mice (Collin et al. 2014). However, we recently found that 3A9 TCR:insHEL NOD. $H2^k$ -*Idd13* mice, which present an increase in 3A9 DN T cells relative to their NOD. $H2^k$ counterpart (Figure 2) (Dugas et al. 2014), exhibit an increase in diabetes incidence (Hillhouse et al. 2016). This result suggests that, in contrast to *Idd2*, the increase in DN T cell number conferred by the *Idd13* locus is not sufficient to control insulinitis present in the 3A9 TCR:insHEL mouse model (as detailed in (Hillhouse et al. 2016)). Because of the contrasting phenotypes of *Idd2* and *Idd13* in controlling diabetes incidence in 3A9 TCR:insHEL NOD. $H2^k$ mice, we decided to study the impact of the combination of both *Idd2* and *Idd13* loci. Expectedly, 3A9 TCR:insHEL NOD. $H2^k$ -*Idd2/13* double congenic mice presented a level of insulinitis that was comparable to both 3A9 TCR:insHEL B10.BR and NOD. $H2^k$ mice (Figure 5). Still, all of the nine 3A9 TCR:insHEL NOD. $H2^k$ -*Idd2/13* mice that were aged to over 28 weeks remained diabetes-free and never exhibited glucosuria nor

glycemia (Table 3). The combination of the *Idd2* and *Idd13* loci in the 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k* mice also significantly reduced the serum level of HEL-specific IgG autoantibodies (Table 3). Taken together, these data show that the combined presence of *Idd2* and *Idd13* loci in 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k* mice enhances the proportion of 3A9 DN T cells in secondary lymphoid organs and decreases the level of autoantibodies, as well as prevents diabetes onset.

We next sought to define the biological process related to the increase in DN T cell proportion which is mediated by the combination of the *Idd2* and *Idd13* congenic intervals. We queried the DAVID bioinformatics database based on the gene list from the *Idd2* and *Idd13* loci. The *Idd2* and *Idd13* gene lists independently revealed nine and five biological processes respectively, while eleven biological processes were identified by the combination of the two gene lists (Table 4). Using the combined *Idd2* and *Idd13* gene lists obtained by the DAVID analysis, we next independently queried the STRING database for each of these eleven biological processes. We selectively considered associations from genes in *Idd2* and *Idd13* that showed a confidence score above 0.7 for the given biological process (Table 5). We find strong interactions between genes in all biological processes, except for lipid transport where the four links between genes from *Idd2* and *Idd13* all presented with a confidence below 0.7. Based on this observation we decided to further restrict our attention to biological processes where a confidence score above 0.7 was given to most of the gene interactions (i.e. more than 50% of the interactions). Out of the eleven biological processes, only three fit these criteria, namely phospholipid catabolism, T cell and cell cycle (Table 5, highlighted in grey).

The DAVID analysis grouped 7 genes from the *Idd2* locus and 28 genes from the *Idd13* locus under phospholipid catabolism. STRING revealed that only two genes from the *Idd2* locus, namely *Arhgef12* and *Pafah1b2* were associated with genes from the *Idd13* locus (Figure 6a). Accordingly, *Arhgef12* was linked to *Adra1d* while *Pafah1b2* was linked to four genes of the *Pla2g4* family, specifically *Pla2g4b*, *Pla2g4d*, *Pla2g4e*, and *Pla2g4f*. Based on ImmGen, *Arhgef12* is strongly expressed in germinal center B cells and *Pafah1b2* is expressed in many immune cell populations (immgen.org). However, neither *Adra1d* nor any of the four *Pla2g4*

genes from the *Idd13* locus are expressed in hematopoietic cells (immgen.org). As we have previously shown that DN T cell proportion is regulated at least in part by hematopoietic-intrinsic factors (Dugas et al. 2014), it is unclear how the *Arhgef12* and *Pafah1b2* genes from the *Idd2* locus interact with *Adra1d* or any of the four *Pla2g4* genes from the *Idd13* locus to influence the proportion of DN T cells, as none of the potentially interacting genes in *Idd13* are expressed in the hematopoietic system.

The T cell biological process showed interactions between genes from the CD3 complex encoded in the *Idd2* locus and *B2m* from the *Idd13* locus (Figure 6b). This interaction stems from the antigen presentation of peptides to CD8⁺ T cells, where the chains of the CD3 complex are necessary for TCR expression which recognizes peptides in the context of MHC class I molecules that are associated with β 2m. However, we have previously demonstrated that *B2m* deficiency does not decrease the proportion of 3A9 DN T cells in both the spleen and lymph nodes of 3A9 TCR transgenic mice, as shown in *B2m*-deficient mice from both B10.BR and NOD.*H2^k* genetic backgrounds (Dugas et al. 2014). The T cell biological process is thus unlikely to explain the additive interaction between *Idd2* and *Idd13* loci in defining the proportion of DN T cells.

Finally, STRING analysis of the cell cycle progression reveals multiple relevant interactions between genes from the *Idd2* and *Idd13* loci (Figure 6c). For one, *Chek1* in *Idd2* partners with *Rad51*, *Mcm8* and *Cdc25b* in *Idd13* to regulate cell cycle progression (Kramer et al. 2004; Lutzmann et al. 2012; Patil et al. 2013; Sorensen et al. 2005). In addition, *Zw10* in *Idd2* and *Bub1*, *Bub1b* and *Casc5* in *Idd13* all localize to the kinetochore and facilitate mitotic progression (Anderson et al. 2002; Genin et al. 2012; Taylor and McKeon 1997; Vallee et al. 2006; Varma et al. 2006). Importantly, all of these genes are ubiquitously expressed.

To determine if cell cycle progression is possibly impaired in NOD.*H2^k* and could therefore define DN T cell number, we performed cell cycle analysis using propidium iodide staining in total spleen cells from B10.BR, NOD.*H2^k* and NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice. A greater proportion

of cells from NOD.*H2^k* mice were actively engaged in S-phase (Figure 7a). Interestingly, cells from NOD.*H2^k-Idd2/13* mice exhibited a comparable cell cycle profile to that of B10.BR mice with a similar proportion of cells in S-phase (Figure 7a). This finding suggests that the *Idd2* and *Idd13* loci on the NOD.*H2^k* background are sufficient to modulate the proportion of cells in S-phase. We confirm that this is not a particularity of the MHC haplotype, as we find that spleen cells from NOD mice also have a higher proportion of cells in S-phase relative to those from C57BL/6 mice (Figure 7b). More importantly, we find that, among T cell subsets, the impact of the *Idd2* and *Idd13* loci on proliferation is specific to DN T cells (Figure 7c). Indeed, when comparing T cell subsets from both NOD.*H2^k* and NOD.*H2^k-Idd2/13* mice, we find a similar proportion of either CD4⁺ or CD8⁺ T cells that express Ki-67. However, a lower proportion of DN T cells from NOD.*H2^k-Idd2/13* mice stained positive for Ki-67 relative to DN T cells from NOD.*H2^k* mice (Figure 7c). As for S-phase measurements, the fraction of Ki-67⁺ DN T cells from NOD.*H2^k-Idd2/13* mice is comparable to that of B10.BR mice. Altogether, these data suggest that the low proportion of DN T cells in the NOD background is influenced by allelic variants of genes encoded within the *Idd2* and *Idd13* loci, which together influence the cell cycle of immunoregulatory DN T cells.

Progression of DN T cells through the cell cycle is influenced by *Idd2* and *Idd13*. Of the candidate genes encoded within *Idd13*, our attention turned to *Rad51*, as inhibition of RAD51 has recently been shown to inhibit diabetes development (Ratiu et al. 2017). RAD51 is a recombinase involved in DNA repair, an essential step to allow efficient progression through the cell cycle. RAD51 acts downstream of γ -H2AX and CHEK1, both of which are encoded within *Idd2*. Interestingly, we found that RAD51, but not γ -H2AX, was expressed more abundantly in spleen cells from NOD.*H2^k* mice relative to B10.BR mice (Figure 8 and data not shown). We also found that NOD.*H2^k* mice carrying either the *Idd2* or the *Idd13* locus both showed a reduction in RAD51 expression, which was not enhanced in NOD.*H2^k-Idd2/13* mice (Figure 8). This result suggests that polymorphisms within the *Idd13* locus, which encodes for *Rad51*, effectively modulate RAD51 expression. Importantly, it also suggests that polymorphisms in the *Idd2* locus, likely in either *H2afx* or *Chek1*, also impact RAD51 expression. Yet, the polymorphism in both *Idd2* and *Idd13* did not cooperate to restore RAD51

expression to the levels observed in B10.BR mice, suggesting that although *Idd2* and *Idd13* clearly regulate RAD51 expression, other pathways are also affected by the two loci.

3.6 Discussion

We have previously shown that autoimmune diabetes susceptibility is associated with decreased DN T cell proportion (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2010). In order to identify the genetic determinants defining DN T cell number, we used a linkage analysis approach and congenic strain validation and demonstrated that DN T cell proportion is influenced by *Idd2* and *Idd13* (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2014). However, as the contribution of each locus was modest, we sought to investigate the interactions between the genetic determinants encoded within *Idd2* and *Idd13* loci and how they cooperate to define DN T cell numbers. Here, we analyzed our linkage analysis data (Collin et al. 2014) and revealed that F2 mice bearing homozygous B10.BR alleles at both the *Idd2* and *Idd13* loci exhibit a significant increase in DN T cell proportion when compared to mice bearing homozygous NOD alleles at either or both loci. In addition, we show that *Idd2* and *Idd13* together increase the proportion of DN T cells in both 3A9 TCR and 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k* mice. Moreover, in a cohort of 9 female mice, none of the 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice develop autoimmune diabetes. Together, these data suggest an additive effect of the mouse *Idd2* and *Idd13* loci in the restoration of DN T cells, a trait associated with autoimmune diabetes resistance. Lastly, we demonstrated that cell cycle and DN T cell proliferation is regulated by the *Idd2* and *Idd13* loci. Together with our bioinformatics analysis, this suggests that cell cycle progression, by modulating RAD51 expression, is likely contributing to defining the proportion of DN T cells in secondary lymphoid organs.

Of interest, RAD51 has recently been linked to type 1 diabetes (Ratiu et al. 2017). In this study, they find that inhibiting RAD51 protects from diabetes development by enhancing the proportion of immunoregulatory B cells. Notably, DN T cells are able to eliminate B cells and in vivo injection of DN T cells leads to a decrease in autoantibody levels (Dugas et al. 2010; Hillhouse et al. 2010; Ma et al. 2008). It is thus tempting to suggest that inhibiting RAD51 leads to a specific increase in DN T cells which would eliminate autoantibody-producing B cells, thereby resulting in a proportional increase in immunoregulatory B cells, altogether preventing autoimmune diabetes onset. Alternatively, as we have shown that RAD51 is

generally increased in the spleen of NOD mice, inhibiting RAD51 may independently affect many cell types, all actively participating in the induction or maintenance of immune tolerance.

Identifying the molecular pathways that influence the size of the DN T cell pool in peripheral lymphoid organs is of interest as it will facilitate the identification of molecular targets that regulate DN T cell numbers. During our analysis of DAVID and STRING bioinformatics databases exploiting the *Idd2* and *Idd13* gene lists, we were able to limit our focus on three biological processes mediated by strong interactions of genes within the two loci, namely phospholipid catabolism, T cell biology and cell cycle progression. However, concerning phospholipid catabolism, the five genes located within the *Idd13* locus that were found to interact with genes from the *Idd2* locus, specifically *Adrald*, *Pla2g4b*, *Pla2g4d*, *Pla2g4e*, and *Pla2g4f*, are not expressed in hematopoietic cells (immgen.org). As we have previously shown that DN T cell proportion is regulated at least in part by hematopoietic-intrinsic factors (Dugas et al. 2014), we found it unlikely that the phospholipid catabolism is the biological process influencing DN T cell numbers. Likewise, the T cell biological process was highlighted by interactions between genes from the CD3 complex encoded in the *Idd2* locus and *B2m* from the *Idd13* locus, where we have previously shown that *B2m*-deficiency does not influence 3A9 DN T cell proportion in secondary lymphoid organs (Dugas et al. 2014). Therefore, the T cell biological process is not likely influencing DN T cell numbers. As a result, we shifted our focus to the third biological process highlighted by our bioinformatics analyses, cell cycle. The STRING analysis of the cell cycle progression revealed several relevant interactions between genes from the *Idd2* and *Idd13* loci, with various genes of interest being ubiquitously expressed. We further validate that cell cycle and proliferation is regulated by the *Idd2* and *Idd13* loci as a greater proportion of lymphocytes from NOD.*H2^k* mice are in S-phase. Moreover, the proportion of Ki-67⁺ DN T cells is also increased in NOD.*H2^k* mice in comparison to both B10.BR and NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice. The greater proportion of proliferating DN T cells in NOD.*H2^k* mice, which exhibit a lower proportion of DN T cells in lymphoid organs, relative to NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice is counterintuitive. However, the increased proportion of cells in S-phase may suggest a block in cell cycle progression,

yielding lower numbers of DN T cells. Altogether, our data thus suggest that DN T cell proportion is influenced by allelic variants of genes encoded within the *Idd2* and *Idd13* loci, which together influence cell cycle progression.

The cell cycle consists of a series of sequential phases, specifically the G₀/G₁, S, G₂, and M (mitosis) phases, leading to cell division. During the cell cycle, multiple checkpoints are encountered prior to entry into the subsequent phase, which provides an important surveillance mechanism for faithful replication and division of cells (Elledge 1996). The STRING analysis of the cell cycle progression revealed that *Chek1* in *Idd2* partners with *Rad51*, *Mcm8* and *Cdc25b* from the *Idd13* locus. Indeed, each of these four genes play an important role during S-phase by controlling DNA replication and the DNA damage response to replicative stress. For instance, the DNA helicase MCM8 is a significant player in the elongation phase of DNA replication (Maiorano et al. 2005), it promotes RAD51 recruitment to DNA damage sites and it facilitates homologous recombination-mediated repair of DNA double-strand breaks (Park et al. 2013). As RAD51 is central in replication fork progression (Berti and Vindigni 2016), MCM8 may participate in this pathway during S-phase. In addition to MCM8, *Cdc25b*, which encodes a phosphatase that is essential for cell cycle transition by promoting the dephosphorylation of key substrates (Lammer et al. 1998), is also a key player during S-phase. For instance, down-regulation of *Cdc25* mRNA levels in HeLa cells delays S-phase and leads to a proliferation defect (Garner-Hamrick and Fisher 1998). Furthermore, CDC25B has been involved in centrosome duplication, a process that is initiated in S-phase (Boutros et al. 2007). Interestingly, unscheduled expression of CDC25B during DNA replication has been linked to replicative stress and the formation of DNA lesions (Bugler et al. 2010). In this regard, CHEK1 also plays a dual role during DNA replication. Indeed, CHEK1 is linked to fork progression during S-phase by controlling the initiation of DNA replication (Petermann et al. 2010), and is also critical in the response to single-stranded DNA lesions by phosphorylating key substrates, including the CDC25 phosphatases, and promoting the activation of DNA damage checkpoints (Patil et al. 2013). Interestingly, the conditional deletion, knockdown or inhibition of *Chek1* is associated with an accumulation of cells in S-phase cells as well as increased cell death (Lam et al. 2004; Sorensen et al. 2005), which mirrors our observations

for DN T cells from mice exhibiting NOD alleles for *Idd2* and *Idd13*. Indeed, our findings suggest that the *Idd2* and *Idd13* loci regulate the proportion of cells accumulating in S-phase and of Ki-67⁺ DN T cells. Moreover, we find that NOD.*H2^k* mice carry fewer DN T cells than both B10.BR and NOD.*H2^k-Idd2/13* mice in the transgenic setting and that this difference in number may be regulated, at least in part, by apoptosis (Hillhouse et al. 2010). Interestingly, CHEK1 phosphorylates RAD51 at serine-309 and recruits it to DNA repair foci in order to promote homologous recombination repair and cell survival (Sorensen et al. 2005). The fact that we observe increased RAD51 levels in the NOD.*H2^k* mice and that RAD51 is central during S-phase argues for a model where dysregulation of RAD51 levels impairs progression of DN T cells through S-phase resulting in a block in their cell cycle progression. Consequently, these results suggests that potential genetic polymorphisms influencing the interactions between genes encoded within *Idd2*, such as *Chek1*, and those encoded within *Idd13*, such as *Rad51*, *Mcm8* and *Cdc25b*, modulate DN T cell number.

In summary, our data clearly demonstrates an interaction between the *Idd2* and *Idd13* loci in determining the number of DN T cells in secondary lymphoid organs, where DN T cell proportion and number is increased in the 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k-Idd2/13* mice relative to both single congenic mice and to 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*. Our findings also suggest that the S-phase is likely contributing to defining the proportion of DN T cells in secondary lymphoid organs. Although cell cycle progression was the biological process that we identified through our bioinformatics approach, we cannot exclude that other pathways contribute to defining the proportion of DN T cells in secondary lymphoid organs. Further investigation of NOD.*H2^k-Idd2/13* double congenic mice may reveal other relevant pathways as a target for potentiating the number of immunoregulatory DN T cells, which may be of clinical use for the antigen-specific treatment of various autoimmune pathologies.

3.7 References

- Akkaraju S, Ho WY, Leong D, Canaan K, Davis MM, Goodnow CC (1997) A range of CD4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis. *Immunity* 7:255-71.
- Anderson MS, Bluestone JA (2005) THE NOD MOUSE: A Model of Immune Dysregulation. *Annu Rev Immunol* 23:447-85.
- Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D (2002) Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298:1395-401.
- Berti M, Vindigni A (2016) Replication stress: getting back on track. *Nat Struct Mol Biol* 23:103-9.
- Bluestone JA, Auchincloss H, Nepom GT, Rotrosen D, St Clair EW, Turka LA (2010a) The Immune Tolerance Network at 10 years: tolerance research at the bedside. *Nat Rev Immunol* 10:797-803.
- Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G (2010b) Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464:1293-300.
- Boutros R, Lobjois V, Ducommun B (2007) CDC25B involvement in the centrosome duplication cycle and in microtubule nucleation. *Cancer Res* 67:11557-64.
- Bugler B, Schmitt E, Aressy B, Ducommun B (2010) Unscheduled expression of CDC25B in S-phase leads to replicative stress and DNA damage. *Mol Cancer* 9:29.
- Chen W, Ford MS, Young KJ, Zhang L (2003) Infusion of in vitro-generated DN T regulatory cells induces permanent cardiac allograft survival in mice. *Transplant Proc* 35:2479-80.
- Collin R, Dugas V, Pelletier AN, Chabot-Roy G, Lesage S (2014) The mouse *idd2* locus is linked to the proportion of immunoregulatory double-negative T cells, a trait associated with autoimmune diabetes resistance. *J Immunol* 193:3503-12.
- Concannon P, Rich SS, Nepom GT (2009) Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med* 360:1646-54.
- Driver JP, Serreze DV, Chen YG (2011) Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin Immunopathol* 33:67-87.
- Dugas V, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Hillhouse EE, Lesage S (2010) Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes. *J Autoimmun* 35:23-32.
- Dugas V, Chabot-Roy G, Beauchamp C, Guimont-Desrochers F, Hillhouse EE, Liston A, Lesage S (2013) Unusual selection and peripheral homeostasis for immunoregulatory CD4 (-) CD8 (-) T cells. *Immunology* 139:129-39.

- Dugas V, Liston A, Hillhouse EE, Collin R, Chabot-Roy G, Pelletier AN, Beauchamp C, Hardy K, Lesage S (2014) Idd13 is involved in determining immunoregulatory DN T-cell number in NOD mice. *Genes Immun* 15:82-7.
- Duncan B, Nazarov-Stoica C, Surls J, Kehl M, Bona C, Casares S, Brumeanu TD (2010) Double negative (CD3+ 4- 8-) TCR alphabeta splenic cells from young NOD mice provide long-lasting protection against type 1 diabetes. *PLoS One* 5:e11427.
- Elledge SJ (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274:1664-72.
- Eppig JT, Blake JA, Bult CJ, Kadin JA, Richardson JE (2015) The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease. *Nucleic acids research* 43:D726-36.
- Ford MS, Chen W, Wong S, Li C, Vanama R, Elford AR, Asa SL, Ohashi PS, Zhang L (2007) Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development. *Eur J Immunol* 37:2234-41.
- Garner-Hamrick PA, Fisher C (1998) Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate cdc25B causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects. *Int J Cancer* 76:720-8.
- Genin A, Desir J, Lambert N, Biervliet M, Van Der Aa N, Pierquin G, Killian A, Tosi M, Urbina M, Lefort A, Libert F, Pirson I, Abramowicz M (2012) Kinetochore KMN network gene CASC5 mutated in primary microcephaly. *Hum Mol Genet* 21:5306-17.
- Ghosh S, Palmer SM, Rodrigues NR, Cordell HJ, Hearne CM, Cornall RJ, Prins JB, McShane P, Lathrop GM, Peterson LB, et al. (1993) Polygenic control of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Nat Genet* 4:404-9.
- He KM, Ma Y, Wang S, Min WP, Zhong R, Jevnikar A, Zhang ZX (2007) Donor double-negative Treg promote allogeneic mixed chimerism and tolerance. *Eur J Immunol* 37:3455-66.
- Hillhouse EE, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Dugas V, Lesage S (2010) Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. *Immunol Cell Biol* 88:771-80.
- Hillhouse EE, Collin R, Chabot-Roy G, Guyon MJ, Tessier N, Boulay M, Liscourt P, Lesage S (2013) Nearby Construction Impedes the Progression to Overt Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Journal of Diabetes Research* 2013:620313.
- Hillhouse EE, Liston A, Collin R, Desautels E, Goodnow CC, Lesage S (2016) TCR transgenic mice reveal the impact of type 1 diabetes loci on early and late disease checkpoints. *Immunol Cell Biol* 94:709-13.
- Ho WY, Cooke MP, Goodnow CC, Davis MM (1994) Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med* 179:1539-49.

- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009a) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research* 37:1-13.
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009b) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 4:44-57.
- Kramer A, Mailand N, Lukas C, Syljuasen RG, Wilkinson CJ, Nigg EA, Bartek J, Lukas J (2004) Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol* 6:884-91.
- Lam MH, Liu Q, Elledge SJ, Rosen JM (2004) Chk1 is haploinsufficient for multiple functions critical to tumor suppression. *Cancer Cell* 6:45-59.
- Lammer C, Wagerer S, Saffrich R, Mertens D, Ansorge W, Hoffmann I (1998) The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 16):2445-53.
- Lang J, Bellgrau D (2004) Animal models of type 1 diabetes: genetics and immunological function. *Adv Exp Med Biol* 552:91-116.
- Lesage S, Hartley SB, Akkaraju S, Wilson J, Townsend M, Goodnow CC (2002) Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes. *J Exp Med* 196:1175-88.
- Liston A, Hardy K, Pittelkow Y, Wilson SR, Makaroff LE, Fahrner AM, Goodnow CC (2007) Impairment of organ-specific T cell negative selection by diabetes susceptibility genes: genomic analysis by mRNA profiling. *Genome Biol* 8:R12.
- Liston A, Lesage S, Gray DHD, O'Reilly LA, Strasser A, Fahrner AM, Boyd RL, Wilson J, Baxter AG, Gallo EM (2004) Generalized Resistance to Thymic Deletion in the NOD Mouse: A Polygenic Trait Characterized by Defective Induction of Bim. *Immunity* 21:817-830.
- Lutzmann M, Grey C, Traver S, Ganier O, Maya-Mendoza A, Ranisavljevic N, Bernex F, Nishiyama A, Montel N, Gavois E, Forichon L, de Massy B, Mechali M (2012) MCM8- and MCM9-deficient mice reveal gametogenesis defects and genome instability due to impaired homologous recombination. *Mol Cell* 47:523-34.
- Lyons PA, Hancock WW, Denny P, Lord CJ, Hill NJ, Armitage N, Siegmund T, Todd JA, Phillips MS, Hess JF, Chen SL, Fischer PA, Peterson LB, Wicker LS (2000) The NOD Idd9 genetic interval influences the pathogenicity of insulinitis and contains molecular variants of Cd30, Tnfr2, and Cd137. *Immunity* 13:107-15.
- Ma Y, He KM, Garcia B, Min W, Jevnikar A, Zhang ZX (2008) Adoptive transfer of double negative T regulatory cells induces B-cell death in vivo and alters rejection pattern of rat-to-mouse heart transplantation. *Xenotransplantation* 15:56-63.
- Maiorano D, Cuvier O, Danis E, Mechali M (2005) MCM8 is an MCM2-7-related protein that functions as a DNA helicase during replication elongation and not initiation. *Cell* 120:315-28.

- McAleer MA, Reifsnyder P, Palmer SM, Prochazka M, Love JM, Copeman JB, Powell EE, Rodrigues NR, Prins JB, Serreze DV, et al. (1995) Crosses of NOD mice with the related NON strain. A polygenic model for IDDM. *Diabetes* 44:1186-95.
- McIver Z, Serio B, Dunbar A, O'Keefe CL, Powers J, Wlodarski M, Jin T, Sobecks R, Bolwell B, Maciejewski JP (2008) Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 141:170-8.
- Park J, Long DT, Lee KY, Abbas T, Shibata E, Negishi M, Luo Y, Schimenti JC, Gambus A, Walter JC, Dutta A (2013) The MCM8-MCM9 complex promotes RAD51 recruitment at DNA damage sites to facilitate homologous recombination. *Mol Cell Biol* 33:1632-44.
- Patil M, Pabla N, Dong Z (2013) Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell Mol Life Sci* 70:4009-21.
- Pearce RB, Formby B, Healy K, Peterson CM (1995) Association of an androgen-responsive T cell phenotype with murine diabetes and *Idd2*. *Autoimmunity* 20:247-58.
- Pelletier AN, Lesage S (2013) The *Idd13* congenic interval defines the number of merocytic dendritic cells, a novel trait associated with autoimmune diabetes susceptibility. *J Autoimmun* 43:70-7.
- Petermann E, Woodcock M, Helleday T (2010) *Chk1* promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16090-5.
- Peterson DA, DiPaolo RJ, Kanagawa O, Unanue ER (1999) Quantitative analysis of the T cell repertoire that escapes negative selection. *Immunity* 11:453-62.
- Prochazka M, Leiter EH, Serreze DV, Coleman DL (1987) Three recessive loci required for insulin-dependent diabetes in nonobese diabetic mice. *Science* 237:286-9.
- Ratiu JJ, Racine JJ, Hasham MG, Wang Q, Branca JA, Chapman HD, Zhu J, Donghia N, Philip V, Schott WH, Wasserfall C, Atkinson MA, Mills KD, Leeth CM, Serreze DV (2017) Genetic and Small Molecule Disruption of the AID/RAD51 Axis Similarly Protects Nonobese Diabetic Mice from Type 1 Diabetes through Expansion of Regulatory B Lymphocytes. *J Immunol* 198:4255-4267.
- Serreze DV, Bridgett M, Chapman HD, Chen E, Richard SD, Leiter EH (1998) Subcongenic analysis of the *Idd13* locus in NOD/Lt mice: evidence for several susceptibility genes including a possible diabetogenic role for beta 2-microglobulin. *J Immunol* 160:1472-8.
- Serreze DV, Prochazka M, Reifsnyder PC, Bridgett MM, Leiter EH (1994) Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene. *J Exp Med* 180:1553-8.
- Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewski J, Syljuasen RG, Lundin C, Bartek J, Helleday T (2005) The cell-cycle checkpoint kinase *Chk1* is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol* 7:195-201.

Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research* 43:D447-52.

Taylor SS, McKeon F (1997) Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* 89:727-35.

Vallee RB, Varma D, Dujardin DL (2006) ZW10 function in mitotic checkpoint control, dynein targeting and membrane trafficking: is dynein the unifying theme? *Cell Cycle* 5:2447-51.

Varma D, Dujardin DL, Stehman SA, Vallee RB (2006) Role of the kinetochore/cell cycle checkpoint protein ZW10 in interphase cytoplasmic dynein function. *J Cell Biol* 172:655-62.

Wallet MA, Flores RR, Wang Y, Yi Z, Kroger CJ, Mathews CE, Earp HS, Matsushima G, Wang B, Tisch R (2009) MerTK regulates thymic selection of autoreactive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4810-5.

Wicker LS, Clark J, Fraser HI, Garner VE, Gonzalez-Munoz A, Healy B, Howlett S, Hunter K, Rainbow D, Rosa RL, Smink LJ, Todd JA, Peterson LB (2005) Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice. *J Autoimmun* 25 Suppl:29-33.

Wicker LS, Todd JA, Peterson LB (1995) Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol* 13:179-200.

Young KJ, DuTemple B, Phillips MJ, Zhang L (2003) Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells. *J Immunol* 171:134-41.

Young KJ, Yang L, Phillips MJ, Zhang L (2002) Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood* 100:3408-14.

Zhang D, Zhang W, Ng TW, Wang Y, Liu Q, Gorantla V, Lakkis F, Zheng XX (2011) Adoptive cell therapy using antigen-specific CD4⁺CD8⁻ T regulatory cells to prevent autoimmune diabetes and promote islet allograft survival in NOD mice. *Diabetologia* 54:2082-92.

Zhang ZX, Ma Y, Wang H, Arp J, Jiang J, Huang X, He KM, Garcia B, Madrenas J, Zhong R (2006) Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, fas-fas ligand-independent pathway. *J Immunol* 177:6920-9.

Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L (2000) Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 6:782-9.

Zucchelli S, Holler P, Yamagata T, Roy M, Benoist C, Mathis D (2005) Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics. *Immunity* 22:385-96.

3.8 Figures

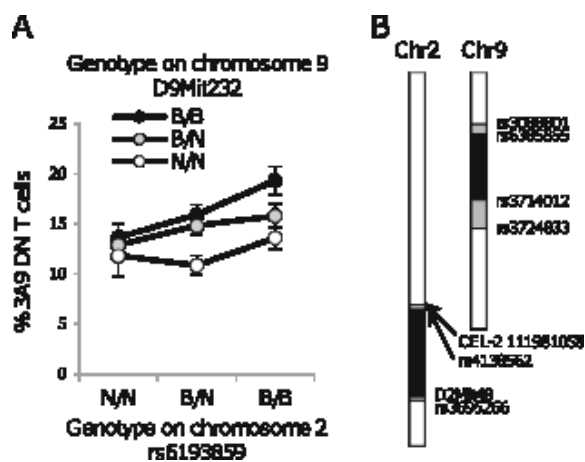


Figure 1 : Interactions between chromosome 2 and chromosome 9 in determining 3A9 DN T cell proportion in 3A9 TCR F2 mice. A) The proportion of 3A9 DN T cells in the skin draining lymph nodes of 3A9 TCR F2 mice is represented based on their genotype on chromosome 2 at rs6193859 (x axis) and chromosome 9 at D9Mit232 (colored circles). N/N =homozygous *NOD.H2^k* alleles, B/N=heterozygous alleles, B/B = B10.BR homozygous alleles. Black circles: homozygous B10.BR alleles at D9Mit232, grey circles: heterozygous alleles at D9Mit232, white circles: homozygous *NOD.H2^k* alleles at D9Mit232. Mean ± SEM are represented. B) Schematic representation of mouse chromosome 2 and chromosome 9 from *NOD.H2^k-Idd2/13* congenic mice. The delimitation of the congenic interval as defined by Illumina medium density or PCR reaction. B10 alleles are shown in black, NOD alleles in white and alleles of undetermined origin in grey. The markers are positioned according to assembly NCBI m37 coordinates.

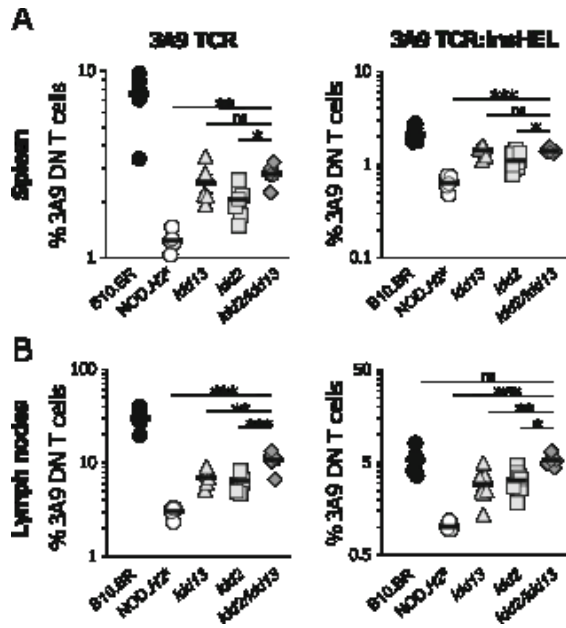


Figure 2 : The *Idd2* and *Idd13* loci cooperate to define the proportion of 3A9 DN T cells in lymph nodes. The proportion of 3A9 DN T cells is shown for 3A9 TCR and 3A9 TCR:insHEL transgenic mice in the spleen (A) and the lymph nodes (B). Each dot represents data from one mouse. Mean \pm SEM are shown. *p* value * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 according to one way ANOVA with Bonferonni post-hoc test. ns, non-significant.

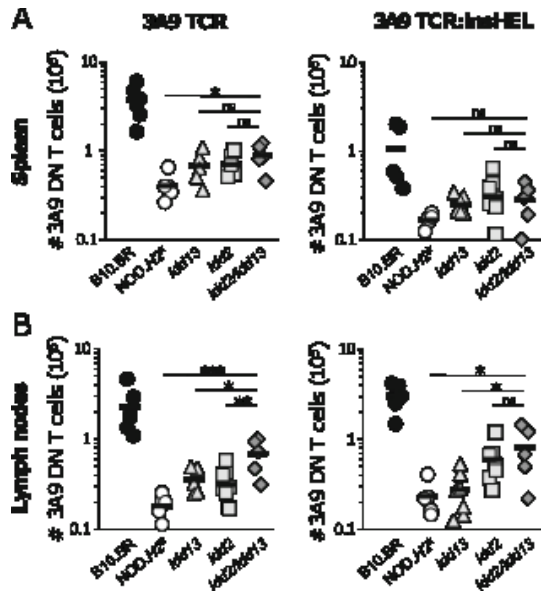


Figure 3 : The *Idd2* and *Idd13* loci cooperate to define the absolute number of 3A9 DN T cells in lymph nodes. The absolute number of 3A9 DN T cells is shown for 3A9 TCR and 3A9 TCR:insHEL transgenic mice in the spleen (A) and the lymph nodes (B). Each dot represents data from one mouse. Mean \pm SEM are shown. *p* value * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 according to one way ANOVA with Bonferonni post-hoc test. ns, non-significant.

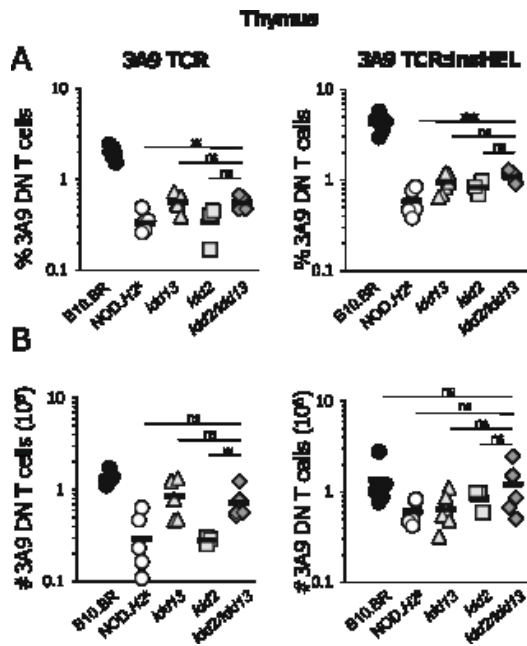


Figure 4: The impact of *Idd2* and *Idd13* loci on the proportion and number of 3A9 DN T cells in secondary lymphoid organs is not due to increased thymic differentiation. The proportion (A) and absolute number (B) of 3A9 DN T cells in the thymus is shown for 3A9 TCR and 3A9 TCR:insHEL transgenic mice. Each dot represents data from one mouse. Mean \pm SEM are shown. *p* value * < 0.05, ** < 0.01 according to one way ANOVA with Bonferonni post-hoc test. ns, non-significant.

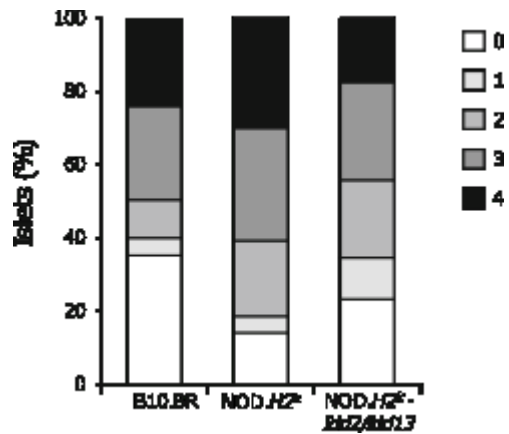


Figure 5: Insulinitis is not affected by the combination of *Idd2* and *Idd13* loci in 3A9 TCR:insHEL mice. The degree of islet infiltration is shown for euglycemic male and female mice of 8-14 weeks old. B10.BR (n=5), NOD.H2^k (n=4) and NOD.H2^k-*Idd2/13* mice (n=5).

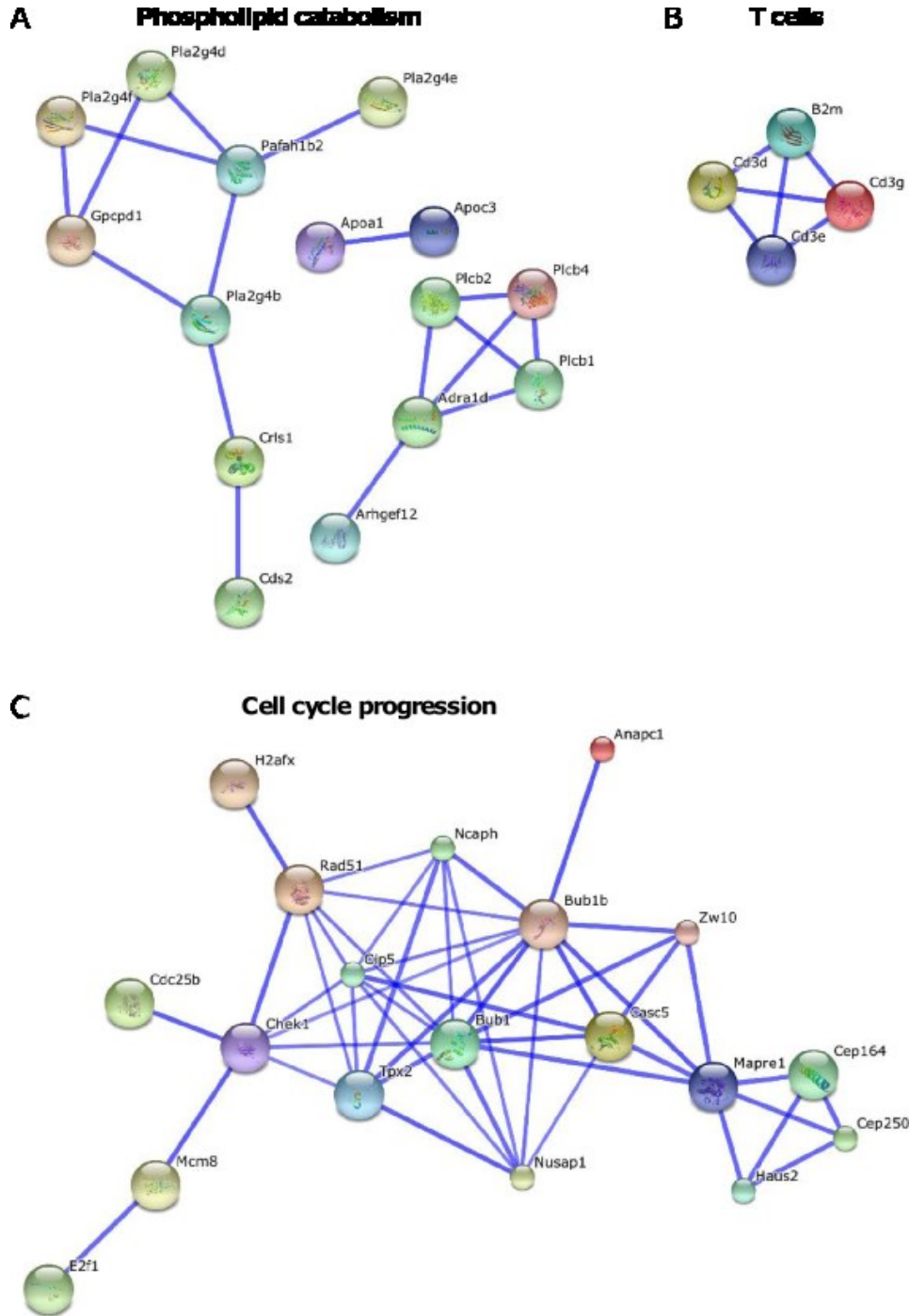


Figure 6 : STRING analysis of gene lists grouped under biological pathways revealed by DAVID. A) Phospholipid catabolic process, B) T cells and C) cell cycle progression, showing the confidence level of protein interaction for genes encoded within the *Idd2* and *Idd13* loci.

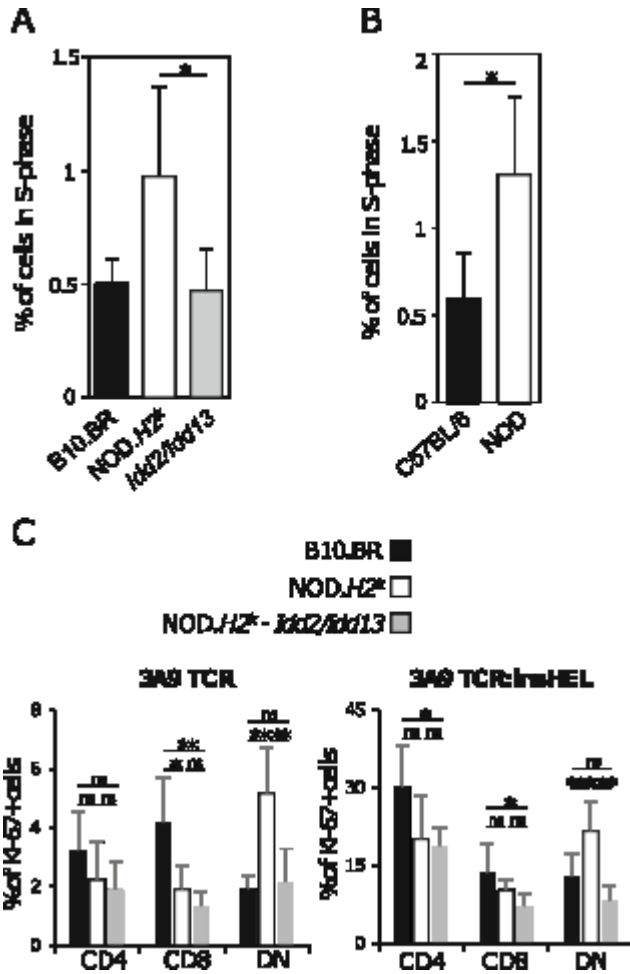


Figure 7 : Allelic variants in *Idd2* and *Idd13* influence cell cycle. Total spleen cells were stained with propidium iodide and the percentage of cells in S-phase was quantified by flow cytometry, for (A) B10.BR, NOD.H2^k and NOD.H2^k-*Idd2/Idd13* mice (n=5) and (B) C57BL/6 (B6) and NOD mice (n=7). Mean ± SEM are shown. C) Spleen cells from B10.BR and NOD.H2^k-*Idd2/Idd13* mice were stained with antibodies to CD3, CD4, CD8 and Ki-67. The percentage of Ki-67⁺ cells was quantified for CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺CD8⁻), CD8⁺ (CD3⁺CD4⁻CD8⁺) and DN (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) T cells. n=5. Mean ± SEM are shown. Student T test, *p* value * <0.05, ** <0.01, *** <0.001, ns= non-significant.

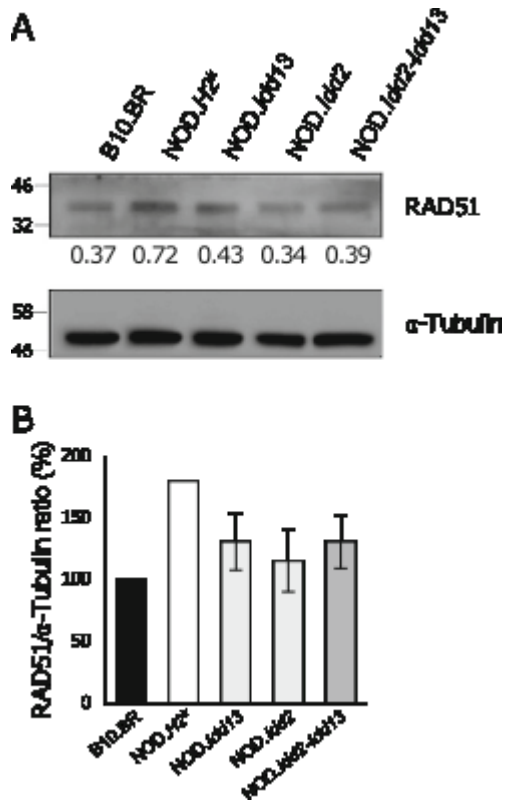


Figure 8 : RAD51 expression is modulated by polymorphisms on both *Idd2* and *Idd13*.

On representative Western blot (A) and data compilation (B) of relative RAD51 protein levels in total spleen cells from B10.BR, NOD.H2^k, NOD.H2^k-*Idd2*, NOD.H2^k-*Idd13* and NOD.H2^k-*Idd2/13*. (n=3).

Table 1 : 3A9 DN T cell proportion in the lymph nodes of 3A9 TCR F2 mice based on homozygous genotypes at one or both loci, specifically at rs6193859 encoded within *Idd13* and at D9Mit232 encoded with *Idd2*.

<i>Idd13</i> ; <i>Idd2</i>	Mean ± SEM		<i>Idd13</i> ; <i>Idd2</i>	Mean ± SEM	<i>p</i> value
N/N ; N/N	11.82 ± 2.05	vs	B/B ; N/N	13.60 ± 1.10	1.00
N/N ; N/N	11.82 ± 2.05	vs	N/N ; B/B	13.65 ± 1.36	1.00
N/N ; N/N	11.82 ± 2.05	vs	B/B ; B/B	19.34 ± 1.42	0.011
B/B ; N/N	13.60 ± 1.10	vs	N/N ; B/B	13.65 ± 1.36	1.00
B/B ; N/N	13.60 ± 1.10	vs	B/B ; B/B	19.34 ± 1.42	0.039
N/N ; B/B	13.65 ± 1.36	vs	B/B ; B/B	19.34 ± 1.42	0.033

* : *p* value <0.05 ; ns : non-significant based on Bonferroni's Multiple Comparison Test

Table 2 : Proportion of 3A9 CD4⁺ and 3A9 CD8⁺ T cells in the spleen and lymph nodes of 3A9 TCR and 3A9 TCR:insHEL mice in each strain, as indicated. Mean \pm SD from at least four mice per group is shown.

		3A9 TCR		3A9 TCR:insHEL	
		% 3A9 CD4 T cells	% 3A9 CD8 T cells	% 3A9 CD4 T cells	% 3A9 CD8 T cells
Spleen	B10.BR	4.43 \pm 3.20	1.22 \pm 0.52	0.21 \pm 0.08	0.12 \pm 0.07
	NOD.H2^k	5.91 \pm 3.27	0.79 \pm 0.18	1.47 \pm 0.98	0.16 \pm 0.04
	NOD.Idd13	6.62 \pm 2.26	1.6 \pm 0.47	1.82 \pm 1.26	0.48 \pm 0.08
	NOD.Idd2	6.58 \pm 4.59	1.54 \pm 0.52	1.61 \pm 2.9	0.5 \pm 0.28
	NOD.Idd2-Idd13	4.15 \pm 2.10	1.07 \pm 0.32	0.64 \pm 0.35	0.36 \pm 0.12
Lymph Nodes	B10.BR	9.52 \pm 5.68	4.04 \pm 1.72	0.24 \pm 0.12	0.53 \pm 0.33
	NOD.H2^k	15.15 \pm 6.18	2.78 \pm 0.69	2.72 \pm 2.56	0.86 \pm 0.38
	NOD.Idd13	17.24 \pm 6.44	5.85 \pm 1.65	2.69 \pm 2.07	1.83 \pm 0.68
	NOD.Idd2	15.11 \pm 7.91	5.52 \pm 1.71	1.07 \pm 1.3	1.44 \pm 0.67
	NOD.Idd2-Idd13	8.87 \pm 3.80	4.41 \pm 0.79	0.81 \pm 0.52	1.47 \pm 0.40

Table 3. Serum antibodies (relative units) and diabetes incidence of 3A9 TCR:insHEL mice from the different strains.

	B10.BR	NOD.H2 ^K	NOD.H2 ^K -Idd2/Idd13
Levels of Total IgG	15.85 ± 4.06	10.34 ± 2.20	7.80 ± 2.35
Levels of IgG anti-HEL	0.45 ± 0.45	3.12 ± 0.90	1.49 ± 0.41
Levels of IgG1 anti-HEL	0.15 ± 0.12	0.57 ± 0.18	0.23 ± 0.07
Diabetes incidence (%)	25 ^{1,2}	60-80 ^{1,2,3}	0

¹ Lesage, Goodnow, JEM (2002)

² Collin et al., JI (2014)

³ Hillhouse et al., ICB (2016)

Table 4. Biological pathways present in *Idd2*, *Idd13* or in both loci

<i>Idd2</i>	<i>Idd13</i>	<i>Idd2 and Idd13</i>
Cell junction and synapse	Cell cycle	Microtubules and cytoskeleton
Dendrite	Intracellular organelle	Cell cycle
DNA checkpoint	Response to stress	Nucleotide process
Glycosylation	Signal process	Phospholipid catabolic process
Immune system development	Cilium formation	Protease inhibitor
Ions transport and voltage		Carbohydrate metabolism
Lipid metabolic process		Ig-like domain
Negative regulation of motion		Lipid transport
Protease		Signal protein
		T cell
		Endoplasmic reticulum membrane

Table 5. Summary of interactions between genes in *Idd2* and *Idd13* loci

	Number of gene interactions with > 0.7 confidence score	Percentage of interactions with > 0.7 confidence score
Phospholipid catabolism	5	71.4%
T cell	2	66.7%
Cell cycle	15	51.7%
Carbohydrate metabolism	5	45.5%
Microtubules and cytoskeleton	10	41.7%
Ig-like domain	3	33.3%
Signal protein	20	26.7%
Protease inhibitor	2	22.2%
Nucleotide process	12	11.8%
Endoplasmic reticulum membrane	1	10.0%
Lipid transport	0	0.0%

Chapitre 4 : Article 3

4.1 Autoimmunity and antibody affinity maturation are modulated by genetic variants on mouse chromosome 12

Roxanne Collin, Véronique Dugas, Geneviève Chabot-Roy, David Salem, Astrid Zahn, Javier M. Di Noia, Joyce Rauch, Sylvie Lesage

Cet article a été publié dans *Journal of Autoimmunity* Vol 58: 90-99 (2015)

Dans le contexte de la présente thèse, des données non-publiées liées à cet article (présentées en Annexe 1) montrent que le locus du chromosome 12 ne régule pas la proportion de cellules DN T, et ajoutent un élément de réponse à l'objectif 1. En dépit de l'absence de différence dans la modulation de la proportion de DN T dans les souris congéniques, des éléments de prédisposition génétique à l'autoimmunité ont été révélés. Puisque l'intervalle génétique est très court, et composé de gènes dont le rôle dans la modulation des anticorps est inconnu, ces travaux jettent une base pour l'identification de nouveaux processus contrôlant la maturation de l'affinité des anticorps et la production d'auto-anticorps.

À l'exception des manipulations techniques concernant les ELISA anti-ADN, tous les résultats présentés proviennent d'expériences que j'ai réalisées. J'ai effectué l'ensemble des analyses et généré la totalité des figures, ainsi que la première version du manuscrit. La conception du manuscrit, ainsi que la réponse aux demandes de révision ont été faits conjointement avec Dre Sylvie Lesage.

Autoimmunity and antibody affinity maturation are modulated by genetic variants on mouse chromosome 12

Roxanne Collin^{a,b}, Véronique Dugas^{a,b,c}, Geneviève Chabot-Roy^a, David Salem^d, Astrid Zahn^e, Javier M. Di Noia^{e,f}, Joyce Rauch^d, Sylvie Lesage^{a,b}

a - Immunology-oncology Section, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, Québec, H1T 2M4, Canada

b - Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

c - Current address: Mitacs, Institute for Aerospace Research, University of Montreal, Montréal, Québec, H3T 2B2, Canada

d - Division of Rheumatology, Department of Medicine, Research Institute of the McGill University Health Centre, Montréal, Québec, H3G 1A4, Canada

e - Division of Immunology and Viral Infections, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Québec, H2W 1R7, Canada

f - Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3T 1J4, Canada

Running title : Chromosome 12 locus affects autoimmunity and global antibody responses

Correspondence address:

Sylvie Lesage

Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Centre de recherche,

5415 boul. de l'Assomption,

Montréal, Québec,

H1T 2M4, CANADA

Tel : 1-514-252-3400 x 4649

Fax : 1-514-252-3569

E-mail : sylvie.lesage@umontreal.ca

4.1 Abstract

Autoimmune diseases result from a break in immune tolerance leading to an attack on self-antigens. Autoantibody levels serve as a predictive tool for the early diagnosis of many autoimmune diseases, including type 1 diabetes. We find that a genetic locus on mouse chromosome 12 influences the affinity maturation of antibodies as well as autoantibody production. Thus, we generated a NOD.*H2^k* congenic strain bearing B10 alleles at the locus comprised within the *D12Mit184* and *D12Mit12* markers, which we named NOD.*H2^k-Chr12*. We determined the biological relevance of the *Chr12* locus on the autoimmune process using an antigen-specific TCR transgenic autoimmune mouse model. Specifically, the 3A9 TCR transgene, which recognizes a peptide from hen egg lysozyme (HEL) in the context of I-A^k, and the HEL transgene, which is expressed under the rat-insulin promoter (iHEL), were bred into the NOD.*H2^k-Chr12* congenic strain. In the resulting 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k-Chr12* mice, we observed a significant decrease in diabetes incidence as well as a decrease in both the quantity and affinity of HEL-specific IgG autoantibodies relative to 3A9 TCR:iHEL NOD.*H2^k* mice. Notably, the decrease in autoantibodies due to the *Chr12* locus was not restricted to the TCR transgenic model, as it was also observed in the non-transgenic NOD.*H2^k* setting. Of importance, antibody affinity maturation upon immunization and re-challenge was also impeded in NOD.*H2^k-Chr12* congenic mice relative to NOD.*H2^k* mice. Together, these results demonstrate that a genetic variant(s) present within the *Chr12* locus plays a global role in modulating antibody affinity maturation.

Keywords : autoantibodies, affinity maturation, NOD congenic mice, transgenic model, autoimmune diabetes, systemic lupus erythematosus.

4.2 Introduction

Autoimmune diabetes results from the immune-mediated destruction of the insulin-secreting beta cells present within the pancreatic islets. Interestingly, molecular pathways associated with diabetes susceptibility are concordant between humans, the NOD mouse and the BB rat, which all spontaneously develop autoimmune diabetes [1-3]. In particular, the NOD mouse has been a key tool to investigate the aetiology as well as the genetic susceptibility of type 1 diabetes, revealing an interesting parallel with susceptibility to type 1 diabetes in humans [1, 4-8]. Consequently, validation of linkage studies for type 1 diabetes susceptibility has been performed in NOD congenic strains [6]. One notable advantage provided by the generation of the congenic lines and sublimes is that it allows for significant restriction of the list of candidate genes associated with autoimmune disease susceptibility.

To explore defects in antigen-specific immune tolerance, we exploit the 3A9 TCR transgenic system, in which the TCR recognizes a peptide from hen egg lysozyme (HEL) in the context of I-A^k [9-17]. Both the HEL transgene, which is expressed under the rat-insulin promoter (iHEL) and the 3A9 TCR transgene were initially backcrossed to two different genetic backgrounds, namely B10.BR and NOD.H2^k. Diabetes-resistant B10.BR mice are C57BL/10 mice that are congenic for the same H2^k MHC locus as NOD.H2^k mice [10, 18]. Expectedly, the incidence of diabetes is relatively low in 3A9 TCR:iHEL B10.BR mice, which carry the B10.BR diabetes resistant genetic background. Although non-transgenic NOD.H2^k mice do not spontaneously develop diabetes [19], they carry all other non-MHC susceptibility loci, such that a high proportion of 3A9 TCR:iHEL NOD.H2^k mice develop diabetes [10]. Therefore, this model can be used to unravel antigen-specific modes of immune tolerance as well as to define non-MHC susceptibility loci linked to autoimmune diabetes susceptibility.

Serum insulin autoantibody levels are associated with autoimmune diabetes susceptibility and they serve as a predictive value for the onset of diabetes in both humans and mice [20-23].

Interestingly, there is growing evidence that autoantibodies are not simply bystanders in the disease process. Indeed, maternally transmitted autoantibodies contribute to diabetes onset in NOD offspring [24, 25]. Similarly, maternally-derived anti-HEL antibodies contribute to the autoimmune diabetes pathology observed in the 3A9 TCR:iHEL NOD. $H2^k$ mouse model [26]. These autoantibodies most likely arise as a consequence of a break in immune tolerance conferred by the NOD genetic background, as neither the C57BL/6 nor the 3A9 TCR:iHEL B10.BR diabetes-resistant strains present with islet-specific pathogenic autoantibodies [10, 27]. Together these data suggest a role for genetically controlled autoantibody levels in the predisposition to autoimmune diabetes.

The genetic regulation of autoantibody production has been studied in the context of other diseases, namely in systemic lupus erythematosus (SLE). For instance, a genetic cross between NZW, NZB and BALB/c strains, where the NZW strain is prone to SLE, demonstrated that the *Nbwal* quantitative trait locus (QTL) on mouse chromosome 12 is linked to high levels of anti-nuclear autoantibodies [28]. Interestingly, autoimmune diabetes and SLE share genetic susceptibility [29]. Furthermore, the NOD mouse not only develops insulin autoantibodies [20, 30] but also develop antinuclear antibodies along with other tissue-specific autoantibodies [27, 31]. In association with their prominent autoimmune-prone nature, NOD mice appear to exhibit a general propensity for producing autoantibodies.

In this study, we determine the effect of genetic modulation on antigen-specific autoantibody production in $H2^k$ mice using both the 3A9 TCR:iHEL mouse model of antigen-specific autoimmune diabetes and non-TCR transgenic mice. Particularly, we develop a congenic strain to define the impact of the B10.BR locus on mouse chromosome 12 (*Chr12*), which coincides with the *Nbwal* locus. We find that, in addition to conferring partial diabetes resistance in the 3A9 TCR:iHEL NOD. $H2^k$ model, this locus regulates the affinity maturation of antibodies as well as autoantibody production.

4.3 Material and methods

Mice

3A9 TCR transgenic and iHEL transgenic mice, where HEL is expressed under the rat insulin promoter, on B10.BR and NOD.*H2^k* (hereafter denoted as NOD^k) backgrounds have been previously described [10]. The congenic strains were obtained by backcrossing B10.BR mice to the 3A9 TCR NOD^k parental strain for eight generations, maintaining mice heterozygous for the B10.BR allele at the *D12Mit184* marker. The iHEL transgene was introduced at the fifth backcross. At the eighth backcross, mice were maintained by brother-sister mating. Fine-mapping by PCR reaction allowed us to determine that the final congenic interval of B10 origin is located between the markers *D12Mit184* and *D12Mit12*. All NOD^k.B10-(*D12Mit184*-*D12Mit12*) congenic mice, hereafter named NOD^k-*Chr12*, were used after the eighth generation backcross. An illumina low-density linkage, serviced through the Center for Applied Genomics at the Hospital for Sick Children, showed the absence of B10 contamination outside the *Chr12* interval. All of the mouse strains were maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal house facility (Montreal, Canada). The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee, overseen by the Canadian Council for Animal Protection approved the experimental procedures.

Diabetes incidence study

Female 3A9 TCR:iHEL mice were monitored daily for overt signs of diabetes (wet cage, hunched posture) and every two weeks for urine glucose levels using Diastix (Bayer, Toronto, Ontario, Canada) starting at 8 to 12 weeks of age. After two successive positive Diastix tests, overt diabetes was confirmed by blood glucose levels higher than 17 mmol/L. The age of diabetes onset is set at the first detection of elevated urine glucose levels. The mice were sacrificed within one week of detection of high blood glucose or when they reached more than 34 weeks of age. At culling, tail DNA was collected to verify the genotype of the mouse. The serum was collected. The pancreas was conserved in formalin for at least 48 hours at room temperature before being sent for paraffin inclusion. The 3A9 TCR:iHEL NOD^k female mice

included in the diabetes incidence study are littermate controls from 3A9 TCR:iHEL congenic mice that carried homozygous NOD alleles at the *Chr12* locus.

Histology

H&E staining was performed on 5 to 7 μm sections of pancreas cut from paraffin blocks. One histology slide per mouse, containing 1 to 3 non-successive cuts per slide were scored for infiltration as previously described [32], and according to the following scale: 0 = no infiltration, 1 = peri-insulitis, 2 = infiltration <50%, 3 = infiltration > 50%, 4=complete infiltration.

Anti-HEL, anti-OVA and total Ig ELISA

Total IgG and total IgM antibodies were measured by ELISA according to the manufacturer's protocol (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA). Serum anti-HEL or anti-OVA IgG, IgM, IgG₁ and IgG_{2c} levels were measured by ELISA on Nunc Maxisorp plates (Thermo Fisher Scientific) coated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of OVA or HEL protein prepared in NaHCO₃ at pH 9.5. Following incubation with serial dilutions of serum, plates were washed and incubated with goat anti-mouse IgG-HRP (Biolegend, clone poly4053), goat anti-mouse IgM-HRP (VWR), goat anti-mouse IgG_{2c}-HRP (Southern Biotech) or with rat anti-mouse IgG₁-biotin (Biolegend, clone RMG1-1) followed by avidin-HRP (Biolegend). Plates were developed with 3,3',5,5' – tetramethylbenzidine (TMB) substrate and read at 450nm. A reference pool of sera from diabetic and non-diabetic TCR:iHEL mice was set to contain 1 arbitrary unit in anti-HEL antibody level, and a pool of non-transgenic mice immunized with OVA was set to contain 1 arbitrary unit in anti-OVA antibody level. Note that IgG_{2c} levels were quantified as NOD mice do not express IgG_{2a} [33].

Affinity ELISA

Sodium thiocyanate (NaSCN) displacement ELISA was performed [34]. Briefly, serum samples were diluted at similar concentrations, based on standard ELISA results. Serum dilutions were incubated overnight in a HEL- or OVA-coated plate. Plates were washed and increasing concentrations of NaSCN were added (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, and 5 M) and incubated for 10 minutes at room temperature. Plates were washed, blocked with 0.1% gelatin and incubated with rat anti-mouse IgG₁-biotin (Biolegend, clone RMG1-1) followed by avidin-HRP (Biolegend). Plates were developed with 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and read at 405nm. Assays were performed in duplicate. Relative affinity value was calculated as follows : the delta value of percent antibody bound between two NaSCN concentrations was multiplied by the highest molar concentration of the NaSCN washing, except for the 5 M NaSCN washing which was multiplied by 6. The sum of all these products is the RAV and provides a quantitative measure of the overall affinity of the response for the Ag considered [34].

Immunizations

Non-TCR transgenic mice of 9-17 weeks of age were immunized i.p. with an emulsion of 50 µg OVA (Sigma) in CFA (Sigma) at day 0 and with an emulsion of 50µg OVA in IFA (Sigma) after 35 days (D35). Mice were sacrificed 8 days after restimulation (D35+8). Serum was collected at day 35 and day 8 after restimulation.

Anti-dsDNA, anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B ELISA

Antibodies to double-stranded DNA (dsDNA), anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B were measured by ELISA as described previously [35]. Immulon 2 HB plates (Thermo Scientific, Waltham, MA) were coated with 50 µl/well of *Escherichia coli* DNA (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) (10 µg/ml); Ro60/SS-A (Immunovision, Springdale, AR) (10.42 Units/ml; 4 mg/ml); or La/SS-B (Immunovision, Springdale, AR) (10.42 Units/ml; 1.3 mg/ml) in 0.01 M

phosphate-buffered saline, pH 7.3, containing 0.02% azide (PBS-azide), and dried for 16 hours at 37°C. Coated plates were blocked with PBS-azide containing 0.5% gelatin and 10% FBS for two hours at 4°C, and washed three times with 0.01 M Tris-buffered saline, pH 7.4 (TBS). Murine sera were diluted at 1/50 (unless stated otherwise) in PBS-azide containing 0.3% gelatin and 10% FBS, and were incubated in duplicate coated wells for three hours at 25°C. Following three washes with TBS, alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG (Southern Biotech, Birmingham, AL) diluted 1/1000 in PBS-azide containing 0.4 % bovine serum albumin was added and incubated for 16 hours at 4°C. Plates were then washed with TBS, developed with p-nitrophenol phosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and the optical density at 405 nm (OD₄₀₅) read using an ELISA reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT). Positive controls included serum from an MRL-lpr/lpr mouse (9-10 weeks old) and serum from a C57BL/6 mouse (B1) immunized with β2-glycoprotein I and lipopolysaccharide. The negative control was serum from a naive C57BL/6 mouse (12-14 weeks old).

Statistics

Data for the various experiments were tested for significance using a non-parametric Mann–Whitney U test with a minimal threshold of 0.05.

4.4 Results

4.4.1 A locus on mouse chromosome 12 impacts diabetes incidence

To investigate the contribution of a proximal locus on chromosome 12 at defining autoantibody production, we generated NOD^k congenic mice bearing B10 alleles overlapping the *Nbwa1* QTL (Figure 1). Fine-mapping at the eighth backcross positioned the *Chr12* congenic segment between the *D12Mit184* and *D12Mit12* markers, where NOD^k-*Chr12* congenic mice were homozygous for B10.BR alleles for both the *D12Mit184* and *D12Mit12* markers and bore homozygous NOD alleles at both the *D12Mit170* and *D12Mit185* markers (Figure 1). The resulting NOD^k-*Chr12* congenic mice bearing the 3A9 TCR:iHEL transgene allows us to evaluate the biological role of this locus in an antigen-specific model of autoimmune diabetes, where autoantibodies precipitate disease onset [10, 26].

First, to assess the global impact of B10 alleles at the *Chr12* interval on autoimmune diabetes, we monitored the diabetes incidence in a cohort of 3A9 TCR:iHEL transgenic NOD^k, B10.BR and NOD^k-*Chr12* female mice (Figure 2a). As previously reported, approximately 80% 3A9 TCR:iHEL transgenic NOD^k and 20% of B10.BR female mice developed diabetes [10]. Notably, only 43% of the 3A9 TCR:iHEL transgenic NOD^k-*Chr12* congenic mice progressed to overt diabetes. This result suggests that B10 alleles within the Ch12 congenic interval confer partial resistance to autoimmune diabetes, relative to the 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice.

In the 3A9 TCR:iHEL transgenic mouse model, insulinitis is comparable between mice bearing either the NOD^k or the B10.BR background [10]. Still, genetic epistasis can often reveal unexpected phenotypes within congenic strains [36, 37]. We thus evaluated whether the decrease in diabetes incidence in the NOD^k-*Chr12* congenic mice was associated with a decrease in insulinitis. In all three genetic backgrounds, similar levels of insulinitis were observed (Figure 2b). However, relative to 3A9 TCR:iHEL transgenic NOD^k mice, there was a slight tendency for a lower degree of insulinitis in both B10.Br and NOD^k-*Chr12* genetic backgrounds, both of which present with a lower incidence of diabetes. As mice were not age-matched and

not matched for disease progression in this analysis (the pancreas was harvested when mice turned diabetic or when the non-diabetic mice reached 36 weeks of age), we undertook to analyze a cohort of young age-matched, non-diabetic mice. Although the severity of insulinitis was lower in this cohort, likely due to the younger age and non-diabetic status of the mice, the degree of insulinitis was comparable between all three strains (Figure 2c). Together, these findings suggest that the *Chr12* congenic interval impacts diabetes incidence without affecting the degree of insulinitis nor the severity of the disease.

4.4.2 Reduced autoantibody levels in congenic mice

Autoantibodies precipitate diabetes onset in the 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice [10, 26] and the *Nbwal* locus is linked to autoantibody production [28]. We thus next investigated whether serum autoantibody levels were modulated in 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* mice. We monitored serum anti-HEL IgM antibodies in non-diabetic euglycemic 3A9 TCR:iHEL transgenic mice and observed no difference in the quantity of anti-HEL IgM antibodies between the NOD^k-*Chr12* congenic mice and their NOD^k littermates (respective mean of 0.58 and 0.60) (Figure 3). Interestingly, among the three strains, euglycemic 3A9 TCR:iHEL B10.BR diabetes resistant mice bear the highest level of anti-HEL IgM autoantibody (Figure 3). However, this is likely due to the increase in total IgM serum levels present in these 3A9 TCR:iHEL B10.BR mice (Figure 3 right panels), rather than to their propensity at producing more IgM autoantibodies. Notably, we also tested the sera from diabetic mice and found that they presented with comparable anti-HEL IgM serum levels to those found in euglycemic mice (Figure 3). The total IgM serum levels also remained unchanged with diabetic status. Therefore, the *Chr12* locus does not appear to influence the total serum IgM nor the HEL-specific IgM levels, where the serum IgM levels do not correlate with diabetes incidence.

The *Nbwal* locus is specifically linked to IgG autoantibody levels [28]. Moreover, we have previously reported that anti-HEL IgG autoantibodies are highly elevated in 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice relative to 3A9 TCR:iHEL B10.BR mice [10]. Similar to our previous observations, 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice present with a higher level of IgG HEL-specific, but

also of anti-HEL IgG₁-specific, autoantibodies than 3A9 TCR:iHEL B10.BR mice (Figure 3). This increase in HEL-specific IgG antibodies in 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice was not accounted for by total IgG levels, as 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice had lower levels of total IgG serum antibodies than the B10.BR counterpart (Figure 3, right panels). More importantly, we found that 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* congenic mice had slightly lower levels of anti-HEL IgG and IgG₁ autoantibodies when compared with 3A9 TCR:iHEL NOD^k littermate controls (Figure 3). This difference in IgG and IgG₁ anti-HEL autoantibody levels was accentuated in diabetic mice, where the 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* congenic mice developed even fewer IgG and IgG₁ anti-HEL serum autoantibodies compared to diabetic 3A9 TCR:iHEL NOD^k littermate controls (Figure 3, note the change in scale for non-diabetic and diabetic mice). In fact, anti-HEL IgG and IgG₁ serum autoantibody levels were significantly increased in diabetic 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice compared to non-diabetic 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice (Table 1), whereas the diabetic status had only a very modest impact on the autoantibody levels in both 3A9 TCR:iHEL B10.BR and 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* congenic mice (Table 1 and Figure 3). Importantly, total IgG levels were similar between euglycemic 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice and 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* mice (Figure 3, right panels). This suggests that the variation in autoantibody levels is specifically conferred by the locus on chromosome 12.

4.4.3 Autoantibody affinity is decreased in 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* congenic mice

The specific decrease in anti-HEL IgG and IgG₁ autoantibody levels in 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* congenic mice relative to 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice could reflect a decrease in isotype switching. However, we did not observe the expected concomitant increase in anti-HEL IgM autoantibody levels. Still, antibody isotype switching occurs in germinal centers and is associated with affinity maturation [38]. To determine if the affinity of the autoantibodies was affected by the *Chr12* locus, we performed an affinity ELISA assay on anti-HEL IgG₁ autoantibodies from euglycemic and diabetic mice. Figure 4a and 4b present comparative antibody dissociation curves and antibody fractions of increasing affinity, respectively. The relative antibody affinity value is presented in panel 4c. In non-diabetic mice, we observed no

difference in anti-HEL IgG₁ autoantibody affinity between the 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* congenic mice and the 3A9 TCR:iHEL NOD^k controls (Figure 4). However, when comparing the diabetic mice from the same strains, we found that the affinity of anti-HEL IgG₁ autoantibodies was decreased in 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* congenic mice relative to the NOD^k counterpart (Figure 4). Similar results were observed with anti-HEL IgG (not shown). Indeed, as for the IgG anti-HEL serum autoantibody levels, the autoantibody affinity does not increase with the diabetic status of 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* congenic mice, whereas a significant increase in anti-HEL IgG₁ autoantibody affinity levels is observed when 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice progress to overt diabetes (Figure 4). Together, these findings suggest that both isotype switching to anti-HEL IgG antibodies as well as affinity maturation is defined at least in part by genetic variants encoded within the *Chr12* locus.

4.4.4 The decrease in autoantibody levels conferred by the *Chr12* locus is not limited to the 3A9 TCR:iHEL transgenic model

To verify if the decrease in autoantibody levels observed in the 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* congenic model was also present in other models, we took advantage of the fact that non-transgenic NOD mice develop anti-nuclear autoantibodies [27]. Non-transgenic NOD^k mice do not develop diabetes [19], yet they still present with autoantibodies directed against various antigens [39]. As the *Nbwal* locus coincides with the *Chr12* locus (Figure 1) and is linked to anti-nuclear autoantibodies [28], we quantified anti-nuclear autoantibodies associated with SLE, namely anti-dsDNA, anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies, in the serum of non-TCR transgenic mice. At 20 weeks of age, all NOD^k mice had detectable levels of anti-dsDNA antibodies, whereas only one NOD^k-*Chr12* congenic mice showed positivity for this autoantibody (Figure 5a). At 30 weeks of age, autoantibody levels had further increased such that the difference between NOD^k-*Chr12* congenic mice and NOD^k mice became statistically significant (Figure 5b). Unfortunately, both anti-Ro and anti-La autoantibodies were below the detection limit in NOD^k mice such that we could not detect the impact of the *Chr12* locus on the level of these autoantibodies (data not shown). Together, these results show that the *Chr12*

locus of B10.BR origin significantly decreases the quantity of spontaneous autoantibody production even in a non-transgenic setting.

4.4.5 The *Chr12* locus affects antibody affinity maturation upon immunization

We have shown that the spontaneous humoral autoantibody response to self-antigens is decreased in both quantity and quality in NOD^k-*Chr12* congenic mice relative to NOD^k mice. To determine whether this phenotype could be extended to humoral responses following immunization, we immunized non-transgenic NOD^k and NOD^k-*Chr12* mice with OVA and CFA. The mice were re-challenged with OVA and IFA after 35 days. To assess the primary and secondary antibody responses, we measured the quantity of OVA antigen-specific antibodies in the serum of the mice 35 days after the first immunization and 8 days after the re-challenge. Our results show that both NOD^k and NOD^k-*Chr12* mice produced the same quantity of OVA-specific IgM, IgG, IgG₁ and IgG_{2c} antibodies in both the primary and secondary responses to antigen (Figure 6).

As the *Chr12* locus affected the autoantibody affinity, we determined whether antibody affinity maturation was affected in NOD^k-*Chr12* congenic mice. At day 35 post-immunization, anti-OVA IgG₁ in NOD^k mice show a relatively low affinity, which increased significantly upon re-challenge (Figure 7). Interestingly, no affinity maturation was observed for anti-OVA antibodies in NOD^k-*Chr12* congenic mice upon re-challenge. Together, these results show that, in addition to its impact on the autoantibody responses, the *Chr12* locus also affects the quality of the humoral response following antigen-specific immunization.

4.5 Discussion

We have generated a NOD^k-*Chr12* congenic mouse and demonstrated that the *Chr12* locus impacts the quality of the humoral response to self-antigens in TCR transgenic and non-TCR transgenic mouse models. Moreover, we show that affinity maturation of induced antibodies is globally affected by this *Chr12* locus. Finally, as autoantibodies contribute to autoimmune diabetes susceptibility in the 3A9 TCR:iHEL transgenic model [26], we find that the *Chr12* locus conferred resistance to autoimmune diabetes in this setting.

Notably, the 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* congenic mice, relative to the 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice, were partially resistant to the spontaneous occurrence of autoimmune diabetes, coinciding with a partial reduction in autoantibody levels. These findings highlight the multifactorial nature and the multigenetic aspect of the autoantibody trait. Indeed, although 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* congenic mice present with a considerable reduction in anti-HEL IgG₁ levels, the B10.BR alleles at the *Chr12* locus are not sufficient to reduce anti-HEL IgG₁ levels below the threshold of detection, as observed in 3A9 TCR:iHEL B10.BR mice. Other B10.BR alleles are thus necessary to fully prevent anti-HEL IgG₁ autoantibody production. Interestingly, while the 3A9 TCR:iHEL B10.BR mice have few, if any, anti-HEL IgG and IgG₁ autoantibodies, they present with higher levels of anti-HEL IgM autoantibodies. Coincidentally, C57BL/6 mice, which have a similar genetic background to B10.BR mice, also present with higher autoreactive IgM antibodies than NOD mice [27]. Whether these IgM autoantibodies contribute to the pathology of the disease has yet to be defined.

3A9 TCR:iHEL B10.BR and NOD^k-*Chr12* mice present with very low levels of anti-HEL IgG autoantibodies relative to 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice. Yet, a considerable proportion of these mice still progress to overt diabetes, demonstrating that although autoantibodies contribute to the disease process in 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice [26], they are not necessary for disease progression in both the 3A9 TCR:iHEL B10.BR and NOD^k-*Chr12* strains. This finding again highlights the multifactorial nature of the autoimmune diabetes process. Indeed, autoimmune

diabetes is a complex genetic trait, wherein many biological parameters increase the susceptibility to disease, such as a decrease in Treg function, an increase in dendritic cell activation, a decrease in thymic selection of autoreactive T cells, and more [4, 40]. Additional experiments are needed to determine how 3A9 TCR:iHEL B10.BR and NOD^k-*Chr12* mice progress to diabetes.

The *Chr12* locus has not previously been associated with susceptibility to autoimmune diabetes. Here, we show that the 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* congenic mice are partially resistant to autoimmune diabetes development. This suggests that the *Chr12* locus defines a new type 1 diabetes susceptibility locus, at least in this transgenic mouse model where diabetes onset is dependent on autoantibody production. It would be interesting to determine whether the *Chr12* locus is sufficient to partially prevent or delay diabetes onset in a non-transgenic setting. To that effect, we are currently generating non-transgenic NOD-*Chr12* congenic mice bearing the H-2^{g7} MHC haplotype.

The *Chr12* locus coincides almost perfectly with *Nbwal*, a locus linked to anti-nuclear autoantibody production [28]. The linkage for *Nbwal* was identified using NZW, NZB and BALB/c genetic crosses, but the contribution of the *Nbwal* QTL to autoantibody production was not validated. In support of the genetic linkage of *Nbwal* to anti-nuclear IgG autoantibodies, we have shown that B10.BR alleles at the *Chr12* locus on NOD^k mice were sufficient to decrease anti-dsDNA serum IgG levels. We thus validate that the B10.BR alleles that coincide with the *Nbwal* QTL regulate the spontaneous production of anti-dsDNA antibodies in a non-transgenic setting.

In defining the quantity and quality of the autoantibody response, we observed that the *Chr12* locus modulated very specific aspects of the humoral autoimmune response. Indeed, the *Chr12* locus had no impact on total immunoglobulin levels or on IgM autoantibody levels. However, it significantly affected both the quantity and affinity of IgG autoantibodies. Isotype switching

to IgG and affinity maturation are two properties that are acquired by the antibodies generated during the germinal center response [38]. Interestingly, we have previously observed that 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice develop prominent ectopic germinal centers within pancreatic islets, whereas none of these structures could be observed in the islets of 3A9 TCR:iHEL B10.BR mice [10]. It is thus tempting to suggest that the *Chr12* locus at least partially prevents germinal center formation in 3A9 TCR:iHEL NOD^k-*Chr12* congenic mice. In line with these observations, others have shown that a similar locus in BALB/c mice affects germinal center formation [41]. In contrast with autoantibody production, we found that the *Chr12* locus affected affinity maturation but not antibody levels upon immunization with OVA. This may be due to the CFA adjuvant, which very efficiently primes the immune system to produce antibodies. Thus, the levels of IgG produced following the CFA immunization may be saturating, such that we cannot observe subtle differences conferred by the *Chr12* locus. Alternatively, differences in the nature of the autoimmune response versus the immunization protocol, where antigen is respectively presented in a chronic or acute manner, may contribute to these distinct phenotypes. Although additional experiments are required to delineate between these hypotheses, we demonstrated that the *Chr12* locus affected the quality of the antibody response, as affinity maturation was not observed in NOD^k-*Chr12* congenic mice.

The *Chr12* locus encodes a very short list of candidate genes (Table 2). Defining the genetic polymorphisms for NOD and B10.BR within the chromosome 12 interval would certainly allow to further restrict the list of candidate genes and could reveal non-synonymous polymorphisms that may affect gene function. Although the NOD genome is available through various databases, to our knowledge the B10.BR genome has not been sequenced. Still, one gene of potential interest is *Itgb1bp1*, an integrin-binding protein. Integrins play a crucial role in T and B cell adhesion processes, including in germinal center formation. It is thus tempting to postulate that genetic variations in *Itgb1bp1* may be implicated in the humoral response and contribute to the phenotype observed in *Chr12* congenic mice. The *Chr12* locus also encodes transcription factors, namely *E2f6*, *Zfp125*, *Tafb1* and *Klf11*, as well as a metallopeptidase *Adam17*, which is involved in cellular interactions. Although none of these genes have a defined role in germinal center formation or antibody responses, they remain relevant

candidate genes. Further studies investigating the expression profile of these genes in the immune system and their impact on spontaneous and induced antibody responses is likely to reveal new molecular pathways defining antibody production that may be relevant to autoimmune pathologies.

Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Canadian Diabetes Association (OG-3-13-4018) to SL, and grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-97916) to JR and (MOP125991) to JMDN. RC holds a scholarship from Fonds de recherche du Québec – Santé, and has previously received salary support from Diabète Québec and l'Université de Montréal. VD held a scholarship from the Fonds de recherche du Québec - Santé. SL holds a New Investigator award from the Canadian Institutes of Health Research. JMDN holds a Canada research chair tier 2. We thank Erin E. Hillhouse for providing a critical review of the manuscript and Christophe Martin for image of the mouse on figure 6.

4.6 References

- [1] Maier LM, Wicker LS. Genetic susceptibility to type 1 diabetes. *Current Opinion in Immunology*, 2005;17:601-8.
- [2] Wicker LS, Clark J, Fraser HI, Garner VE, Gonzalez-Munoz A, Healy B *et al.* Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice. *J Autoimmun*, 2005;25 Suppl:29-33.
- [3] Wallis RH, Wang K, Marandi L, Hsieh E, Ning T, Chao GY *et al.* Type 1 diabetes in the BB rat: a polygenic disease. *Diabetes*, 2009;58:1007-17.
- [4] Anderson MS, Bluestone JA. THE NOD MOUSE: A Model of Immune Dysregulation. *Annu Rev Immunol*, 2005;23:447-85.
- [5] Driver JP, Serreze DV, Chen YG. Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin Immunopathol*, 2011;33:67-87.
- [6] Wicker LS, Todd JA, Peterson LB. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol*, 1995;13:179-200.
- [7] Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA *et al.* Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet*, 2009;41:703-7.
- [8] Consortium. WTCC. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 2007;447:661-78.
- [9] Allen PM, Matsueda GR, Evans RJ, Dunbar JB, Jr., Marshall GR, Unanue ER. Identification of the T-cell and Ia contact residues of a T-cell antigenic epitope. *Nature*, 1987;327:713-5.
- [10] Lesage S, Hartley SB, Akkaraju S, Wilson J, Townsend M, Goodnow CC. Failure to Censor Forbidden Clones of CD4 T Cells in Autoimmune Diabetes. *Journal of Experimental Medicine*, 2002;196:1175-88.
- [11] Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol*, 2003;4:350-4.
- [12] Zhang M, Vacchio MS, Vistica BP, Lesage S, Egwuagu CE, Yu CR *et al.* T cell tolerance to a neo-self antigen expressed by thymic epithelial cells: the soluble form is more effective than the membrane-bound form. *J Immunol*, 2003;170:3954-62.
- [13] Liston A, Gray DH, Lesage S, Fletcher AL, Wilson J, Webster KE *et al.* Gene dosage--limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *J Exp Med*, 2004;200:1015-26.
- [14] Liston A, Lesage S, Gray DH, O'Reilly LA, Strasser A, Fahrner AM *et al.* Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity*, 2004;21:817-30.

- [15]Guimont-Desrochers F, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Dugas V, Hillhouse EE, Dusseault J *et al.* Absence of CD47 in vivo influences thymic dendritic cell subset proportions but not negative selection of thymocytes. *International Immunology*, 2009;21:167-77.
- [16]Collin R, Dugas V, Pelletier AN, Chabot-Roy G, Lesage S. The Mouse Idd2 Locus Is Linked to the Proportion of Immunoregulatory Double-Negative T Cells, a Trait Associated with Autoimmune Diabetes Resistance. *J Immunol*, 2014;193:3503-12.
- [17]Dugas V, Liston A, Hillhouse EE, Collin R, Chabot-Roy G, Pelletier AN *et al.* Idd13 is involved in determining immunoregulatory DN T-cell number in NOD mice. *Genes Immun*, 2014;1038:65.
- [18]Akkaraju S, Ho WY, Leong D, Canaan K, Davis MM, Goodnow CC. A range of CD4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis. *Immunity*, 1997;7:255-71.
- [19]Podolin PL, Pressey A, DeLarato NH, Fischer PA, Peterson LB, Wicker LS. I-E+ nonobese diabetic mice develop insulinitis and diabetes. *J Exp Med*, 1993;178:793-803.
- [20]Yu L, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K *et al.* Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000;97:1701-6.
- [21]Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P *et al.* The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007;104:17040-5.
- [22]Steck AK, Johnson K, Barriga KJ, Miao D, Yu L, Hutton JC *et al.* Age of islet autoantibody appearance and mean levels of insulin, but not GAD or IA-2 autoantibodies, predict age of diagnosis of type 1 diabetes: diabetes autoimmunity study in the young. *Diabetes Care*, 2011;34:1397-9.
- [23]Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Williams AJ, Ziegler AG, Bingley PJ *et al.* Type 1 diabetes risk assessment: improvement by follow-up measurements in young islet autoantibody-positive relatives. *Diabetologia*, 2006;49:2969-76.
- [24]Greeley SA, Katsumata M, Yu L, Eisenbarth GS, Moore DJ, Goodarzi H *et al.* Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice. *Nat Med*, 2002;8:399-402.
- [25]Melanitou E, Devendra D, Liu E, Miao D, Eisenbarth GS. Early and quantal (by litter) expression of insulin autoantibodies in the nonobese diabetic mice predict early diabetes onset. *J Immunol*, 2004;173:6603-10.
- [26]Silva DG, Daley SR, Hogan J, Lee SK, Teh CE, Hu DY *et al.* Anti-islet autoantibodies trigger autoimmune diabetes in the presence of an increased frequency of islet-reactive CD4 T cells. *Diabetes*, 2011;60:2102-11.
- [27]Quintana FJ, Cohen IR. Autoantibody Patterns in Diabetes-prone NOD Mice and in Standard C57BL/6 Mice. *J Autoimmun*, 2001;17:191-7.

- [28] Rigby RJ, Rozzo SJ, Boyle JJ, Lewis M, Kotzin BL, Vyse TJ. New loci from New Zealand Black and New Zealand White mice on chromosomes 4 and 12 contribute to lupus-like disease in the context of BALB/c. *J Immunol*, 2004;172:4609-17.
- [29] Wandstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol*, 2001;2:802-9.
- [30] Bonifacio E, Atkinson M, Eisenbarth G, Serreze D, Kay TW, Lee-Chan E *et al.* International Workshop on Lessons From Animal Models for Human Type 1 Diabetes: identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Diabetes*, 2001;50:2451-8.
- [31] Burt RA, Watkins L, Tan IKL, Wang N, Quirk F, Mackin L *et al.* An NZW-Derived Interval on Chromosome 7 Moderates Sialadenitis, But Not Insulinitis in Congenic Nonobese Diabetic Mice. *The Journal of Immunology*, 2009;184:859-68.
- [32] Hillhouse EE, Collin R, Chabot-Roy G, Guyon M-J, Tessier N, Boulay M *et al.* Nearby Construction Impedes the Progression to Overt Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Journal of Diabetes Research*, 2013;2013:1-7.
- [33] Martin RM, Brady JL, Lew AM. The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice. *J Immunol Methods*, 1998;212:187-92.
- [34] Zahn A, Daugan M, Safavi S, Godin D, Cheong C, Lamarre A *et al.* Separation of Function between Isotype Switching and Affinity Maturation In Vivo during Acute Immune Responses and Circulating Autoantibodies in UNG-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, 2013;190:5949-60.
- [35] Levine JS, Subang R, Nasr SH, Fournier S, Lajoie G, Wither J *et al.* Immunization with an apoptotic cell-binding protein recapitulates the nephritis and sequential autoantibody emergence of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 2006;177:6504-16.
- [36] Wang N, Elso CM, Mackin L, Mannering SI, Strugnell RA, Wijburg OL *et al.* Congenic mice reveal genetic epistasis and overlapping disease loci for autoimmune diabetes and listeriosis. *Immunogenetics*, 2014;66:501-6.
- [37] Carlborg O, Haley CS. Epistasis: too often neglected in complex trait studies? *Nat Rev Genet*, 2004;5:618-25.
- [38] Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, 2012;30:429-57.
- [39] Damotte D, Colomb E, Cailleau C, Brousse N, Charreire J, Carnaud C. Analysis of susceptibility of NOD mice to spontaneous and experimentally induced thyroiditis. *Eur J Immunol*, 1997;27:2854-62.
- [40] Lehuen A, Diana J, Zaccane P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol*, 2010;10:501-13.

[41] Tarasenko T, Kole HK, Bolland S. A Lupus-Suppressor BALB/c Locus Restricts IgG2 Autoantibodies without Altering Intrinsic B Cell-Tolerance Mechanisms. *The Journal of Immunology*, 2008;180:3807-14.

4.7 Figures

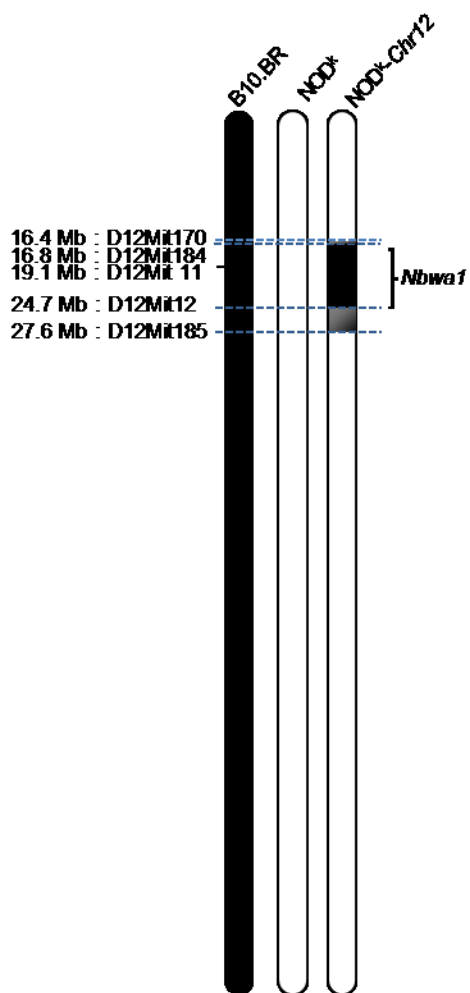


Figure 1. Delimitation of the Chr12 interval from B10.BR origin. Representation of mouse chromosome 12 from parental B10.BR, parental NOD^k and congenic NOD^k-*Chr12* mice, showing the delimitation of the congenic interval as defined by PCR reaction. B10 alleles are shown in black, NOD alleles in white and alleles of undetermined origin in grey. The position of the *Nbwa1* locus is indicated with a bracket.

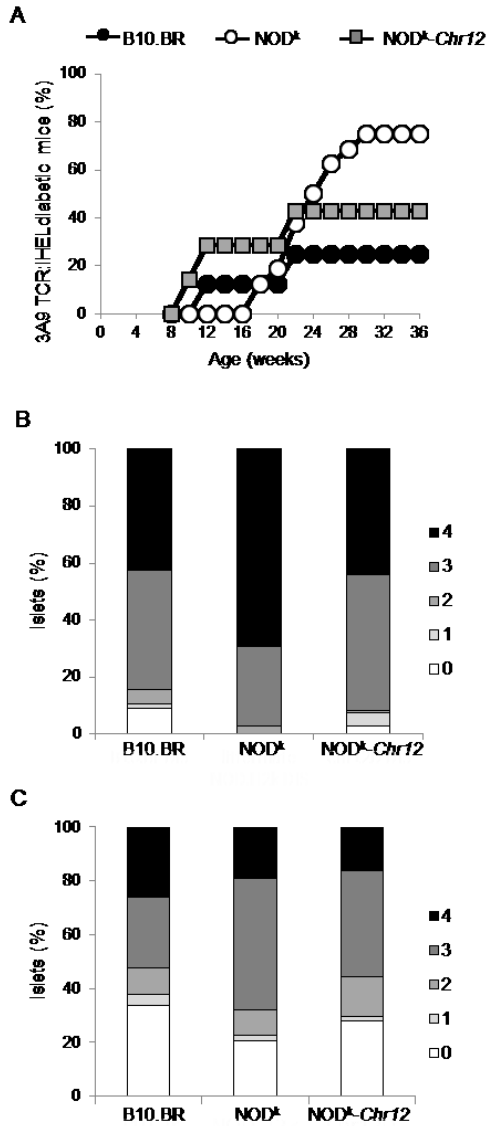


Figure 2. Decrease in diabetes incidence in 3A9 TCR:iHEL NOD^k-Chr12 congenic mice compared to 3A9 TCR:iHEL NOD^k mice. A) 3A9 TCR:iHEL mice were monitored for diabetes onset. NOD^k (white circles, n=16) B10.BR (black circles, n=8), NOD^k-Chr12 (grey squares, n=7). B) Compilation of infiltration stages in the pancreas of female 3A9 TCR:iHEL mice included in the diabetes incidence study. NOD^k, n=4 ; B10.BR, n=6 ; NOD^k-Chr12, n=5. C) Compilation of infiltration stages in the pancreas of non-diabetic 3A9 TCR:iHEL mice of 8 to 14 weeks of age NOD^k, n=8 ; B10.BR, n=7 ; NOD^k-Chr12, n=3. The diabetes incidence data for B10.BR mice (A) and the histology data for some B10.BR and NOD^k control mice (B, C) are replicates of those previously published [16].

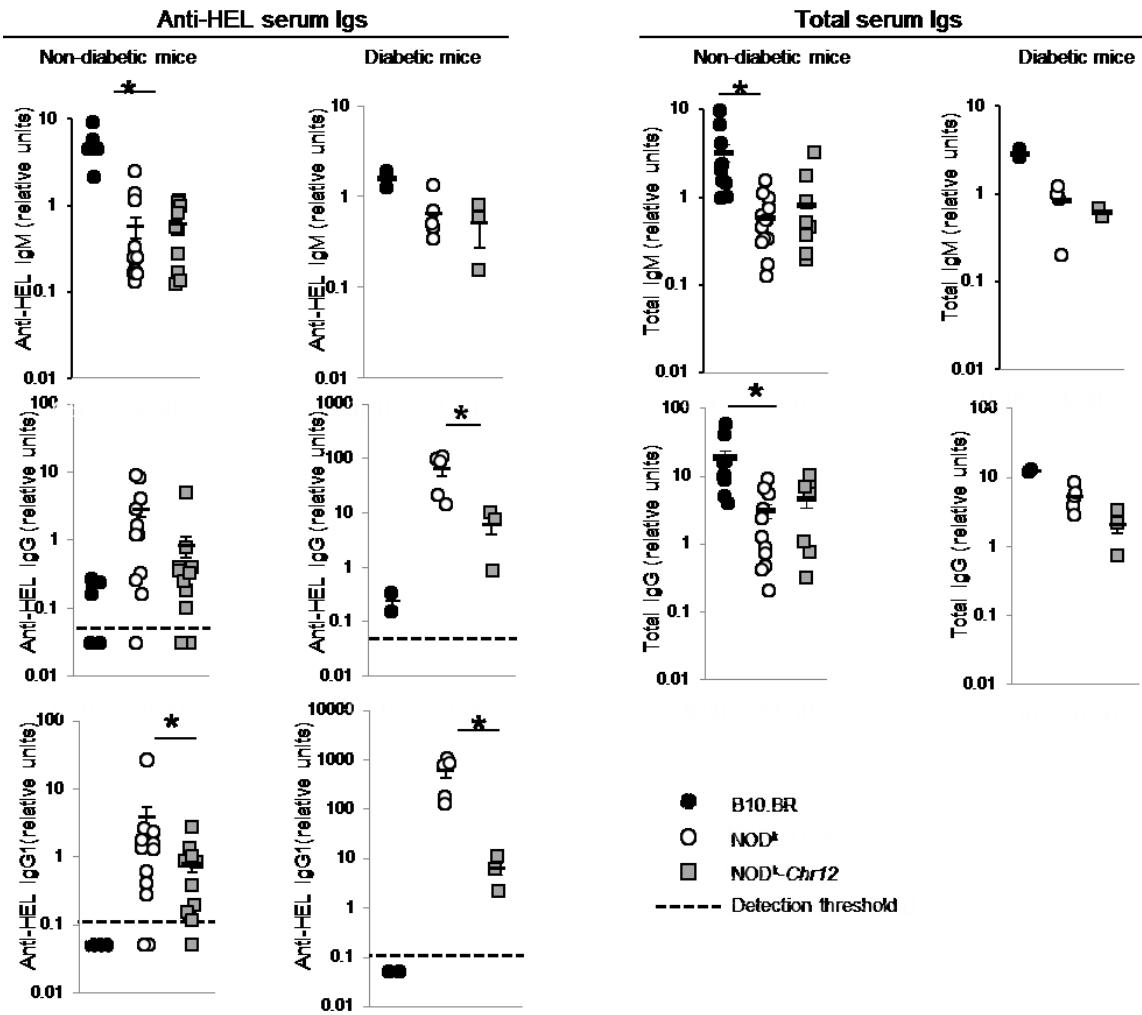


Figure 3. Decrease in anti-HEL IgG antibodies, but not in total IgG antibodies, in 3A9 TCR:iHEL NOD^{k-Chr12} congenic mice. The serum of diabetic and non-diabetic mice were analyzed by ELISA for total IgG, total IgM and for HEL-specific IgM, IgG, and IgG₁ antibodies. Titers are expressed in arbitrary units relative to a reference immune sera from 3A9 TCR:iHEL NOD^k diabetic and non-diabetic mice set at 1 unit. NOD^k mice are littermate controls of NOD^{k-Chr12} congenic mice. B10.BR (black circles), NOD^k (white circles), and NOD^{k-Chr12} (grey squares). Each dot represents one mouse. Mean ± SEM are shown. * Mann-Whitney U test p < 0.05.

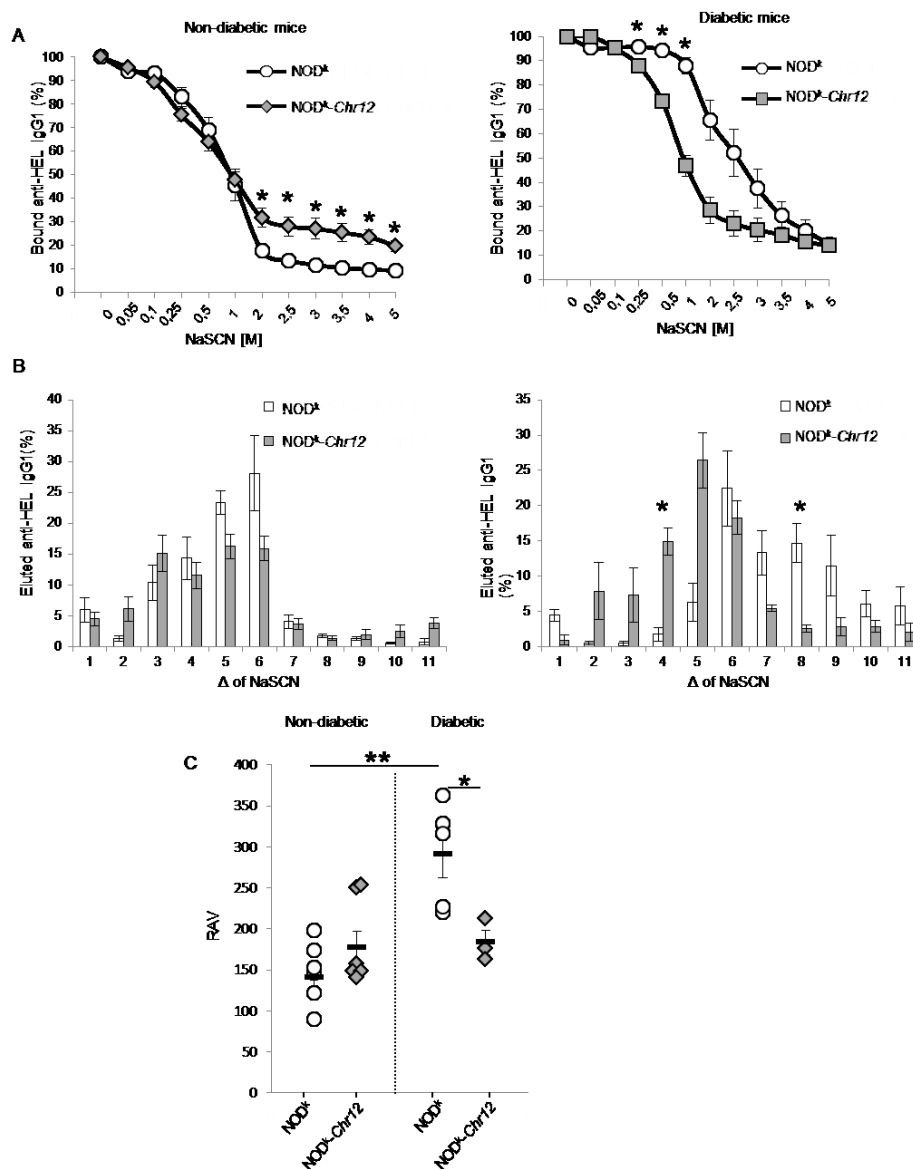


Figure 4. Anti-HEL IgG₁ affinity is not increased in diabetic NOD^k-Chr12 congenic mice.

Analysis of the affinity of anti-HEL specific IgG₁ in the serum of 3A9 TCR:iHEL mice was performed by NaSCN displacement. A) The quantity anti-HEL IgG₁ bound to the ELISA plate with increasing concentration of NaSCN and B) the fraction of anti-HEL IgG₁ eluted between each increasing NaSCN concentration (Δ) in diabetic (right) and non-diabetic (left) mice is depicted. C) Relative affinity value (RAV) of serum anti-HEL IgG₁ antibody is shown. Each symbol represents one mouse. NOD^k (white), NOD^k-Chr12 (grey). Mean \pm SEM are shown. Mann-Whitney U test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

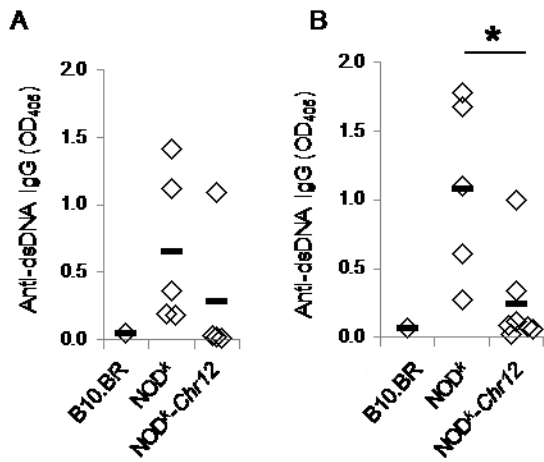


Figure 5. Significant decrease in anti-nuclear antibodies in NOD^k-*Chr12* congenic mice. Anti-dsDNA specific antibodies were analyzed in the serum of A) 20 week and B) 30 week-old non-TCR transgenic H2^k mice. Results are expressed as mean OD₄₀₅ of duplicates. Each dot represent one mouse, bars represent the mean. * Mann-Whitney U test p < 0.05.

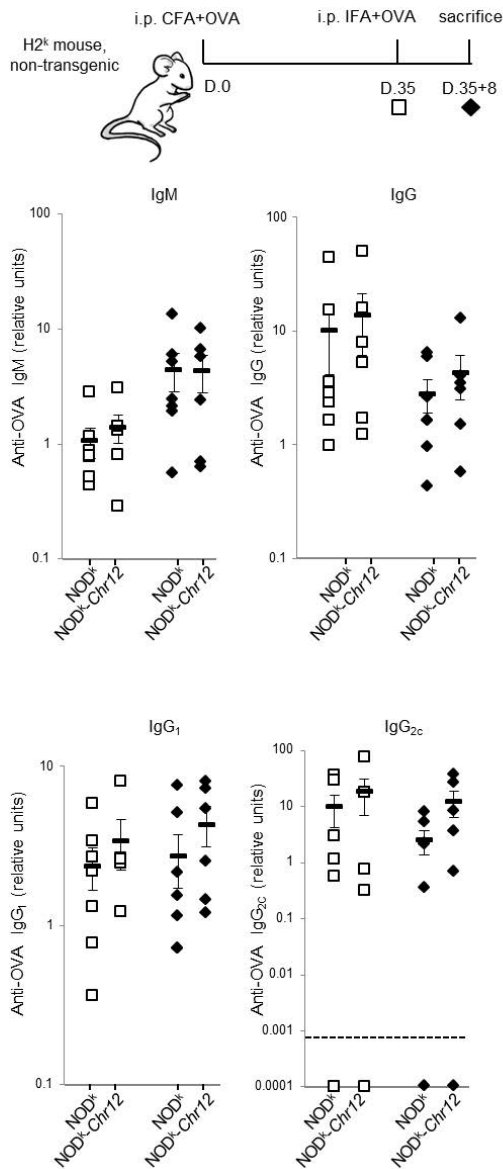


Figure 6. Antibody production after immunization is not altered in NOD^k-Chr12 congenic mice. The serum of immunized (D35) and re-challenged (D35+8) mice were analyzed by ELISA for the level of anti-OVA IgM, IgG, IgG₁ and IgG_{2c}. Titers are expressed in arbitrary units relative to a reference sera from a mix of B10.BR, NOD^k, NOD^k-Chr12 mice D35+8 mice set at 1 unit. Each dot represents one mouse. The bars represent the mean ± SEM. Detection threshold is depicted by the dotted line where applicable. D35 (white squares), D35+8 (black diamonds).

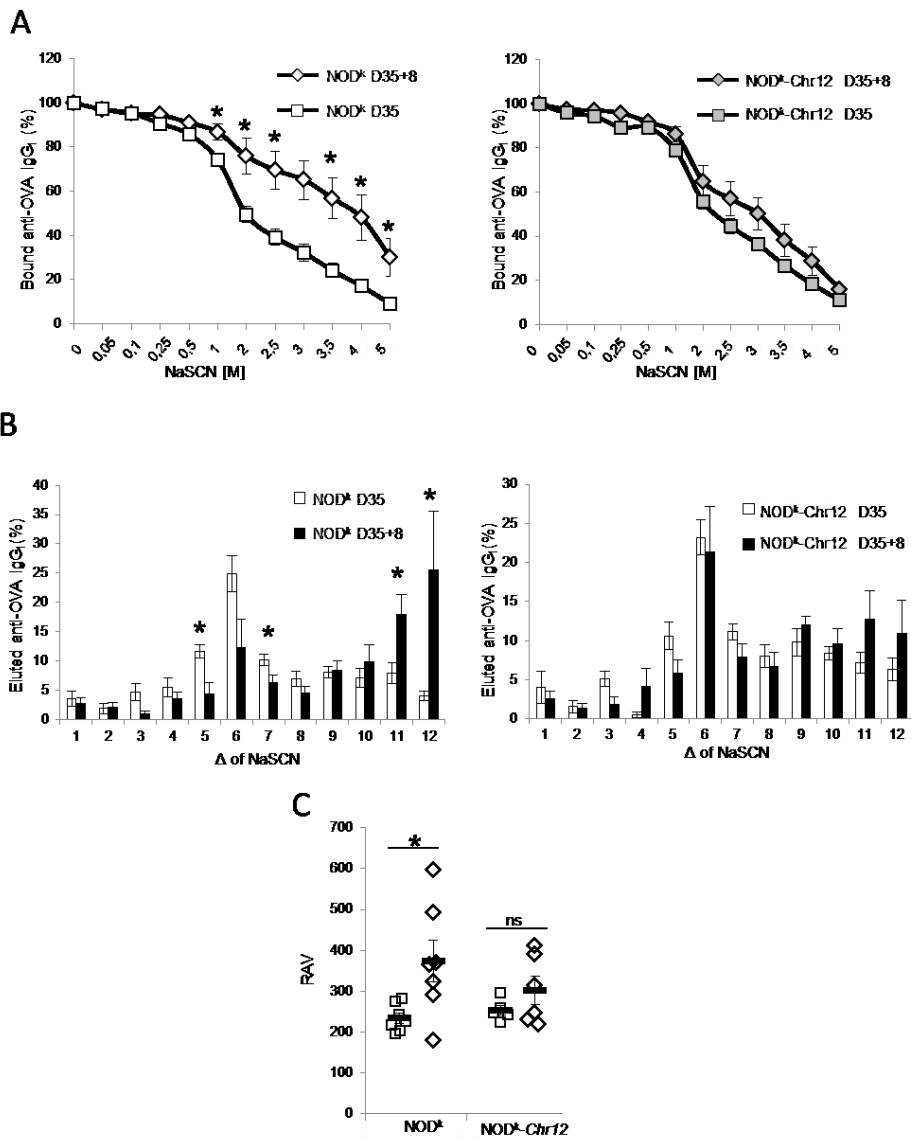


Figure 7. Antibody affinity in immunized NOD^{k-Chr12} congenic mice is not increased upon re-challenge. Analysis of the affinity of anti-OVA specific IgG₁ by NaSCN displacement in the serum of immunized before (D35) and after re-challenge (D35+8). A) The quantity of anti-OVA IgG₁ bound to the ELISA plate with increasing concentration of NaSCN and B) the fraction of anti-OVA IgG₁ eluted between each increasing NaSCN concentration (Δ) is depicted for NOD^k (left) and NOD^{k-Chr12} (right) mice. C) Relative affinity value (RAV) of serum anti-OVA IgG₁ antibody is shown. Each symbol represents one mouse. Representative of 3 independent experiments. D35 (squares), D35+8 (diamonds). Mean \pm SEM are shown.* Mann-Whitney U test $p < 0.05$.

Table 1. Fold increase of anti-HEL antibodies in diabetic mice relative to non-diabetic mice.

Mouse strain	IgM	IgG	IgG1
3A9 TCR :iHEL NOD ^k	1.40	22.88	153.12
3A9 TCR :iHEL NOD ^k -Chr12	0.84	7.18	8.21

Table 2. List of candidate gene comprised within the *Chr12* locus.

Gene	Position (Mb)
E2f6	16.81-16.83
Rock2	16.89-16.98
Pqlc3	16.99-17.00
Kcnf1	17.17-17.18
Pdia6	17.27-17.28
Atp6v1c2	17.28-17.33
Nol10	17.35-17.43
Odc1	17.54-17.55
Hpcal1	17.69-17.79
Zfp125	20.90-20.90
Asap2	21.11-21.27
Itgb1bp1	21.24-21.29
Cpsf3	21.29-21.32
Iah1	21.32-21.32
Adam17	21.32-21.37
Ywhaq	21.39-21.42
Gm10330	23.78-23.78
Taf1b	24.50-24.56
Grhl1	24.57-24.62
Klf11	24.65-24.66
Cys1	24.67-24.68

Chapitre 5 : Article 4

5.1 Elucidating the origin of peripheral immunoregulatory CD4-CD8- T cells

Roxanne Collin, Geneviève Chabot-Roy, Mengqie Dong, Heather J. Melichar, Erin E. Hillhouse, Sylvie Lesage

Cet article est en préparation pour soumission, et répond directement à l'objectif 3 de la présente thèse en élucidant certains des aspects biologiques du développement des cellules DN T. Il contribue également à distinguer les cellules DN T de populations similaires n'exprimant pas les corécepteurs CD4 et CD8 grâce à l'étude du répertoire TCR par séquençage ARN et grâce à l'étude du phénotype des cellules DN T tant dans le thymus qu'en périphérie. Comme les cellules DN T sont très similaires aux NKT de type II, l'utilisation de souris CD1d ko dans l'entièreté de l'étude apporte pour la première fois un portrait global du développement des cellules DN T en absence de toute contamination par les NKT.

Ma contribution à cet article est majeure. J'ai effectué toutes les expériences présentées, avec l'aide de Geneviève Chabot-Roy pour la mise au point de modèles d'injections intra-thymiques et de culture de thymus embryonnaires. J'ai généré toutes les figures et rédigé la première version du manuscrit. La conceptualisation des expériences, et leur interprétation subséquente s'est faite en collaboration étroite avec Dre Sylvie Lesage et Dre Heather Melichar.

Elucidating the origin of peripheral immunoregulatory CD4-CD8- T cells

Roxanne Collin^{1,2}, Geneviève Chabot-Roy¹, Mengqie Dong^{1,2}, Heather J. Melichar^{1,3}, Erin E. Hillhouse¹, Sylvie Lesage^{1,2}

1 - Immunology-oncology Section, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, Québec, H1T 2M4, Canada

2 - Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

3 - Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3T 1J4, Canada

Running title : Thymic differentiation of CD4-CD8- T cells

Correspondence address:

Sylvie Lesage

Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Centre de recherche,

5415 boul. de l'Assomption,

Montréal, Québec,

H1T 2M4, CANADA

Tel : 1-514-252-3400 x 4649

Fax : 1-514-252-3569

E-mail : sylvie.lesage@umontreal.ca

5.2 Abstract

Several regulatory T cell subsets play specific roles in the maintenance of peripheral immune tolerance, together precluding the development of autoimmunity. Due to their unique antigen-specific immunoregulatory function, we focus on $CD4^-CD8^-TCR_\beta^+$ cells found in peripheral lymphoid organs, hereafter referred to as pDN T cells. pDN T cell number play an important role in the induction of immune tolerance in various pathological settings. As such, understanding their developmental pathway may provide clues on how to modulate pDN T cell number and function for the development of immune therapies. As for other regulatory T cell subsets, many non-mutually exclusive hypotheses potentially explain the development of pDN T cells. Using various reporter mouse models, we demonstrate that CD4 or CD8 co-receptor downregulation contributes minimally to the pDN T cell pool. We instead find that most pDN T cells originate from the thymus, specifically by transiting through the immature $CD4^+CD8^+$ (DP) thymocyte stage. Surprisingly, using diverse MHC-deficient mouse strains, we show that pDN T cells are less dependent on MHC restriction than both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. Together these findings provide a better understanding of the origin, differentiation and antigen-specificity of immunoregulatory pDN T cells, which is essential for the development of future immune therapy approaches.

Keywords: thymic differentiation, unconventional T cell subset, immunoregulation, MHC restriction.

5.3 Introduction

Autoimmunity results from a break in immune tolerance that triggers T and/or B lymphocytes to aberrantly recognize and mount an immune response against self-antigens, leading to the destruction of healthy organs, glands, joints or the nervous system. A prominent role in the prevention of autoimmunity has been credited to various regulatory T cell subsets, including peripheral immunoregulatory $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ T cells[490], hereafter denoted pDN T cells (for peripheral double negative T cells), which make up approximately 1-3% of total T cells in both mice[491, 492] and humans[373]. Indeed, we and others have shown that the immunoregulation provided by pDN T cells is mediated by antigen-specific cytotoxicity[493-496]. Importantly, pDN T cells, which display similar characteristics in both mice and humans, exhibit potent immunosuppressive properties in multiple model systems, from transplantation to autoimmunity, suggesting a vast array of applicability of pDN T cells in cellular therapy[497]. While the therapeutic potential of pDN T cells has been demonstrated in the context of various disease settings, the differentiation pathway yielding immunoregulatory pDN T cells remains a matter of debate as many non-mutually exclusive hypotheses could explain their development[498].

Various complex molecular events direct the process of T cell development and thymic selection (reviewed in^{10, 11}). T cell differentiation occurs in the thymus following the migration of haematopoietic progenitors from the bone marrow. Progression through the different maturation stages are primarily identified based on the expression of the CD4 and CD8 coreceptors and T cell receptor (TCR). The earliest T cell progenitors do not express a T cell receptor (TCR) nor the CD4 or CD8 coreceptors and are consequently classed as double negative thymocytes (hereafter denoted as DN for thymic double negative to contrast with pDN T cells in periphery). DN can further divided into 4 stages based on the sequential expression of CD44 and CD25, as follows, DN1 ($\text{CD44}^+\text{CD25}^-$) \rightarrow DN2 ($\text{CD44}^+\text{CD25}^+$) \rightarrow DN3 ($\text{CD44}^-\text{CD25}^+$) \rightarrow DN4 ($\text{CD44}^-\text{CD25}^-$). DN3 thymocytes that successfully generate a functional TCR β -chain proliferate and progress to the $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ (double positive, DP) stage. DP thymocytes that express a functional $\alpha\beta$ TCR will be subjected to positive and negative

selection on self-peptide/MHC complexes, giving rise to conventional CD4⁺ or CD8⁺ TCR_{αβ} T cells that are self-tolerant and exit the thymus to populate peripheral tissues.

In addition to conventional T cells, various unconventional T cell subsets are also found in peripheral tissue. Of these, some T cells bear a CD4⁻CD8⁻ phenotype, namely some γδ T cells, a subset of NKT cells and immunoregulatory pDN T cells. These subsets are distinct from conventional CD4⁺ or CD8⁺ TCR_{αβ} T cells in many ways, including their thymic differentiation. γδ T cells deviate from the conventional T cell differentiation pathway at the DN2 or DN3 stages and are thought to receive a strong TCR signal^{11, 22, 23}. Moreover, most γδ T cells do not depend on MHC class I or class II molecules for their development as they can be found in both β2m^{-/-} and MHCII^{-/-} mice^{24, 25}. Similarly to conventional T cells, the thymic differentiation pathway of NKT cells (reviewed in^{26, 27, 28}) proceeds through the DP stage. Yet, NKT cells differ in that they depend on the non-classical MHC class I molecule, CD1d, as opposed to the classical MHC molecules[456, 499-501]. While the thymic differentiation of γδ T cells and NKT cells is better understood, that of immunoregulatory pDN T cells remains unclear. Accordingly, while some data suggests development in the periphery[381, 502], other reports support a thymic differentiation pathway for mature pDN T cells[503-505]. More specifically, depending on the model being used, pDN T cells have been proposed to either, 1- arise as a consequence of CD4¹² or CD8^{13, 14} co-receptor downregulation on mature T cells, 2- derive directly from thymic precursors at the DN stages^{15, 16, 17}, 3- derive directly from thymic precursors at the DP stage^{18, 19, 20}, or 4- be generated via an extrathymic pathway²¹.

Here, we revisit immunoregulatory pDN T cell thymic differentiation using physiological lymphoreplete mouse models. Using complementary approaches, we demonstrate that while coreceptor downregulation may contribute to a small fraction of pDN T cells, most pDN T cells originate directly from the thymus, specifically by transiting through the immature DP thymocyte stage. In addition, the differentiation of DN T cells implicates a strong TCR signal with only a modest requirement for MHC restriction, conferring unique properties to this rare subset. Altogether, we address key aspects of DN T cell differentiation relevant to the eventual development of cell therapy protocols for the prevention and/or treatment of various immunopathologies.

5.4 Material and methods

Mice

C57BL/6 (000664), CD1d ko (cat #008881), β 2m ko (cat #002087), Rag-1 ko (002216), β 2mMHCII ko and Thpok-GFP (cat #027663) were originally purchased from Jackson Laboratories. The following strains crossed to CD1d ko mice, namely Nur77-GFP (cat #016617), MHCII (cat #003584), dlckcre (cat #012837), CD4cre (cat#022071), Rosa YFP (Cat #007903), E8Icre (cat #008766), B6.SJL (cat #002014) were also originally purchased from Jackson Laboratories. KbDb ko⁶⁷, Eomes-GFP⁶⁸, RAG-GFP mice⁶⁹ and E8IIIcre mice were generous gifts from Carla Shatz, Thierry Walzer, Rafei Moutih and Alfred Singer, respectively. For timed-pregnancies, apparition of vaginal plug was set as day 0.5. All of the mouse strains were maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal house facility (Montreal, Canada). The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee, overseen by the Canadian Council for Animal Protection approved the experimental procedures.

RNA-sequencing and repertoire analysis

DN T cells were sorted on a FACS Aria III from the spleen of CD1d ko mice using the phenotype Viability dye-CD19-TCR β +CD4-CD8 α - ; iNKT were sorted from the spleen of C57BL/6 mice based on the phenotype Viability dye-CD19-TCR β +PBS57:CD1d tetramer+ (Figure S1). Sorted cells were conserved in Trizol and sent for RNA extraction and sequencing by the IRIC Genomic Platform, Montreal.

For TCR repertoire analysis, Fatsq files from RNA-sequencing of pDN T cells or NKT cells from were analyzed with the miXCR program⁷⁰ using the following alignment options : --parameters rna-seq --species mmu --loci TRA or TRB. Clones were exported and analyzed for V usage and CDR3 sequence. Clones with out-of-frame CDR3 sequences were excluded manually. Analysis of repertoire diversity: the Shannon diversity index was defined as: $-\sum_{i=1}^N (p_i)(\ln p_i)$ where p_i is the proportion of sequence i relative to the total N sequences. The Pielou's evenness index was defined as: $J=H/\ln(S)$, where H is the Shannon index and S is the number of unique TCR CDR3 sequences or unique V chains.

Flow cytometry

Thymus, spleen and lymph nodes were pressed through a 70 μ m cell strainer (Thermo Fisher Scientific). Bone marrow cells were extracted from the tibias by centrifugation. Spleen and bone marrow cell suspensions were treated with NH₄Cl to lyse red blood cells. Cells were counted by trypan-blue exclusion and single cell suspensions were stained extracellularly with combinations of the antibodies detailed in table 1. Unless otherwise stated, pDN T cells are defined as TCR β ⁺CD4⁻CD8 α ⁻, CD4⁺ T are defined as TCR β ⁺CD4⁺CD8 α ⁻ and CD8⁺ T are defined as TCR β ⁺CD4⁻CD8 α ⁺. In some experiments, CD19 or a viability dye were also used as additional negative markers before gating on TCR β ⁺ cells. In CD1d-sufficient C57BL/6 mice, iNKT were excluded from CD4⁺ T, CD8⁺ T and pDN T cells by the use of PBS-57 CD1d tetramer (NIH tetramer core facility). Data were collected using a BD LSR-Fortessa X20, a BD LSR II or a BD FACS Canto and analyzed using FlowJo software (Treestar). TCRV β repertoire was analyzed by flow cytometry with anti-mouse TCR V β screening panel (BD Bioscience) according to manufacturer's instructions.

Thymic graft under the kidney capsule

E15.5 or E16.5 CD1d ko embryonic thymi were harvested in cold sterile PBS. Six to eight week-old CD1d ko or Rag-1 ko mice were anesthetized by isoflurane inhalation. Fur was removed and an incision was made to expose the left kidney. One embryonic thymus was grafted per mouse. Anafen (Merial) was injected at 5mg/kg per mouse immediately after surgery and every day for 3 additional days. Embryonic thymi expressing CD45.1 were grafted in recipient mice expressing CD45.2, or embryonic thymi expressing CD45.2 were grafted in recipient mice expressing CD45.1. All donor and recipients were CD1d ko.

Statistics

Significance was tested using IBM SPSS software by one-way ANOVA with Games-Howell post-Hoc test for comparisons between more than two groups. Paired or unpaired T-tests were used for comparisons between two groups.

5.5 Results

5.5.1 Immunoregulatory pDN T cells from the periphery exhibit a polyclonal repertoire and an activated phenotype.

Immunoregulatory T cell subsets can be differentiated based on various factors, including their phenotype and TCR repertoire. Consequently, we first set out to better define the properties of immunoregulatory pDN T cells which may distinguish them from other immunoregulatory T cell subsets. As pDN T cells and a subset of NKT cells both share the $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ phenotype²⁰, we quantified pDN T cells in CD1d ko mice in which all NKT cell subset are absent¹¹⁻¹⁴. Similar to what has been previously reported for CD1d-sufficient mice, although sometimes on a different genetic background²¹⁻²³, we find that pDN T cells comprise less than 1% of total cells spleen and lymph nodes of CD1d^{-/-} mice (**Figure 1A**). DN T cells expressing high levels of $\text{TCR}\beta^+$ were also found in the thymus, and hereafter referred to as tDN T cells. In order to assess their TCR repertoire diversity, pDN T cells were sorted from the spleen of CD1d^{-/-} mice and submitted to RNA-sequencing (see sorting strategy in **Figure S1**). As a control, iNKT cells, which express an oligoclonal TCR repertoire²⁴, were sorted from the spleen of a C57BL/6 mouse. In contrast to iNKT cells, we found that pDN T cells bear a polyclonal TCR repertoire, with a high diversity of CDR3 sequences and variable chain usage for both $\text{TCR}\alpha$ and $\text{TCR}\beta$ chains, represented by an evenness index near 1 for these 4 parameters (**Figure 1B**). Thus, similar to human DN T cells²⁵, mouse pDN T cells bear a polyclonal TCR repertoire suggesting that they can recognize a diversity of antigens. In line with this observation, we find that pDN T cells express the CD44, CD62L and CD69 activation markers (**Figure 1C**). Together, these results demonstrate that pDN T cells exhibit a polyclonal TCR repertoire as well as an antigen-experienced phenotype.

5.5.2 pDN T cells originate in the thymus

There have been contradictory findings regarding the origin of pDN T cells^{16,26}. To determine whether pDN T cells arise from thymic differentiation, we first determined the timing of differentiation in embryonic thymi. We identified tDN T cells as early as embryonic

day 14.5 and thereafter, while both CD4⁺ T and CD8⁺ T cells could be detected as early as embryonic day E15.5 (**Figure 2 and S2**), demonstrating that tDN T cells appear early in T cell thymic differentiation. Following their detection, tDN T, CD4⁺ T and CD8⁺ T cell numbers continued to rise as the embryos aged (**Figure 2**). Together, these data demonstrate that tDN T cells differentiate in the thymus. Importantly, as embryos lack peripheral T cells, the presence of tDN T cells cannot be attributed to recirculation of mature T cells back to the thymus.

To determine if pDN T cells found in secondary lymphoid organs could originate from the thymus, we generated B6.CD1d^{-/-}.Rag2^{GFP} reporter mice, where the Rag2^{GFP} model is used to track recent thymic emigrants (RTEs)²⁷⁻²⁹. As a control, we first assessed the GFP expression in thymocytes of B6.CD1d^{-/-}.Rag2^{GFP} reporter mice, where developing cells that recently rearranged their TCR will be positive for GFP. Expectedly, most CD4⁺, CD8⁺ and tDN T cells were positive for GFP expression (**Figure 3A**), suggesting that they have recently undergone TCR rearrangement, irrespective of mouse age (**Figure S3**). As GFP expression dilutes upon cell division, we next assessed GFP expression in the spleen for CD4⁺ T, CD8⁺ T and pDN T cells in mice ranging from 1 to 13 weeks old. In comparison to CD4⁺ T cells, we found that a lower proportion of CD8⁺ T cells were positive for GFP expression in the spleen (**Figure 3B**), in agreement with previous reports^{44, 45}. Interestingly, most pDN T cells were GFP-negative, even in 1 week old mice (**Figure 3B**), suggesting that pDN T cells, or their progenitors, are highly proliferative. This is not unlike iNKT cells from the Rag2^{GFP} model, which are mostly GFP negative even prior to their exit from the thymus due to extensive proliferation post TCR rearrangement⁴⁴. To test whether the loss of GFP expression in DN T cells parallels a high proliferative rate, we quantified Ki-67 expression and found that a higher proportion of DN T cells were indeed in active cell-cycle/proliferation in comparison to age-matched CD4⁺ and CD8⁺ T cells (**Figure 3B**), especially in younger mice. Together, these results suggest that the low frequency of GFP⁺ DN T cells in the periphery is a result of their high proliferative capacity which leads to rapid dilution of the RAG-driven GFP fluorescence, thus limiting the sensitivity of detection for DN T cell RTEs.

In order to corroborate that pDN T cells are derived from thymic precursors, we exploited a thymic graft system, where embryonic thymi grafted under the kidney capsule allows for thymocyte differentiation and thymic output, thus permitting the study of thymic-derived T

cells in periphery. Using this system, we grafted thymic lobes from E15.5 or E16.5 CD1d^{-/-} embryos under the kidney capsule of adult CD1d^{-/-} mice expressing a different CD45 allelic marker, allowing us to track thymus-derived cells in the peripheral organs of the host. A sizeable number of pDN T cells that were derived from the grafted thymus were detected in the host spleens at 2, 3 and 4 weeks post-graft (**Figure 4**). Altogether, the observations made from these complementary approaches demonstrate that a significant number of pDN T cells differentiate from thymic precursors.

5.5.3 Thymic DN T cells directly derive from DP progenitors

Having shown that pDN T cells have a thymic precursor, we next wanted to define the thymic stage at which DN T cells are generated. While conventional CD4⁺ and CD8⁺ T cells differentiate from DP thymocytes, unconventional T cell subsets may take alternative differentiation pathways, where $\gamma\delta$ T cells, NKT cells and CD4⁺Foxp3⁺ Tregs differentiate from immature CD3⁻CD4⁻CD8⁻ triple negative (TN), DP, and CD4⁺ SP thymocytes, respectively³⁰⁻³³. To define the differentiation steps that precede the generation of pDN T cells, we took advantage of transgenic reporter mice that allow for cell fate tracking. Specifically, we crossed four Cre transgenic mouse models, where the Cre enzyme is driven by different promoters at distinct stages of thymocyte differentiation, to ROSA-fl-STOP-fl-YFP mice (hereafter referred to as RosaYFP mice), resulting in promoter-driven-Cre x RosaYFP mice. The promoters include E8III³⁴ and CD4, which are both driven in early TCR^{-/low} DP thymocytes, dlck, which is driven in late TCR^{hi} DP thymocytes, and E8I³⁵, which is the specific promoter for CD8 α expression in mature single positive CD8 T cells⁴⁷. In this fate mapping model, activation of the given promoter induces Cre expression and subsequent permanent expression of YFP in this cell and all its daughter cells. Therefore, using this system, we can quantify the proportion of YFP⁺ cells among tDN T cells that originate from the varying thymic differentiation stages. For all reporter systems, both CD1d^{-/-} and CD1d^{+/+} mice were studied. In both CD4-Cre and E8III-Cre reporter mice, we found that almost all tDN T cells were positive for YFP expression (**Figure 5**), demonstrating that tDN T cells transition through the early DP stage. However, in dlck-Cre reporter mice, less than half of

tDN T cells were positive for YFP expression (**Figure 5C**), indicating that at least some tDN T cells do not transition through the late DP stage and thus differentiate earlier than conventional CD4⁺ and CD8⁺ T cells. This result is in line with the earlier appearance of tDN T cells, relative to CD4⁺ and CD8⁺ T cells, in embryonic thymi (**Figure 2**). Moreover, in E8I-Cre reporter mice, we found that less than 6% of tDN T cells were positive for YFP expression (**Figure 5D**). As E8I is the specific promoter for CD8 α expression in mature single positive CD8⁺ T cells⁴⁷, these findings show that mature CD8⁺ T cells are not the main precursors to tDN T cells. In order to corroborate these results, other thymocyte subsets were assessed for YFP expression. As expected, we found that all DP thymocytes are YFP⁺ in CD4-Cre, E8III-Cre and dlck-Cre reporter mice, but YFP⁻ in E8I-Cre reporter mice (**Figure 5**). Moreover, $\gamma\delta$ T cells were mostly negative for YFP expression in CD4-Cre, dlck-Cre and E8I-Cre reporter mice (**Figures 5A, C, D**), as $\gamma\delta$ T cells do not transition through the DP stage³². Interestingly, we found that a high proportion of $\gamma\delta$ T cells expressed YFP in E8III-Cre reporter mice (**Figures 5B**), which could be explained by either recirculating cells from the periphery to the thymus or an early expression of E8III, likely at or before the DN3a stage, a step from which $\gamma\delta$ T cells can still emerge¹¹. Altogether, these findings demonstrate that tDN T cells originate from the thymic DP stage.

5.5.4 DN T cells undergo agonist selection during their thymic differentiation

Conventional T cells differentiate in the thymus from DP precursors that are subject to positive selection, to generate a pool of useful T cells, and to negative selection, to purge many potentially autoreactive T cells³⁶⁻³⁸. In contrast, several unconventional T cells, such as CD4⁺Foxp3⁺ Tregs and CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ IELs, are instead selected via a process termed agonist selection, where strong TCR signals permit cellular differentiation rather than inducing clonal deletion^{39,40}, thus promoting self-reactivity which is vital to their immunoregulatory function. Positive, negative and agonist selection result from different strengths of TCR signalling that can be indirectly measured by the level of expression of CD5 and Nur77^{39,41,42}, where elevated expression of each of these proteins has been used to qualify agonist selection^{39,41-47}. We thus isolated the thymus from Nur77^{GFP}.CD1d^{-/-} mice and quantified GFP expression as a surrogate marker of Nur77 induction in correlation with CD5 levels. We found that more than half of the

tDN T cells expressed high levels of Nur77 (**Figure 6A, 6B**). Importantly, these levels were higher than those of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, which undergo positive selection, but comparable to those of CD25⁺CD4⁺ T cells, which undergo agonist selection. In the spleen of Nur77^{GFP}.CD1d^{-/-} mice, although reduced compared to thymic levels, we found that DN T cells again expressed higher levels of Nur77 than those of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (**Figure 6A, 6B**). Together, these results suggest that DN T cell undergo agonist selection, reflected by high levels of Nur77. However, when assessing CD5 expression, we found that tDN T cells exhibited levels comparable to thymic CD8⁺ T cells, but lower than CD4⁺ T cells and, whereas CD5 levels on pDN T cells were lower than both conventional cell types in the spleen (**Figure 6A, 6B**). These results contrasted with Nur77 levels and may reflect signaling properties that are distinct to tDN T cells. This is not unlike other unconventional T cell subsets that are thought to receive strong TCR signals during their development yet exhibit low levels of CD5 levels, including iNKT cells and $\gamma\delta$ T cells^{22, 40} (**Figure 6C**). Furthermore, pDN T cells exhibit an activated phenotype as well as a polyclonal TCR repertoire (**Figure 1**), which is also reminiscent of other T cell populations selected following agonist selection^{39,40}. Altogether, these results suggest that tDN T cells receive strong TCR signaling akin to agonist selection. It also suggests that CD5 is a poor surrogate marker of TCR signaling in unconventional T cell subsets.

5.5.5 MHC-restriction of immunoregulatory DN T cells influences their phenotype and function

MHC restriction is imposed on T cells during thymic differentiation and is based on TCR specificity^{36,48,49}. CD4⁺ helper T cells and CD8⁺ cytotoxic T cells are generally restricted to MHC II- and MHC I-peptide complexes, respectively. As opposed to conventional T cells, iNKT cells recognize lipids and glycolipids presented by the non-classical MHC I molecule CD1d^{12,50,51}, while CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ IELs recognize antigens presented by both class I and II MHC molecules^{52,53}. Here, we took advantage of five different mouse strains in order to define the MHC restriction of DN T cells. More specifically, we assessed the proportion and phenotype of DN T cells in the thymus and spleen of MHC sufficient mice (B6.CD1d^{-/-}), classical MHC I ko (K^bD^b^{-/-}.CD1d^{-/-}), both classical- and non-classical MHC I-ko (B2m^{-/-}),

MHC II ko (MHC II^{-/-}CD1d^{-/-}) and total MHC ko (B2m^{-/-}MHC II^{-/-}) mice. Of note, β 2-microglobulin (B2m) is an essential component both of classical and of most non-classical MHC I molecules, including CD1d, thus both CD1d^{-/-} and B2m^{-/-} mice lack NKT cells. When analyzing the proportion and absolute number of tDN T cells in these mouse strains, we found that MHCII deficiency alone had no effect on tDN T cell proportion and number relative to CD1d^{-/-} mice (**Figure 7**), arguing against an essential role for MHC II in selection of tDN T cells. In contrast, tDN T cells were significantly decreased in B2m^{-/-} mice in comparison to CD1d^{-/-} mice (**Figure 7**). The proportion of tDN T cells in B2m^{-/-} and K^bD^b^{-/-}CD1d^{-/-} mice was comparable, suggesting that the reduction in tDN T cells observed in B2m^{-/-} mice is likely due to a deficit in classical as opposed to non-classical MHC I complexes (**Figure 7**). Moreover, a further reduction in tDN T cells was observed in B2m^{-/-}MHC II^{-/-}, suggesting that in absence of MHC I, MHC II-deficiency impacts tDN T cell differentiation (**Figure 7**). Interestingly, the impact of MHC deficiency was also reflected on tDN T cell phenotype, as observed by the expected graded expression of CD5, CD69, CD44 and CD24 when relevant MHC signals are present (**Figure 7**). Altogether, these results suggest that thymic DN T cells are MHC I-restricted, however, in absence of MHC I, DN T can be selected by MHC II.

5.6 Discussion

Here, we investigated several of the aspects of differentiation pathway and origin of pDN T cells, a rare T cell subset associated with immune regulation. Although the presence of DN T cells was reported in CD1d ko mice^{17, 46}, this is the first time that the origin of pDN T cells is studied completely in absence of NKT cells. Thymic grafts under the kidney capsule unambiguously showed that pDN T cells originate from thymic precursors. We then explored many of the possible origins of pDN T cells in non-manipulated reporter mice, and found that pDN T cells differentiate from DP precursors and were selected primarily on classical MHC I molecules following a strong TCR signal.

pDN T cells compose an unconventional T cell subsets. In comparison to iNKT cells, we find that pDN T cells exhibit a polyclonal TCR _{$\alpha\beta$} repertoire, suggesting that they can recognize a broad variety of antigens. In addition, as for other unconventional T cell subsets, pDN T cells express a variety of activation markers in line with an antigen-experienced phenotype. This phenotype can either be the result of self- or commensal-antigen encounter. Interestingly, in a TCR transgenic model, we found that pDN T cells expressed activation markers such as CD44 and CD69 in conditions where the cognate antigen was expressed as a self-antigen (⁵⁴ and data not shown). Although this does not exclude the possibility that commensal antigens may drive the expression of activation markers, it suggests that self-antigen is sufficient to confer the antigen-experienced phenotype to pDN T cells. Moreover, it is tempting to suggest that the extensive proliferation of pDN T cells relative to conventional T cells is likely driven by self-antigen recognition in periphery, thereby promoting their immunoregulatory properties.

Many hypotheses have been put forth in an attempt to explain the differentiation pathway of pDN T cells. Here, by using thymic grafts, we unequivocally demonstrate that pDN T cells can originate in the thymus. Using cell-fate mapping and embryonic development, we also show that pDN T cells must transit to an early DP stage and, in contrast to $\gamma\delta$ T cells, do not directly differentiate from immature DN thymocytes. To our knowledge, this is the first documentation of a T cell subset that differentiates at the early DP stage. Indeed, $\gamma\delta$ T cells and Tregs respectively differentiate from DN and CD4⁺ thymocytes, while NKT cells, MAIT cells and IELs all differentiate from late DP stages⁵⁵⁻⁵⁹. The functional consequence of

differentiating for an early DP stage remains to be established. In starting to address this issue, we found that although early DP thymocytes express low levels of TCR, tDN T cells have received strong TCR signals, as determined by Nur77 expression levels. This strong signal appears to be mostly driven by self-peptide recognition of classical MHC I molecules and seems to drive a cytotoxic differentiation program inducing strong levels of Eomes (not shown). Of interest, the dramatic decrease in tDN T cells in $\beta 2m/MHCII$ deficient mice suggests that some pDN T cells could also be dependent on MHCII molecules. Functional studies will be needed to determine how MHC restriction in pDN T cells influences their specificity and immunoregulatory properties.

In our study, we exploit CD1d ko mice to carefully and completely exclude all NKT cells. This is particularly important, because type II NKT cells, as for pDN T cells, have a polyclonal TCR $\alpha\beta$ as well as lack CD4 and CD8 coreceptors. As such, pDN T cells and type II NKT cells cannot currently be distinguished using phenotypic markers. In addition to pDN T cells and type II NKT cells, some MAIT cells also bear a CD4⁻CD8⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁺ phenotype^{61, 62}. These cells are restricted to the non-classical MHC molecule MR1 and develop at the DP thymocyte stage^{63, 64}. MAIT cells, which represent approximately 0.1% of total thymocytes and less than 0.1% of total spleen cells⁶¹, express an invariant V α 19-J α 33 TCR^{65, 66}. We did not specifically exclude MAIT cells in our study. However, based on the frequency of the V α 19-J α 33 TCR in our RNA-seq data, we find that MAIT cells represent less than 0.6% of total pDN T cells. MAIT cells thus represent a negligible proportion of pDN T cells in the spleen of CD1d KO mice.

In summary, our research revealed key properties of DN T cell development that could influence their immunoregulatory function, and distinguish them from both conventional CD4⁺ and CD8⁺ T cells as well as from the more “innate-like” NKT cells and gamma-delta T cells. Future work will reveal how the thymic differentiation imposes immunoregulatory function to pDN T cells.

5.7 References

1. Shevach, E.M. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* **25**, 195-201 (2006).
2. Abraham, V.S., Sachs, D.H. & Sykes, M. Mechanism of protection from graft-versus-host disease mortality by IL-2. III. Early reductions in donor T cell subsets and expansion of a CD3+CD4-CD8- cell population. *J Immunol* **148**, 3746-3752 (1992).
3. Strober, S., *et al.* Cloned natural suppressor cell lines express the CD3+CD4-CD8- surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor. *J Immunol* **143**, 1118-1122 (1989).
4. Fischer, K., *et al.* Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* **105**, 2828-2835 (2005).
5. Hillhouse, E.E., Beauchamp, C., Chabot-Roy, G., Dugas, V. & Lesage, S. Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. *Immunol Cell Biol* **88**, 771-780 (2010).
6. Zhang, Z.X., Yang, L., Young, K.J., DuTemple, B. & Zhang, L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* **6**, 782-789 (2000).
7. Zhang, Z.X., *et al.* Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, fas-fas ligand-independent pathway. *J Immunol* **177**, 6920-6929 (2006).
8. Young, K.J. & Zhang, L. The nature and mechanisms of DN regulatory T-cell mediated suppression. *Hum Immunol* **63**, 926-934 (2002).
9. Hillhouse, E.E., Delisle, J.S. & Lesage, S. Immunoregulatory CD4(-)CD8(-) T cells as a potential therapeutic tool for transplantation, autoimmunity, and cancer. *Frontiers in immunology* **4**, 6 (2013).
10. Hillhouse, E.E. & Lesage, S. A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells. *J Autoimmun* **40**, 58-65 (2013).
11. Bendelac, A., *et al.* CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* **268**, 863-865 (1995).
12. Bendelac, A., Savage, P.B. & Teyton, L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* **25**, 297-336 (2007).
13. Exley, M., Garcia, J., Balk, S.P. & Porcelli, S. Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *The Journal of experimental medicine* **186**, 109-120 (1997).
14. Bendelac, A. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med* **182**, 2091-2096 (1995).
15. Zhang, D., *et al.* New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. *Blood* **109**, 4071-4079 (2007).
16. Ford, M.S., Zhang, Z.X., Chen, W. & Zhang, L. Double-Negative T Regulatory Cells Can Develop Outside the Thymus and Do Not Mature from CD8+ T Cell Precursors. *J Immunol* **177**, 2803-2809 (2006).

17. Terrence, K., Pavlovich, C.P., Matechak, E.O. & Fowlkes, B.J. Premature expression of T cell receptor (TCR)alpha beta suppresses TCRgamma delta gene rearrangement but permits development of gamma delta lineage T cells. *J Exp Med* **192**, 537-548 (2000).
18. Fritsch, M., Andersson, A., Petersson, K. & Ivars, F. A TCR alpha chain transgene induces maturation of CD4- CD8- alpha beta+ T cells from gamma delta T cell precursors. *Eur J Immunol* **28**, 828-837 (1998).
19. Bruno, L., Fehling, H.J. & von Boehmer, H. The alpha beta T cell receptor can replace the gamma delta receptor in the development of gamma delta lineage cells. *Immunity* **5**, 343-352 (1996).
20. Bendelac, A., Rivera, M.N., Park, S.H. & Roark, J.H. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* **15**, 535-562 (1997).
21. Dugas, V., *et al.* Idd13 is involved in determining immunoregulatory DN T-cell number in NOD mice. *Genes Immun* **15**, 82-87 (2014).
22. Farr, A.R., Wu, W., Choi, B., Cavalcoli, J.D. & Laouar, Y. CD1d-unrestricted NKT cells are endowed with a hybrid function far superior than that of iNKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 12841-12846 (2014).
23. Dugas, V., Beauchamp, C., Chabot-Roy, G., Hillhouse, E.E. & Lesage, S. Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes. *J Autoimmun* **35**, 23-32 (2010).
24. MacDonald, H.R. NK1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells: new clues to their origin, specificity, and function. *The Journal of experimental medicine* **182**, 633-638 (1995).
25. Bristeau-Leprince, A., *et al.* Human TCR alpha/beta+ CD4-CD8- double-negative T cells in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome express restricted Vbeta TCR diversity and are clonally related to CD8+ T cells. *J Immunol* **181**, 440-448 (2008).
26. Pobezinsky, L.A., *et al.* Clonal deletion and the fate of autoreactive thymocytes that survive negative selection. *Nat Immunol* **13**, 569-578 (2012).
27. Boursalian, T.E., Golob, J., Soper, D.M., Cooper, C.J. & Fink, P.J. Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. *Nat Immunol* **5**, 418-425 (2004).
28. Guy-Grand, D., *et al.* Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J Exp Med* **197**, 333-341 (2003).
29. McCaughy, T.M., Wilken, M.S. & Hogquist, K.A. Thymic emigration revisited. *J Exp Med* **204**, 2513-2520 (2007).
30. Hsieh, C.S., Lee, H.M. & Lio, C.W. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol* **12**, 157-167 (2012).
31. Godfrey, D.I., Stankovic, S. & Baxter, A.G. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol* **11**, 197-206 (2010).
32. Zarin, P., Chen, E.L., In, T.S., Anderson, M.K. & Zuniga-Pflucker, J.C. Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much? *Cellular immunology* **296**, 70-75 (2015).
33. Dashtsoodol, N., *et al.* Alternative pathway for the development of Valpha14+ NKT cells directly from CD4-CD8- thymocytes that bypasses the CD4+CD8+ stage. *Nat Immunol* **18**, 274-282 (2017).
34. Park, J.H., *et al.* Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat Immunol* **11**, 257-264 (2010).

35. Maekawa, Y., *et al.* Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nature immunology* **9**, 1140-1147 (2008).
36. Labrecque, N., Baldwin, T. & Lesage, S. Molecular and genetic parameters defining T-cell clonal selection. *Immunol Cell Biol* **89**, 16-26 (2011).
37. Hogquist, K.A., Baldwin, T.A. & Jameson, S.C. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* **5**, 772-782 (2005).
38. Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M. & Hogquist, K.A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* **14**, 377-391 (2014).
39. Stritesky, G.L., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A. Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annu Rev Immunol* **30**, 95-114 (2012).
40. Baldwin, T.A., Hogquist, K.A. & Jameson, S.C. The fourth way? Harnessing aggressive tendencies in the thymus. *J Immunol* **173**, 6515-6520 (2004).
41. Moran, A.E., *et al.* T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J Exp Med* **208**, 1279-1289 (2011).
42. Cruz Tleugabulova, M., *et al.* Discrete TCR Binding Kinetics Control Invariant NKT Cell Selection and Central Priming. *J Immunol* **197**, 3959-3969 (2016).
43. Azzam, H.S., *et al.* CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J Exp Med* **188**, 2301-2311 (1998).
44. Li, K.P., *et al.* Temporal Expression of Bim Limits the Development of Agonist-Selected Thymocytes and Skews Their TCRbeta Repertoire. *J Immunol* **198**, 257-269 (2017).
45. Suen, A.Y. & Baldwin, T.A. Proapoptotic protein Bim is differentially required during thymic clonal deletion to ubiquitous versus tissue-restricted antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 893-898 (2012).
46. Daley, S.R., Hu, D.Y. & Goodnow, C.C. Helios marks strongly autoreactive CD4+ T cells in two major waves of thymic deletion distinguished by induction of PD-1 or NF-kappaB. *J Exp Med* **210**, 269-285 (2013).
47. Ross, E.M., Bourges, D., Hogan, T.V., Gleeson, P.A. & van Driel, I.R. Helios defines T cells being driven to tolerance in the periphery and thymus. *Eur J Immunol* **44**, 2048-2058 (2014).
48. Van Laethem, F., *et al.* Deletion of CD4 and CD8 coreceptors permits generation of alphabetaT cells that recognize antigens independently of the MHC. *Immunity* **27**, 735-750 (2007).
49. Van Laethem, F., Tikhonova, A.N. & Singer, A. MHC restriction is imposed on a diverse T cell receptor repertoire by CD4 and CD8 co-receptors during thymic selection. *Trends Immunol* **33**, 437-441 (2012).
50. Matsuda, J.L., *et al.* Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* **192**, 741-754 (2000).
51. Godfrey, D.I., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J. & Van Kaer, L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* **4**, 231-237 (2004).
52. Gangadharan, D., *et al.* Identification of Pre- and Postselection TCRalphabeta(+) Intraepithelial Lymphocyte Precursors in the Thymus. *Immunity* **25**, 631-641 (2006).

53. Ruscher, R., Kummer, R.L., Lee, Y.J., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A. CD8alphaalpha intraepithelial lymphocytes arise from two main thymic precursors. *Nat Immunol* **18**, 771-779 (2017).
54. Dugas, V., Beauchamp, C., Chabot-Roy, G., Hillhouse, E.E. & Lesage, S. Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes. *J Autoimmun* **35**, 23-32 (2010).
55. Gapin, L., Matsuda, J.L., Surh, C.D. & Kronenberg, M. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* **2**, 971-978 (2001).
56. Koay, H.F., *et al.* A three-stage intrathymic development pathway for the mucosal-associated invariant T cell lineage. *Nature Immunology* **17**, 1300-1311 (2016).
57. Stritesky, G.L., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A. Selection of Self-Reactive T Cells in the Thymus. *Annu Rev Immunol* **30**, 95-114 (2012).
58. Das, R. Transcriptional control of invariant NKT cell development. **238**, 195-215 (2010).
59. Yui, M.A. & Rothenberg, E.V. Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity. *Nat Rev Immunol* **14**, 529-545 (2014).

5.8 Figures

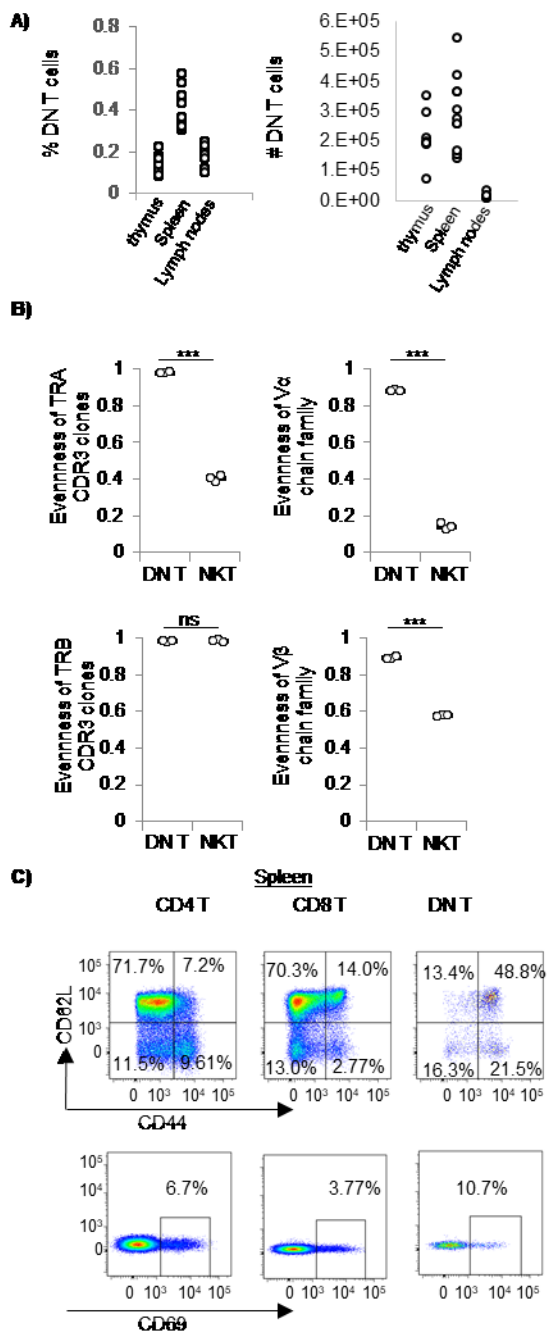


Figure 1. **TCR repertoire and phenotype of pDN T cells.** A) The thymus, spleen and lymph nodes were harvested from 8-12 week old non-transgenic CD1d-deficient B6 mice and the proportion (left panel) and absolute number (right panel) of DN T cells (CD4-CD8-TCR β +) is

shown. B) TCR repertoire was determined by analysis of 3 DN T cell samples and 3 iNKT samples by RNA-sequencing. Diversity of the repertoire is quantified by the “evenness index” for DN T cells sorted from CD1d ko mice compared to NKT cells sorted from B6 mice as shown in figure S1. Unpaired T test was used to test significance *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant. C) Phenotypic analysis of maturation and activation markers in T cells from CD1d ko mice in the spleen. Profiles are shown for CD4 T cells (TCR β +CD4+CD8 α -), CD8 T cells (TCR β +CD4-CD8 α +) and DN T cells (TCR β +CD4-CD8 α -), and are representative of 12 CD1d ko mice, 12 independent experiments.

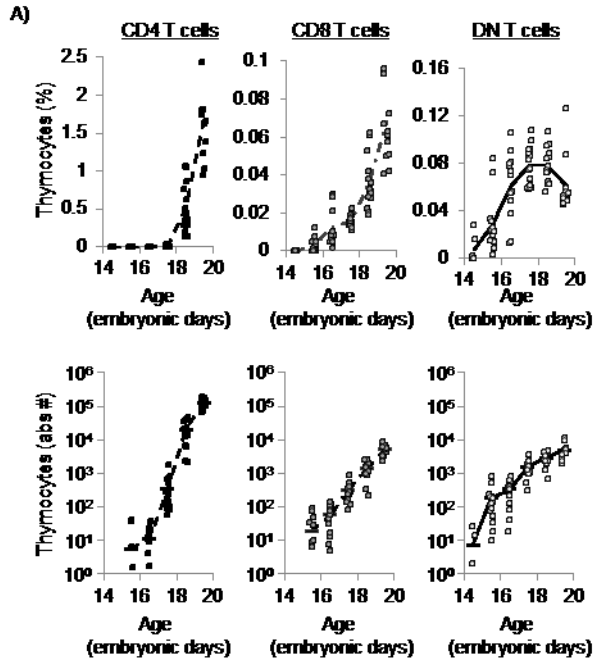


Figure 2. **Immunoregulatory DN T cells are found in embryonic thymi.** T cell populations were quantified in CD1d ko embryonic thymi from E14.5 to E19.5 days. Proportion and absolute number of respective populations is shown among total thymocytes as gated in figure S2. Each dot represents one embryo. Representative of at least 2 independent experiments per time-point.

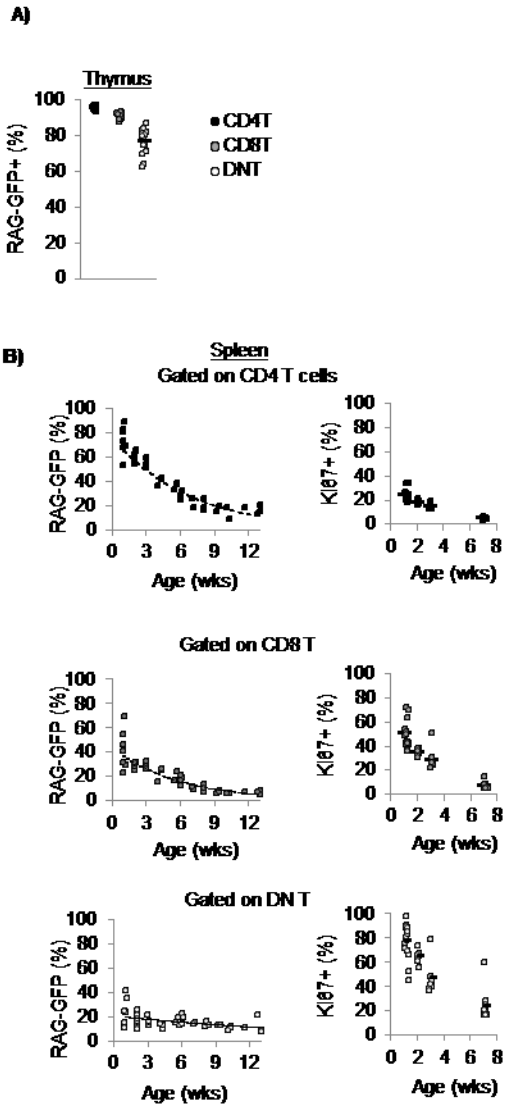


Figure 3 : **Recent thymic emigrants are present among pDN T cells.** T cell subsets from B6.CD1d.RAG.GFP mice were analysed A) in the thymus of 7 to 10 week-old mice or B) in the spleen of 1 to 13 week-old mice for the presence of GFP+ cells. Exponential regression curve of the mean GFP+ cells among each T cell subset in function of age is shown. Ki-67 expression in 1 wk, 2 wks, 3 wks old or adult 6-8 wks old (pooled and indicated as 7 wks old) CD1d ko mice is shown for spleen T cell subsets, as indicated. Each dot represent one mouse. Representative of at least 3 experiments.

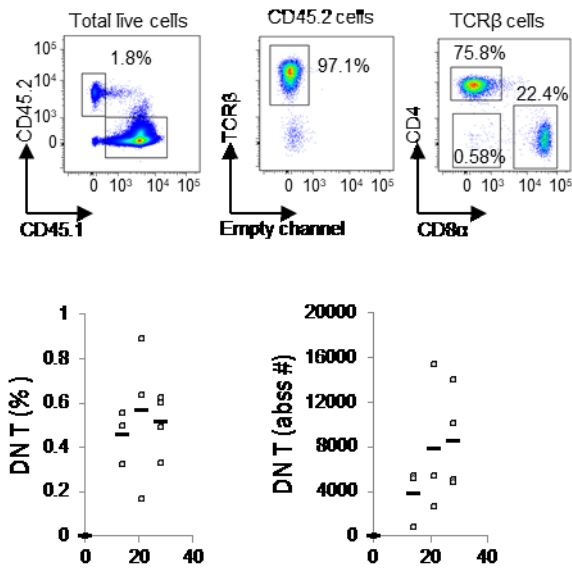


Figure 4. **pDN T cells originate from a thymic precursor.** E15.5 or E16.5 CD1d ko thymi were grafted under the kidney capsule of CD1d ko mice. The allotypic markers CD45.1 and CD45.2 allowed discrimination of graft-derived vs host-derived cells. T cell populations derived from the grafted thymus were studied after 2, 3 or 4 weeks post-graft. Representative profile of graft-derived cells (CD45.2+) 14 days post-graft. Proportion of DN T cells among graft-derived splenocytes, or total number of graft-derived DN T cells at the indicated time-points are shown. Each dot represent one mouse. Representative of at least 2 independent experiments per time-point.

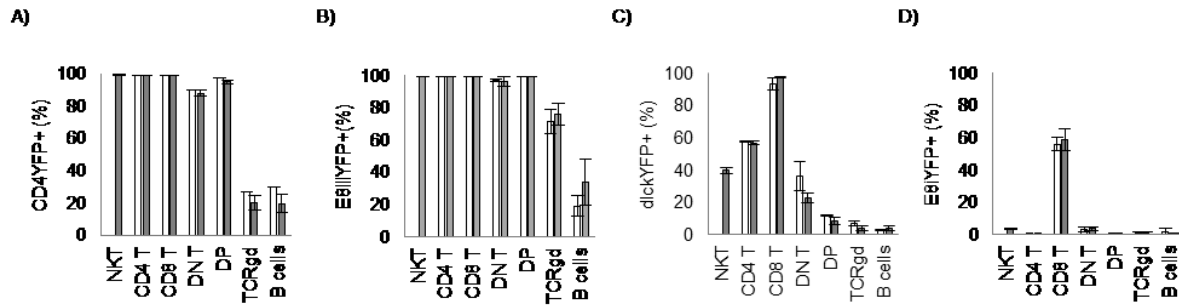


Figure 5. **Thymic DN T cells originate directly from DP precursors.** Analysis of the thymus populations from CD1d ko (white) or CD1d+ (grey) reporter mice in which permanent YFP expression is driven by the promoters A) CD4 (n=1 CD1d ko, n=4 CD1d+), B) E8iii (n=4 CD1d ko, n=5 CD1d+), C) dlck (n=4 CD1d ko, n=4 CD1d+), or D) E8i (n=5 CD1d ko, n=11 CD1d+). Percentage of YFP+ cells among each subset is shown. NKT cells were gated as viability-CD19-PBS57-CD1d tetramer+TCR β + and were absent in CD1d ko mice ; CD4, CD8 and DN T cells were first gated as Viability⁻CD19⁻PBS57-CD1d tetramer⁻TCR β ⁺ ; TCR $\gamma\delta$ cells were gated as Viability-CD19-PBS57-CD1d tetramer-TCR β -CD3+TCR $\gamma\delta$ + ; B cells were gated as viability-CD19+.

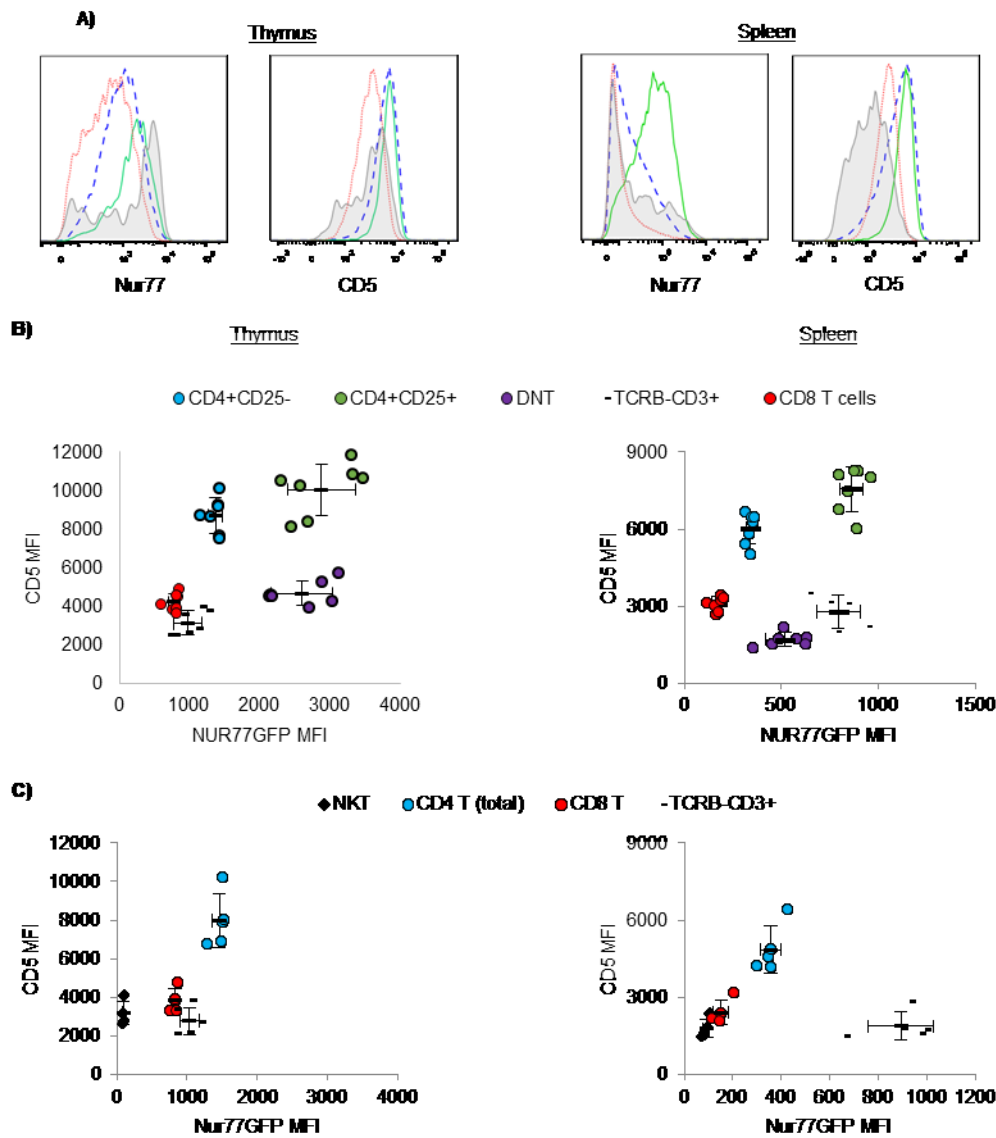


Figure 6. **Agonist selection of DN T cells.** A) T cell populations from Cd1d ko Nur77-GFP mice were analysed for the expression of Nur77 and CD5. CD25- CD4 T cells, blue dashed ; CD25+ CD4 T cells, green ; CD8 T cells, red dotted ; DN T cells, tinted. Representative of 7 mice, 4 independent experiments. B) Nur77GFP and CD5 mean fluorescence intensity are depicted for T cell populations in CD1d ko mice (top), or in CD1d+ mice (bottom). Each marker represent an individual mouse. 4 independent experiments in Nur77GFP CD1d ko mice and 3 independent experiments in Nur77GFP (CD1d+) mice.

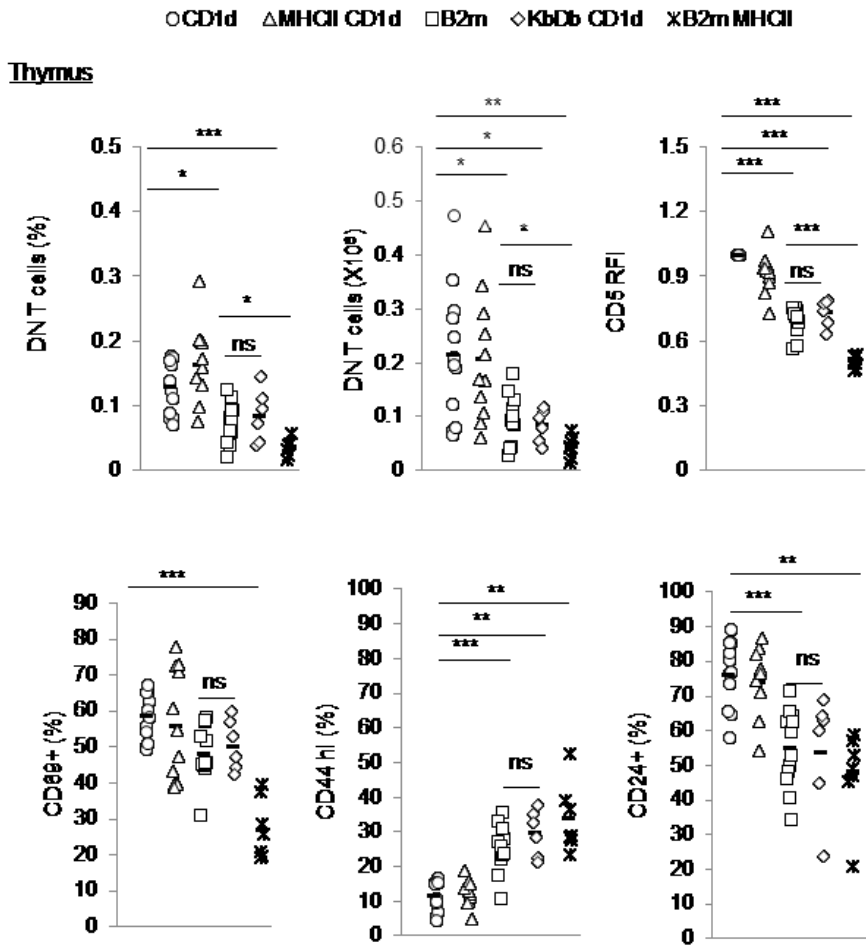


Figure 7. **Influence of MHC deficiency on DN T cells.** Proportion among total lymphocytes, absolute number and expression of surface molecule on DN T cells is depicted for various MHC deficient strains in the thymus. RFI : relative fluorescence intensity normalised to CD1d ko DN T cells from each experiment.

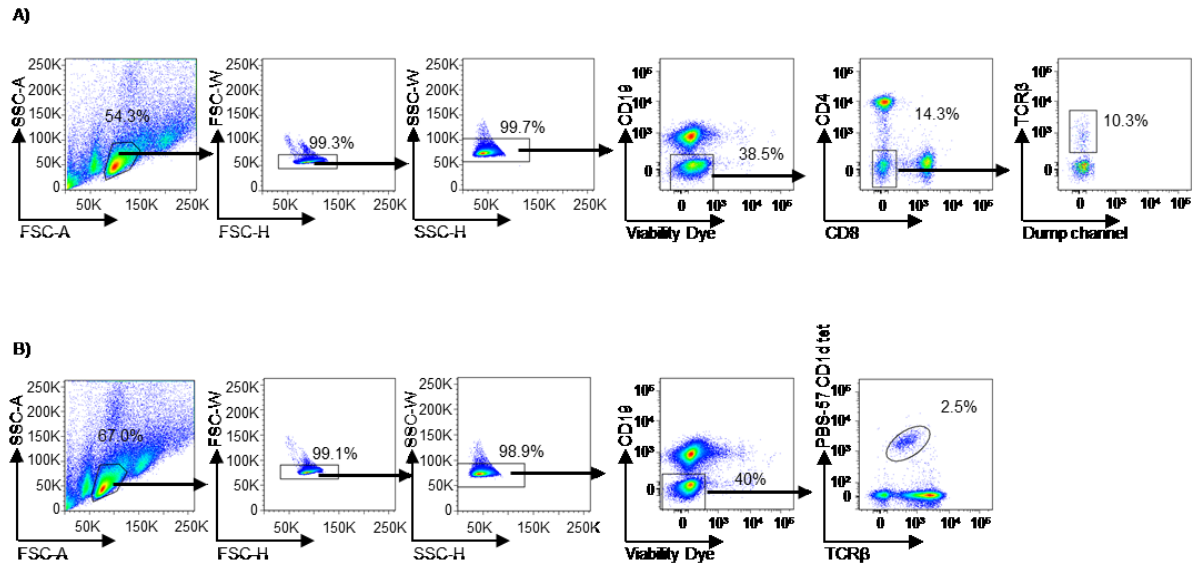


Figure S1. Gating strategy for sorting DN T cells and NKT for RNA-Seq. A) The spleens of three to five B6.CD1d^{-/-} mice were pooled and stained with viability dye as well as antibodies to CD19, CD4, CD8 α and TCR β . Doublets were electronically excluded. Viable DN T cells (CD19-CD4-CD8-TCR β ⁺) were sorted on a FACS Aria III. B) The spleens of two to three B6 mice were pooled and stained with viability dye, PE-coupled PBS-57 CD1d-tetramer, as well as antibodies to CD19 and TCR β . Doublets were electronically excluded. Viable type 1 NKT cells (CD19-TCR β ⁺) were sorted on a FACS Aria III. Purity was above 95% for all sorts. 3 independent sorts were done for each subset.

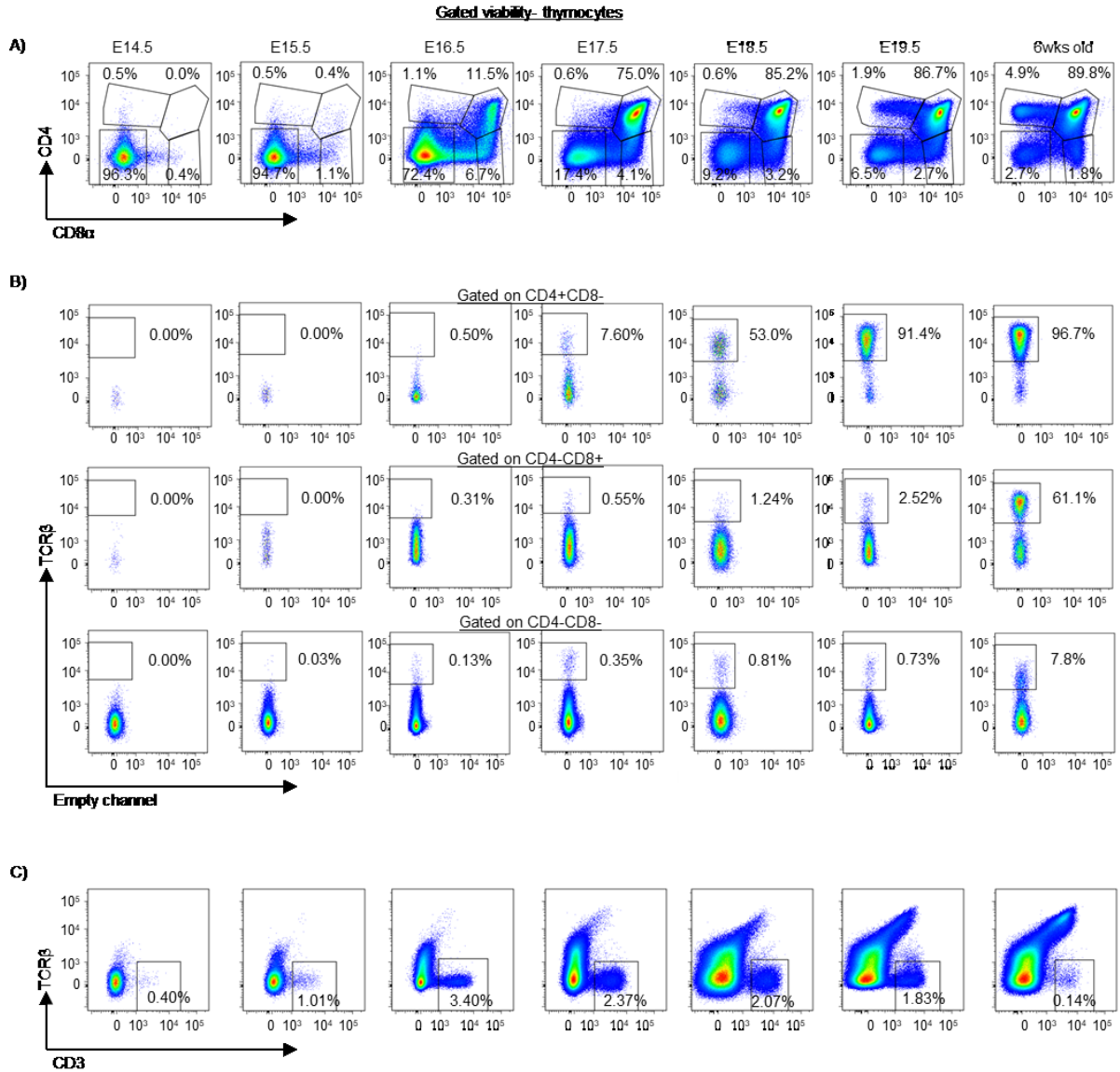


Figure S2. **Representative profiles of embryonic thyme from E14.5 to E19.5.** A) gated on total viable thymocytes and then B) on indicated cell subset. Percentage of TCR⁺ cells are indicated C) CD3⁺TCRβ⁻ gated on total viable thymocytes. Representative of at least n=6 , with at least 2 independent experiments per embryonic time-point.

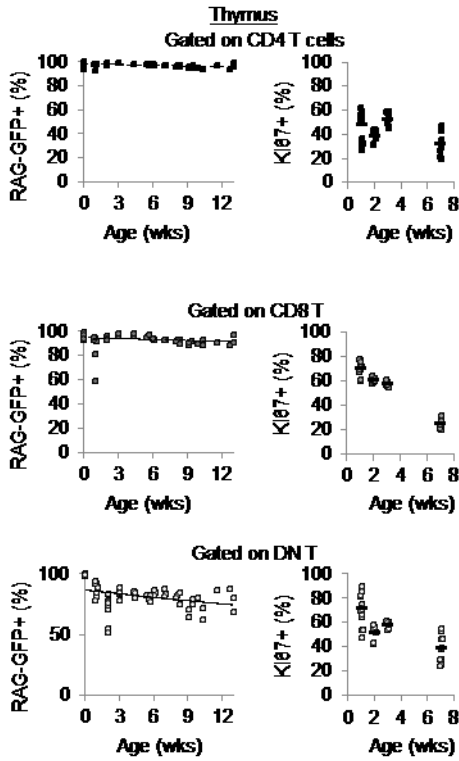


Figure S3 : **Recent thymic emigrants are present among tDN T irrespective of mouse age.** T cell subsets from B6.CD1d.RAG.GFP mice were analysed in the thymus for the presence of GFP+ cells. Exponential regression curve of the mean GFP+ cells among each T cell subset in function of age is shown. Ki-67 expression in 1 wk, 2 wks, 3 wks old or adult 6-8 wks old (pooled and indicated as 7 wks old) CD1d ko mice is shown for spleen T cell subsets, as indicated. Each dot represent one mouse. Representative of at least 3 experiments.

Table I. Reagents used for flow cytometry experiments and NK cell depletion

Reagent	Clone	Provider	Fluorochrome
Anti-mouse CD3	17A2	Biolegend	BV711
Anti-mouse CD4	GK1.5	eBioscience	ef450
Anti-mouse CD4	RM5-5	Biolegend	BV786
Anti-mouse CD4	GK1.5	Biolegend	PECY7
Anti-mouse CD5	53-7.3	Biolegend	PERCP
Anti-mouse CD8 α	53-6.7	Biolegend	PERCP
Anti-mouse CD8 α	53-6.7	Biolegend	APCCY7
Anti-mouse CD8 α	53-6.7	Biolegend	BV510
Anti-mouse CD19	6D5	Biolegend	FITC
Anti-mouse CD19	6D5	Biolegend	BV605
Anti-mouse CD24	M1/69	Biolegend	APC
Anti-mouse CD25	PC61	Biolegend	PB
Anti-mouse CD44	IM7	Biolegend	PECY7
Anti-mouse CD45.1	A20.1	Biolegend	FITC
Anti-mouse CD45.2	104	Biolegend	PB
Anti-mouse CD49b	DX5	Biolegend	APC
Anti-mouse CD49b	DX5	Biolegend	FITC
Anti-mouse CD62L	MEL-14	Biolegend	APC
Anti-mouse CD69	H1.2F3	Biolegend	PE
Anti-mouse Eomes	Dan11mag	eBioscience	ef660
Anti-mouse ki67	B56	BD	FITC
Anti-mouse TCR β	H57-597	Biolegend	APC
Anti-mouse TCR β	H57-597	Biolegend	FITC
Anti-mouse TCR β	H57-597	Biolegend	PE
Anti-mouse TCRgd	GL3	Biolegend	PERCPCy5.5
Anti-mouse TCR V beta panel		BD	FITC
PBS-57 mCD1d tetramer		NIH	PE
PBS-57 mCD1d tetramer		NIH	BV421
Fixable viability dye		eBioscience	ef780
Fixable viability dye		eBioscience	ef506
NK1.1	PK136		unconjugated

Chapitre 6 : Discussion

Les résultats présentés dans cette thèse ont principalement montré la contribution de locus *Idd* dans la modulation de la proportion de cellules DN T immunorégulatrices dans un modèle transgénique, et ont révélé une partie des mécanismes de différenciation menant à la production de cellules DN T non-transgéniques. Ces deux approches sont complémentaires et contribuent ensemble à lever le voile sur les voies biologiques déterminant la présence d'un compartiment optimal de cellules DN T immunorégulatrices.

6.1 Le contrôle génétique des cellules DN T et la modulation de leur nombre

Les cellules DN T possèdent un intéressant potentiel immunorégulateur, médié par leur reconnaissance antigène-spécifique des cellules cibles. Dans les modèles murins reposant sur l'utilisation de cellules T transgéniques spécifiques pour un antigène donné, les cellules DN T parviennent à éliminer les cellules auto-réactives. Des études utilisant des modèles non-transgéniques de diabète de type 1 ou de GVH supportent également un rôle protecteur des cellules DN T [382, 506-508]. Plus particulièrement, un nombre élevé de cellules DN T est aussi associé à la résistance au diabète chez la souris, et le transfert de cellules DN T dans des souris prédisposées au diabète permet la prévention de la maladie [378]. Ces résultats suggèrent que la modulation *in vivo* des cellules DN T pour en augmenter le nombre pourrait prévenir l'auto-immunité chez la souris. L'association entre un nombre élevé de cellules DN T et la résistance au diabète chez la souris, nous a poussé à identifier les différences génétiques modulant la proportion de cellules DN T immunorégulatrices.

6.1.1 La modulation des cellules DN T par les locus *Idd2* et *Idd13*

Puisque le nombre et la proportion de cellules DN T chez la souris semblait associée à la résistance au diabète, une étude précédente par notre équipe et des collaborateurs a testé l'hypothèse que des régions *Idd* associées à la résistance au diabète pourraient augmenter les

cellules DN T. En utilisant le modèle transgénique TCR 3A9, la comparaison de lignées de souris congéniques NOD.*H2^k* portant divers locus *Idd* de la lignée B6 ou B10 à la lignée parentale NOD.*H2^k* a révélé que le locus *Idd13*, mais non les locus *Idd3*, *Idd5* ou *Idd9*, participait à l'augmentation de la proportion de cellules DN T dans la rate et les ganglions lymphatiques drainant la peau [290]. D'autres analyses par lignées de souris congéniques avaient déjà montré que des déterminants génétiques contenus dans le locus *Idd13* contrôlent la proportion d'autres types cellulaires impliqués dans la tolérance immune, comme les cellules NKT [292] et les DC mérocytiques [291]. Les résultats de cette étude sur les cellules DN T montraient une nouvelle association du locus *Idd13* à une population immunorégulatrice. Toutefois, en comparant avec les lignées TCR 3A9 B10.BR et TCR 3A9 NOD.*H2^k*-*Idd13*, il était apparent que d'autres régions génétiques permettaient aussi d'augmenter la proportion de ces cellules [290].

Dans le cadre de l'objectif 1 de cette thèse, afin d'identifier de façon non-biaisée les autres locus contribuant à la proportion de cellules DN T chez les souris TCR 3A9, nous avons donc eu recours à une approche d'analyse de liaison génétique. L'utilisation de ce modèle TCR transgénique, en opposition à un modèle non transgénique NOD vs B6 a permis d'étudier les cellules DN T dans un contexte où leur nombre dans les organes lymphoïdes secondaire est suffisamment élevé. De plus, l'utilisation d'un modèle TCR transgénique assure aussi l'absence de cellules NKT parmi la population de cellules DN T étudiée [290, 377]. Cette approche par analyse de liaison génétique a permis de confirmer que la fréquence de cellules DN T dans les organes lymphoïdes de la souris est un trait multigénique, contrôlé par plusieurs locus (Article 1, Figure 2). L'article 1 a validé qu'un segment du locus *Idd2* permet d'augmenter la fréquence de cellules DN T dans les organes lymphoïdes secondaires de souris TCR 3A9, mais aussi qu'au moins deux gènes situés sur le chromosome 9 agissent ensemble dans la détermination de la fréquence de ces cellules. Enfin, nos résultats montraient aussi que les souris TCR3A9 :insHEL congéniques pour le segment augmentant le plus la proportion de cellules DN T, Chr9L, étaient résistantes au diabète comparativement aux souris contrôles NOD.*H2^k* (Article 1, Figure 7 et Figure 8). Ces résultats liaient au niveau génétique la réduction de l'incidence de diabète et l'augmentation des cellules DN T, suggérant que les cellules DN T pourraient contribuer à la résistance au diabète conférée par le locus *Idd2*. Suite

à la publication de ces données, des souris non-transgéniques NOD.*Idd2* ont été générées, et nous avons pu observer que cette lignée (maintenant disponible au Jackson Laboratory sous le numéro 026624) est également résistante au diabète (Annexe 2). L'investigation des mécanismes cellulaires liés à cette protection au diabète pourront permettre d'identifier les voies par lesquelles *Idd2* protège de l'auto-immunité chez les souris non-transgéniques, et si cette protection est aussi associée, ou non, à une augmentation du nombre de cellules DN T.

Bien que d'autres locus suggestifs pour le contrôle de la proportion de cellules DN T dans les souris TCR 3A9 aient été identifiés lors de l'analyse de liaison génétique, seuls *Idd13*, un locus situé sur le chromosome 6 proximal et un locus situé sur le chromosome 12 semblaient expliquer les phénotypes des lignées parentales NOD.*H2^k* et B10.BR. Pour ces locus, les allèles d'origine B10.BR contribuent à l'augmentation des cellules DN T (Annexe 3). En absence de lignée de souris congénique disponible, le locus du chromosome 6 n'a pas été testé pour sa contribution à la proportion de cellules DN T. Toutefois, une lignée NOD.*H2^k* congénique pour le locus Chr12 avait été générée par notre équipe. Au contraire d'*Idd2* et d'*Idd13*, le locus situé sur le chromosome 12 n'affecte pas la proportion de cellules DN T dans le modèle TCR 3A9 (Annexe 1). Ce locus Chr12, qui inclut le *Quantitative trait locus* (QTL) *Nbwal* associé aux auto-anticorps dans le lupus, modulait toutefois le niveaux d'auto-anticorps, la maturation d'affinité des anticorps et la résistance au diabète dans le modèle transgénique TCR 3A9 :insHEL (Article 3, figures 2-4), suggérant qu'il pourrait s'agir d'un nouveau locus de susceptibilité au diabète.

La génération subséquente de souris NOD congéniques pour le locus Chr12 a cependant révélé que les allèles d'origine B10 de ce locus ne sont pas suffisants pour protéger du diabète dans le modèle NOD non-transgénique (Annexe 4). Les niveaux d'anticorps IgG dirigés contre l'insuline (*Insulin Auto-Antibodies*, IAA) ont aussi été évalués dans ces souris NOD.*Chr12* faisant partie de l'incidence de diabète. Au contraire de nos observations dans le modèle TCR 3A9 :insHEL (Article 3, figure 2), les souris congéniques NOD.*Chr12* diabétiques ne possédaient pas moins d'anticorps dirigées contre des antigènes présents dans les îlots pancréatiques que les souris NOD diabétiques (Annexe 4). Ceci suggère que dans le contexte de l'haplotype H-2^{g7} du CMH, le locus *Chr12* n'est pas suffisant pour empêcher le développement du diabète, ni la production d'anticorps dirigés contre des antigènes

pancréatiques chez les souris devenant diabétiques. Dans ce modèle non-transgénique, l'affinité des IAA n'a pas été testée. Malgré l'absence apparente de différence phénotypique entre les souris NOD et NOD.*Chr12*, l'effet du locus *Chr12* n'est pas limité au modèle transgénique en ce qui concerne la production d'auto-anticorps ou la maturation d'affinité des anticorps après immunisation dans les souris NOD.*H2^k* (Article 3, figures 5 et 7). Ceci suggère que l'absence d'effet du locus *Chr12* sur la production d'auto-anticorps dans les souris NOD.*Chr12* n'est pas uniquement dû à la présence d'un répertoire de cellules T polyclonales comparativement à un répertoire de cellules T limité par le transgène TCR 3A9.

La maturation d'affinité des anticorps est le résultat d'hypermutations somatiques du BCR et a lieu dans les centres germinatifs lors de la réponse immune [156]. Outre les cellules B, plusieurs types cellulaires sont impliqués dans cette réaction, notamment des cellules T CD4 TFH et TFR, des cellules NKT, des cellules CD8 et des DC [509, 510]. Il est donc possible que le phénotype observé dans les souris congéniques NOD.*H2^k-Chr12* soit extrinsèque aux cellules B elles-mêmes. La source du défaut de maturation d'affinité pourrait même se trouver en-dehors des centres germinatifs, puisqu'une altération de la structure du thymus parvient à perturber la maturation d'affinité des anticorps [511]. Considérant la courte liste de gènes encodant des protéines dans le locus *Chr12*, il serait possible de déterminer l'impact de la délétion de chacun de ces gènes sur le système immunitaire. En étudiant une grande variété de phénotypes, avant et après immunisation, cela pourrait permettre d'élucider le mécanisme associé au blocage de la maturation d'affinité des anticorps chez les souris congéniques NOD.*H2^k-Chr12*, mais pourrait aussi apporter de nouvelles informations sur le rôle immunitaire des gènes de cet intervalle.

6.1.2 La combinaison de locus dans la modulation des cellules DN T

Puisque seuls deux locus contrôlant la proportion de cellules DN T étaient validés dans le modèle TCR 3A9 et ne permettaient individuellement qu'une augmentation partielle des cellules DN T, nous avons entrepris de déterminer si une interaction additive entre les deux locus validés pouvait restaurer le nombre de cellules DN T au niveau observé dans les souris B10.BR. Pour ce faire, des souris double congéniques pour les locus *Idd2* et *Idd13* ont été

généérées (Article 2). La combinaison du locus *Idd13* au segment d'*Idd2* a permis de déterminer que ces deux locus sont suffisants dans les souris congéniques TCR 3A9 :insHEL pour produire une fréquence de cellules DN T égale à celle retrouvée chez les souris B10.BR TCR3A9 :insHEL (Article 2, figure 2). Ensemble, les articles 1 et 2 apportent des informations importantes quant à la régulation de la proportion de cellules DN T dans le modèle TCR 3A9 :insHEL. Ces travaux ont montré la nature multigénique du contrôle des cellules DN T, mais aussi que différents locus sont impliqués selon la présence ou non de l'autoantigène reconnu par les cellules T, et selon l'organe lymphoïde étudié.

L'augmentation d'une population cellulaire dans un organe donné peut être due à différents facteurs : une plus grande production, une plus grande prolifération, une apoptose moindre ou une migration préférentielle. Les travaux de notre laboratoire sur le contrôle génétique des cellules DN T par les locus *Idd2* et *Idd13* supportent une collaboration entre ces différents mécanismes. En effet, la comparaison des souris de fond génétique B10.BR et NOD.*H2^k* montre des différences dans la proportion de cellules DN T dans le thymus, la rate et les ganglions lymphatiques, où la proportion et le nombre de cellules DN T est augmenté chez les souris B10.BR TCR 3A9 et TCR 3A9 :insHEL en comparaison aux souris de fond génétique NOD.*H2^k* portant les même transgènes. Toutefois, alors que la proportion de cellules DN T thymiques est partiellement augmentée dans le thymus de souris congéniques TCR 3A9 :insHEL NOD.*H2^k*-*Idd2/Idd13*, suggérant un léger impact sur la production thymique, les ganglions lymphatiques de ces souris possèdent des niveaux des cellules DN T comparables aux animaux de fond génétique B10.BR. Ceci montre qu'au-delà de l'effet des locus sur la production des cellules DN T, un mécanisme périphérique comble l'écart entre la lignée congénique pour *Idd2/Idd13* et la lignée B10.BR. Les résultats de l'article 2 pointent fortement vers un rôle du cycle cellulaire et de la prolifération périphérique dans la modulation des cellules DN T médiée par les deux locus validés.

Tel que démontré dans l'article 4, les cellules DN T non-transgéniques semblent se distinguer des cellules T CD4 et CD8 en ce qui concerne le cycle cellulaire, tel qu'indiqué par la plus grande proportion de cellules DN T positives pour Ki-67 dans les souris CD1d ko (Article 4, figure 3B). Dans ce contexte non-transgénique du modèle CD1d ko, les cellules DN T prolifèrent davantage que les cellules T CD4 ou T CD8, comparativement au modèle TCR

3A9 transgénique où les cellules DN T de souris B10.BR sont moins positives pour le marqueur Ki-67 que les cellules T CD4 ou CD8. Des différences entre les modèles pourraient être dues à des différences de répertoire (monoclonal vs polyclonal), de spécificité au CMH (classe II vs diverse), ou encore à l'environnement plus ou moins propice à l'activation. La combinaison des informations recueillies par les modèles transgéniques antigène-spécifiques et les modèles non-transgéniques permet au final de dresser un portrait des facteurs influençant ces cellules DN T immunorégulatrices. L'identification des polymorphismes génétiques liés à la modulation de la proportion et du nombre de cellules DN T sera facilitée par l'évolution de nos connaissances sur la biologie de ces cellules.

6.1.3 La modulation du nombre de cellules DN T thymiques

Le thymus n'a pas été étudié lors de l'analyse de liaison génétique menée par notre groupe, dont les résultats sont rapportés dans l'article 1. Les locus génétiques influençant la proportion de cellules DN T ont donc jusqu'à présent surtout expliqué les variations de cellules DN T périphériques, avec peu d'effet sur la population thymique. Bien que l'augmentation des DN T thymiques ne semble pas nécessaire à l'augmentation des cellules DN T périphériques, il n'est pas exclu qu'elle puisse avoir un rôle. Alors que des différences peuvent tout de même être observées quant à la proportion cellules DN T entre les souris NOD.*H2^k* et B10.BR transgéniques pour le TCR 3A9 (Article 2, figure 4) [434], l'association entre les DN T thymiques et la tolérance immune n'a pas été bien établie. Certains locus pourraient influencer davantage la sélection thymique des cellules DN T, mais une différence dans l'homéostasie périphérique des cellules DN T semble être suffisante dans le modèle TCR 3A9 :insHEL pour restaurer un haut nombre de cellules DN T périphériques. Une certaine dissociation existe donc entre les locus déterminant le nombre de cellules DN T thymiques et périphériques. Par exemple, la délétion du gène encodant la protéine CD47 n'influence pas la proportion de cellules DN T thymiques, alors qu'une sévère réduction périphérique de ces cellules peut être observée [378, 434]. Ainsi, il pourrait être intéressant de déterminer quels sont les facteurs génétiques contribuant à l'augmentation des DN T thymiques dans les souris TCR 3A9 ou TCR 3A9 :insHEL de fond génétique B10.BR comparativement aux souris de

fond génétique NOD.*H2^k*, et de vérifier leur influence sur la prédisposition à l'auto-immunité et la distribution de la population de cellules DN T périphériques.

Grâce aux approches par lignées congéniques, nos études ont pu ajouter à d'autres, et valider le rôle de facteurs génétiques contenus dans les régions *Idd2* et *Idd13* dans la détermination de la proportion de cellules DN T et de leur cycle cellulaire. L'utilisation d'une approche bio-informatique dans l'Article 2 a finalement permis de cibler le processus de cycle cellulaire et de mitose en particulier dans l'investigation d'une interaction entre les locus *Idd2* et *Idd13*.

6.1.4 Exploitation du Collaborative Cross

Lors de notre analyse de liaison génétique, nous avons eu recours à des souris F2 portant le TCR 3A9 transgénique, afin d'augmenter la sensibilité de détection des variations dans la proportion de cellules DN T. En comparaison aux souris portant le transgène TCR 3A9, des animaux non-transgéniques de même fond génétique possèdent une faible proportion de cellules DN T [290]. Toutefois, les souris NOD et NOD.*H2^k* possèdent tout de même moins de cellules DN T que les souris B10.BR [378] (données non-publiées reliées à l'article 3), et il en va de même pour les souris NOD.CD1d ko, en comparaison aux souris B6.CD1d ko (données non-publiées, E.E. Hillhouse). Dans l'optique d'une approche génétique visant à identifier les locus régulant la proportion de cellules DN T chez les souris non-transgénique, il serait nécessaire d'utiliser des lignées parentales possédant le plus grand écart possible dans leur proportion de cellules DN T. Bien que les lignées B6 et NOD soient de bonnes candidates, d'autres lignées de souris pourraient présenter des écarts de phénotype encore plus grands et être utilisées pour une analyse de liaison génétique en contexte non-transgénique. Sans se limiter à des souris F2, il est aussi maintenant possible d'exploiter les lignées du CC, discutées dans la section 1.3.2.3, afin d'identifier les locus régulant divers phénotypes, dont les proportions de cellules immunitaires. Nous avons caractérisé le phénotype des 8 lignées fondatrices du CC, en plus d'étudier la proportion de cellules DN T et d'autres types cellulaires dans plus de 60 lignées de la cohorte australienne CC, en collaboration avec l'équipe du Dr Morahan (Annexe 5, article en préparation pour soumission au *Journal of Immunology*). Nos résultats concernant les lignées fondatrices (Annexe 5, table I et Annexe 6)

montrent que la lignée B6 possède bien la plus haute proportion de cellules DN T dans la rate. Toutefois, c'est la lignée CAST qui s'est révélée en posséder le moins. Des polymorphismes entre cette lignée et la lignée B6 pourraient donc permettre de plus fortes variations dans la proportion de cellules DN T que les polymorphismes présents entre les lignées NOD et B6. Malheureusement, les résultats de notre cohorte du CC n'ont révélé aucun locus significativement associé au contrôle de la proportion de cellules DN T (Annexe 7). Plutôt, seuls deux locus, l'un sur le chromosome 3 et l'un sur le chromosome 6, atteignent à peine le seuil suggestif établi à un LOD score de 5.6 correspondant à une p-value de 0.01. Dans le croisement complexe qu'est le CC, il semble que plusieurs locus d'influence individuellement mineure interagissent pour déterminer la proportion de cellules DN T. Ceci implique que l'étude d'un nombre plus élevé de lignées du CC serait nécessaire afin d'identifier les locus participant aux plus fortes variations de cellules DN T, s'il y a lieu.

Bien que l'étude des lignées du CC n'ait pas révélé de nouveaux locus majeurs impliqués dans le contrôle des cellules DN T, les informations obtenues lors de cette étude pourraient se révéler utiles dans de futurs projets, par exemple en combinant les données recueillies par différentes équipes afin d'en extraire des corrélations et associations. De plus, nos résultats montrent que l'une des lignées du CC, nommée Yox, se présente avec une proportion de cellules DN T très élevée en comparaison avec les autres lignées étudiées et les lignées fondatrices (Annexe 6). L'étude de la lignée Yox pourrait apporter de précieuses informations sur les mécanismes permettant de générer une haute proportion de cellules DN T dans des animaux non-transgéniques. L'investigation plus en profondeur des particularités génétiques de cette lignée pourrait aussi permettre de révéler les conditions génétiques contribuant à une si haute proportion de cellules DN T, que ce soit une mutation, de l'épistasie ou une combinaison optimale d'un ensemble de locus contribuant au trait de façon additive.

Pour toutes les lignées du CC, bien que les iNKT aient été exclus, des cellules NKT de type II peuvent être présentes parmi la population de cellules DN T de ces souris, et l'interprétation des résultats doit en tenir compte.

6.1.5 Les variations des cellules DN T chez l'humain

Les études s'intéressant aux variations du nombre de DN T chez l'humain parviennent à des conclusions variées quant à l'impact d'une augmentation de cellules DN T. Par exemple, alors que des études portant sur le rejet de greffe et la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) concordent avec les études murines et suggèrent un rôle protecteur d'un nombre élevé de cellules DN T [512], des études s'intéressant au syndrome lymphoprolifératif autoimmun, au lupus ou à l'auto-immunité juvénile suggèrent au contraire une corrélation positive entre les pathologies et un nombre élevé de cellules DN T [513, 514].

Considérant les conclusions différentes en fonction de la maladie étudiée en ce qui concerne l'impact de la proportion de cellules DN T chez l'humain dans la tolérance immune, il est crucial d'identifier des marqueurs cellulaires définissant les cellules DN T immunorégulatrices fonctionnelles. Bien que des résultats obtenus dans le modèle transgénique TCR 3A9 :insHEL suggèrent que la fonction immunorégulatrice des cellules DN T n'est pas affectée chez des souris prédisposées au diabète, il n'est pas exclu que des différences fonctionnelles puissent exister en fonction de la pathologie étudiée. Par exemple, il a été montré que des cellules DN T de patients atteints de lupus produisent davantage d'IL-4 en comparaison avec des donneurs sains, ou même en comparaison avec des patients atteints d'arthrite rhumatoïde [515]. La production d'IL-17, d'interféron gamma (IFN γ) et de *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) par les cellules DN T des patients atteints de lupus [513] pourrait aussi être une distinction fonctionnelle associée à leur potentielle pathogénicité.

Enfin, tel que mentionné précédemment, d'autres populations de cellules T portent le phénotype double négatif CD4-CD8-, notamment des cellules NKT de type I ou de type II et des cellules T $\gamma\delta$. Il est donc aussi possible que les divergences entre les conclusions des différentes études soient liées aux stratégies d'identification des cellules considérées DN T. L'avantage des modèles murins est de pouvoir permettre l'exclusion totale des cellules NKT grâce à des modèles génétiquement modifiés, tels que par l'utilisation de CD1d ko ou de TCR transgéniques. Ces systèmes possèdent eux aussi leurs limitations, et l'étude des cellules DN T et de l'influence de leur nombre et phénotype dans des maladies autres que la GVH ou le diabète a été peu étudié. Toutefois, dans l'optique de déterminer les facteurs permettant la

modulation des cellules DN T, les modèles murins génétiquement modifiés constituent un excellent point de départ.

6.2 Le développement de cellules DN T

6.2.1 Pourquoi s'intéresser au développement des cellules DNT

Des variations dans le nombre de cellules DN T périphériques sont associées à la résistance au diabète auto-immun, et ces variations peuvent être régulées de façon génétique par les locus *Idd2* et *Idd13* (Articles 1 et 2) [290]. En complément à l'approche génétique, identifier les voies de développement des cellules DN T a aussi pour but d'élucider les facteurs permettant de moduler le nombre de cellules DN T, que ce soit au niveau du thymus ou de la périphérie. Les études s'intéressant au développement des cellules DN T sont parvenues au fil du temps à diverses conclusions concernant l'origine de ces cellules. Les modèles reposant sur l'utilisation de TCR transgéniques ont apporté d'intéressantes informations concernant notamment les ressemblances entre les cellules DN T et les cellules T $\gamma\delta$. Ces études proposent que les cellules DN T soient des cellules T $\gamma\delta$ redirigées vers un choix TCR $\alpha\beta$ [436, 516]. Toutefois, les modèles transgéniques ne sont pas parfaitement représentatifs des étapes normales du développement thymique, considérant l'expression précoce du TCR. Sans invalider les découvertes utilisant les modèles transgéniques, il convient de les mettre en perspective et d'étudier l'origine des cellules DN T dans des contextes davantage physiologiques.

Puisque les cellules NKT, particulièrement les NKT de type II, sont très similaires aux cellules DN T immunorégulatrices, il est possible que certaines conclusions tirées sur l'origine de cellules T CD4-CD8- concernent en fait les NKT, ou inversement, selon les marqueurs utilisés. Particulièrement, les études réalisées avant l'utilisation des tétramères de CD1d étudiaient souvent une population mixte contenant les cellules DN T et les NKT, par exemple lorsque CD49b était utilisé comme marqueur de cellules NKT. Effectivement, certaines cellules DN T expriment CD49b, et auraient donc pu être considérées comme des cellules NKT par certaines études [437, 517]. Le développement des tétramères CD1d pour l'étude spécifique des iNKT permet d'en exclure les cellules DN T, mais un marqueur positif spécifique aux cellules DN T n'a toujours pas été validé. Grâce aux modèles murins déficients pour CD1d, et ne possédant donc pas de cellules NKT, il est possible d'étudier spécifiquement les cellules DN T CD1d indépendantes et leurs caractéristiques. Nous avons pris avantage de

tels modèles pour définir l'origine et les propriétés des cellules DN T dans l'article 4 de cette thèse.

6.2.2 La sélection thymique des DN T

6.2.2.1 Signal TCR et restriction au CMH

Nos travaux ont révélé certaines des propriétés uniques de ce rare type cellulaire. Par exemple, les cellules DN T, au contraire des NKT [517] ou d'autres cellules T dites « innées » [518], possèdent un phénotype naïf dans le thymus, alors que leur expression accrue du marqueur CD44 en périphérie rappelle plutôt celui de cellules activées ou mémoires (Article 4, Figure 1 et Annexe 8). D'ailleurs, un phénotype activé des cellules DN T a aussi été observé au laboratoire lors de la comparaison des cellules DN T dans des souris TCR 3A9, TCR 3A9 :insHEL et CD1d ko. Ces résultats générés par E.E. Hillhouse montraient que les cellules DN T périphériques étaient davantage activées dans les souris TCR 3A9 :insHEL, où l'antigène reconnu par le TCR est présent, que dans les souris portant simplement le transgène TCR 3A9. Les cellules DN T de souris CD1d ko non-transgéniques possédaient un phénotype davantage similaire à celles des souris TCR 3A9 :insHEL pour les marqueurs CD122, CD69 et CD44, suggérant une reconnaissance de leur antigène en périphérie. Ce phénotype activé, combiné aux indices d'un fort signal TCR dans le thymus (niveaux de Nur77), suggère que les cellules DN T non-transgéniques seraient spécifiques pour des antigènes du soi.

Il est intéressant de noter que les cellules DN T, exprimant de forts niveaux de Nur77 dans le thymus, possèdent pourtant de faibles niveaux du marqueur CD5 (Article 4, Figure 6), lui aussi associé à la sélection agoniste et à un fort signal TCR [80]. Cette observation de différents niveaux de CD5 et Nur77, bien que surprenante, a toutefois déjà été rapportée dans le cas de cellules NKT rétrogéniques [519]. La faible corrélation entre les niveaux de CD5 et Nur77 dans les cellules DN T en comparaison aux cellules T CD4 et CD8 pourrait suggérer des voies de signalisation distinctes lors du signal TCR.

Dans le modèle TCR 3A9 transgénique, les cellules DN T thymiques ne sont pas réduites lorsque l'antigène HEL est présent, supportant une hypothèse que ces cellules ne sont pas

soumises à la délétion par sélection négative. D'un autre côté, toujours dans le modèle TCR 3A9, la présence de l'antigène HEL dans le thymus ne favorise pas non plus de façon significative la production de cellules DN T [434]. En contraste, il est connu que les cellules Treg sont davantage produites dans des modèles similaires lorsque l'antigène est présent [520-522]. Les cellules DN T recevraient donc un fort signal TCR, mais leur sélection semble dépendre de différents critères de présentation antigénique que la sélection agoniste des cellules Treg.

Lors de la sélection thymique, l'expression des molécules de CMH de classe I et de CMH de classe II est nécessaire à la sélection positive des cellules T CD4 et CD8, respectivement. Outre les molécules classiques de présentation d'antigène, des molécules non classiques existent également, dont certaines comme CD1d, H2-M3 et MR1 sont associées à la sélection de cellules T dites innées [33, 37, 79, 480, 523-525]. La molécule beta-2-microglobuline participe quant à elle à la structure des molécules de CMH de classe I, incluant les molécules non-classiques CD1d [526] ou MR1 [525, 527].

Grâce à l'utilisation de souris ko, nous avons évalué l'effet sur les cellules DN T de l'absence de différentes molécules de CMH, en comparaison à l'effet connu qu'ont ces déficiences sur les cellules T CD4 et CD8. Les cellules DN T semblent moins dépendantes d'un type de CMH particulier pour leur sélection et survie, puisqu'elles sont présentes dans le thymus de souris déficientes pour la molécule $\beta 2m$ ainsi que dans le thymus de souris déficientes pour les molécules de CMH de classe II. Toutefois, l'absence de $\beta 2m$ est suffisante pour réduire la proportion et le nombre de cellules DN T tant dans le thymus (Article 4, Figure 7) que dans la rate (Annexe 9) comparativement à des souris CD1d ko ($\beta 2m^{+/+}$) et l'absence de CMH II, combiné à l'absence de $\beta 2m$ ($\beta 2mMHCII$ double ko) réduit aussi les cellules DN T comparativement à des souris uniquement déficientes pour $\beta 2m$. Ces données sur les souris $\beta 2m$ et CMH II ko concordent avec les observations d'un autre groupe s'intéressant aux cellules DN T thymiques, mais qui n'avait pas étudié l'impact de la double déficience $\beta 2mMHCII$ [86].

L'utilisation de souris ko pour évaluer la restriction au CMH des cellules DN T possède tout de même ses limites. Particulièrement en périphérie, les variations observées dans les populations de cellules T dans les souris déficientes pour différentes combinaisons de

molécules de CMH (Annexe 9) peuvent être dues à des mécanismes homéostatiques et à une compétition entre les types de cellules T. Il est intéressant de noter que, bien que les cellules DN T ressemblent aux cellules T CD8 sur plusieurs points, elles semblent compétitionner avec les cellules T CD4. Par exemple, dans les souris CMHII ko, où les cellules T CD4 sont drastiquement réduites, le nombre et la proportion de cellules DN T sont augmentés. Ceci pourrait être dû à une compétition avec les cellules T CD4 pour des facteurs solubles ou l'interaction avec les APC, ou pourrait être dû à un avantage intrinsèque des cellules DN T indépendantes du CMH II.

6.2.2.2 Sélection des cellules DN T sur cellules hématopoïétiques

Sachant maintenant que certaines cellules DN T peuvent dépendre du CMH pour leur sélection thymique, l'une des questions restante est la nature des cellules thymique pouvant permettre la sélection des cellules DN T. Effectivement, alors que les cellules T conventionnelles sont sélectionnées par des cellules cTEC, les NKT, les cellules MAIT et certaines cellules T CD4 et T CD8 non conventionnelles peuvent être sélectionnées par des cellules hématopoïétiques lorsque les bonnes conditions sont présentes [33-36, 79, 426, 501].

Nous avons donc procédé par une approche de chimères hématopoïétiques, où les animaux donneurs et receveurs étaient CD1d ko ou β 2mMHCII double ko, en 4 combinaisons possibles, tel que détaillé à l'Annexe 10. Ceci a permis d'étudier la sélection des cellules DN T en présence de CMH uniquement sur les cellules thymiques radiorésistantes (groupe TEC) ou uniquement sur les cellules transférées de la moelle (groupe HC) en comparaison à des groupes contrôles positifs (TEC and HC) et négatifs (no MHC). Surprenamment, le nombre de cellules DN T ne différait pas significativement entre les groupes, alors que des souris β 2mMHCII double ko intactes possèdent beaucoup moins de cellules DN T que les animaux CD1d ko. Toutefois, nous avons pu observer une différence dans l'expression de CD5, associé au signal TCR, et dans l'expression de CD44 et CD24, associées à la maturation et l'activation des cellules T. La comparaison des 4 groupes de chimères pour l'expression de CD5 a montré que l'expression du CMH sur l'un ou l'autre des compartiments (TEC ou HC) permettait une expression similaire de CD5, qui était plus élevée que le groupe contrôle. Ceci suggère que les cellules épithéliales, mais aussi les cellules hématopoïétiques peuvent participer à la sélection

des cellules DN T. L'expression de CD44 et CD24 a quant à elle pu montrer que les cellules DN T sélectionnées sur des cellules hématopoïétiques possèdent un phénotype similaire à celles sélectionnées sur des cellules épithéliales. Les cellules DN T diffèrent donc sur ce point avec les NKT, les cellules MAIT et certaines cellules T CD8 « innate-like » exprimant toutes CD44.

Quelques points communs peuvent être observés entre différents types de cellules T sélectionnées sur des cellules hématopoïétiques [427]. Par exemple, les cellules NKT [75], les cellules CD8 « innées » [426] et T-CD4 [425] dépendent toutes de la voie de signalisation SLAM-SAP-Fyn. Les cellules MAIT échappent cependant à la dépendance à SAP, et se distinguent par là des autres cellules sélectionnées par une population hématopoïétique [427, 458, 528]. Dans le cas des cellules DN T, leur dépendance à cette voie de signalisation n'est pas connue, et serait une piste intéressante à investiguer qui ajouterait des informations au modèle de développement des cellules DN T. Finalement, il a été suggéré que les cellules pouvant être sélectionnées positivement par des cellules hématopoïétiques possèderaient un TCR de plus grande affinité pour son antigène [529].

Des études ultérieures portant sur l'identification des types cellulaires hématopoïétiques et épithéliaux médiant la sélection des cellules DN T dans le thymus permettraient de mieux comprendre le type de signaux nécessaires à la sélection de ces cellules, et comment les événements de sélection thymique peuvent influencer les propriétés immunorégulatrices des cellules DN T. Les cellules hématopoïétiques pouvant potentiellement médier la sélection de cellules T par présentation antigénique incluent les thymocytes DP, comme pour la sélection des NKT et des cellules MAIT [36, 501], ou les DC et les cellules B. Des cellules B ont d'ailleurs été rapportées pour présenter des antigènes du soi dans le thymus [109]. Au contraire des DC et des cellules B, les thymocytes DP n'expriment pas le CMH de classe II chez la souris, et ne pourraient donc pas participer à la sélection des cellules DN T restreintes au CMH de classe II.

6.2.3 Une origine DP vs TN des cellules DN T thymiques

Les cellules portant le TCR $\alpha\beta$ se développent typiquement à partir d'un précurseur DP, alors que les cellules exprimant un TCR $\gamma\delta$ sont produites à partir d'un stade TN.

Toutefois, des exceptions à cette règle ont été rapportées. Par exemple, quelques cellules NKT CD4-CD8- semblent pouvoir être produites à partir d'un stade TN [438], tel que montré par des modèles de souris rapporteuses couplés à des expériences de délétion conditionnelle.

Bien qu'il semble que la plupart des cellules DN T procèdent par un stade DP, tel que nos résultats obtenus de 3 types de souris rapporteuses différentes (Article 4, figure 4 et figure S7, il n'est pas exclu qu'une minorité de cellules DN T puissent se différencier directement à partir d'un stade TN. En effet, l'expression de YFP régulé par le promoteur de CD4 n'est pas aussi élevée que celle des cellules T CD4 ou CD8. L'hypothèse d'une origine TN des cellules DN T est toutefois difficile à tester de façon physiologique. Bloquer la différenciation thymique au stade DP, de façon similaire aux expériences menées par Dashtsool *et al* [438], forcerait artificiellement la seule sélection de cellules procédant par un stade TN, et leur prolifération accrue en périphérie. De plus, l'utilisation de systèmes de délétion conditionnelle *in vivo* peut être imparfaite en ce qui concerne l'expression du transgène par la totalité d'une population. Plutôt que l'absence d'expression d'un facteur spécifique des cellules DP par les cellules DN T, il serait nécessaire d'étudier l'expression positive d'un marqueur spécifique à un stade TN.

6.2.4 Les similarités avec les cellules T CD8, une origine SP

Nos résultats mettent en valeur les ressemblances et distinctions entre les cellules DN T et les lymphocytes T conventionnels CD4 et CD8, de même qu'avec les cellules T régulatrices. Il est intéressant de remarquer les grandes ressemblances entre les cellules DN T et les cellules T CD8, au niveau de la restriction au CMH, mais aussi au niveau de leur répertoire d'expression des chaînes TCR V β (Annexe 11). Une telle ressemblance du répertoire des DN T et des cellules T CD8 avait déjà été rapportée et suggérait un lien ontogénique entre ces deux types cellulaires [530]. Il est possible que les similitudes entre cellules DN T et cellules T CD8 soient liées à leur rôle cytotoxique et à leur restriction au CMH de classe I, deux points communs qui n'impliquent pas nécessairement un lien de précurseur entre ces populations cellulaires.

Les résultats de l'article 4 indiquent que les cellules DN T thymique ne proviennent pas du stade CD8. Toutefois, dans la rate, presque la moitié des cellules DN T avaient une activité de l'amplificateur E8I (spécifique pour les cellules CD8 T matures) à un moment ou un autre, tel que montré par l'étude de souris rapporteuses (Annexe 12). Nous avons également observé une augmentation liée à l'âge dans la proportion de cellules DN T positives pour l'expression de YFP induite par E8i. Ces résultats supportent une proximité biologique entre les cellules CD8 T et les cellules DN T périphériques. Des transferts adoptifs de cellules CD8 T sur de longues périodes de temps seraient toutefois nécessaires afin de démontrer hors de tout doute qu'il y a conversion. Plutôt, une autre interprétation possible est que les cellules DN T utilisent E8I suite à leur activation. Effectivement, l'amplificateur E8i dirige aussi l'expression de CD8 α par les cellules exprimant des homodimères de CD8 α [531]. L'expression de CD8 $\alpha\alpha$, qui n'agit pas comme co-récepteur, mais plutôt comme répresseur du signal TCR, peut être un marqueur d'activation des cellules T [532, 533].

Grâce à des transferts adoptifs réalisés en contexte lymphopénique [86, 439] ou non-lymphopénique [395], des données suggèrent que les cellules DN T thymiques contiennent des précurseurs des cellules T CD8 $\alpha\alpha$ IEL. Ainsi, les cellules DN T thymiques et périphériques peuvent migrer à l'intestin et exprimer CD8 $\alpha\alpha$ en présence des signaux appropriés tels que la cytokine IL-15 ou l'activation du TCR [395]. L'expression de E8I-YFP par les cellules DN T de la rate pourrait donc aussi indiquer la réversion de l'expression de CD8 $\alpha\alpha$ par des cellules DN T ayant transité par l'intestin. Puisque les cellules DN T sont définies par l'exclusion de CD8 α à leur surface, la vérification de l'expression intracellulaire de CD8 α par les cellules DN T E8I-YFP+ pourrait être utile à déterminer si la transcription de CD8 α s'inscrit avant ou à la suite de l'expression du signal YFP dans les cellules DN T. D'autres méthodes, telles que l'étude de la transcription en temps réel pourraient aussi être appliquées [534].

6.2.5 Impact de la voie de développement sur la fonction des cellules DN T

La voie de différenciation des cellules T peut influencer leur efficacité à monter une réponse immunitaire et protéger contre des pathogènes. Par exemple, une origine thymique ou extrathymique a des impacts sur la capacité des cellules T CD4 et CD8 à contrôler une

infection [535]. Il pourrait en aller de même avec la restriction au CMH des cellules DN T, ou avec les cellules DN T dérivant de cellules T CD8 ou non. Nos résultats indiquent que les cellules DN T peuvent être restreintes à différentes molécules de CMH, ou même en être indépendantes. Le rôle cytotoxique antigène-spécifique des cellules DN T a surtout été étudié dans les modèles transgéniques, tels que le modèle TCR 2C et le modèle TCR 3A9, où les cellules T sont respectivement restreintes aux CMH de classe I et au CMH de classe II. Il est intéressant de noter que les seules cibles cellulaires validées des cellules DN T 3A9 sont les cellules B présentant l'antigène HEL. En contraste, les cellules DN T 2C, restreintes au CMH de classe I, peuvent éliminer des cellules T CD8, des cellules B et des DC [376]. La fonction des cellules DN T non-transgéniques n'a pas été longuement étudiée dans le modèle CD1d ko, mais des données générées par Erin Hillhouse suggèrent que les cellules DN T de souris NOD.CD1d ko seraient cytotoxiques envers des cellules B présentant des antigènes dérivés d'îlots pancréatiques, en ligne avec les résultats obtenus dans le modèle TCR 3A9. Basé sur les modèles utilisant d'autres modèles non-transgéniques pouvant contenir des NKT, les cellules DN T non-transgéniques pourraient également éliminer une diversité de cibles cellulaires [376].

Nos données comparant les cellules DN T de souris déficientes pour le CMH I, pour le CMH II, ou encore pour la combinaison des deux types, indique qu'elles maintiennent un répertoire polyclonal et un phénotype apparenté à celui de cellules activées ou mémoires, représenté par l'expression de CD44 par la majorité des cellules DN T. Les cellules DN T périphériques de souris déficientes pour les différents types de CMH se présentent tout de même avec de légères altérations de phénotype, qui pourraient altérer leur fonction. En particulier, l'expression de CD5 par les cellules DN T périphériques de souris CMHIIko et de souris β 2mCMHII double ko est significativement augmentée en comparaison avec les cellules DN T provenant de souris CD1d ko. Cette forte expression de CD5 a également déjà été observée par des cellules DN T provenant de souris CD4/CD8/CMHI/CMHII ko (Quad-Ko), et reflète possiblement la forte prolifération homéostatique des cellules DN T périphériques dans un environnement dont les populations lymphocytaires sont altérées. Des niveaux élevés de CD5 sont associés à une meilleure prolifération homéostatique [536, 537], suggérant que la déficience en CMH II favorise la prolifération périphérique des cellules DN T possédant de

plus hauts niveaux de CD5. L'étude des cibles cellulaires et de la fonction des cellules DN T en fonction de leur restriction au CMH permettrait possiblement de réconcilier les conclusions issues des modèles reposant sur l'utilisation de TCR transgéniques.

L'utilisation de E8I par certaines cellules DN T périphériques suggérant une origine CD8 α +, pourrait aussi influencer la fonction de ces cellules. Notamment, lors de l'étude des souris rapporteuse E8I, nous avons effectivement observé des différences significatives entre les cellules DN T YFP+ et les cellules DN T YFP- en ce qui concerne *Eomesodermin* (Eomes). Ce facteur de transcription est associé chez les cellules T CD8 à une meilleure compétition et survie des cellules mémoires[538]. Eomes est aussi associé à un sous-type non-conventionnel de cellules T CD8 mémoires "virtuelles" ou "innate-like", davantage présentes chez les souris âgées et dont le phénotype CD244+CD62L+ rappelle celui des cellules DN T [539]. Même si le rôle de l'expression d'Eomes par les cellules DN T demeure à définir, l'accumulation dans le temps de cellules DN T ayant exprimé E8I, de même que l'expression accrue d'Eomes par ces cellules (Annexe 12), concorderait donc avec un avantage de survie de cellules DN T activées ou mémoires.

Qu'un processus similaire d'induction de phénotype mémoire suite à un signal d'interférons de type 1 soit présent chez les cellules DN T périphériques, ou que des cellules T CD8 $\alpha\beta$ activées perdent plutôt l'expression de leur co-récepteur, reste à déterminer. Effectivement, bien qu'il soit maintenant clair que certaines cellules DN T ont exprimé CD8 α , leur expression précédente de CD8 β par des cellules matures n'a pu être déterminée grâce à des souris rapporteuse. En effet, les autres séquences amplificatrices du promoteur de CD8 (E8II, E8III, E8IV et E8V) sont exprimées au stade thymique DP [415] et ne seraient donc pas appropriées à l'étude d'une origine CD8 $\alpha\beta$ SP des cellules DN T.

6.2.6 Parallèles entre les cellules DN T et les cellules mémoires

Les cellules DN T périphériques possèdent un phénotype particulier en ce qui a trait aux marqueurs CD62L et CD44 (Article 4, Figure 1), rappelant un phénotype de cellules

mémoires ou effectrices, qui sont CD44^{hi} plutôt que de cellules naïves (CD44^{lo}) [13, 540, 541]. L'homéostasie des cellules T mémoire, en comparaison aux cellules naïves, repose moins sur les interactions avec le CMH, et davantage sur les cytokines IL-7 et IL-15 [542]. Des transferts de cellules DN T provenant de souris CD1d ko vers des animaux déficients pour les molécules de CMH I et de CMH II pourraient déterminer si les cellules DN T sélectionnées en présence de ces molécules sont indépendantes des signaux de CMH une fois en périphérie.

Dans des souris non immunisées, des cellules possédant un phénotype mémoire ont déjà été rapportées, particulièrement parmi les populations de cellules T CD8. Ces cellules T CD8 « mémoires innées », ou « mémoires virtuelles » pourraient entre autre être induites suite à une exposition à un environnement lymphopénique ou à la cytokine IL-4 [543, 544]. Quelques points distinguent toutefois les cellules DN T des cellules « mémoires virtuelles » : la dépendance à l'IL-4 produite par les NKT, et la présence du phénotype mémoire au stade thymique. Effectivement, les cellules DN T et leur phénotype activé ne dépendent pas complètement des cellules NKT, et les cellules DN T thymiques possèdent un phénotype naïf, c'est-à-dire CD44⁻ (Annexe 8). Ceci suggère que même en absence d'immunisation, l'acquisition du phénotype « mémoire » des cellules DN T en périphérie repose sur des mécanismes différents de ceux observés pour les cellules T CD8 « mémoires innées ». Une contribution partielle des cellules NKT au phénotype activé des cellules DN T de souris CD1d⁺ n'est toutefois pas écartée.

Enfin, nos résultats (Annexe 14) ainsi que des études précédentes[545] montrent un enrichissement des cellules DN T dans la moelle osseuse, connue pour être un niche préférentielle de cellules mémoires. La fonctionnalité des cellules DN T de la moelle osseuse a été peu étudiée, mais leurs niveaux plus élevés de CD69 en comparaison avec les cellules DN T provenant de la rate ou des ganglions lymphatiques (Article 4, Figure 1 et Annexe 8) laisse croire à une population cellulaire activée. La nature de ces cellules, circulantes ou résidentes, n'a pas été déterminée. Investiguer la fonctionnalité des cellules DN T de la moelle osseuse, en comparaison avec la population présente dans la rate chez la souris, ou dans le sang chez l'humain, pourrait s'avérer important dans de futures thérapies cellulaires. Un enrichissement de cellules DN T immunorégulatrices antigène-spécifiques dans la moelle osseuse pourrait

permettre d'optimiser le prélèvement de ces cellules chez des patients atteints d'auto-immunité.

6.3 Les modèles d'étude des cellules DN T

Les cellules DN T représentent un rare sous-type chez les souris non-transgéniques telle que la lignée B6. Outre la possibilité de contamination des cellules étudiées par les NKT de type II, le faible pourcentage des cellules DN T représente un défi en ce qui concerne l'étude de leurs propriétés. Différents modèles menant à une augmentation marquée du nombre de DN T peuvent être utilisés pour remédier à la rareté de ces cellules et favoriser leur étude. Toutefois, ces modèles reposent sur des altérations de processus clés déterminant la sélection, mort ou survie des cellules T.

6.3.1 Interférer avec l'apoptose

6.3.3.1 Le modèle *lpr*

L'interaction entre FAS et son ligand est impliquée dans la voie de l'apoptose, et les cellules exprimant FAS meurent suite à la liaison du ligand présent sur une autre cellule. Cette interaction est d'ailleurs l'un des mécanismes par lequel des cellules T cytotoxiques, pouvant exprimer FAS-L, éliminent des cellules cibles exprimant FAS [546]. La mutation *lpr*, menant à une variante non-fonctionnelle de la molécule, entraîne un syndrome lymphoprolifératif autoimmun auto-immune (auto-immune lymphoprolifération syndrome, ALPS). Le nombre de cellules DN T est augmenté dans les organes lymphoïdes des souris $Fas^{lpr/lpr}$, particulièrement dans les ganglions lymphatiques. Cette augmentation des cellules DN T est moins marquée dans le thymus (Annexe 15) [547]. Le développement thymique des souris $Fas^{lpr/lpr}$ et même de souris FAS ko procède relativement normalement. Spécifiquement, la sélection négative du répertoire spécifique des superantigènes ne semble pas affectée [548].

Fournissant une explication au moins partielle à l'accumulation spécifique de cellules DN T dans les souris $Fas^{lpr/lpr}$, des études ont montré que l'apoptose des cellules DN T périphériques serait dépendante de FAS [394]. Dans le modèle $Fas^{lpr/lpr}$, il a été proposé que les cellules DN T accumulant en périphérie sont générés à partir de cellules T CD8 [442]. Des études chez l'humain, menées sur un syndrome lymphoprolifératif autoimmun rapportent une similitude du répertoire TCR entre les cellules DN T et les cellules T CD8 oligoclonales, supportant

aussi, bien qu'indirectement, un lien ontogénique entre ces deux types cellulaires [549]. En procédant pas transfert adoptif (suivi grâce aux marqueurs CD45.1 et CD45.2) de cellules T dans des hôtes Fas^{lpr/lpr} ou B6.SJL nous avons également observé la conversion de cellules T CD8 Fas^{lpr/lpr} en cellules DN T négatives pour le tétramère PBS-57:mCD1d. Si les cellules T CD8 d'origine lpr se différencient bien en cellules DN T dans un hôte B6.SJL, nos résultats semblent indiquer que le taux de conversion est moindre que dans un hôte B6.Fas^{lpr/lpr}. Ceci suggère des composantes à la fois intrinsèques et extrinsèques aux cellules T favorisant leur conversion de T CD8 à DN T (Annexe 14, panneau du bas). Il est donc possible que la conversion de cellules T CD8 en cellules DN T soit une voie majeure de production des cellules DN T dans les animaux portant la mutation Fas^{lpr/lpr}, mais ne représente qu'une voie mineure dans un contexte physiologique.

Indiquant un rôle important d'Eomes dans le développement ou la survie des cellules DN T provenant de souris Fas^{lpr/lpr}, il a été observé que la déficience en Eomes prévient le syndrome lymphoprolifératif autoimmun dans les souris Fas^{lpr/lpr} [550]. Considérant nos résultats indiquant une expression accrue d'Eomes par les cellules DN T ayant exprimé CD8 (Annexe 12), il est tentant de proposer qu'Eomes serait impliqué dans la voie de différenciation périphérique de conversion des CD8 T en DN T.

L'un des aspects problématiques du modèle Fas^{lpr/lpr} est l'expression anormale du marqueur B220 par les cellules DN T [551-554] et leur rôle potentiellement pathogénique [555-557], bien qu'un rôle régulateur ait aussi été observé [385, 558]. L'expression de B220 par les cellules T a été associée à l'apoptose et à l'activation. Supportant toutefois un rôle non causal des cellules DN T dans ce modèle, une étude a montré une dissociation entre la proportion de cellules DN T B220+ et la production d'auto-anticorps et la présence de glomérulonéphrite dans des souris Fas^{lpr/lpr} dont les cellules T exprimaient sélectivement FAS grâce à un transgène [559]. Les cellules DN T provenant de souris Fas^{lpr/lpr} pourraient donc avoir une efficacité altérée de leur fonction régulatrice, puisque l'élimination de certaines cibles par les cellules DN T dépend de l'expression de FAS-FASL, et particulièrement de l'expression de FAS sur les cellules cibles [376, 385].

Le modèle Fas^{lpr/lpr} peut donc se montrer utile dans l'étude de la contribution des cellules DN T anormales dans le syndrome lymphoprolifératif autoimmun. Toutefois, le défaut

d'expression de FAS par les cellules DN T a potentiellement une trop grande influence sur la fonction et la différenciation de ces cellules pour que les résultats obtenus dans le modèle Fas^{lpr/lpr} soient bien applicables à un contexte physiologique.

6.3.3.2 Les souris Bim ko

BIM est une molécule pro-apoptotique membre de la famille BCL-2. La déficience en BIM, encodée par le gène *BCL2L11*, est associée à des multiples défauts et altérations de populations cellulaires chez les souris BIM ko [560, 561]. Lors de la sélection thymique, BIM participe à l'apoptose des cellules DP et, bien que n'étant pas nécessaire [562], a été associé à la sélection négative [563, 564]. Les souris déficientes pour BIM se présentent avec une augmentation de cellules DN T matures au niveau du thymus [395, 565]. Au contraire du modèle Fas^{lpr/lpr}, c'est donc au stade de la sélection thymique que les cellules DN T sont affectées par la déficience en BIM. Des travaux menés en utilisant ce modèle ont suggéré que les cellules DN T présentes dans la souris BIM ko procèdent par un stade thymique DP [395]. Ces observations concordent avec nos résultats dans les souris CD1d ko, suggérant que l'absence de BIM ne mène pas à une voie de différenciation thymique des cellules DN T complètement distincte. Le répertoire TCR des cellules DN T est cependant légèrement affecté dans les animaux BIM ko [395]. Comme les cellules DN T présentes dans les souris BIM ko ont été sélectionnées dans des conditions de sélection thymique altérée, davantage de comparaisons entre les cellules DN T BIM ko et des cellules DN T wt seront nécessaires afin d'évaluer l'impact de la délétion de BIM sur la fonctionnalité, le développement et l'homéostasie des cellules DN T.

6.3.2 Les modèles TCR transgéniques : interférer avec le répertoire TCR

Les modèles reposant sur l'utilisation de TCR transgéniques spécifiques d'un antigène connu sont des outils précieux dans l'étude de réactions immunitaires dépendantes de cellules T. Dans ces modèles toutefois, l'expression du TCR survient très tôt durant le développement des thymocytes, avant le stade DP [434, 516, 566]. Les modèles TCR transgéniques permettent la sélection de cellules DN T restreintes aux CMH de classe I, comme les modèles

TCR 2C et HY ou de classe II, comme le modèles TCR 3A9. Dans ces modèles, l'expression d'un répertoire TCR spécifique facilite l'étude fonctionnelle des différents types de cellules T, et peut donner des indices quant à certains aspects de leur homéostasie. Par exemple, dans le modèle TCR 3A9, la présence de l'antigène HEL réduit la proportion de cellules DN T périphériques, suggérant l'influence de l'antigène du soi dans la modulation périphérique de la proportion de ces cellules [434].

Bien que l'augmentation du nombre de cellules DN T dans les modèles transgéniques constitue un net avantage lors de leur étude, ces cellules semblent provenir d'une différente voie de différenciation. Spécifiquement, l'expression précoce du TCR au stade thymique DN_i donne lieu à une population de cellules DN T matures dont les précurseurs ne seraient vraisemblablement pas des thymocytes de stade DP. Cette hypothèse d'une origine TN des cellules DN T présentes dans les modèles TCR transgénique est supportée par quelques études. Spécifiquement, une étude dans le modèle transgénique HY a par exemple montré que l'expression du transgène à partir d'un stade DP grâce au promoteur de CD4 réduit drastiquement la population CD4-CD8- [566]. Enfin, dans le modèle TCR 3A9, les cellules DN T thymiques apparaissent très tôt lors du développement embryonnaire et sont détectables au jour E15, alors que la population de cellules DP est détectée autour de E17 [434].

La voie de différenciation des cellules DN T thymiques dans les animaux transgéniques ne semble donc pas représentative de la voie utilisée par les cellules DN T d'animaux non-transgéniques. Effectivement, le développement de cellules DN T matures (TCR β +) dans le thymus embryonnaire de souris B6.CD1d ko ne précède vraisemblablement pas l'apparition de la population CD4+CD8+ (Article 4, figure S7), et la plupart des cellules DN T de souris B6.CD1d non-transgéniques ont procédé par un intermédiaire ayant exprimé CD4 (Article 4, figure4) et E8III (Article 4, Figure S7), deux indices d'une origine CD4+CD8+. Une comparaison de ces résultats avec des animaux TCR transgéniques issus d'un croisement CD4^{cre}XRosaYFP pourrait indiquer quelle proportion de cellules DN T portant un TCR transgénique ont procédé par un stade DP.

Malgré leur voie de différenciation distincte, les cellules DN T provenant de modèles transgéniques et non transgéniques partagent des similarités fonctionnelles et phénotypiques,

dont la cytotoxicité envers les cellules auto-réactives, et un phénotype activé en présence d'autoantigènes.

6.3.3 Le modèle CD1d ko : interférer avec le développement des NKT

Les cellules NK T sont un sous-type de cellules T non-conventionnelles, de phénotype CD4⁺ ou CD4-CD8⁻, et dont le TCR est restreint à la molécule CD1d. Comme pour les cellules T CD4 et CD8, la sélection des cellules NKT nécessite une reconnaissance de l'antigène spécifique à leur TCR via une molécule présentatrice d'antigène. L'expression de CD1d est spécifiquement nécessaire à la différenciation des cellules NKT. Cette molécule de CMH-I non-classique est exprimée par les cellules présentatrices d'antigènes (comme les cellules B et les cellules dendritiques), mais aussi par les thymocytes DP, qui permettent la sélection des NKT [501].

Alors que l'utilisation de lignées CD1d ko, comme dans l'Article 4, permet de discriminer les cellules DN T des populations de NKT, elle ne remédie pas à la problématique du faible nombre de cellules DN T, ce qui limite l'utilisation de certaines techniques comme les transferts adoptifs. De plus, il est impossible d'exclure que l'élimination des cellules NKT ait un impact sur l'homéostasie ou même la fonction des cellules DN T. Ces deux types cellulaires étant similaires sur de nombreux points, il demeure fort plausible qu'ils partagent une niche commune, ou même qu'ils interagissent d'une façon ou d'une autre dans le contrôle de l'immunité. Bien que la souris CD1d ko constitue l'un des modèles possédant le moins d'altérations biologiques, l'élimination d'une population immunitaire n'est pas sans conséquences. Ainsi, il est connu que les cellules NKT peuvent jouer un rôle protecteur dans le développement du diabète et que les souris NOD CD1d ko se présentent avec une incidence de diabète augmentée [567-569], et certaines études rapportent même une augmentation des manifestations de dermatite auto-immune dans le modèle MRL-lpr en absence de CD1d [570]. Comme CD1d est exprimé par les cellules B [571], des altérations dans développement des cellules B sont aussi observées dans les souris CD1d ko [572].

Nous avons observé que l'expression d'Eomes par les cellules DN T provenant de souris CD1d ko est significativement plus basse que celles de cellules DN T provenant de souris

CD1d⁺ (Annexe 13). Deux possibilités peuvent expliquer cette différence : l'expression marquée d'Eomes par les NKT de type II présents dans la population de cellules DN T de souris CD1d⁺, ou l'influence de l'interaction entre les cellules DN T et les NKT ou des facteurs produits par les NKT. La production de cytokines par les NKT, dont l'IL-4, peut effectivement influencer le phénotype de cellules avec lesquelles ils sont en contact, tels que les cellules T CD4 « innate-like » dans le thymus [79].

Les souris CD1d ko se présentent aussi avec une augmentation de cellules MAIT, un autre sous-type de cellules DN T, portant un TCR invariant V α 33J α 18 [481]. Cependant, les cellules MAIT ne constituent vraisemblablement qu'une faible fraction des cellules DN T de la rate de souris CD1d ko [481], sont surtout présentes au niveau des muqueuses telles que l'intestin ou le poumon [573], et possèdent un répertoire TCR peu diversifié ne correspondant pas au répertoire polyclonal des cellules DN T [481, 482].

Comme le système immunitaire repose sur des interactions complexes entre les différents type cellulaires, il n'est pas exclu que les cellules DN T provenant de souris CD1d ko et de souris CD1d⁺ possèdent des différences fonctionnelles ou développementales. Toutefois, il s'agit jusqu'à présent de l'un des rares modèles permettant l'étude d'une population de cellules DN T « pure », c'est-à-dire dépourvue de contamination par les NKT de type II, qui ne peuvent être exclues autrement.

6.4 La quête d'un marqueur unique aux cellules DN T

Les cellules DN T immunorégulatrices constituent une population difficile à étudier dans les modèles de souris non-transgéniques et chez l'humain. Ces cellules se retrouvent non seulement en faible nombre [372-374], mais se montrent aussi difficile à distinguer d'autres sous-types de cellules T, dont les NKT en particulier. Jusqu'à maintenant, aucun marqueur ou facteur de transcription n'a été spécifiquement attribué à l'ensemble des cellules DN T tout en étant absent de l'ensemble des NKT et des autres cellules T.

Lors de notre investigation des différences entre les cellules DN T et NKT, nous avons effectué une analyse de séquençage ARN. En plus de nous avoir permis de déterminer les séquences du répertoire TCR des cellules DN T, ces données donneront des indices quant aux différences entre les cellules DN T provenant de souris CD1d ko et les cellules iNKT. Surtout, ces données de séquençage ARN nous fournissent un profil d'expression complet des cellules DN T, et leur investigation plus en profondeur en comparaison avec d'autres bases de données RNA-seq pourrait permettre d'identifier une signature d'expression génique spécifique aux cellules DN T. Des analyses préliminaires de ces données de RNA-seq nous ont poussées à investiguer l'expression de Eomes par les cellules DN T. Nous avons ainsi validé que ce facteur de transcription est exprimé par une fraction des cellules DN T, mais non par les iNKT. L'expression par les NKT de type II demeure à déterminer en comparaison des cellules DN T, mais Eomes pourrait ultimement s'inscrire dans une combinaison de marqueurs permettant de distinguer les cellules DN T polyclonales des cellules NKT.

L'identification d'un marqueur universel des cellules DN T, ou encore d'un « Master regulator » du choix de différenciation DN T, favoriserait des avancées importantes dans l'étude de ce rare type cellulaire. Ceci permettrait potentiellement la génération de modèles de souris rapporteuses, la délétion spécifique des cellules DN T in vivo, etc. Ainsi, en utilisant un système de souris rapporteuses, il pourrait devenir possible de déterminer si les cellules DN T thymiques sont les progéniteurs directs de l'ensemble des cellules DN T périphériques, ou encore si les cellules DN T peuvent constituer un intermédiaire de certaines cellules exprimant CD4 ou CD8, par exemple les cellules IELs ou d'autres cellules non-conventionnelles. Alors qu'un lien de précurseur-descendant n'a pu être établi directement entre les cellules DN T

thymiques et les cellules DN T périphériques en contexte physiologique, nos résultats suggèrent fortement que ces deux populations sont liées. La découverte d'un marqueur spécifique aux cellules DN T permettrait de confirmer notre hypothèse.

Conclusion et perspectives

Les objectifs de cette thèse étaient de déterminer les facteurs permettant de moduler le nombre de cellules DN T chez la souris. D'un point de vue génétique, les locus *Idd2* et *Idd13*, ainsi que leur interaction, participent à l'augmentation de la proportion de cellules DN T périphériques. Le degré de contribution des différents locus contrôlant la proportion de cellules DN T diffère selon l'organe étudié est influencée par la présence ou non de l'antigène pour lequel les cellules DN T sont spécifiques. D'un point de vue développemental, nous avons montré que les cellules DN T thymiques dérivent directement d'un précurseur DP, alors que certaines cellules DN T périphériques proviennent d'un intermédiaire ayant exprimé CD8.

Les cellules DN T possèdent un fort potentiel immunorégulateur, et de futures thérapies cellulaires contre l'auto-immunité ou favorisant la tolérance post-greffe pourraient avoir avantage à utiliser ces cellules. L'une des approches pouvant être utilisée serait de produire un grand nombre de cellules DN T *in vitro* grâce à des protocoles d'amplification, et possiblement d'activation, pour ensuite injecter ces cellules à des patients pouvant en bénéficier. Grâce à notre compréhension grandissante de la biologie des cellules DN T, il pourrait aussi devenir possible de moduler directement, *in vivo*, le nombre de ces cellules, en augmentant leur production, prolifération ou migration aux sites pertinents. Davantage d'études seront bien sûr nécessaires avant de parvenir à de tels résultats et à une approche de médecine personnalisée tenant compte des particularités de chaque patient.

D'un point de vue génétique, les nouvelles technologies d'analyse d'expression génique et de délétion ciblée (par exemple grâce à Crispr/Cas9), ainsi que les bases de données grandissantes seront utiles lors de l'investigation des gènes candidats contenus dans les intervalles génétiques contrôlant la proportion et le nombre de cellules DN T. Nos travaux indiquent déjà un impact de polymorphismes présents dans le locus *Idd2* sur l'expression de gènes inclus dans le locus *Idd13*, par exemple *Rad51*, mais des études à plus grande échelle et incluant plusieurs sous-types cellulaires pourraient révéler davantage d'interactions ayant un impact sur les cellules DN T et l'auto-immunité. Spécifiquement, il serait nécessaire de déterminer dans un premier temps quel compartiment et quel type cellulaire contribue à l'augmentation des cellules DN T médiée par le locus *Idd2*. De façon similaire aux

expériences menées sur les souris NOD^k.*Idd13*, des chimères hématopoïétiques permettraient de déterminer si les gènes candidats du chromosome 9 permettent une augmentation des cellules DN T de façon moelle-intrinsèque et/ou cellule-intrinsèque. Dans le cas d'une régulation intrinsèque aux cellules DN T ou à leurs progéniteurs, des expériences de séquençage ARN des cellules DN T provenant de souris congéniques et des lignées parentales pourraient réduire considérablement la liste de gènes candidats, ou du moins apporterait des informations précieuses quant à l'impact des locus et sous-locus situés sur le chromosome 9 sur le profil transcriptomique des cellules DN T. Le locus Chr9L murin étudié dans cette thèse, situé entre 27.9Mb et 52.3Mb, est orthologue à une région située sur le chromosome 15 humain, suggérant que l'identification des gènes candidats contrôlant les cellules DN T chez la souris pourrait aussi être applicable à l'humain.

Les résultats présentés dans cette thèse, et les diverses études d'autres groupes de recherche, suggèrent que les cellules DN T pourraient constituer une population versatile, aux multiples spécificités reflétées par un répertoire TCR polyclonal et différentes restrictions aux molécules de CMH. Ceci suggère que l'utilité des cellules DN T pourrait être appliquée à différents contextes de pathologie, une fois identifiés les marqueurs spécifiques de leur rôle régulateur. Déterminer les marqueurs spécifiques des cellules DN T demeure aussi nécessaire dans le cadre des études chez l'humain, afin de distinguer les cellules DN T immunorégulatrices d'autres populations similaires tels que les NKT. La fonction des cellules DN T humaines, et l'impact sur cette fonction de différents paramètres tel que la restriction au CMH ou l'expression de facteurs de transcription tels qu'Eomes, pourraient alors être investigués.

À terme, l'étude des cellules DN T permettra de révéler l'étendue de leur rôle immunorégulateur, et pourrait identifier de nouveaux moyens de moduler le nombre et la fonction de ces cellules dans des thérapies personnalisées favorisant la tolérance immunitaire.

Bibliographie

1. Clark, R. and T. Kupper, *Old Meets New: The Interaction Between Innate and Adaptive Immunity*. Journal of Investigative Dermatology, 2005. **125**(4): p. 629-637.
2. Howard, C.J., et al., *The role of dendritic cells in shaping the immune response*. Animal Health Research Reviews, 2004. **5**(2): p. 191-195.
3. Brubaker, S.W., et al., *Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective*. Annu Rev Immunol, 2015. **33**: p. 257-90.
4. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Control of adaptive immunity by the innate immune system*. Nature Immunology, 2015. **16**: p. 343.
5. Pegram, H.J., et al., *Activating and inhibitory receptors of natural killer cells*. Immunology And Cell Biology, 2010. **89**: p. 216.
6. Liao, N.-S., et al., *MHC Class I Deficiency: Susceptibility to Natural Killer (NK) Cells and Impaired NK Activity*. Science, 1991. **253**(5016): p. 199-202.
7. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.
8. Bassing, C.H., W. Swat, and F.W. Alt, *The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination*. Cell, 2002. **109**(2, Supplement 1): p. S45-S55.
9. Di Noia, J.M. and M.S. Neuberger, *Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 1-22.
10. Stavnezer, J., J.E.J. Guikema, and C.E. Schrader, *Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination*. Annual review of immunology, 2008. **26**: p. 261-292.
11. Avalos, A.M. and H.L. Ploegh, *Early BCR Events and Antigen Capture, Processing, and Loading on MHC Class II on B Cells*. Front Immunol, 2014. **5**.
12. Rossjohn, J., et al., *T Cell Antigen Receptor Recognition of Antigen-Presenting Molecules*. Annual Review of Immunology, 2015. **33**(1): p. 169-200.
13. Pennock, N.D., et al., *T cell responses: naïve to memory and everything in between*. Adv Physiol Educ, 2013. **37**(4): p. 273-83.
14. Slifka, M.K. and R. Ahmed, *Long-term humoral immunity against viruses: revisiting the issue of plasma cell longevity*. Trends in Microbiology, 1996. **4**(10): p. 394-400.
15. Hammarlund, E., et al., *Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination*. Nature Medicine, 2003. **9**: p. 1131.
16. Crotty, S. and R. Ahmed, *Immunological memory in humans*. Seminars in Immunology, 2004. **16**(3): p. 197-203.
17. Crotty, S., et al., *Cutting Edge: Long-Term B Cell Memory in Humans after Smallpox Vaccination*. The Journal of Immunology, 2003. **171**(10): p. 4969-4973.
18. Dörner, T. and A. Radbruch, *Antibodies and B Cell Memory in Viral Immunity*. Immunity, 2007. **27**(3): p. 384-392.
19. Ahmed, R. and D. Gray, *Immunological memory and protective immunity: understanding their relation*. Science, 1996. **272**(5258): p. 54-60.
20. Schmidt, R.E., B. Grimbacher, and T. Witte, *Autoimmunity and primary immunodeficiency: two sides of the same coin?* Nature Reviews Rheumatology, 2017. **14**: p. 7.
21. Nutsch, K.M. and C.-S. Hsieh, *T cell tolerance and immunity to commensal bacteria*. Current opinion in immunology, 2012. **24**(4): p. 385-391.

22. Cong, Y., et al., *CD4⁺ T Cells Reactive to Enteric Bacterial Antigens in Spontaneously Colitic C3H/HeJBir Mice: Increased T Helper Cell Type 1 Response and Ability to Transfer Disease*. The Journal of Experimental Medicine, 1998. **187**(6): p. 855-864.
23. Raje, N. and C. Dinakar, *Overview of Immunodeficiency Disorders*. Immunology and allergy clinics of North America, 2015. **35**(4): p. 599-623.
24. Krangel, M.S., *Mechanics of T cell receptor gene rearrangement*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(2): p. 133-9.
25. Kallenbach, S., et al., *Three lymphoid-specific factors account for all junctional diversity characteristic of somatic assembly of T-cell receptor and immunoglobulin genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 2799-803.
26. Gilfillan, S., et al., *Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire*. Science, 1993. **261**(5125): p. 1175-8.
27. Cabaniols, J.P., et al., *Most α/β T Cell Receptor Diversity Is Due to Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*. J Exp Med, 2001. **194**(9): p. 1385-90.
28. Pearce, G., *Normal structure, function and histology of the thymus*. Toxicol Pathol, 2006. **34**(5): p. 504-14.
29. Daley, S.R., D.Y. Hu, and C.C. Goodnow, *Helios marks strongly autoreactive CD4⁺ T cells in two major waves of thymic deletion distinguished by induction of PD-1 or NF- κ B*. Journal of Experimental Medicine, 2013. **210**(2): p. 269-285.
30. McCaughy, T.M., et al., *Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla*. J Exp Med, 2008. **205**(11): p. 2575-84.
31. Klein, L., et al., *Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)*. Nature reviews. Immunology, 2014. **14**(6): p. 377-91.
32. Xu, X. and Q. Ge, *Maturation and migration of murine CD4 single positive thymocytes and thymic emigrants*. Comput Struct Biotechnol J, 2014. **9**.
33. Cho, H., et al., *Positive selecting cell type determines the phenotype of MHC class Ib-restricted CD8⁺ T cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(32): p. 13241-6.
34. Horai, R., et al., *Requirements for selection of conventional and innate T lymphocyte lineages*. Immunity, 2007. **27**(5): p. 775-85.
35. Li, W., et al., *An alternate pathway for CD4 T cell development: thymocyte-expressed MHC class II selects a distinct T cell population*. Immunity, 2005. **23**(4): p. 375-86.
36. Seach, N., et al., *Double Positive Thymocytes Select Mucosal-Associated Invariant T Cells*. The Journal of Immunology, 2013. **191**(12): p. 6002-6009.
37. Gapin, L., et al., *NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 971-8.
38. Yates, A.J., *Theories and Quantification of Thymic Selection*. Front Immunol, 2014. **5**.
39. Sinclair, C., et al., *Asymmetric thymocyte death underlies the CD4:CD8 T-cell ratio in the adaptive immune system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(31): p. E2905-14.
40. Sawicka, M., et al., *From pre-DP, post-DP, SP4, and SP8 Thymocyte Cell Counts to a Dynamical Model of Cortical and Medullary Selection*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 19.
41. Tanchot, C., et al., *Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2057-62.

42. Kirberg, J., A. Berns, and H. von Boehmer, *Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules*. J Exp Med, 1997. **186**(8): p. 1269-75.
43. Takeda, S., et al., *MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span*. Immunity, 1996. **5**(3): p. 217-28.
44. Nestic, D. and S. Vukmanovic, *MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8+ thymic emigrants*. J Immunol, 1998. **160**(8): p. 3705-12.
45. Brocker, T., *Survival of Mature CD4 T Lymphocytes Is Dependent on Major Histocompatibility Complex Class II-expressing Dendritic Cells*. J Exp Med, 1997. **186**(8): p. 1223-32.
46. Freitas, A.A. and B. Rocha, *Peripheral T cell survival*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(2): p. 152-6.
47. Wirnsberger, G., M. Hinterberger, and L. Klein, *Regulatory T-cell differentiation versus clonal deletion of autoreactive thymocytes*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(1): p. 45-53.
48. Xing, Y. and K.A. Hogquist, *T-cell tolerance: central and peripheral*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2012. **4**(6).
49. McGargill, M.A., J.M. Derbinski, and K.A. Hogquist, *Receptor editing in developing T cells*. Nature Immunology, 2000. **1**(4): p. 336-41.
50. Fink, P.J., *If at first you don't succeed*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 271-2.
51. Santori, F.R., et al., *Editing autoreactive TCR enables efficient positive selection*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1729-34.
52. Salomon, B., et al., *B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes*. Immunity, 2000. **12**(4): p. 431-40.
53. Lohr, J., et al., *Role of B7 in T cell tolerance*. J Immunol, 2004. **173**(8): p. 5028-35.
54. Lio, C.W. and C.S. Hsieh, *A two-step process for thymic regulatory T cell development*. Immunity, 2008. **28**(1): p. 100-11.
55. Burchill, M.A., et al., *IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 280-90.
56. Burchill, M.A., et al., *Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire*. Immunity, 2008. **28**(1): p. 112-21.
57. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1142-51.
58. Breed, E.R., S.T. Lee, and K.A. Hogquist, *Directing T cell fate: How thymic antigen presenting cells coordinate thymocyte selection*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2017.
59. Malhotra, D., et al., *Polyclonal CD4(+) T cell tolerance is established by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns*. Nat Immunol, 2016. **17**(2): p. 187-95.
60. Baldwin, T.A., K.A. Hogquist, and S.C. Jameson, *The fourth way? Harnessing aggressive tendencies in the thymus*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6515-20.
61. Stritesky, G.L., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Selection of Self-Reactive T Cells in the Thymus*. Annual review of immunology, 2012. **30**(1): p. 95-114.

62. Lambolez, F., M. Kronenberg, and H. Cheroutre, *Thymic differentiation of TCR alpha beta(+) CD8 alpha alpha(+) IELs*. Immunol Rev, 2007. **215**: p. 178-88.
63. Kronenberg, M. and L. Gapin, *The unconventional lifestyle of NKT cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 557-68.
64. Hsieh, C.S., H.M. Lee, and C.W. Lio, *Selection of regulatory T cells in the thymus*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(3): p. 157-67.
65. Fontenot, J.D. and A.Y. Rudensky, *Molecular aspects of regulatory T cell development*. Seminars in Immunology, 2004. **16**(2): p. 73-80.
66. Marks, B.R., et al., *Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation*. Nature Immunology, 2009. **10**: p. 1125.
67. Doisne, J.M., et al., *iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling*. J Exp Med, 2009. **206**(6): p. 1365-78.
68. Ouyang, W., et al., *Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 642-53.
69. Zuniga, L.A., et al., *Th17 cell development: from the cradle to the grave*. Immunol Rev, 2013. **252**(1): p. 78-88.
70. Konkel, J.E., et al., *Control of the development of CD8alphaalpha+ intestinal intraepithelial lymphocytes by TGF-beta*. Nat Immunol, 2011. **12**(4): p. 312-9.
71. Savage, A.K., et al., *The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 391-403.
72. Bacchetta, R., et al., *Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1713-22.
73. Nichols, K.E., et al., *Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP*. Nat Med, 2005. **11**(3): p. 340-5.
74. Borowski, C. and A. Bendelac, *Signaling for NKT cell development. the SAP-FynT connection*, 2005. **201**(6): p. 833-836.
75. Eberl, G., B. Lowin-Kropf, and H.R. MacDonald, *Cutting edge: NKT cell development is selectively impaired in Fyn-deficient mice*. Journal of immunology, 1999. **163**(8): p. 4091-4.
76. Godfrey, D.I. and S.P. Berzins, *Control points in NKT-cell development*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**: p. 505.
77. MacDonald, H.R., *Development and selection of NKT cells*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(2): p. 250-4.
78. Thiault, N., et al., *Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors*. Nat Immunol, 2015. **16**(6): p. 628-34.
79. Prince, A.L., et al., *Development of innate CD4+ and CD8+ T cells in Itk-deficient mice is regulated by distinct pathways*. J Immunol, 2014. **193**(2): p. 688-99.
80. Azzam, H.S., et al., *CD5 Expression Is Developmentally Regulated By T Cell Receptor (TCR) Signals and TCR Avidity*. The Journal of Experimental Medicine, 1998. **188**(12): p. 2301-2311.
81. Azzam, H.S., et al., *Fine tuning of TCR signaling by CD5*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5464-72.
82. Kearse, K.P., et al., *Early molecular events induced by T cell receptor (TCR) signaling in immature CD4+ CD8+ thymocytes: increased synthesis of TCR-alpha protein is an early response to TCR signaling that compensates for TCR-alpha instability, improves*

- TCR assembly, and parallels other indicators of positive selection.* J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 193-202.
83. Ordonez-Rueda, D., et al., *Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling.* Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2233-47.
 84. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.* J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
 85. Moran, A.E., et al., *T cell receptor signal strength in T(reg) and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse.* J Exp Med, 2011. **208**(6): p. 1279-89.
 86. Ruscher, R., et al., *CD8alphaalpha intraepithelial lymphocytes arise from two main thymic precursors.* Nature Immunology, 2017. **18**(7): p. 771-779.
 87. Liu, T., et al., *CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4(+)T(reg)cells.* Biol Direct, 2009. **4**: p. 40.
 88. Swat, W., et al., *CD69 expression during selection and maturation of CD4+8+ thymocytes.* Eur J Immunol, 1993. **23**(3): p. 739-46.
 89. Xing, Y., et al., *Late stages of T cell maturation in the thymus involve NF-kappaB and tonic type I interferon signaling.* Nat Immunol, 2016. **17**(5): p. 565-73.
 90. Blum, J.S., *Pathways of Antigen Processing.* 2013. **31**: p. 443-73.
 91. Collado, J.A., et al., *The Repertoires of Peptides Presented by MHC-II in the Thymus and in Peripheral Tissue: A Clue for Autoimmunity?* Front Immunol, 2013. **4**.
 92. Zal, T., A. Volkman, and B. Stockinger, *Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen.* The Journal of experimental medicine, 1994. **180**(6): p. 2089-99.
 93. Volkman, A., T. Zal, and B. Stockinger, *Antigen-presenting cells in the thymus that can negatively select MHC class II-restricted T cells recognizing a circulating self antigen.* Journal of immunology, 1997. **158**(2): p. 693-706.
 94. Li, J., et al., *Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus.* J Exp Med, 2009. **206**(3): p. 607-22.
 95. Murata, S., et al., *Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes.* Science, 2007. **316**(5829): p. 1349-53.
 96. Florea, B.I., et al., *Activity-based profiling reveals reactivity of the murine thymoproteasome-specific subunit beta5t.* Chem Biol, 2010. **17**(8): p. 795-801.
 97. Sasaki, K., et al., *Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8(+) T cells.* Nat Commun, 2015. **6**: p. 7484.
 98. Xing, Y., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Thymoproteasome subunit-beta5T generates peptide-MHC complexes specialized for positive selection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(17): p. 6979-84.
 99. Nitta, T., et al., *Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells.* Immunity, 2010. **32**(1): p. 29-40.
 100. Honey, K., et al., *Cathepsin L regulates CD4+ T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands.* J Exp Med, 2002. **195**(10): p. 1349-58.

101. Gommeaux, J., et al., *Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4⁺ thymocytes*. Eur J Immunol, 2009. **39**(4): p. 956-64.
102. Nakagawa, T., et al., *Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus*. Science, 1998. **280**(5362): p. 450-3.
103. Anderson, M.S., et al., *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein*. Science, 2002. **298**(5597): p. 1395-401.
104. Pugliese, A., et al., *Self-antigen-presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exist in both thymus and peripheral lymphoid organs*. J Clin Invest, 2001. **107**(5): p. 555-64.
105. Fan, Y., et al., *Thymus-specific deletion of insulin induces autoimmune diabetes*. Embo j, 2009. **28**(18): p. 2812-24.
106. Chentoufi, A.A. and C. Polychronakos, *Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1383-90.
107. Passos, G.A., et al., *Update on Aire and thymic negative selection*. Immunology, 2018. **153**(1): p. 10-20.
108. Aschenbrenner, K., et al., *Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells*. Nature Immunology, 2007. **8**(4): p. 351-8.
109. Yamano, T., et al., *Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction*. Immunity, 2015. **42**(6): p. 1048-61.
110. Gardner, J.M., et al., *Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells*. Science, 2008. **321**(5890): p. 843-7.
111. Gardner, James M., et al., *Extrathymic Aire-Expressing Cells Are a Distinct Bone Marrow-Derived Population that Induce Functional Inactivation of CD4⁺ T Cells*. Immunity, 2013. **39**(3): p. 560-572.
112. Eldershaw, S.A., D.M. Sansom, and P. Narendran, *Expression and function of the autoimmune regulator (Aire) gene in non-thymic tissue*. Clin Exp Immunol, 2011. **163**(3): p. 296-308.
113. Gallegos, A.M. and M.J. Bevan, *Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation*. The Journal of experimental medicine, 2004. **200**(8): p. 1039-49.
114. Takaba, H., et al., *Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance*. Cell, 2015. **163**(4): p. 975-87.
115. Takaba, H. and H. Takayanagi, *The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus*. Trends Immunol, 2017. **38**(11): p. 805-816.
116. Heino, M., et al., *APECED mutations in the autoimmune regulator (AIRE) gene*. Hum Mutat, 2001. **18**(3): p. 205-11.
117. Melichar, H.J., et al., *Stable Interactions and Sustained TCR Signaling Characterize Thymocyte–Thymocyte Interactions that Support Negative Selection*. The Journal of Immunology, 2015. **194**(3): p. 1057-1061.
118. Theofilopoulos, A.N., D.H. Kono, and R. Baccala, *The multiple pathways to autoimmunity*. Nature Immunology, 2017. **18**: p. 716.
119. Danke, N.A., et al., *Autoreactive T cells in healthy individuals*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 5967-72.

120. Nagele, E.P., et al., *Natural IgG Autoantibodies Are Abundant and Ubiquitous in Human Sera, and Their Number Is Influenced By Age, Gender, and Disease*. PLoS One, 2013. **8**(4).
121. Hudson, K.E., et al., *Partial tolerance of autoreactive B and T cells to erythrocyte-specific self-antigens in mice*. Haematologica, 2012. **97**(12): p. 1836-44.
122. Quintana, F.J. and I.R. Cohen, *Autoantibody Patterns in Diabetes-prone NOD Mice and in Standard C57BL/6 Mice*. Journal of autoimmunity, 2001. **17**(3): p. 191-197.
123. Audiger, C., et al., *The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance*. J Immunol, 2017. **198**(6): p. 2223-2231.
124. Tang, Q. and J.A. Bluestone, *The Foxp3(+) regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation*. Nat Immunol, 2008. **9**(3): p. 239-44.
125. Sojka, D.K., Y.H. Huang, and D.J. Fowell, *Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target*. Immunology, 2008. **124**(1): p. 13-22.
126. Povoleri, G.A.M., et al., *Thymic Versus Induced Regulatory T Cells – Who Regulates the Regulators?* Front Immunol, 2013. **4**.
127. Workman, C.J., et al., *The Development and Function of Regulatory T Cells*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(16): p. 2603-22.
128. Davidson, T.S., et al., *Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4022-6.
129. Zheng, S.G., et al., *IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2018-27.
130. Hoeppli, R.E., et al., *The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 61.
131. Schuster, C., et al., *Peripherally induced regulatory T cells contribute to the control of autoimmune diabetes in the NOD mouse model*. Eur J Immunol, 2018. **48**(7): p. 1211-1216.
132. Samstein, R.M., et al., *Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict*. Cell, 2012. **150**(1): p. 29-38.
133. Haribhai, D., et al., *A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis*. J Immunol, 2009. **182**(6): p. 3461-8.
134. Awasthi, A., et al., *A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1380-9.
135. Wu, H.Y., et al., *In vivo induction of Tr1 cells via mucosal dendritic cells and AHR signaling*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23618.
136. Gregori, S., et al., *Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway*. Blood, 2010. **116**(6): p. 935-44.
137. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
138. Brockmann, L., et al., *IL-10 Receptor Signaling Is Essential for TR1 Cell Function In Vivo*. J Immunol, 2017. **198**(3): p. 1130-1141.
139. Vieira, P.L., et al., *IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 5986-93.

140. Lim, J.Y., et al., *Enhanced immunoregulation of mesenchymal stem cells by IL-10-producing type 1 regulatory T cells in collagen-induced arthritis*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 26851.
141. Passerini, L., et al., *Functional type 1 regulatory T cells develop regardless of FOXP3 mutations in patients with IPEX syndrome*. Eur J Immunol, 2011. **41**(4): p. 1120-31.
142. Gregori, S., K.S. Goudy, and M.G. Roncarolo, *The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 30.
143. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?* Int Immunol, 2009. **21**(10): p. 1105-11.
144. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
145. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. Int Immunol, 1998. **10**(12): p. 1969-80.
146. Fukaura, H., et al., *Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients*. J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 70-7.
147. Chen, Y., et al., *Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis*. Science, 1994. **265**(5176): p. 1237-40.
148. Weiner, H.L., *Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells*. Microbes Infect, 2001. **3**(11): p. 947-54.
149. Pelanda, R. and R.M. Torres, *Central B-cell tolerance: where selection begins*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2012. **4**(4): p. a007146.
150. Hartley, S.B., et al., *Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death*. Cell, 1993. **72**(3): p. 325-35.
151. Hartley, S.B., et al., *Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens*. Nature, 1991. **353**(6346): p. 765-9.
152. Nemazee, D.A. and K. Burki, *Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes*. Nature, 1989. **337**(6207): p. 562-6.
153. Hippen, K.L., et al., *In vivo assessment of the relative contributions of deletion, anergy, and editing to B cell self-tolerance*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 909-16.
154. Nishana, M. and S.C. Raghavan, *Role of recombination activating genes in the generation of antigen receptor diversity and beyond*. Immunology, 2012. **137**(4): p. 271-81.
155. Papavasiliou, F.N. and D.G. Schatz, *Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity*. Cell, 2002. **109** Suppl: p. S35-44.
156. Gatto, D. and R. Brink, *The germinal center reaction*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2010. **126**(5): p. 898-907; quiz 908-9.
157. Griffiths, G.M., et al., *Somatic mutation and the maturation of immune response to 2-phenyl oxazolone*. Nature, 1984. **312**(5991): p. 271-5.
158. Bernard, O., N. Hozumi, and S. Tonegawa, *Sequences of mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic changes*. Cell, 1978. **15**(4): p. 1133-44.

159. Brink, R. and T.G. Phan, *Self-Reactive B Cells in the Germinal Center Reaction*. Annu Rev Immunol, 2018. **36**: p. 339-357.
160. Tsubata, T., *B-cell tolerance and autoimmunity*. F1000Res, 2017. **6**.
161. Lesley, R., et al., *Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF*. Immunity, 2004. **20**(4): p. 441-53.
162. Gauld, S.B., K.T. Merrell, and J.C. Cambier, *Silencing of autoreactive B cells by anergy: a fresh perspective*. Current Opinion in Immunology, 2006. **18**(3): p. 292-297.
163. Goodnow, C.C., et al., *Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice*. Nature, 1988. **334**(6184): p. 676-82.
164. Halverson, R., R.M. Torres, and R. Pelanda, *Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens*. Nat Immunol, 2004. **5**(6): p. 645-50.
165. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 20-1.
166. Ramsey, C., et al., *Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(4): p. 397-409.
167. Dooley, J., et al., *Genetic predisposition for beta cell fragility underlies type 1 and type 2 diabetes*. Nature Genetics, 2016. **48**: p. 519.
168. Wu, H.-J. and E. Wu, *The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity*. Gut Microbes, 2012. **3**(1): p. 4-14.
169. Atarashi, K. and K. Honda, *Microbiota in autoimmunity and tolerance*. Current Opinion in Immunology, 2011. **23**(6): p. 761-768.
170. Manfredo Vieira, S., et al., *Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans*. Science, 2018. **359**(6380): p. 1156-1161.
171. Fernando, M.M.A., et al., *Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis*. PLoS Genet, 2008. **4**(4).
172. Rioux, J.D., et al., *Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(44): p. 18680-18685.
173. Wicker, L.S., J.A. Todd, and L.B. Peterson, *Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse*. Annual review of immunology, 1995. **13**: p. 179-200.
174. Wicker, L.S., et al., *Genetic control of diabetes and insulinitis in the nonobese diabetic (NOD) mouse*. J Exp Med, 1987. **165**(6): p. 1639-54.
175. Pociot, F., et al., *Genetics of Type 1 Diabetes: What's Next?* Diabetes, 2010. **59**(7): p. 1561-71.
176. Knight, J.C., *Genomic modulators of the immune response*. Trends Genet, 2013. **29**(2): p. 74-83.
177. Richard-Miceli, C. and L.A. Criswell, *Emerging patterns of genetic overlap across autoimmune disorders*. Genome Med, 2012. **4**(1): p. 6.
178. Wandstrat, A. and E. Wakeland, *The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 802-9.
179. Cojocaru, M., *Multiple autoimmune syndrome*. Mædica, 2010. **5**(2): p. 132-4.
180. Kahn, C.R., *The molecular mechanism of insulin action*. Annu Rev Med, 1985. **36**: p. 429-51.
181. Klinke, D.J., *Extent of Beta Cell Destruction Is Important but Insufficient to Predict the Onset of Type 1 Diabetes Mellitus*. PLoS One, 2008. **3**(1).

182. Patterson, C., et al., *Diabetes in the young - a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014. **103**(2): p. 161-75.
183. Patterson, C.C., et al., *Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase*. *Diabetologia*, 2012. **55**(8): p. 2142-7.
184. DIAMOND, *Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999*. *Diabet Med*, 2006. **23**(8): p. 857-66.
185. Atkinson, M.A., G.S. Eisenbarth, and A.W. Michels, *Type 1 diabetes*. *Lancet*, 2014. **383**(9911): p. 69-82.
186. Heller, S., et al., *Insulin degludec, an ultra-longacting basal insulin, versus insulin glargine in basal-bolus treatment with mealtime insulin aspart in type 1 diabetes (BEGIN Basal-Bolus Type 1): a phase 3, randomised, open-label, treat-to-target non-inferiority trial*. *Lancet*, 2012. **379**(9825): p. 1489-97.
187. Stephens, C.H., et al., *In situ type 1 oligomeric collagen macroencapsulation promotes islet longevity and function in vitro and in vivo*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2018. **315**(4): p. E650-e661.
188. Billings, L.K., *The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS?* 2010. **1212**: p. 59-77.
189. Ali, O., *Genetics of type 2 diabetes*. *World J Diabetes*, 2013. **4**(4): p. 114-23.
190. Das, S.K. and S.C. Elbein, *The Genetic Basis of Type 2 Diabetes*. *Cellscience*, 2006. **2**(4): p. 100-31.
191. Donath, M.Y. and S.E. Shoelson, *Type 2 diabetes as an inflammatory disease*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(2): p. 98-107.
192. Ahlqvist, E., et al., *Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018. **6**(5): p. 361-369.
193. Laugesen, E., J.A. Østergaard, and R.D. Leslie, *Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledge and uncertainty*. *Diabet Med*, 2015. **32**(7): p. 843-52.
194. Magnuson, A.M., et al., *Population dynamics of islet-infiltrating cells in autoimmune diabetes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015. **112**(5): p. 1511-1516.
195. Carrero, J.A., S.T. Ferris, and E.R. Unanue, *Macrophages and dendritic cells in islets of Langerhans in diabetic autoimmunity: a lesson on cell interactions in a mini-organ*. *Curr Opin Immunol*, 2016. **43**: p. 54-59.
196. Calderon, B., et al., *Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present beta cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(16): p. 6121-6.
197. Diana, J., et al., *Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes*. *Nature Medicine*, 2012. **19**: p. 65.
198. In't Veld, P., *Insulinitis in human type 1 diabetes: The quest for an elusive lesion*. *Islets*, 2011. **3**(4): p. 131-8.
199. Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth, *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. *Nature*, 2010. **464**(7293): p. 1293-300.
200. Willcox, A., et al., *Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes*. *Clin Exp Immunol*, 2009. **155**(2): p. 173-81.

201. Itoh, N., et al., *Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients*. J Clin Invest, 1993. **92**(5): p. 2313-22.
202. Anderson, M.S. and J.A. Bluestone, *THE NOD MOUSE: A Model of Immune Dysregulation*. Annual review of immunology, 2005. **23**(1): p. 447-485.
203. Lesage, S., et al., *Failure to Censor Forbidden Clones of CD4 T Cells in Autoimmune Diabetes*. Journal of Experimental Medicine, 2002. **196**(9): p. 1175-1188.
204. Kendall, P.L., et al., *Tertiary Lymphoid Structures in the Pancreas Promote Selection of B Lymphocytes in Autoimmune Diabetes*. The Journal of Immunology, 2007. **178**(9): p. 5643-5651.
205. Li, M., L.J. Song, and X.Y. Qin, *Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes*. J Cell Mol Med, 2014. **18**(5): p. 749-58.
206. Graham, K.L., et al., *Pathogenic Mechanisms in Type 1 Diabetes: The Islet is Both Target and Driver of Disease*. Rev Diabet Stud, 2012. **9**(4): p. 148-68.
207. Wicker, L.S., B.J. Miller, and Y. Mullen, *Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice*. Diabetes, 1986. **35**(8): p. 855-60.
208. Foulis, A.K., M.A. Farquharson, and R. Hardman, *Aberrant expression of class II major histocompatibility complex molecules by B cells and hyperexpression of class I major histocompatibility complex molecules by insulin containing islets in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus*. Diabetologia, 1987. **30**(5): p. 333-43.
209. Richardson, S.J., et al., *Islet cell hyperexpression of HLA class I antigens: a defining feature in type 1 diabetes*. Diabetologia, 2016. **59**(11): p. 2448-2458.
210. Burrack, A.L., T. Martinov, and B.T. Fife, *T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes*. Frontiers in Endocrinology, 2017. **8**(343).
211. Coppieters, K.T., et al., *Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients*. The Journal of Experimental Medicine, 2012. **209**(1): p. 51-60.
212. Wong, F.S. and C.A. Janeway, *The role of CD4 and CD8 T cells in type 1 diabetes in the NOD mouse*. Research in Immunology, 1997. **148**(5): p. 327-332.
213. Ablamunits, V., D. Elias, and I.R. Cohen, *The pathogenicity of islet-infiltrating lymphocytes in the non-obese diabetic (NOD) mouse*. Clin Exp Immunol, 1999. **115**(2): p. 260-7.
214. Mora, C., et al., *Pancreatic infiltration but not diabetes occurs in the relative absence of MHC class II-restricted CD4 T cells: studies using NOD/CIITA-deficient mice*. J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4576-88.
215. Wicker, L.S., et al., *Beta 2-microglobulin-deficient NOD mice do not develop insulinitis or diabetes*. Diabetes, 1994. **43**(3): p. 500-4.
216. Katz, J., C. Benoist, and D. Mathis, *Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulinitis in non-obese diabetic mice*. Eur J Immunol, 1993. **23**(12): p. 3358-60.
217. Phillips, J.M., et al., *Type 1 Diabetes Development Requires Both CD4+ and CD8+ T cells and Can Be Reversed by Non-Depleting Antibodies Targeting Both T Cell Populations*. Rev Diabet Stud, 2009. **6**(2): p. 97-103.

218. Christianson, S.W., L.D. Shultz, and E.H. Leiter, *Adoptive Transfer of Diabetes Into Immunodeficient NOD- μ Mice: Relative Contributions of CD4⁺ and CD8⁺ T-Cells From Diabetic Versus Prediabetic NOD.NON-Thy-1^a Donors*. *Diabetes*, 1993. **42**(1): p. 44-55.
219. Coppieters, K., N. Amirian, and M. von Herrath, *Intravital imaging of CTLs killing islet cells in diabetic mice*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(1): p. 119-31.
220. Haskins, K. and A. Cooke, *CD4 T cells and their antigens in the pathogenesis of autoimmune diabetes*. *Curr Opin Immunol*, 2011. **23**(6): p. 739-45.
221. Debray-Sachs, M., et al., *Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma*. *J Autoimmun*, 1991. **4**(2): p. 237-48.
222. Waid, D.M., G.M. Vaitaitis, and D.H. Wagner, Jr., *Peripheral CD4^{lo}CD40⁺ auto-aggressive T cell expansion during insulin-dependent diabetes mellitus*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(5): p. 1488-97.
223. Jain, R., et al., *Innocuous IFN γ induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production*. *J Exp Med*, 2008. **205**(1): p. 207-18.
224. Petzold, C., et al., *Foxp3(+) regulatory T cells in mouse models of type 1 diabetes*. *J Diabetes Res*, 2013. **2013**: p. 940710.
225. Wong, F.S. and L. Wen, *B Cells in Autoimmune Diabetes*. *Rev Diabet Stud*, 2005. **2**(3): p. 121-35.
226. Hinman, R.M., *B cells and type 1 diabetes ...in mice and men*. 2014. **160**(2): p. 128-32.
227. Serreze, D.V., et al., *B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. *J Immunol*, 1998. **161**(8): p. 3912-8.
228. Wong, F.S., et al., *Investigation of the role of B-cells in type 1 diabetes in the NOD mouse*. *Diabetes*, 2004. **53**(10): p. 2581-7.
229. Noorchashm, H., et al., *I-Ag7-mediated antigen presentation by B lymphocytes is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet beta cells of nonobese diabetic mice*. *J Immunol*, 1999. **163**(2): p. 743-50.
230. Serreze, D.V., et al., *B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice*. *J Exp Med*, 1996. **184**(5): p. 2049-53.
231. Chiu, P.P.L., D.V. Serreze, and J.S. Danska, *Development and Function of Diabetogenic T-cells in B-cell-Deficient Nonobese Diabetic Mice*. *Diabetes*, 2001. **50**(4): p. 763-770.
232. Yang, M., B. Charlton, and A.M. Gautam, *Development of insulinitis and diabetes in B cell-deficient NOD mice*. *J Autoimmun*, 1997. **10**(3): p. 257-60.
233. Martin, S., et al., *Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-cell deficiency*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(14): p. 1036-40.
234. Greeley, S.A., et al., *Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice*. *Nature medicine*, 2002. **8**(4): p. 399-402.
235. Bingley, P.J., et al., *Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives*. *Diabetes*, 1994. **43**(11): p. 1304-10.

236. Verge, C.F., et al., *Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies*. *Diabetes*, 1996. **45**(7): p. 926-33.
237. Christie, M.R., et al., *Validity of Screening for Individuals at Risk for Type 1 Diabetes by Combined Analysis of Antibodies to Recombinant Proteins*. *Diabetes Care*, 1997. **20**(6): p. 965-970.
238. Achenbach, P., et al., *Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics*. *Diabetes*, 2004. **53**(2): p. 384-92.
239. Achenbach, P., et al., *Type 1 diabetes risk assessment: improvement by follow-up measurements in young islet autoantibody-positive relatives*. *Diabetologia*, 2006. **49**(12): p. 2969-76.
240. Knip, M., et al., *Prediction of Type 1 Diabetes in the General Population*. *Diabetes Care*, 2010. **33**(6): p. 1206-12.
241. Kim, H.S. and M.S. Lee, *Role of innate immunity in triggering and tuning of autoimmune diabetes*. *Curr Mol Med*, 2009. **9**(1): p. 30-44.
242. Price, J.D. and K.V. Tarbell, *The Role of Dendritic Cell Subsets and Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes and Other Autoimmune Diseases*. *Front Immunol*, 2015. **6**.
243. Katz, J.D., et al., *Cutting edge: merocytic dendritic cells break T cell tolerance to beta cell antigens in nonobese diabetic mouse diabetes*. *J Immunol*, 2010. **185**(4): p. 1999-2003.
244. Pelletier, A.-N., et al., *The Size of the Plasmacytoid Dendritic Cell Compartment Is a Multigenic Trait Dominated by a Locus on Mouse Chromosome 7*. *The Journal of Immunology*, 2012. **188**(11): p. 5561-5570.
245. Jansen, A., et al., *Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice*. *Diabetes*, 1994. **43**(5): p. 667-75.
246. Jun, H.S., et al., *The Role of Macrophages in T Cell-mediated Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice*. *J Exp Med*, 1999. **189**(2): p. 347-58.
247. Lee, K.U., K. Amano, and J.W. Yoon, *Evidence for initial involvement of macrophage in development of insulinitis in NOD mice*. *Diabetes*, 1988. **37**(7): p. 989-91.
248. Driver, J.P., D.V. Serreze, and Y.G. Chen, *Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease*. *Semin Immunopathol*, 2011. **33**(1): p. 67-87.
249. Barrett, J.C., et al., *Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes*. *Nat Genet*, 2009. **41**(6): p. 703-7.
250. Todd, J.A., J.I. Bell, and H.O. McDevitt, *HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus*. *Nature*, 1987. **329**(6140): p. 599-604.
251. Quartey-Papafio, R., et al., *Aspartate at position 57 of nonobese diabetic I-Ag7 beta-chain diminishes the spontaneous incidence of insulin-dependent diabetes mellitus*. *J Immunol*, 1995. **154**(10): p. 5567-75.
252. Suri, A., M.G. Levisetti, and E.R. Unanue, *Do the peptide-binding properties of diabetogenic class II molecules explain autoreactivity?* *Current Opinion in Immunology*, 2008. **20**(1): p. 105-110.

253. Pugliese, A., et al., *The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes*. Nat Genet, 1997. **15**(3): p. 293-7.
254. Vafiadis, P., et al., *Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus*. Nat Genet, 1997. **15**(3): p. 289-92.
255. Sansom, D.M. and L.S.K. Walker, *The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology*. Immunological Reviews, 2006. **212**(1): p. 131-148.
256. Kavvoura, F.K. and J.P. Ioannidis, *CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a HuGE Review and meta-analysis*. Am J Epidemiol, 2005. **162**(1): p. 3-16.
257. Araki, M., et al., *Genetic evidence that the differential expression of the ligand-independent isoform of CTLA-4 is the molecular basis of the Idd5.1 type 1 diabetes region in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 2009. **183**(8): p. 5146-57.
258. Driver, J.P., Y.G. Chen, and C.E. Mathews, *Comparative Genetics: Synergizing Human and NOD Mouse Studies for Identifying Genetic Causation of Type 1 Diabetes*. Rev Diabet Stud, 2012. **9**(4): p. 169-87.
259. Törn, C., et al., *Role of Type 1 Diabetes-Associated SNPs on Risk of Autoantibody Positivity in the TEDDY Study*. Diabetes, 2015. **64**(5): p. 1818-29.
260. Kaprio, J., et al., *Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland*. Diabetologia, 1992. **35**(11): p. 1060-7.
261. Hyttinen, V., et al., *Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study*. Diabetes, 2003. **52**(4): p. 1052-5.
262. Fava, D., et al., *Evidence That the Age at Diagnosis of IDDM Is Genetically Determined*. Diabetes Care, 1998. **21**(6): p. 925-929.
263. Redondo, M.J., et al., *Concordance for Islet Autoimmunity among Monozygotic Twins*. New England Journal of Medicine, 2008. **359**(26): p. 2849-2850.
264. Committee on Diabetic Twins, J.D.S., *Diabetes mellitus in twins: a cooperative study in Japan*. Diabetes Research and Clinical Practice, 1988. **5**(4): p. 271-280.
265. Nistico, L., et al., *Emerging effects of early environmental factors over genetic background for type 1 diabetes susceptibility: evidence from a Nationwide Italian Twin Study*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(8): p. E1483-91.
266. Kumar, D., et al., *North-American twins with IDDM. Genetic, etiological, and clinical significance of disease concordance according to age, zygosity, and the interval after diagnosis in first twin*. Diabetes, 1993. **42**(9): p. 1351-63.
267. Rewers, M. and J. Ludvigsson, *Environmental risk factors for type 1 diabetes*. Lancet, 2016. **387**(10035): p. 2340-8.
268. Knip, M. and O. Simell, *Environmental Triggers of Type 1 Diabetes*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(7).
269. Peppia, M., et al., *Fetal or Neonatal Low-Glycotoxin Environment Prevents Autoimmune Diabetes in NOD Mice*. Diabetes, 2003. **52**(6): p. 1441-1448.
270. Hyöty, H. and K. Taylor, *The role of viruses in human diabetes*. Diabetologia, 2002. **45**(10): p. 1353-1361.

271. Laitinen, O.H., et al., *Coxsackievirus B1 is associated with induction of beta-cell autoimmunity that portends type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2014. **63**(2): p. 446-55.
272. Serreze, D.V., et al., *Acceleration of type 1 diabetes by a coxsackievirus infection requires a preexisting critical mass of autoreactive T-cells in pancreatic islets*. *Diabetes*, 2000. **49**(5): p. 708-11.
273. Serreze, D.V., et al., *Diabetes Acceleration or Prevention by a Coxsackievirus B4 Infection: Critical Requirements for both Interleukin-4 and Gamma Interferon*. *J Virol*, 2005. **79**(2): p. 1045-52.
274. Honeyman, M.C., N.L. Stone, and L.C. Harrison, *T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents*. *Mol Med*, 1998. **4**(4): p. 231-9.
275. Roep, B.O., et al., *Molecular Mimicry in Type 1 Diabetes*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002. **958**(1): p. 163-165.
276. Dotta, F., et al., *Coxsackie B4 virus infection of β cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(12): p. 5115-20.
277. Horwitz, M.S., et al., *Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry*. *Nat Med*, 1998. **4**(7): p. 781-5.
278. Coppieters, K.T., T. Boettler, and M. von Herrath, *Virus Infections in Type 1 Diabetes*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(1).
279. Filippi, C.M. and M.G. von Herrath, *Viral Trigger for Type 1 Diabetes: Pros and Cons*. *Diabetes*, 2008. **57**(11): p. 2863-71.
280. Winkler, C., et al., *An Interferon-Induced Helicase (IFIH1) Gene Polymorphism Associates With Different Rates of Progression From Autoimmunity to Type 1 Diabetes*. *Diabetes*, 2011. **60**(2): p. 685-90.
281. Looney, B.M., et al., *Effects of Type 1 Diabetes-Associated IFIH1 Polymorphisms on MDA5 Function and Expression*. *Current Diabetes Reports*, 2015. **15**(11): p. 96.
282. Nejentsev, S., et al., *Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes*. *Science*, 2009. **324**(5925): p. 387-9.
283. Nerup, J., et al., *On the pathogenesis of IDDM*. *Diabetologia*, 1994. **37 Suppl 2**: p. S82-9.
284. Szkudelski, T., *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas*. *Physiol Res*, 2001. **50**(6): p. 537-46.
285. Furman, B.L., *Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats*. *Curr Protoc Pharmacol*, 2015. **70**: p. 5.47.1-20.
286. King, A.J.F., *The use of animal models in diabetes research*. *Br J Pharmacol*, 2012. **166**(3): p. 877-94.
287. Lukic, M.L., S. Stosic-Grujicic, and A. Shahin, *Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes*. *Dev Immunol*, 1998. **6**(1-2): p. 119-28.
288. Reddy, S., D. Wu, and R.B. Elliott, *Low dose streptozotocin causes diabetes in severe combined immunodeficient (SCID) mice without immune cell infiltration of the pancreatic islets*. *Autoimmunity*, 1995. **20**(2): p. 83-92.
289. Leiter, E.H. and A. Schile, *Genetic and Pharmacologic Models for Type 1 Diabetes*. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2013. **3**(1): p. 9-19.
290. Dugas, V., et al., *Idd13 is involved in determining immunoregulatory DN T-cell number in NOD mice*. *Genes Immun*, 2014. **15**(2): p. 82-7.

291. Pelletier, A.N. and S. Lesage, *The Idd13 congenic interval defines the number of merocytic dendritic cells, a novel trait associated with autoimmune diabetes susceptibility*. J Autoimmun, 2013. **43**: p. 70-7.
292. Chen, Y.-G., et al., *Subcongenic analysis of genetic basis for impaired development of invariant NKT cells in NOD mice*. Immunogenetics, 2007. **59**(9): p. 705-712.
293. Sgouroudis, E., A. Albanese, and C.A. Piccirillo, *Impact of protective IL-2 allelic variants on CD4+ Foxp3+ regulatory T cell function in situ and resistance to autoimmune diabetes in NOD mice*. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 6283-92.
294. Gale, E.A. and K.M. Gillespie, *Diabetes and gender*. Diabetologia, 2001. **44**(1): p. 3-15.
295. Markle, J.G.M., et al., *Sex Differences in the Gut Microbiome Drive Hormone-Dependent Regulation of Autoimmunity*. Science, 2013. **339**(6123): p. 1084-1088.
296. Dolenšek, J., M.S. Rupnik, and A. Stožer, *Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas*. Islets, 2015. **7**(1).
297. Cabrera, O., et al., *The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2334-9.
298. Staeva, T.P., et al., *Recent Lessons Learned From Prevention and Recent-Onset Type 1 Diabetes Immunotherapy Trials*. Diabetes, 2013. **62**(1): p. 9-17.
299. Thayer, T.C., B.S. Wilson, and C.E. Mathews, *Use of NOD Mice to Understand Human Type 1 Diabetes*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2010. **39**(3): p. 541-61.
300. Liston, A., et al., *Gene dosage--limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity*. The Journal of experimental medicine, 2004. **200**(8): p. 1015-26.
301. Yui, M.A., et al., *Production of congenic mouse strains carrying NOD-derived diabetogenic genetic intervals: An approach for the genetic dissection of complex traits*. Mammalian Genome, 1996. **7**(5): p. 331-334.
302. Hill, N.J., et al., *NOD Idd5 locus controls insulinitis and diabetes and overlaps the orthologous CTLA4/IDDM12 and NRAMP1 loci in humans*. Diabetes, 2000. **49**(10): p. 1744-1747.
303. In't Veld, P., *Insulinitis in human type 1 diabetes: a comparison between patients and animal models*. Semin Immunopathol, 2014. **36**(5): p. 569-79.
304. Hillhouse, E.E., et al., *TCR transgenic mice reveal the impact of type 1 diabetes loci on early and late disease checkpoints*. Immunology and Cell Biology, 2016. **94**(7): p. 709-13.
305. Silva, D.G., et al., *Anti-islet autoantibodies trigger autoimmune diabetes in the presence of an increased frequency of islet-reactive CD4 T cells*. Diabetes, 2011. **60**(8): p. 2102-11.
306. Zipris, D., et al., *TLR9-signaling pathways are involved in Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in the biobreeding diabetes-resistant rat*. J Immunol, 2007. **178**(2): p. 693-701.
307. White, D. and M. Rabago-Smith, *Genotype-phenotype associations and human eye color*. Journal Of Human Genetics, 2010. **56**: p. 5.
308. Aguirre-Gamboa, R., et al., *Differential Effects of Environmental and Genetic Factors on T and B Cell Immune Traits*. Cell Rep, 2016. **17**(9): p. 2474-2487.
309. Kochi, Y., *Genetics of autoimmune diseases: perspectives from genome-wide association studies*. Int Immunol, 2016. **28**(4): p. 155-61.

310. Marouli, E., et al., *Rare and low-frequency coding variants alter human adult height*. Nature, 2017. **542**(7640): p. 186-190.
311. McEvoy, B.P. and P.M. Visscher, *Genetics of human height*. Econ Hum Biol, 2009. **7**(3): p. 294-306.
312. Crawford, N.G., et al., *Loci associated with skin pigmentation identified in African populations*. Science, 2017. **358**(6365).
313. Brodin, P., et al., *Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences*. Cell, 2015. **160**(0): p. 37-47.
314. Liston, A., E.J. Carr, and M.A. Linterman, *Shaping Variation in the Human Immune System*. Trends in Immunology, 2016. **37**(10): p. 637-646.
315. Roederer, M., et al., *The genetic architecture of the human immune system: a bioresource for autoimmunity and disease pathogenesis*. Cell, 2015. **161**(2): p. 387-403.
316. Mangino, M., et al., *Innate and adaptive immune traits are differentially affected by genetic and environmental factors*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 13850.
317. van der Vliet, H.J.J. and E.E. Nieuwenhuis, *IPEX as a Result of Mutations in FOXP3*. Clinical and Developmental Immunology, 2007. **2007**: p. 5.
318. Khattri, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 337-42.
319. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
320. Kappes, D.J., *Expanding roles for ThPOK in thymic development*. Immunol Rev, 2010. **238**(1): p. 182-94.
321. He, X., et al., *The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment*. Nature, 2005. **433**(7028): p. 826-33.
322. Dave, V.P., et al., *HD mice: A novel mouse mutant with a specific defect in the generation of CD4⁺ T cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(14): p. 8187-8192.
323. Aaltonen, J., et al., *An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains*. Nature Genetics, 1997. **17**: p. 399.
324. Ionita-Laza, I., et al., *GENETIC ASSOCIATION ANALYSIS OF COPY NUMBER VARIATION (CNVs) IN HUMAN DISEASE PATHOGENESIS*. Genomics, 2009. **93**(1): p. 22-6.
325. Altshuler, D., M.J. Daly, and E.S. Lander, *Genetic Mapping in Human Disease*. Science, 2008. **322**(5903): p. 881-8.
326. Cooper, D.N., et al., *Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease*. Hum Genet, 2013. **132**(10): p. 1077-130.
327. Flint, J. and E. Eskin, *Genome-wide association studies in mice*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(11): p. 807-17.
328. Witte, J.S., *Genome-Wide Association Studies and Beyond*. Annu Rev Public Health, 2010. **31**: p. 9-20.
329. Hong, E.P. and J.W. Park, *Sample Size and Statistical Power Calculation in Genetic Association Studies*. Genomics Inf, 2012. **10**(2): p. 117-22.
330. Bush, W.S. and J.H. Moore, *Chapter 11: Genome-Wide Association Studies*. PLoS Comput Biol, 2012. **8**(12).

331. Hatzikotoulas, K., A. Gilly, and E. Zeggini, *Using population isolates in genetic association studies*. Brief Funct Genomics, 2014. **13**(5): p. 371-7.
332. Erzurumluoglu, A.M., et al., *Importance of Genetic Studies in Consanguineous Populations for the Characterization of Novel Human Gene Functions*. Ann Hum Genet, 2016. **80**(3): p. 187-96.
333. Cook, J.P. and A.P. Morris, *Multi-ethnic genome-wide association study identifies novel locus for type 2 diabetes susceptibility*. European Journal Of Human Genetics, 2016. **24**: p. 1175.
334. Rosenberg, N.A., et al., *Genome-wide association studies in diverse populations*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(5): p. 356-66.
335. Qiu, F., et al., *Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down?* Oncotarget, 2017. **8**(1): p. 268-84.
336. MacGillivray, D.M. and T.R. Kollmann, *The Role of Environmental Factors in Modulating Immune Responses in Early Life*. Front Immunol, 2014. **5**.
337. Romeo, J., et al., *Physical activity, immunity and infection*. Proc Nutr Soc, 2010. **69**(3): p. 390-9.
338. Simpson, R.J. and K. Guy, *Coupling aging immunity with a sedentary lifestyle: has the damage already been done?--a mini-review*. Gerontology, 2010. **56**(5): p. 449-58.
339. Casellas, J., *Inbred mouse strains and genetic stability: a review*. Animal, 2011. **5**(1): p. 1-7.
340. Collin, R., et al., *An Unbiased Linkage Approach Reveals That the p53 Pathway Is Coupled to NK Cell Maturation*. Journal of immunology, 2017.
341. Pelletier, A.N., et al., *NK Cell Proportion and Number Are Influenced by Genetic Loci on Chromosomes 8, 9, and 17*. J Immunol, 2016. **196**(6): p. 2627-36.
342. Suwanai, H., et al., *A defective Il15 allele underlies the deficiency in natural killer cell activity in nonobese diabetic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(20): p. 9305-10.
343. Franckaert, D., et al., *An orthologous non-MHC locus in rats and mice is linked to CD4+ and CD8+ T-cell proportion*. Genes and Immunity, 2017.
344. Yang, H., et al., *On the subspecific origin of the laboratory mouse*. Nat Genet, 2007. **39**(9): p. 1100-7.
345. Frazer, K.A., et al., *A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains*. Nature, 2007. **448**(7157): p. 1050-3.
346. Churchill, G.A., et al., *The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits*. Nat Genet, 2004. **36**(11): p. 1133-7.
347. Phillippi, J., et al., *Using the emerging Collaborative Cross to probe the immune system*. Genes Immun, 2014. **15**(1): p. 38-46.
348. Graham, J.B., et al., *Extensive Homeostatic T Cell Phenotypic Variation within the Collaborative Cross*. Cell Rep, 2017. **21**(8): p. 2313-2325.
349. Kelada, S.N.P., et al., *Genetic Analysis of Hematological Parameters in Incipient Lines of the Collaborative Cross*. G3 (Bethesda), 2012. **2**(2): p. 157-65.
350. Durrant, C., et al., *Collaborative Cross mice and their power to map host susceptibility to Aspergillus fumigatus infection*. Genome Res, 2011. **21**(8): p. 1239-48.
351. Ferris, M.T., et al., *Modeling host genetic regulation of influenza pathogenesis in the collaborative cross*. PLoS Pathog, 2013. **9**(2): p. e1003196.

352. Bottomly, D., et al., *Expression quantitative trait Loci for extreme host response to influenza a in pre-collaborative cross mice*. G3 (Bethesda), 2012. **2**(2): p. 213-21.
353. Gralinski, L.E., et al., *Genome Wide Identification of SARS-CoV Susceptibility Loci Using the Collaborative Cross*. PLoS Genet, 2015. **11**(10): p. e1005504.
354. Lore, N.I., F.A. Iraqi, and A. Bragonzi, *Host genetic diversity influences the severity of Pseudomonas aeruginosa pneumonia in the Collaborative Cross mice*. BMC Genet, 2015. **16**: p. 106.
355. Nachshon, A., et al., *Dissecting the Effect of Genetic Variation on the Hepatic Expression of Drug Disposition Genes across the Collaborative Cross Mouse Strains*. Front Genet, 2016. **7**.
356. Abu-Toamih Atamni, H.J., et al., *Glucose tolerance female-specific QTL mapped in collaborative cross mice*. Mamm Genome, 2017. **28**(1-2): p. 20-30.
357. Levy, R., et al., *Collaborative cross mice in a genetic association study reveal new candidate genes for bone microarchitecture*. BMC Genomics, 2015. **16**.
358. Thaisz, J., et al., *Genetic analysis of albuminuria in collaborative cross and multiple mouse intercross populations*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **303**(7): p. F972-81.
359. Mao, J.H., et al., *Identification of genetic factors that modify motor performance and body weight using Collaborative Cross mice*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16247.
360. Weerasekera, L.Y., et al., *Characterization of Retinal Vascular and Neural Damage in a Novel Model of Diabetic Retinopathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015. **56**(6): p. 3721-30.
361. Rogala, A.R., et al., *The Collaborative Cross as a Resource for Modeling Human Disease: CC011/Unc, a New Mouse Model for Spontaneous Colitis*. Mammalian Genome, 2014. **25**(3): p. 95-108.
362. Shorter, J.R., et al., *Male Infertility Is Responsible for Nearly Half of the Extinction Observed in the Mouse Collaborative Cross*. Genetics, 2017. **206**(2): p. 557-572.
363. Atamni, H.J., et al., *Mapping liver fat female-dependent quantitative trait loci in collaborative cross mice*. Mamm Genome, 2016. **27**(11-12): p. 565-573.
364. Morahan, G., L. Balmer, and D. Monley, *Establishment of "The Gene Mine": a resource for rapid identification of complex trait genes*. Mamm Genome, 2008. **19**(6): p. 390-3.
365. Prochazka, M., et al., *Genetic control of diabetogenesis in NOD/Lt mice. Development and analysis of congenic stocks*. Diabetes, 1989. **38**(11): p. 1446-55.
366. Wicker, L.S., et al., *Fine mapping, gene content, comparative sequencing, and expression analyses support Ctla4 and Nramp1 as candidates for Idd5.1 and Idd5.2 in the nonobese diabetic mouse*. J Immunol, 2004. **173**(1): p. 164-73.
367. Hamilton-Williams, E.E., et al., *Fine mapping of type 1 diabetes regions Idd9.1 and Idd9.2 reveals genetic complexity*. Mamm Genome, 2013. **24**(9-10): p. 358-75.
368. Serreze, D.V., et al., *Subcongenic analysis of the Idd13 locus in NOD/Lt mice: evidence for several susceptibility genes including a possible diabetogenic role for beta 2-microglobulin*. J Immunol, 1998. **160**(3): p. 1472-8.
369. Hall, B., A. Limaye, and A.B. Kulkarni, *Overview: Generation of Gene Knockout Mice*. Curr Protoc Cell Biol, 2009. **Chapter**: p. Unit-19.1217.
370. Sauer, B., *Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/lox System*. Methods, 1998. **14**(4): p. 381-392.

371. Unniyampurath, U., R. Pilankatta, and M.N. Krishnan, *RNA Interference in the Age of CRISPR: Will CRISPR Interfere with RNAi?* Int J Mol Sci, 2016. **17**(3): p. 291.
372. Strober, S., et al., *Cloned natural suppressor cell lines express the CD3+CD4-CD8-surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor.* Journal of immunology, 1989. **143**(4): p. 1118-22.
373. Fischer, K., et al., *Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells.* Blood, 2005. **105**(7): p. 2828-35.
374. Abraham, V.S., D.H. Sachs, and M. Sykes, *Mechanism of protection from graft-versus-host disease mortality by IL-2. III. Early reductions in donor T cell subsets and expansion of a CD3+CD4-CD8- cell population.* Journal of immunology, 1992. **148**(12): p. 3746-52.
375. Hillhouse, E.E., J.-S. Delisle, and S. Lesage, *Immunoregulatory CD4-CD8- T cells as a potential therapeutic tool for transplantation, autoimmunity and cancer.* Frontiers in Immunology, 2013. **4**.
376. Hillhouse, E.E. and S. Lesage, *A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells.* Journal of autoimmunity, 2013. **40**: p. 58-65.
377. Hillhouse, E.E., et al., *Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice.* Immunology and Cell Biology, 2010. **88**(8): p. 771-780.
378. Dugas, V., et al., *Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes.* Journal of autoimmunity, 2010. **35**(1): p. 23-32.
379. McIver, Z., et al., *Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation.* British Journal of Haematology, 2008. **141**(2): p. 170-178.
380. Zhang, Z.X., et al., *Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway.* Journal of immunology, 2006. **177**(10): p. 6920-9.
381. Zhang, D., et al., *New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses.* Blood, 2007. **109**(9): p. 4071-9.
382. He, K.M., et al., *Donor double-negative Treg promote allogeneic mixed chimerism and tolerance.* Eur J Immunol, 2007. **37**(12): p. 3455-66.
383. Ford McIntyre, M.S., et al., *Consequences of double negative regulatory T cell and antigen presenting cell interaction on immune response suppression.* International Immunopharmacology, 2011. **11**(5): p. 597-603.
384. Zhang, Z.X., et al., *Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression.* Nature medicine, 2000. **6**(7): p. 782-9.
385. Ford, M.S., et al., *The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo.* J Exp Med, 2002. **196**(2): p. 261-7.
386. Shevach, E.M., *Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression.* Immunity, 2009. **30**(5): p. 636-45.
387. Vignali, D.A.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
388. Schmidt, A., N. Oberle, and P.H. Krammer, *Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression.* Front Immunol, 2012. **3**.

389. Strauss, L., et al., *A unique subset of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4345-54.
390. Takeuchi, Y. and H. Nishikawa, *Roles of regulatory T cells in cancer immunity*. Int Immunol, 2016. **28**(8): p. 401-9.
391. Facciabene, A., G.T. Motz, and G. Coukos, *T Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis*. Cancer Res, 2012. **72**(9): p. 2162-71.
392. Marra, L.E., et al., *IL-10 induces regulatory T cell apoptosis by up-regulation of the membrane form of TNF-alpha*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 1028-35.
393. Cohen, P.L. and R.A. Eisenberg, *Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 243-69.
394. Mohamood, A.S., *Fas-Mediated Apoptosis Regulates the Composition of Peripheral $\alpha\beta$ T Cell Repertoire by Constitutively Purging Out Double Negative T Cells*. 2008. **3**(10).
395. Li, K.P., et al., *Temporal Expression of Bim Limits the Development of Agonist-Selected Thymocytes and Skews Their TCRbeta Repertoire*. J Immunol, 2017. **198**(1): p. 257-269.
396. Liston, A., et al., *Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim*. Immunity, 2004. **21**(6): p. 817-30.
397. Shah, D.K. and J.C. Zuniga-Pflucker, *An overview of the intrathymic intricacies of T cell development*. J Immunol, 2014. **192**(9): p. 4017-23.
398. Yui, M.A. and E.V. Rothenberg, *Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(8): p. 529-45.
399. Pui, J.C., et al., *Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination*. Immunity, 1999. **11**(3): p. 299-308.
400. Radtke, F., et al., *Deficient T Cell Fate Specification in Mice with an Induced Inactivation of Notch1*. Immunity, 1999. **10**(5): p. 547-558.
401. Yashiro-Ohtani, Y., et al., *Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A*. Genes Dev, 2009. **23**(14): p. 1665-76.
402. Backer, R.A., et al., *A central role for Notch in effector CD8(+) T cell differentiation*. Nat Immunol, 2014. **15**(12): p. 1143-51.
403. Mathieu, M., et al., *The Notch signaling pathway controls short-lived effector CD8+ T cell differentiation but is dispensable for memory generation*. J Immunol, 2015. **194**(12): p. 5654-62.
404. Mochizuki, K., S. He, and Y. Zhang, *Notch and Inflammatory T Cell Response: New Developments and Challenges*. Immunotherapy, 2011. **3**(11): p. 1353-66.
405. Tsukumo, S.-i. and K. Yasutomo, *Notch Governing Mature T Cell Differentiation*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(12): p. 7109-7113.
406. Hattori, N., et al., *Involvement of transcription factors TCF-1 and GATA-3 in the initiation of the earliest step of T cell development in the thymus*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 1137-47.
407. Garcia-Ojeda, M.E., et al., *GATA-3 promotes T-cell specification by repressing B-cell potential in pro-T cells in mice*. Blood, 2013. **121**(10): p. 1749-59.

408. Weber, B.N., et al., *A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation*. Nature, 2011. **476**(7358): p. 63-8.
409. Kastner, P., et al., *Bcl11b represses a mature T-cell gene expression program in immature CD4(+)CD8(+) thymocytes*. Eur J Immunol, 2010. **40**(8): p. 2143-54.
410. Albu, D.I., et al., *BCL11B is required for positive selection and survival of double-positive thymocytes*. The Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(12): p. 3003-3015.
411. Pennington, D.J., B. Silva-Santos, and A.C. Hayday, *$\gamma\delta$ T cell development — having the strength to get there*. Current Opinion in Immunology, 2005. **17**(2): p. 108-115.
412. Wang, F., C.Y. Huang, and O. Kanagawa, *Rapid deletion of rearranged T cell antigen receptor (TCR) Valpha-Jalpha segment by secondary rearrangement in the thymus: role of continuous rearrangement of TCR alpha chain gene and positive selection in the T cell repertoire formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11834-9.
413. Petrie, H.T., et al., *Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 615-22.
414. Gascoigne, N.R., et al., *TCR Signal Strength and T Cell Development*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2016. **32**: p. 327-348.
415. Singer, A., S. Adoro, and J.H. Park, *Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice*. Nature reviews. Immunology, 2008. **8**(10): p. 788-801.
416. Sun, G., et al., *The zinc finger protein cKrox directs CD4 lineage differentiation during intrathymic T cell positive selection*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 373-81.
417. Hernandez-Hoyos, G., et al., *GATA-3 expression is controlled by TCR signals and regulates CD4/CD8 differentiation*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 83-94.
418. Setoguchi, R., et al., *Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development*. Science, 2008. **319**(5864): p. 822-5.
419. Grueter, B., et al., *Runx3 regulates integrin alpha E/CD103 and CD4 expression during development of CD4-/CD8+ T cells*. J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1694-705.
420. Egawa, T., et al., *The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells*. The Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(8): p. 1945-1957.
421. Yu, Q., et al., *In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8+ T cells*. J Exp Med, 2003. **197**(4): p. 475-87.
422. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. Nature Reviews Immunology, 2002. **2**: p. 309.
423. Taniuchi, I., *Views on helper/cytotoxic lineage choice from a bottom-up approach*. Immunol Rev, 2016. **271**(1): p. 98-113.
424. Anderson, G., et al., *Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro*. J Exp Med, 1994. **179**(6): p. 2027-31.
425. Li, W., et al., *The SLAM-Associated Protein (SAP)/Fyn/PKC θ Pathway is Required for Thymocyte-mediated CD4 T Cell Development*. Immunity, 2007. **27**(5): p. 763-74.
426. Bediako, Y., et al., *SAP is required for the development of innate phenotype in H2-M3-restricted CD8(+) T cells()*. J Immunol, 2012. **189**(10): p. 4787-96.

427. Veillette, A., Z. Dong, and S. Latour, *Consequence of the SLAM-SAP Signaling Pathway in Innate-like and Conventional Lymphocytes*. *Immunity*, 2007. **27**(5): p. 698-710.
428. Marinova, T., et al., *Presence of HLA-DR immunopositive cells in human fetal thymus*. *Arch Physiol Biochem*, 2001. **109**(1): p. 74-9.
429. Park, S.H., et al., *HLA-DR expression in human fetal thymocytes*. *Hum Immunol*, 1992. **33**(4): p. 294-8.
430. Artyomov, M.N., et al., *CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(39): p. 16916-21.
431. Veillette, A., et al., *The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck*. *Cell*, 1988. **55**(2): p. 301-8.
432. Doyle, C. and J.L. Strominger, *Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion*. *Nature*, 1987. **330**(6145): p. 256-9.
433. Norment, A.M., et al., *Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules*. *Nature*, 1988. **336**(6194): p. 79-81.
434. Dugas, V., et al., *Unusual selection and peripheral homeostasis for immunoregulatory CD4(-) CD8(-) T cells*. *Immunology*, 2013. **139**(1): p. 129-39.
435. Hayes, S.M., L. Li, and P.E. Love, *TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate*. *Immunity*, 2005. **22**(5): p. 583-93.
436. Egawa, T., et al., *Lineage diversion of T cell receptor transgenic thymocytes revealed by lineage fate mapping*. *PLoS One*, 2008. **3**(1): p. e1512.
437. Farr, A.R., et al., *CD1d-unrestricted NKT cells are endowed with a hybrid function far superior than that of iNKT cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(35): p. 12841-6.
438. Dashtsoodol, N., et al., *Alternative pathway for the development of Valpha14(+) NKT cells directly from CD4(-)CD8(-) thymocytes that bypasses the CD4(+)CD8(+) stage*. *Nat Immunol*, 2017. **18**(3): p. 274-282.
439. Pobeziński, L.A., et al., *Clonal deletion and the fate of autoreactive thymocytes that survive negative selection*. *Nature Immunology*, 2012. **13**(6): p. 569-578.
440. Zhao, X., et al., *A novel differentiation pathway from CD4(+) T cells to CD4(-) T cells for maintaining immune system homeostasis*. *Cell Death Dis*, 2016. **7**(4): p. e2193-.
441. Rodriguez-Rodriguez, N., et al., *Programmed cell death 1 and Helios distinguish TCR-alphabeta+ double-negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells*. *Journal of immunology*, 2015. **194**(9): p. 4207-14.
442. Pestano, G.A., et al., *Inactivation of misselected CD8 T cells by CD8 gene methylation and cell death*. *Science*, 1999. **284**(5417): p. 1187-91.
443. Van Laethem, F., et al., *Deletion of CD4 and CD8 coreceptors permits generation of alphabetaT cells that recognize antigens independently of the MHC*. *Immunity*, 2007. **27**(5): p. 735-50.
444. Van Laethem, F., et al., *Lck availability during thymic selection determines the recognition specificity of the T cell repertoire*. *Cell*, 2013. **154**(6): p. 1326-41.
445. Van Laethem, F., A.N. Tikhonova, and A. Singer, *MHC restriction is imposed on a diverse T cell receptor repertoire by CD4 and CD8 co-receptors during thymic selection*. *Trends Immunol*, 2012. **33**(9): p. 437-41.

446. Mayans, S., et al., *alphabetaT cell receptors expressed by CD4(-)CD8alphabeta(-) intraepithelial T cells drive their fate into a unique lineage with unusual MHC reactivities*. *Immunity*, 2014. **41**(2): p. 207-18.
447. Haks, M.C., et al., *Attenuation of gammadeltaTCR signaling efficiently diverts thymocytes to the alphabeta lineage*. *Immunity*, 2005. **22**(5): p. 595-606.
448. Kreslavsky, T., et al., *T cell receptor-instructed alphabeta versus gammadelta lineage commitment revealed by single-cell analysis*. *J Exp Med*, 2008. **205**(5): p. 1173-86.
449. Correa, I., et al., *Most gamma delta T cells develop normally in beta 2-microglobulin-deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(2): p. 653-7.
450. Bigby, M., et al., *Most gamma delta T cells develop normally in the absence of MHC class II molecules*. *J Immunol*, 1993. **151**(9): p. 4465-75.
451. Paul, S., Shilpi, and G. Lal, *Role of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells in autoimmunity*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2015. **97**(2): p. 259-271.
452. Lawand, M., J. Déchanet-Merville, and M.-C. Dieu-Nosjean, *Key Features of Gamma-Delta T-Cell Subsets in Human Diseases and Their Immunotherapeutic Implications*. *Frontiers in Immunology*, 2017. **8**(761).
453. Vantourout, P., *Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology()*. 2013. **13**(2): p. 88-100.
454. Porcelli, S., et al., *Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain*. *J Exp Med*, 1993. **178**(1): p. 1-16.
455. Dellabona, P., et al., *An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells*. *The Journal of experimental medicine*, 1994. **180**(3): p. 1171-6.
456. Bendelac, A., et al., *CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes*. *Science*, 1995. **268**(5212): p. 863-5.
457. Fowlkes, B.J., et al., *A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family*. *Nature*, 1987. **329**(6136): p. 251-4.
458. Das, R., *Transcriptional control of invariant NKT cell development*. 2010. **238**(1): p. 195-215.
459. Godfrey, D.I., et al., *NKT cells: what's in a name?* *Nature reviews. Immunology*, 2004. **4**(3): p. 231-7.
460. Liu, Y., et al., *A modified alpha-galactosyl ceramide for staining and stimulating natural killer T cells*. *Journal of immunological methods*, 2006. **312**(1-2): p. 34-9.
461. Scott-Browne, J.P., et al., *Germline-encoded recognition of diverse glycolipids by natural killer T cells*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(10): p. 1105-13.
462. Bedel, R., et al., *Effective functional maturation of invariant natural killer T cells is constrained by negative selection and T-cell antigen receptor affinity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(1): p. E119-28.
463. Mallevaey, T., et al., *T Cell Receptor CDR2 β and CDR3 β Loops Collaborate Functionally to Shape the iNKT Cell Repertoire*. *Immunity*, 2009. **31**(1): p. 60-71.
464. Matsuda, J.L., et al., *Natural killer T cells reactive to a single glycolipid exhibit a highly diverse T cell receptor β repertoire and small clone size*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(22): p. 12636-41.

465. Zhou, D., et al., *Lysosomal Glycosphingolipid Recognition by NKT Cells*. Science, 2004. **306**(5702): p. 1786-1789.
466. Tsuji, M., *Glycolipids and phospholipids as natural CD1d-binding NKT cell ligands*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(16): p. 1889-98.
467. Kain, L., et al., *The Identification of the Endogenous Ligands of Natural Killer T Cells Reveals the Presence of Mammalian α -Linked Glycosylceramides*. Immunity, 2014. **41**(4): p. 543-54.
468. Fox, L.M., et al., *Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes*. PLoS Biol, 2009. **7**(10): p. e1000228.
469. Pei, B., et al., *Diverse endogenous antigens for mouse NKT cells: self-antigens that are not glycosphingolipids*. J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1348-60.
470. O'Keefe, J., M. Podbielska, and E.L. Hogan, *Invariant natural killer T cells and their ligands: focus on multiple sclerosis*. Immunology, 2015. **145**(4): p. 468-75.
471. Dhodapkar, M.V. and V. Kumar, *Type II NKT Cells and Their Emerging Role in Health and Disease*. The Journal of Immunology, 2017. **198**(3): p. 1015-1021.
472. Godfrey, D.I., S. Stankovic, and A.G. Baxter, *Raising the NKT cell family*. Nature Immunology, 2010. **11**(3): p. 197-206.
473. Tupin, E., Y. Kinjo, and M. Kronenberg, *The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms*. Nature Reviews Microbiology, 2007. **5**: p. 405.
474. Subleski, J.J., et al., *The split personality of NKT cells in malignancy, autoimmune and allergic disorders*. Immunotherapy, 2011. **3**(10): p. 1167-84.
475. Godfrey, D.I. and M. Kronenberg, *Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells*. J Clin Invest, 2004. **114**(10): p. 1379-88.
476. Wermeling, F., et al., *Invariant NKT cells limit activation of autoreactive CD1d-positive B cells*. J Exp Med, 2010. **207**(5): p. 943-52.
477. Shi, F.D., *Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the mouse*. 2001. **98**(12): p. 6777-82.
478. Sundararaj, S., et al., *Differing roles of CD1d2 and CD1d1 proteins in type I natural killer T cell development and function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(6): p. E1204-e1213.
479. Xiao, X. and J. Cai, *Mucosal-Associated Invariant T Cells: New Insights into Antigen Recognition and Activation*. Front Immunol, 2017. **8**.
480. Treiner, E., et al., *Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 164-9.
481. Koay, H.F., et al., *A three-stage intrathymic development pathway for the mucosal-associated invariant T cell lineage*. Nature Immunology, 2016. **17**(11): p. 1300-1311.
482. Goldfinch, N., et al., *Conservation of mucosal associated invariant T (MAIT) cells and the MR1 restriction element in ruminants, and abundance of MAIT cells in spleen*. Veterinary research, 2010. **41**(5): p. 62.
483. Martin, E., et al., *Stepwise development of MAIT cells in mouse and human*. PLoS Biol, 2009. **7**(3): p. e54.
484. Gold, M.C., R.J. Napier, and D.M. Lewinsohn, *MR1-restricted mucosal associated invariant T (MAIT) cells in the immune response to Mycobacterium tuberculosis*. Immunol Rev, 2015. **264**(1): p. 154-66.
485. Hinks, T.S.C., *Mucosal-associated invariant T cells in autoimmunity, immune-mediated diseases and airways disease*. Immunology, 2016. **148**(1): p. 1-12.

486. Gulden, E., N. Palm, and K.C. Herold, *MAIT Cells: A Link between Gut Integrity and Type 1 Diabetes*. *Cell Metab*, 2017. **26**(6): p. 813-815.
487. Rouxel, O., et al., *Cytotoxic and regulatory roles of mucosal-associated invariant T cells in type 1 diabetes*. *Nature Immunology*, 2017. **18**: p. 1321.
488. Cheroutre, H., F. Lambolez, and D. Mucida, *The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(7): p. 445-56.
489. Sheridan, B.S. and L. Lefrançois, *Intraepithelial Lymphocytes: To Serve and Protect*. *Curr Gastroenterol Rep*, 2010. **12**(6): p. 513-21.
490. Shevach, E.M., *From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells*. *Immunity*, 2006. **25**(2): p. 195-201.
491. Abraham, V.S., D.H. Sachs, and M. Sykes, *Mechanism of protection from graft-versus-host disease mortality by IL-2. III. Early reductions in donor T cell subsets and expansion of a CD3+CD4-CD8- cell population*. *J Immunol*, 1992. **148**(12): p. 3746-52.
492. Strober, S., et al., *Cloned natural suppressor cell lines express the CD3+CD4-CD8- surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor*. *J Immunol*, 1989. **143**(4): p. 1118-22.
493. Hillhouse, E.E., et al., *Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice*. *Immunol Cell Biol*, 2010. **88**(8): p. 771-80.
494. Zhang, Z.X., et al., *Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression*. *Nat Med*, 2000. **6**(7): p. 782-9.
495. Zhang, Z.X., et al., *Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, fas-fas ligand-independent pathway*. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 6920-9.
496. Young, K.J. and L. Zhang, *The nature and mechanisms of DN regulatory T-cell mediated suppression*. *Hum Immunol*, 2002. **63**(10): p. 926-34.
497. Hillhouse, E.E., J.S. Delisle, and S. Lesage, *Immunoregulatory CD4(-)CD8(-) T cells as a potential therapeutic tool for transplantation, autoimmunity, and cancer*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 6.
498. Hillhouse, E.E. and S. Lesage, *A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells*. *J Autoimmun*, 2013. **40**(0): p. 58-65.
499. Bendelac, A., P.B. Savage, and L. Teyton, *The biology of NKT cells*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 297-336.
500. Exley, M., et al., *Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells*. *J Exp Med*, 1997. **186**(1): p. 109-20.
501. Bendelac, A., *Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes*. *J Exp Med*, 1995. **182**(6): p. 2091-6.
502. Ford, M.S., et al., *Double-Negative T Regulatory Cells Can Develop Outside the Thymus and Do Not Mature from CD8+ T Cell Precursors*. *J Immunol*, 2006. **177**(5): p. 2803-9.
503. Terrence, K., et al., *Premature expression of T cell receptor (TCR)alphabeta suppresses TCRgammadelta gene rearrangement but permits development of gammadelta lineage T cells*. *J Exp Med*, 2000. **192**(4): p. 537-48.

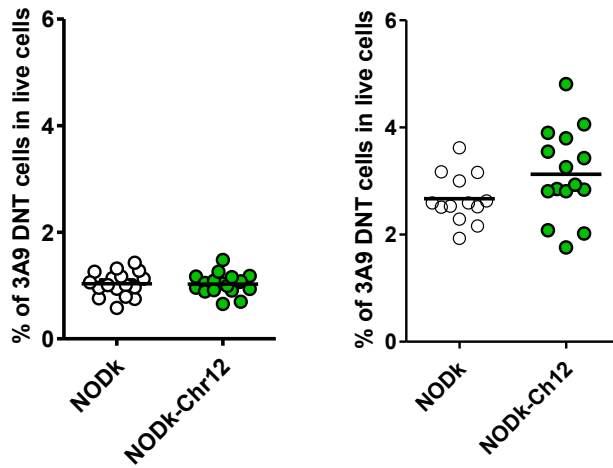
504. Fritsch, M., et al., *A TCR alpha chain transgene induces maturation of CD4- CD8-alpha beta+ T cells from gamma delta T cell precursors*. Eur J Immunol, 1998. **28**(3): p. 828-37.
505. Bruno, L., H.J. Fehling, and H. von Boehmer, *The alpha beta T cell receptor can replace the gamma delta receptor in the development of gamma delta lineage cells*. Immunity, 1996. **5**(4): p. 343-52.
506. Duncan, B., et al., *Double negative (CD3+ 4- 8-) TCR alphabeta splenic cells from young NOD mice provide long-lasting protection against type 1 diabetes*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11427.
507. Zhang, D., et al., *Adoptive cell therapy using antigen-specific CD4-CD8- T regulatory cells to prevent autoimmune diabetes and promote islet allograft survival in NOD mice*. Diabetologia, 2011. **54**(8): p. 2082-2092.
508. Su, Y., et al., *Double negative Treg cells promote nonmyeloablative bone marrow chimerism by inducing T-cell clonal deletion and suppressing NK cell function*. Eur J Immunol, 2012. **42**(5): p. 1216-25.
509. Kranich, J. and N.J. Krautler, *How Follicular Dendritic Cells Shape the B-Cell Antigenome*. Front Immunol, 2016. **7**.
510. Ramiscal, R.R. and C.G. Vinuesa, *T-cell subsets in the germinal center*. Immunol Rev, 2013. **252**(1): p. 146-55.
511. AbuAttieh, M., et al., *Affinity maturation of antibodies requires integrity of the adult thymus*. Eur J Immunol, 2012. **42**(2): p. 500-10.
512. Ye, H., et al., *Characterization of CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells reconstitution in patients following hematopoietic stem-cell transplantation*. Transplant Immunology, 2011. **25**(4): p. 180-186.
513. Crispin, J.C., et al., *Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8761-6.
514. Tarbox, J.A., et al., *Elevated double negative T cells in pediatric autoimmunity*. J Clin Immunol, 2014. **34**(5): p. 594-9.
515. Dean, G.S., et al., *Characterization of CD3+ CD4- CD8- (double negative) T cells in patients with systemic lupus erythematosus: production of IL-4*. Lupus, 2002. **11**(8): p. 501-7.
516. Terrence, K., *Premature Expression of T Cell Receptor (Tcr)αβ Suppresses Tcrγδ Gene Rearrangement but Permits Development of γδ Lineage T Cells*. 2000. **192**(4): p. 537-48.
517. Pellicci, D.G., et al., *DX5/CD49b-positive T cells are not synonymous with CD1d-dependent NKT cells*. Journal of immunology, 2005. **175**(7): p. 4416-25.
518. Berg, L.J., *Signalling through TEC kinases regulates conventional versus innate CD8+ T-cell development*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**: p. 479.
519. Cruz Tleugabulova, M., et al., *Discrete TCR Binding Kinetics Control Invariant NKT Cell Selection and Central Priming*. The Journal of Immunology, 2016. **197**(10): p. 3959-3969.
520. Jordan, M.S., et al., *Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide*. Nature Immunology, 2001. **2**: p. 301.
521. Apostolou, I., et al., *Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen*. Nature Immunology, 2002. **3**: p. 756.

522. Walker, L.S., et al., *Antigen-dependent proliferation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo*. J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 249-58.
523. Shawar, S.M., et al., *Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 839-80.
524. Alfonso, C. and L. Karlsson, *Nonclassical MHC class II molecules*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 113-42.
525. Krovi, S.H. and L. Gapin, *Structure and function of the non-classical major histocompatibility complex molecule MRI*. Immunogenetics, 2016. **68**(8): p. 549-59.
526. Kim, H.S., et al., *Biochemical characterization of CD1d expression in the absence of beta2-microglobulin*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9289-95.
527. Yamaguchi, H. and K. Hashimoto, *Association of MRI protein, an MHC class I-related molecule, with beta(2)-microglobulin*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(2): p. 722-9.
528. Gapin, L., *Where Do MAIT Cells Fit in the Family of Unconventional T Cells?* PLoS Biol, 2009. **7**(3).
529. Zerrahn, J., et al., *Class I MHC molecules on hematopoietic cells can support intrathymic positive selection of T cell receptor transgenic T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11470-5.
530. Rodriguez-Rodriguez, N., et al., *Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR-alpha-beta(+) CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells*. Eur J Immunol, 2016. **46**(6): p. 1383-91.
531. Ellmeier, W., et al., *An enhancer that directs lineage-specific expression of CD8 in positively selected thymocytes and mature T cells*. Immunity, 1997. **7**(4): p. 537-47.
532. Cheroutre, H. and F. Lambolez, *Doubting the TCR coreceptor function of CD8alphaalpha*. Immunity, 2008. **28**(2): p. 149-59.
533. Madakamutil, L.T., et al., *CD8alphaalpha-mediated survival and differentiation of CD8 memory T cell precursors*. Science, 2004. **304**(5670): p. 590-3.
534. Wang, C., et al., *Real-time imaging of translation on single mRNA transcripts in live cells*. Cell, 2016. **165**(4): p. 990-1001.
535. Blais, M.-É., et al., *Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses?* Blood, 2004. **103**(8): p. 3102-3110.
536. Kieper, W.C., J.T. Burghardt, and C.D. Surh, *A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 40-4.
537. Cho, J.H., et al., *T cell receptor-dependent regulation of lipid rafts controls naive CD8⁺ T cell homeostasis*. Immunity, 2010. **32**(2): p. 214-26.
538. Banerjee, A., et al., *Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8⁺ T cells to compete for the memory cell niche*. J Immunol, 2010. **185**(9): p. 4988-92.
539. Martinet, V., et al., *Type I interferons regulate eomesodermin expression and the development of unconventional memory CD8(+) T cells*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7089.
540. Haluszczak, C., et al., *The antigen-specific CD8⁺ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion*. J Exp Med, 2009. **206**(2): p. 435-48.
541. Sprent, J. and C.D. Surh, *Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 478-84.

542. Surh, C.D. and J. Sprent, *Homeostasis of Naive and Memory T Cells*. *Immunity*, 2008. **29**(6): p. 848-862.
543. Jameson, S.C., Y.J. Lee, and K.A. Hogquist, *Innate Memory T cells*. *Adv Immunol*, 2015. **126**: p. 173-213.
544. Lee, Y.J., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Alternative memory in the CD8 lineage*. *Trends Immunol*, 2011. **32**(2): p. 50-6.
545. Sykes, M., *Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells*. *Journal of immunology*, 1990. **145**(10): p. 3209-15.
546. Strasser, A., P.J. Jost, and S. Nagata, *The many roles of FAS receptor signaling in the immune system*. *Immunity*, 2009. **30**(2): p. 180-92.
547. Trimble, L.A., et al., *Fas-dependent elimination of nonselected CD8 cells and lpr disease*. *J Immunol*, 2002. **168**(10): p. 4960-7.
548. Adachi, M., et al., *Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(5): p. 2131-6.
549. Bristeau-Leprince, A., et al., *Human TCR alpha/beta+ CD4-CD8- double-negative T cells in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome express restricted Vbeta TCR diversity and are clonally related to CD8+ T cells*. *J Immunol*, 2008. **181**(1): p. 440-8.
550. Kinjyo, I., et al., *Cutting edge: Lymphoproliferation caused by Fas deficiency is dependent on the transcription factor eomesodermin*. *J Immunol*, 2010. **185**(12): p. 7151-5.
551. Renno, T., et al., *Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(2): p. 540-7.
552. Renno, T., et al., *Peripheral T cells undergoing superantigen-induced apoptosis in vivo express B220 and upregulate Fas and Fas ligand*. *J Exp Med*, 1996. **183**(2): p. 431-7.
553. Oka, S., et al., *Presence of B220 within thymocytes and its expression on the cell surface during apoptosis*. *Immunology*, 2000. **100**(4): p. 417-23.
554. Watanabe, Y. and T. Akaike, *Activation signal induces the expression of B cell-specific CD45R epitope (6B2) on murine T cells*. *Scand J Immunol*, 1994. **39**(5): p. 419-25.
555. Zhang, Z., V.C. Kytтарыs, and G.C. Tsokos, *The role of IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis*. *J Immunol*, 2009. **183**(5): p. 3160-9.
556. D'Acquisto, F. and T. Crompton, *CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells: Saviours or villains of the immune response?* *Biochemical Pharmacology*, 2011. **82**(4): p. 333-340.
557. Kytтарыs, V.C., et al., *Cutting edge: IL-23 receptor deficiency prevents the development of lupus nephritis in C57BL/6-lpr/lpr mice*. *J Immunol*, 2010. **184**(9): p. 4605-9.
558. Juvet, S.C. and L. Zhang, *Double negative regulatory T cells in transplantation and autoimmunity: recent progress and future directions*. *J Mol Cell Biol*, 2012. **4**(1): p. 48-58.
559. Fukuyama, H., et al., *Transgenic expression of Fas in T cells blocks lymphoproliferation but not autoimmune disease in MRL-lpr mice*. *J Immunol*, 1998. **160**(8): p. 3805-11.
560. Labi, V., et al., *Deregulated cell death and lymphocyte homeostasis cause premature lethality in mice lacking the BH3-only proteins Bim and Bmf*. *Blood*, 2014. **123**(17): p. 2652-62.

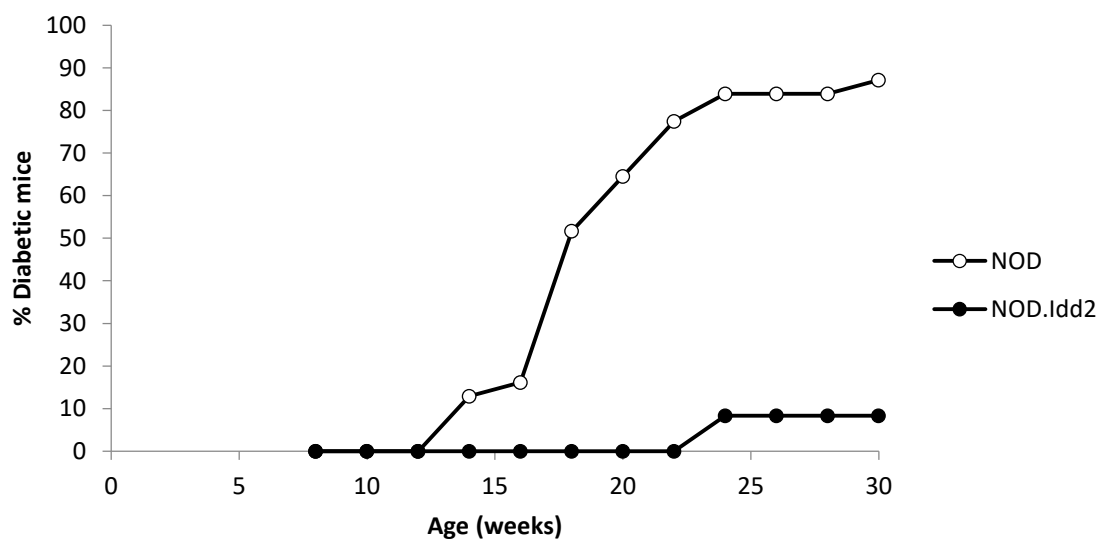
561. Bouillet, P., et al., *Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity*. *Science*, 1999. **286**(5445): p. 1735-8.
562. Hu, Q., et al., *Bim-mediated apoptosis is not necessary for thymic negative selection to ubiquitous self-antigens*. *J Immunol*, 2009. **183**(12): p. 7761-7.
563. Bouillet, P., et al., *BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes*. *Nature*, 2002. **415**(6874): p. 922-6.
564. Kovalovsky, D., *A Novel TCR Transgenic Model Reveals That Negative Selection Involves an Immediate, Bim-Dependent Pathway and a Delayed, Bim-Independent Pathway*. 2010. **5**(1).
565. Hutcheson, J. and H. Perlman, *Loss of Bim results in abnormal accumulation of mature CD4(-)CD8(-)CD44(-)CD25(-) thymocytes*. *Immunobiology*, 2007. **212**(8): p. 629-36.
566. Baldwin, T.A., et al., *The timing of TCR α expression critically influences T cell development and selection*. *J Exp Med*, 2005. **202**(1): p. 111-21.
567. Duarte, N., et al., *Prevention of Diabetes in Nonobese Diabetic Mice Mediated by CD1d-Restricted Nonclassical NKT Cells*. *The Journal of Immunology*, 2004. **173**(5): p. 3112-3118.
568. Wang, B., Y.B. Geng, and C.R. Wang, *Cd1-Restricted Nk T Cells Protect Nonobese Diabetic Mice from Developing Diabetes*. *J Exp Med*, 2001. **194**(3): p. 313-20.
569. Naumov, Y.N., et al., *Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(24): p. 13838-43.
570. Yang, J.Q., et al., *CD1d deficiency exacerbates inflammatory dermatitis in MRL-*lpr/lpr* mice*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(6): p. 1723-32.
571. Brigl, M. and M.B. Brenner, *CD1: antigen presentation and T cell function*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 817-90.
572. Palmer, V.L., et al., *Cd1d regulates B cell development but not B cell accumulation and IL10 production in mice with pathologic CD5(+) B cell expansion*. *BMC Immunol*, 2015. **16**.
573. Rahimpour, A., et al., *Identification of phenotypically and functionally heterogeneous mouse mucosal-associated invariant T cells using MRI tetramers*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2015. **212**(7): p. 1095-1108.
574. Grupillo, M., et al., *An improved intracellular staining protocol for efficient detection of nuclear proteins in YFP-expressing cells*. *Biotechniques*, 2011. **51**(6): p. 417-20.

Annexe 1



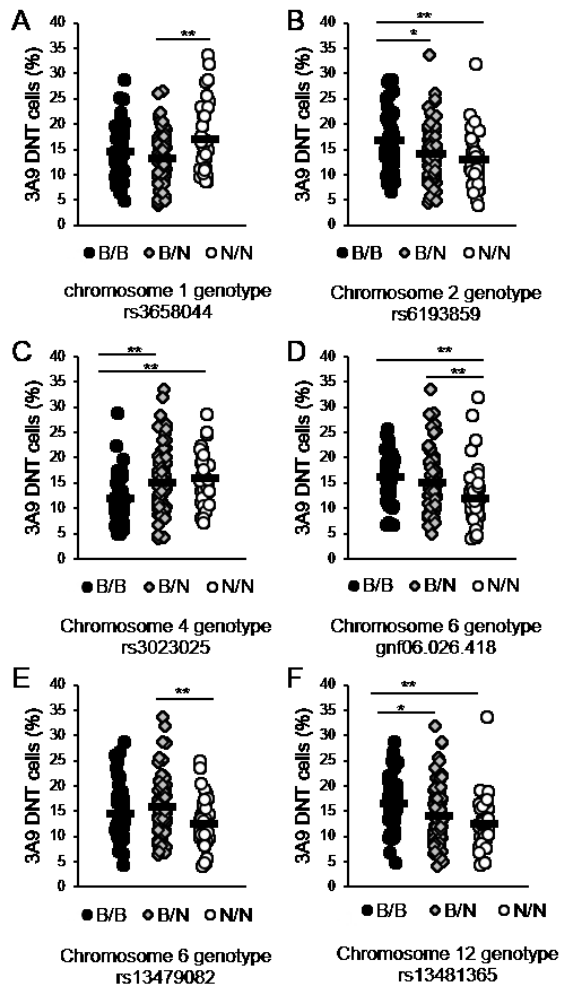
La proportion de cellules DN T n'est pas significativement influencée par le locus Chr12.
Proportion de cellules DN T dans la rate (panneau de gauche) ou les ganglions lymphatique (panneau de droite) de souris TCR 3A9 NOD.H2k

Annexe 2



Le locus Chr9L (*Idd2*) protège du développement du diabète dans les souris NOD, après réintroduction de l'haplotype H-2^{g7} du CMH. Incidence de diabète monitorée par vérification du glucose urinaire à intervalle régulier de deux semaines chez les souris NOD (blanc) ou NOD.*Idd2* (noir).

Annexe 3



Parmi les locus suggestifs présentés dans l'article 1, ceux situés sur les chromosomes 6 et 12 pourraient expliquer une proportion de cellules DN T plus élevée chez la lignée parentale B10.BR. Proportion de cellules DN T 3A9 dans les ganglions lymphatiques des souris F2 ségréguées selon leurs génotypes aux SNP suivants atteignant un LOD score suggestif :

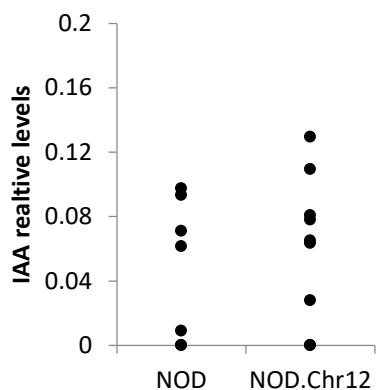
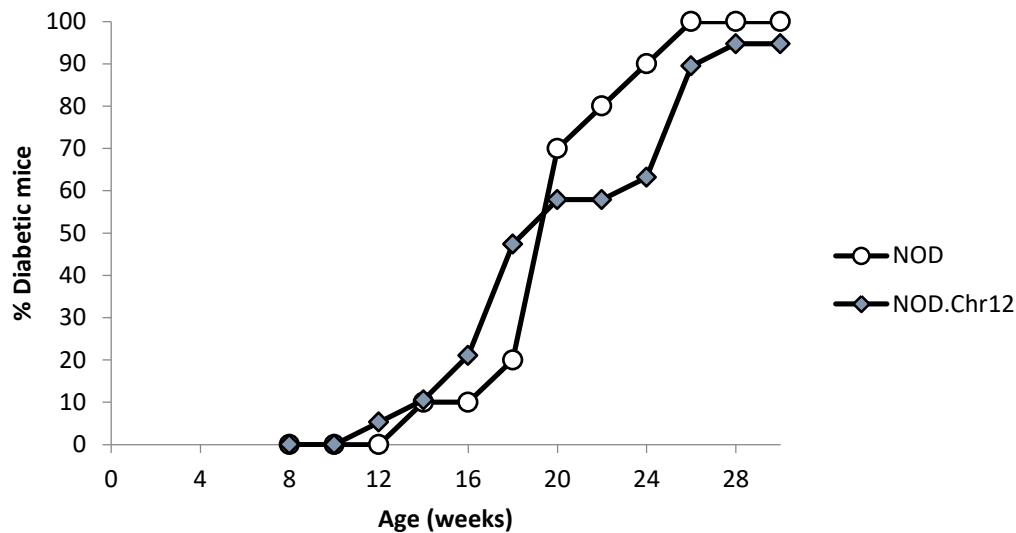
- A) rs365804 ; chromosome 1,
- B) rs6193859 ; chromosome 2,
- C) rs3023025 ; chromosome 4,
- D) gnf06.026.418 ; chromosome 6

E) rs13479082 ; chromosome 6

F) rs13481365 ; chromosome 12.

B/B mice, homozygote pour les allèles B10.BR (cercles noirs); B/N, heterozygotes pour les allèles B10.BR et NOD. $H2^k$ (losanges gris); N/N, homozygote pour les allèles NOD. $H2^k$ (cercles blancs). Chaque symbole représente une souris individuelle. *p value*, * <0.05 , ns = non-significatif.

Annexe 4



Le locus Chr12 ne protège pas du développement du diabète dans les souris NOD après réintroduction du CMH I-A^{g7} et n'influence pas les niveaux d'auto-anticorps dirigés contre l'insuline. Panneau du haut : incidence de diabète chez les souris NOD (blanc) et les souris NOD.Chr12 (Gris), telle qu'évaluée par la présence de glucose urinaire et sanguin. Panneau du bas : niveaux d'anticorps anti-insuline dans le sérum de souris NOD ou NOD.Chr12 diabétiques, après leur sacrifice.

Annexe 5

Outbreeding inbred mouse strains reveals that heritable human immunological variations are also heritable in mice

Roxanne Collin, Lois Balmer, Grant Morahan, Sylvie Lesage

Ce manuscrit sera édité et resoumis au *Journal of Immunology* suite aux commentaires reçus par les pairs. Cet article porte sur l'identification des régions génétiques contribuant au contrôle de diverses populations cellulaires du système immunitaire adaptatif et inné dans une cohorte de souris issues du Collaborative Cross. Les résultats mettent en valeur un parallèle entre les phénotypes immunitaires génétiquement contrôlés chez l'humain et ceux pour lesquels des locus majeurs peuvent être identifiés grâce au Collaborative Cross.

Dans le contexte de la présente thèse, cet article s'intéresse aux paramètres génétiques contribuant à la fréquence de cellules DN T dans les souris non-transgéniques, et identifie une lignée en particulier qui possède une forte fréquence de ces cellules normalement rares. Les analyses génétiques n'ont toutefois pas révélé de locus régulant significativement les cellules DN T, suggérant que le contrôle de ces cellules est de nature multigénique dans les lignées du Collaborative Cross.

Outbreeding inbred mouse strains reveals that heritable human immunological variations are also heritable in mice¹

Running title: Common heritable immunological traits in humans and mice

Roxanne Collin^{*,2}, Lois Balmer^{†,‡,2} Grant Morahan^{†,3}, Sylvie Lesage^{*,3}

^{*}Department of Immunology-Oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, Québec, H1T 2M4, Canada, and Département de Microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

[†]Centre for Diabetes Research, Harry Perkins Institute of Medical Research, Nedlands 6009, WA, Australia, and Centre of Medical Research, University of Western Australia, Perth 6000, WA, Australia

[‡]School of Medical and Health Science, Edith Cowan University, Joondalup, Perth, Western Australia

Keywords : Collaborative Cross, quantitative trait loci, immune system genetics, mouse model, genetic variations

Abstract

Variations in the proportion and number of specific immune cell types among healthy individuals are influenced by both heritable and non-heritable factors. Mouse models, subjected to fewer non-heritable factors than humans, allow the identification of genetic factors that shape the immune system. We characterized immunological trait variability in the Collaborative Cross, a powerful genetic resource of recombinant inbred mouse strains derived from eight diverse founder strains. Eighteen immunological traits were studied in over 60 Collaborative Cross strains, including traits primarily determined either by heritable or non-heritable factors in humans. We found that human immunological heritable traits are also genetically determined in mice, whereas traits primarily influenced by non-heritable factors in humans did not associate with specific genetic loci in mice. The Collaborative Cross thus represents a useful resource to identify factors that determine immunological variations, as well as defining other immune traits likely to be heritable in humans.

Introduction

Inter-individual variations for many traits, such as eye colour, height and body weight, are readily observed in healthy individuals. Similarly, the proportion, function and phenotype of immune cell subsets also demonstrate inter-individual variations^{1, 2, 3}. These variations are shaped both by heritable and non-heritable factors, with the degree of contribution varying for each immunological trait^{3, 4, 5, 6, 7}. For instance, some NK cell traits are highly heritable, whereas other T cell and dendritic cell (DC) traits are predominantly influenced by non-heritable factors^{1, 5, 6, 8, 9, 10}. Of interest, relevant parallels between mice and humans have been made regarding the genetic control of given traits and phenotypes, such as disease susceptibility^{11, 12, 13, 14}. Indeed, despite notable differences between the two species¹⁵, mice evidently share genetic similarities with humans and can be useful in defining the contribution of genetic elements shaping the immune system^{16, 17}.

Genetic studies in mice typically exploit two parental inbred strains, such that genetic diversity in these studies is limited. To circumvent some of the limitations associated with *a priori* selection of two inbred mouse strains for genetic analyses, the Collaborative Cross (CC)^{18, 19} has emerged as a powerful genetic resource. The CC comprises dozens of new inbred strains descended from eight diverse founder strains, harnessing over 90% of common genetic diversity of the mouse species²² which can be exploited to study biological traits. The CC has already proved useful in identifying genes mediating different phenotypes, including defining the proportion of some immune cells and other hematological parameters^{20, 21, 22}, the response and susceptibility to infections^{23, 24, 25, 26} and a wide range of other traits including metabolism, cancer development, contact hypersensitivity and IgG glycosylation^{27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37}. Here, we expand on these studies by characterizing eighteen immunological traits including subsets of NK cells, DCs and T cells. We confirm previous findings of specific loci linked to T cell traits, including the CD4:CD8 T cell ratio, and we define new loci linked to other immune cell traits. More importantly, we find that, as for humans, some NK cell traits are highly influenced by heritable factors, whereas we did not observe significant genetic linkage for given T cell and DC traits that are predominantly influenced by non-heritable

factors in humans. Our results strongly support the use of inbred mouse strains to identify both heritable and non-heritable influences determining the variability of immunological traits.

Materials and methods

Mice :

All experimental and animal handling activities were performed in accordance with the guidelines and institutional Animal Ethics committee with ARVO statement for the Use of Animals. The principles, development and initial characterization of the CC have been described^{18, 37}. Mice were bred at the Animal Resource Centre (Australia, WA, Perth) and were generously provided by Geniad Pty Ltd³⁷. Male and female mice were used at 5-8 weeks of age, housed under a 12-hour light/dark cycle and given a standard diet with free access to food and water. During the analysis of the CC strains, B6 mice were periodically included to ensure experimental reproducibility. The eight founder strains, analyzed separately from the CC strains at Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, were ordered from Jackson Laboratories and housed at under specific-pathogen-free conditions. B6 and NOD mice were maintained on-site by brother-sister mating, and the 6 other founder strains were sacrificed at least one week after reception. Five to nine week-old mice were used for all phenotypic analyses. Two males and two females of each founder were included, except for B6 mice, where one male and four females were included. No immunophenotypic differences between males and females were observed (not shown). The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee, overseen by the Canadian Council for Animal Protection, approved the experimental procedures.

Flow cytometry :

Spleens were treated with collagenase (1mg/mL in PBS, Type V from *Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich) for 15 minutes at 37°C and passed through a 70µM cell strainer to yield single-cell suspensions prior to staining with antibodies. Single-cell suspensions were stained with the following antibodies: CD3 (145-2C11), CD4 (GK1.5), CD8 (53-6.7), CD11c (N418), CD19 (6D5), CD27 (LG.3A10), CD49b (DX5), B220 (RA3-6B2) TCRβ (H57-597), from Biolegend, CD11b (M1/70) from BD pharmingen, mPDCA-1 (eBio927) from eBioscience and mCD1d:PBS57 tetramer-PE from the NIH tetramer core facility. Data were

acquired using a BD FACS Aria II or a BD LSR Fortessa X20 and analyzed using the Flow-Jo software version 7.6.5.

Gene Mapping in the CC strains

We used the previously described Gene Miner mapping tools ³⁴ (130.95.9.22/Geniad2/) to obtain genome-wide logarithm of the odds (LOD) score results. Mean values of cell proportions for each CC strain and founder strain were entered. Genotypes of the latest generation strains were used when available. Including the 8 founder strains, a total of 71 strains for DC subsets and 72 strains for NK and T cell subsets were analyzed for genetic association using the MugaQTL (normalize) function. A total of between 242 and 251 mice were included in the phenotype analyses, with a minimum of 2 mice per strain. To obtain empirical P values, sets of 1,000 permutations were employed for each trait.

Statistical analysis:

A one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test was performed to determine differences between founder strains. $p < 0.05$ was considered significant. Founders with the highest and lowest proportion of each cell subset are summarized in Supplementary table I.

Results

Characterization of Immunophenotypes in the CC Founders.

We used three well-established multi-parameter flow-cytometry panels to define eighteen immunological phenotypes in the spleen (Supplementary Figure 1)^{38, 39, 40, 41, 42, 43}. Analysis of these traits in the eight founder strains (A/J, B6, 129, NOD, NZO, CAST, PWK, and WSB) revealed that there was a wide range of variation for most NK cell and T cell traits but less so for conventional DC (cDC) traits (Table I). In particular, the proportion of total NK cells was highly increased in NZO mice compared to the other seven founder strains. CAST and NOD mice exhibited low and high T cell numbers relative to the others strains, respectively. These results suggest that genetic variations likely have a major effect in defining proportions of lymphocyte populations in the spleen.

Characterization of Immunophenotypes in the CC Strains.

To define such genetic variations, we quantified these traits in over 60 CC strains (Figure 1). Interestingly, all eighteen traits in the CC exceeded the range of variation strains observed in the founder strains (Table I, Figure 1). For instance, the lowest and highest proportion of cDC1 in the founder strains is 6.4% (PWK strain) and 24.1% (B6) representing a variation of less than fourfold, whereas a variation of 25 fold is observed with values ranging from 1.8% to 45.4% for cDC1 in the CC strains. These observations of transgressive segregation suggest that the traits result from interaction among multiple genetic variants that have been inherited independently by the CC strains.

Genetic Associations Influencing Variation in Immune Cell Proportions.

The data from the phenotypic analysis of the eighteen traits described in Table I were compared with the genotype of each CC and founder strain. Genetic associations were plotted as logarithm of the odds (LOD) scores. LOD scores exceeding the significant threshold of 0.001, corresponding to LOD scores above 7.0, was observed for eight traits, namely total NK cells, pre-mNK cells, CD27+CD11b- mature NK cells, total cDC, cDC1, CD4+ T cells,

CD4⁺:CD8⁺ T cell ratio and iNKT cells (Figure 2). Analysis of founder coefficients at the loci associated with these different phenotypes revealed which founder alleles were important in determining each trait (Figure 3). For instance, CAST and NZO mice exhibit the lowest and highest proportion of NK cells, respectively (Table I), and the genetic variation contributing to the locus linked to NK cells is primarily driven by alleles from CAST and NZO founder strains (Figure 3). Indeed, alleles from the founder strain that exhibit the highest and/or lowest proportion of a given immune cell type were linked to similar variations in the proportion of these cells in the CC strains for five of the traits; namely NK cells, pre-mNK cells, cDC1, CD4⁺ T cells and iNKT cells. These five immunological traits are thus highly driven by specific allelic variations. In contrast, three traits (CD27⁺CD11b⁻ mNK cells, total cDC, and CD4⁺:CD8⁺ T cell ratio) are likely to be regulated by more complex genetic interactions.

Influence of Heritability on Immunological Traits.

Variations in immune cell populations are often thought to vary in parallel; i.e. if the proportion of an immune cell population is increased it is expected that the proportion of a different immune cell population must be decreased. If this hypothesis is true, one would expect some loci to influence more than one phenotype. However, we did not find this to be the case. For instance, loci on chromosome 2 and 17 are linked to CD4⁺ T cell proportion, but no significant linkage was observed for CD8⁺ T cells. These results suggest that immune cell traits are regulated independently, in line with a recent study demonstrating that humans present a continuous distribution rather than discrete immunophenotypes^{1, 8}. To determine whether the CC mouse strains also exhibited a continuous distribution of immunophenotypes, we performed a principal component analysis for the CC and founder mouse strains with the eighteen phenotypic traits. We find, as for humans, a continuous distribution of the immunophenotypes (Figure 4), where the first two principal components explained only 17.4% and 14.5% of the phenotypic variance, respectively. These findings support the view that the eighteen immunological traits are independently regulated by distinct heritable, as well as non-heritable, factors.

Discussion

The parameters regulating the proportion of various immune cell populations have been studied in humans and mice from both genetic^{3, 5, 44, 45, 46} and non-genetic (environment, diet, age, etc.) perspectives^{4, 6, 47, 48, 49, 50}. While environmental factors can shape the immune system, intrinsic host factors such as the genetic background arguably explain a considerable portion of the immune variation observed in humans and mice. The use of the CC strains is an invaluable tool for the identification of loci linked to different phenotypic traits. Previous studies, and a proof of concept for the Gene Miner mapping software³⁴, have successfully exploited the CC strains to map genes mediating a wide range of phenotypes and could greatly reduce the number of candidate genes based on the founder haplotype effects^{20, 21, 22, 23, 24, 29, 32}. In the present study, we successfully identified loci already known to be linked to the proportion of specific immune cells. Notably, a locus on chromosome 17 was linked to the CD4:CD8 T cell ratio⁵¹. Still, most of the loci linked to the immunological traits in this study have not been previously identified. The CC strains proved useful in mapping genetic loci that were not found in previous studies using crosses between common inbred strains. For example, genetic control of the total NK cell population was previously investigated in F2 cohorts, found that loci on mouse chromosomes 8, 9 and 17 were linked to NK cell proportion^{42, 52}. Linkage in the CC and founder strains instead identified a new locus on chromosome 16 for this same trait. These differences are due to the presence of a higher diversity of alleles in the CC strains that are absent in selected F2 outcrosses, and that likely play a dominant genetic impact in determining the phenotypes⁵³.

Many loci reported to be linked to specific immune traits did not reach the significant LOD score threshold in the present study. This may be explained by the relatively small size of our study, which included only 63 or 64 CC strains per phenotype. While it was initially intended that more than 1000 CC strains would be generated, infertility problems and extinction of many strains decreased the number of available CC strains⁵⁴. The current study of up to 64 CC strains plus the 8 founder strains has sufficient power to identify major effect genes³⁴ but not loci with minor impact on to multigenic traits. Alternatively, the variations could be driven

by non-heritable factors. Indeed, although mice are subjected to fewer non-heritable influences than humans due to a controlled diet and environment, they are still influenced by many non-heritable factors including somatic mutations, epigenetic changes, age, seasonal changes, microbiota, etc. Here, we attempt to control for age by exclusively including mice between five to eight weeks of age. Nevertheless, this does not preclude the impact of other non-heritable factors in modulating the immunological traits.

The genetic diversity of the CC strains and their multi-parental origin is closer to what is seen in human populations than the two-founder approaches used in conventional mouse genetics. The range of variability observed in the phenotypes of the CC strains was also more comparable to variability among healthy humans, as has been shown for regulatory T cells ²². Although the conclusions vary between studies concerning the degree of genetic heritability of human immune system components, variations in some immune population frequencies and phenotype seem to be more affected by the environment, while others are more affected by genetics ^{3, 4, 5, 6, 7}. Interestingly, the highest genetic associations in the present study were linked to immune parameters that also have a strong genetic component in humans. For example, NKT cell frequencies vary considerably among healthy individuals ⁵⁵ and have been suggested to have a strong genetic heritability in some ^{5, 6}, although not by all studies ⁷. Similarly, HLA-DR+ NK cells and CD56 bright NK cells, that are similar to the mouse pre-mNK population ⁵⁶, had a stronger heritability than other NK subsets in a twin study ⁶ and were shown to be associated with human loci in GWAS studies of healthy individuals or twin cohorts ^{3, 5, 10}. Early NK maturation stages have also been associated with genetic components ³. This is in agreement with our finding that NK functional maturation is significantly associated with genetic parameters in the CC strains. Another population for which human studies showed strong genetic determinants are the proportion and subsets of Tregs ^{5, 7}. While we did not test for Treg proportion, a previous study using CC strains did show strong association of Treg subsets to chromosome X loci ²².

In conclusion, our results add to that of others and validate the ability of a relatively small cohort of CC strains to map loci affecting complex traits and reveal potential candidate genes. Follow-up studies investigating differential expression of the candidate genes in the founder strains and the impact of their deficiency in mouse models could help in the development of therapeutic strategies to manipulate the immune system. Beyond QTL associations, the CC strains will also prove useful in the future for the study of correlations between different phenotypes, for example between immune cell frequencies and disease susceptibilities. The CC strains overall represent an important community resource that has only begun to be exploited and is likely to bring important new discoveries.

Acknowledgements:

We thank Kevin Li for his assistance running the Flow Cytometry Centre at Harry Perkins Institute of Medical Research, Perth, W.A.

References

1. Kaczorowski, K.J. *et al.* Continuous immunotypes describe human immune variation and predict diverse responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E6097-E6106 (2017).
2. Ye, C.J. *et al.* Intersection of population variation and autoimmunity genetics in human T cell activation. *Science* **345**, 1254665 (2014).
3. Roederer, M. *et al.* The genetic architecture of the human immune system: a bioresource for autoimmunity and disease pathogenesis. *Cell* **161**, 387-403 (2015).
4. Liston, A., Carr, E.J. & Linterman, M.A. Shaping Variation in the Human Immune System. *Trends in Immunology* **37**, 637-646 (2016).
5. Orru, V. *et al.* Genetic variants regulating immune cell levels in health and disease. *Cell* **155**, 242-256 (2013).
6. Brodin, P. *et al.* Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell* **160**, 37-47 (2015).
7. Mangino, M., Roederer, M., Beddall, M.H., Nestle, F.O. & Spector, T.D. Innate and adaptive immune traits are differentially affected by genetic and environmental factors. *Nature communications* **8**, 13850 (2017).
8. Brodin, P. & Davis, M.M. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol* **17**, 21-29 (2017).
9. De Jager, P.L. *et al.* ImmVar project: Insights and design considerations for future studies of "healthy" immune variation. *Semin Immunol* **27**, 51-57 (2015).
10. Aguirre-Gamboa, R. *et al.* Differential Effects of Environmental and Genetic Factors on T and B Cell Immune Traits. *Cell Rep* **17**, 2474-2487 (2016).
11. Driver, J.P., Serreze, D.V. & Chen, Y.G. Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin Immunopathol* **33**, 67-87 (2011).
12. Wandstrat, A. & Wakeland, E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* **2**, 802-809 (2001).
13. Sugiyama, F. *et al.* Concordance of murine quantitative trait loci for salt-induced hypertension with rat and human loci. *Genomics* **71**, 70-77 (2001).
14. Quan, L. *et al.* Most Lung and Colon Cancer Susceptibility Genes Are Pair-Wise Linked in Mice, Humans and Rats. *PLoS One* **6** (2011).
15. Mestas, J. & Hughes, C.C.W. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology* **172**, 2731-2738 (2004).
16. Shay, T. *et al.* Conservation and divergence in the transcriptional programs of the human and mouse immune systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 2946-2951 (2013).

17. Mostafavi, S. *et al.* Variation and genetic control of gene expression in primary immunocytes across inbred mouse strains. *J Immunol* **193**, 4485-4496 (2014).
18. Churchill, G.A. *et al.* The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits. *Nat Genet* **36**, 1133-1137 (2004).
19. Threadgill, D.W. & Churchill, G.A. Ten Years of the Collaborative Cross. *Genetics* **190**, 291-294 (2012).
20. Kelada, S.N.P. *et al.* Genetic Analysis of Hematological Parameters in Incipient Lines of the Collaborative Cross. *G3: Genes|Genomes|Genetics* **2**, 157-165 (2012).
21. Phillippi, J. *et al.* Using the emerging Collaborative Cross to probe the immune system. *Genes Immun* **15**, 38-46 (2014).
22. Graham, J.B. *et al.* Extensive Homeostatic T Cell Phenotypic Variation within the Collaborative Cross. *Cell Rep* **21**, 2313-2325 (2017).
23. Durrant, C. *et al.* Collaborative Cross mice and their power to map host susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infection. *Genome Research* **21**, 1239-1248 (2011).
24. Bottomly, D. *et al.* Expression quantitative trait Loci for extreme host response to influenza a in pre-collaborative cross mice. *G3: Genes|Genomes|Genetics* **2**, 213-221 (2012).
25. Gralinski, L.E. *et al.* Genome Wide Identification of SARS-CoV Susceptibility Loci Using the Collaborative Cross. *PLoS genetics* **11**, e1005504 (2015).
26. Ferris, M.T. *et al.* Modeling host genetic regulation of influenza pathogenesis in the collaborative cross. *PLoS Pathog* **9**, e1003196 (2013).
27. Mao, J.H. *et al.* Identification of genetic factors that modify motor performance and body weight using Collaborative Cross mice. *Scientific reports* **5**, 16247 (2015).
28. Nachshon, A. *et al.* Dissecting the Effect of Genetic Variation on the Hepatic Expression of Drug Disposition Genes across the Collaborative Cross Mouse Strains. *Frontiers in Genetics* **7** (2016).
29. Levy, R., Mott, R.F., Iraqi, F.A. & Gabet, Y. Collaborative cross mice in a genetic association study reveal new candidate genes for bone microarchitecture. *BMC Genomics* **16** (2015).
30. Thaisz, J. *et al.* Genetic analysis of albuminuria in collaborative cross and multiple mouse intercross populations. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **303**, F972-981 (2012).
31. Philip, V.M. *et al.* Genetic analysis in the Collaborative Cross breeding population. *Genome Research* **21**, 1223-1238 (2011).
32. Atamni, H.J., Botzman, M., Mott, R., Gat-Viks, I. & Iraqi, F.A. Mapping liver fat female-dependent quantitative trait loci in collaborative cross mice. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **27**, 565-573 (2016).

33. Abu-Toamih Atamni, H.J., Ziner, Y., Mott, R., Wolf, L. & Iraqi, F.A. Glucose tolerance female-specific QTL mapped in collaborative cross mice. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **28**, 20-30 (2017).
34. Ram, R., Mehta, M., Balmer, L., Gatti, D.M. & Morahan, G. Rapid Identification of Major-Effect Genes Using the Collaborative Cross. *Genetics* **198**, 75-86 (2014).
35. Boutilier, J.K. *et al.* Variable cardiac alpha-actin (Actc1) expression in early adult skeletal muscle correlates with promoter methylation. *Biochim Biophys Acta* **1860**, 1025-1036 (2017).
36. Andrikopoulos, S. *et al.* Identification of ABCC8 as a contributory gene to impaired early-phase insulin secretion in NZO mice. *J Endocrinol* **228**, 61-73 (2016).
37. Morahan, G., Balmer, L. & Monley, D. Establishment of "The Gene Mine": a resource for rapid identification of complex trait genes. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **19**, 390-393 (2008).
38. Guimont-Desrochers, F., Cappello, Z.J., Chagnon, M., McDuffie, M. & Lesage, S. Cutting Edge: Genetic Characterization of IFN-Producing Killer Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* **182**, 5193-5197 (2009).
39. Pelletier, A.-N., Guimont-Desrochers, F., Ashton, M.P., Brodnicki, T.C. & Lesage, S. The Size of the Plasmacytoid Dendritic Cell Compartment Is a Multigenic Trait Dominated by a Locus on Mouse Chromosome 7. *The Journal of Immunology* **188**, 5561-5570 (2012).
40. Pelletier, A.N. & Lesage, S. The Idd13 congenic interval defines the number of merocytic dendritic cells, a novel trait associated with autoimmune diabetes susceptibility. *J Autoimmun* **43**, 70-77 (2013).
41. Collin, R., Dugas, V., Pelletier, A.N., Chabot-Roy, G. & Lesage, S. The Mouse Idd2 Locus Is Linked to the Proportion of Immunoregulatory Double-Negative T Cells, a Trait Associated with Autoimmune Diabetes Resistance. *J Immunol* **193**, 3503-3512 (2014).
42. Pelletier, A.N., Guilbault, L., Guimont-Desrochers, F., Hillhouse, E.E. & Lesage, S. NK Cell Proportion and Number Are Influenced by Genetic Loci on Chromosomes 8, 9, and 17. *J Immunol* **196**, 2627-2636 (2016).
43. Collin, R. *et al.* An Unbiased Linkage Approach Reveals That the p53 Pathway Is Coupled to NK Cell Maturation. *J Immunol* (2017).
44. Valdar, W. *et al.* Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice. *Nat Genet* **38**, 879-887 (2006).
45. Chen, J. & Harrison, D.E. Quantitative trait loci regulating relative lymphocyte proportions in mouse peripheral blood. *Blood* **99**, 561-566 (2002).
46. Chen, Y.G., Tsaih, S.W. & Serreze, D.V. Genetic control of murine invariant natural killer T-cell development dynamically differs dependent on the examined tissue type. *Genes and Immunity* **13**, 164-174 (2011).

47. Carr, E.J. *et al.* The cellular composition of the human immune system is shaped by age and cohabitation. *Nat Immunol* **17**, 461-468 (2016).
48. Nakamura, K. *et al.* Effect of food-restriction stress on immune response in mice. *Journal of Neuroimmunology* **30**, 23-29 (1990).
49. Beura, L.K. *et al.* Recapitulating adult human immune traits in laboratory mice by normalizing environment. *Nature* **532**, 512-516 (2016).
50. Dopico, X.C. *et al.* Widespread seasonal gene expression reveals annual differences in human immunity and physiology. *Nat Commun* **6**, 7000 (2015).
51. Franckaert, D. *et al.* An orthologous non-MHC locus in rats and mice is linked to CD4⁺ and CD8⁺ T-cell proportion. *Genes Immun* **18**, 118-126 (2017).
52. Suwanai, H., Wilcox, M.A., Mathis, D. & Benoist, C. A defective Ii15 allele underlies the deficiency in natural killer cell activity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9305-9310 (2010).
53. Yang, H., Bell, T.A., Churchill, G.A. & Pardo-Manuel de Villena, F. On the subspecific origin of the laboratory mouse. *Nat Genet* **39**, 1100-1107 (2007).
54. Shorter, J.R. *et al.* Male Infertility Is Responsible for Nearly Half of the Extinction Observed in the Mouse Collaborative Cross. *Genetics* **206**, 557-572 (2017).
55. Chan, A.C. *et al.* Immune characterization of an individual with an exceptionally high natural killer T cell frequency and her immediate family. *Clin Exp Immunol* **156**, 238-245 (2009).
56. Guimont-Desrochers, F. & Lesage, S. Revisiting the Prominent Anti-Tumoral Potential of Pre-mNK Cells. *Frontiers in immunology* **4**, 446 (2013).

Footnotes:

1 -This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (2014-06531) to SL; by the Diabetes Research Foundation of Western Australia, Discovery Project Grant DP110102067 from the Australian Research Council to GM; by Program Grant 1037321 and Project Grant 1069173 from the National Health and Medical Research Council of Australia to GM. SL holds a Senior scholarship and RC holds studentship both from Fonds de recherche du Québec – Santé. LB was supported by Diabetes Research W.A. and mice were supplied by Geniad Pty Ltd.

2- These authors contributed equally to the work

3- Co-corresponding authors

Corresponding authors:

Sylvie Lesage

Research Center

Maisonneuve-Rosemont Hospital

5415 l'Assomption Blvd

Montréal, Québec

Canada, H1T 2M4

Phone number 1-514-252-3400 x 4649

Fax number 1-514-252-3430

Grant Morahan

Centre for Medical Research

The University of Western Australia (M519)

35 Stirling Highway

Crawley, WA 6009

Australia

+ 61 8 6151 0756

+61 8 6151 0701

4- Abbreviations: CC, Collaborative Cross; DC, dendritic cell; conventional DC, cDC; logarithm of the odds, LOD;

Figures:

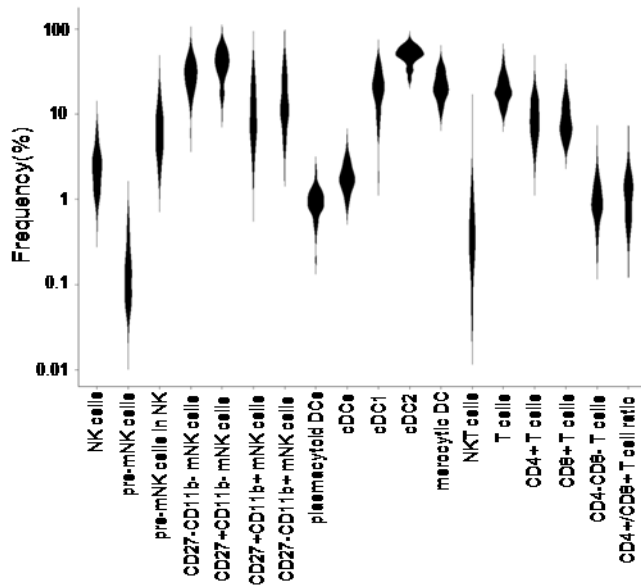


Figure 1. Variation of immune populations in the CC strains

For each CC strain, a mean value was calculated from at least 2 mice per strain. The violin plots show the distribution of immune phenotypes for NK cells, DC and T cells in the CC strains, by considering the mean values for each strain.

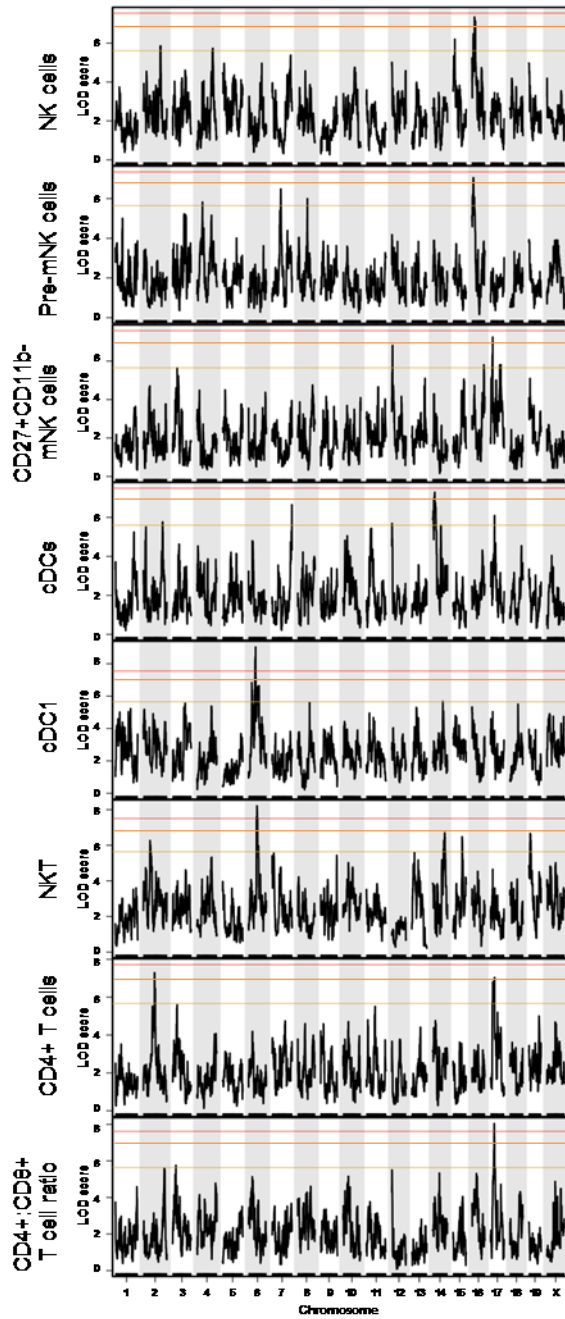


Figure 2. Genome-wide linkage analysis for the proportion of immune cell subsets reveals significant associations

Genome-wide scans for indicated immunophenotypes calculated using data from up to 64 CC strains and the 8 founder strains. The x axis represents genomic location, the y axis is the LOD

score representing the statistical association between the phenotype and the genomic location. Suggestive (P value < 0.01 , LOD score > 5.6), significant (P value < 0.001 , LOD score > 7.0) and highly significant (P value < 0.0001 , LOD score > 7.8) thresholds are represented by yellow, orange and redlines, respectively. Only phenotypes reaching the significant threshold (LOD score > 7.0) are shown.

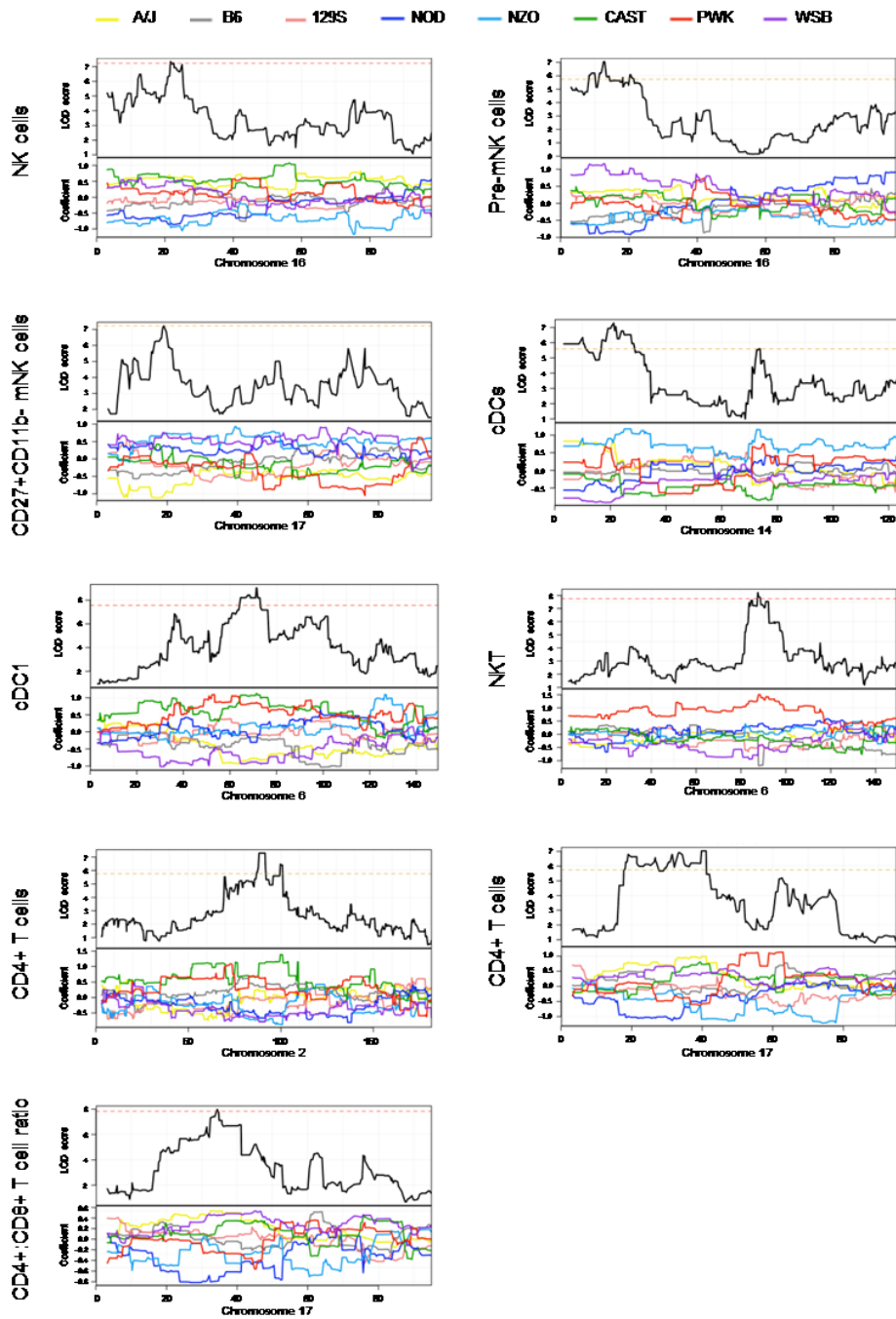


Figure 3. Haplotype distribution for the loci linked to the immunophenotypes.

For each panel, a high resolution map of the chromosome(s) associated with the immunophenotypes presented in figure 2 is shown. The x axis indicates the chromosomal

location. For the top half of each panel, the y axis is the LOD score associated to each genetic location. The lower half of each panel represents the effect of founder haplotypes at the chromosomal location for the phenotype studied, where y axis is the calculated log-odds ratio of the eight colour-coded founder haplotypes.

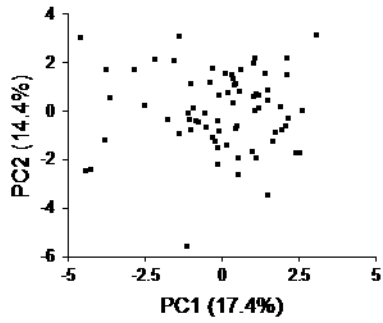
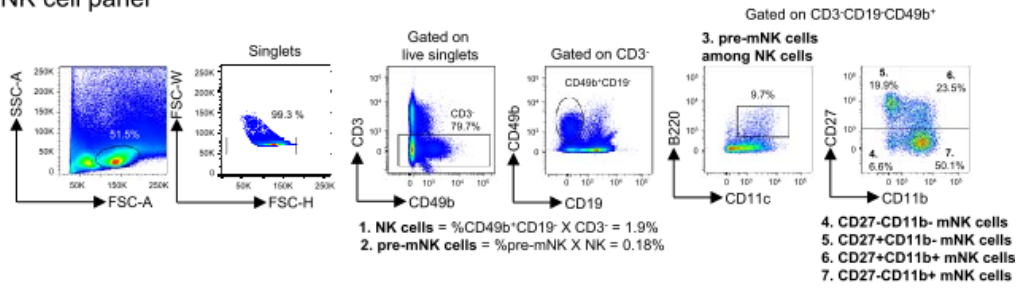


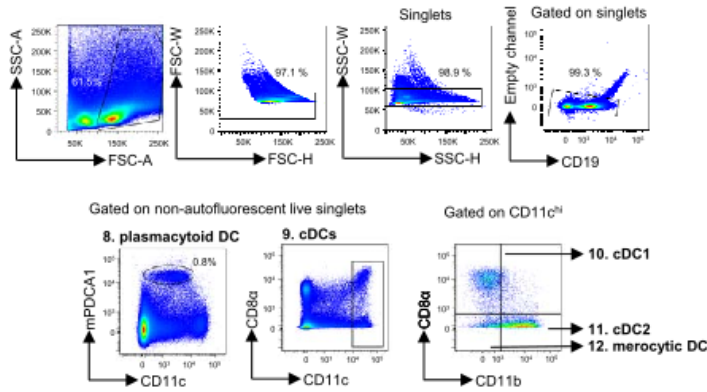
Figure 4. The immunophenotypes vary continuously for the CC strains.

Principal component analysis of a total of 71 strains (63 CC strains+8 founder strains) analyzed for 18 phenotypes. The first two principal components explained only 17.4% and 14.5% of the phenotypic variance.

A) NK cell panel



B) DC panel



C) T cell panel

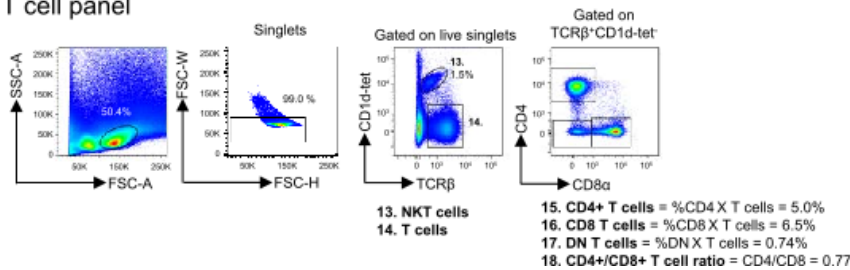


Figure S1. Gating strategy used to define the 18 immunophenotypes.

A) NK cell panel. Lymphocytes were gated based on FSC-A and SSC-A profile, and doublets were excluded. Among singlets, NK cells are defined as CD3-CD19-CD49b⁺; pre-mNK are defined as B220⁺CD11c^{low} NK cells; NK functional differentiation is defined by four stages from CD27-CD11b⁻, CD27⁺CD11b⁻, CD27⁺CD11b⁺ to CD27-CD11b⁺. Frequency of cells among the parent population is indicated for each population. B) DC panel. Dead cells and debris were excluded based on FSC-A and SSC-A profile and doublets and autofluorescent cells were subsequently excluded. Among non-autofluorescent singlets, plasmacytoid DC are defined as mPDCA-1⁺CD11c^{low} cells and cDCs are defined as CD11c^{hi}. Among cDCs, cDC1 are CD8α⁺CD11b⁻, cDC2 are CD8α⁻CD11b⁺ and mcDC are defined as CD8α⁻CD11b⁻.

Frequency of cells among parent population is indicated for each population. C) T cell panel. Lymphocytes were gated based on FSC-A and SSC-A profile, and doublets were excluded. Among singlets, NKT are defined as TCR β +CD1d tetramer+ and T cells are defined as TCR β +CD1d tetramer-. Frequency of cells among parent population is indicated beside their respective population. CD4+/CD8+ T cell ratio is defined as the frequency of CD4+CD8- among T cells divided by the frequency of CD4-CD8+ among T cells. For all panels, the corresponding phenotype numbers 1-18 are indicated for each phenotype summarized in table 1, and the calculation steps required to obtain the proportion of cell subsets among total cells are shown where relevant.

Pheno #	Immunological trait	Eight founder strains										CC strains	
		A/J	B6	129Sv	NOOD	NZO	CAST	PWK	WSB	Mean±SD	MIN-MAX		
1	NK cells	1.17±0.04	2.2±0.46	1.31±0.47	2.14±0.64	6.1±0.29	0.76±0.27	1.23±0.1	1.46±0.61	2.52±1.44	0.54-7.45		
2	pre-mNK cells	0.16±0.03	0.17±0.04	0.08±0.03	0.06±0.02	0.38±0.05	0.09±0.02	0.13±0.03	0.05±0.03	0.17±0.15	0.02-0.67		
3	pre-mNK cells	13.3±1.99	7.75±1.17	6.46±1.07	2.9±0.56	6.26±1.04	12.75±1.91	10.72±3.16	3.03±0.24	7.21±4.67	1.48-23.93		
4	CD27-CD11b- mNK cells	16±2.08	5.38±1.48	20.18±2.86	7.28±1.09	22.18±2.95	7.45±1.04	11.69±2.06	15.43±2.08	30.54±12.32	5.98-65.23		
5	CD27+CD11b- mNK cells	37.6±5.94	17.9±3.15	32.5±3.53	35.68±3.15	10.54±1.3	32.8±5.17	49.88±2.63	39.85±6.92	40.53±15.04	11.47-69.37		
6	CD27+CD11b+ mNK cells	22.58±2.81	29.8±7.45	24.73±2.18	39.83±2.58	10.34±1.78	48.78±3.98	26.88±2.36	20.93±2.8	12.3±9.29	1.37-37.97		
7	CD27-CD11b+ mNK cells	23.85±4.64	46.94±4.51	22.58±4.68	17.23±4.47	56.95±2.37	10.93±1.45	11.62±3	23.8±9.32	16.63±11.21	3.13-44.8		
8	plasmacytoid DCs	0.67±0.17	0.5±0.18	1.44±0.17	1.53±0.25	0.87±0.28	0.86±0.21	0.97±0.07	1.96±0.25	0.97±0.37	0.19-2.17		
9	gDCs	1.13±0.28	2.11±0.91	1.89±0.29	2.26±0.19	1.1±0.2	2.02±0.5	1.84±0.38	1.52±0.46	1.89±0.73	0.78-4.39		
10	gDC1	20.05±1.09	24.12±2.54	12.33±1.63	12.35±1.65	17.15±2.23	8.66±1.78	6.37±1.46	19.35±5.53	21.2±10.11	1.84-45.43		
11	gDC2	61.43±2.8	58.8±4.38	68.93±3.74	64.28±1.73	56.98±4.04	73.93±2.67	72.13±2.81	62.38±8.66	50.49±11.33	25.33-74.63		
12	macrophage DC	14.03±2.68	12.64±2.22	16.65±2.39	17.7±3.47	22.18±1.96	14.8±0.47	18.73±2.16	13.61±3.68	22.54±8.05	9.78-42.82		
13	NKT cells	0.85±0.11	1.33±0.25	0.9±0.19	0.73±0.04	0.76±0.17	0.06±0.02	0.03±0.01	1.14±0.2	0.56±0.81	0.03-6.02		
14	T cells	11.9±1.19	18.4±5.21	17.88±3.96	27.33±3.05	15.28±2.78	5.81±1.88	12.26±2.21	21.98±3.3	20.29±7.66	9.33-45.5		
15	CD4+T cells	6.45±1.02	8.8±3.92	8.98±1.9	15.6±2.23	9.54±1.62	3.7±1.6	6.36±0.95	12.65±1.3	9.63±4.99	2.1-26.2		
16	CD8+T cells	4.98±0.24	8.84±2.48	8.32±2.21	10.91±1.02	5.22±1.17	1.86±0.29	5.28±1.22	8.65±2.14	9.22±4.43	3.88-22.98		
17	CD4-CD8- T cells	0.25±0.05	0.61±0.12	0.39±0.02	0.46±0.07	0.24±0.02	0.11±0.03	0.37±0.11	0.48±0.12	1.05±0.62	0.21-4.06		
18	CD4+/CD8+T cell ratio	1.29±0.17	1.03±0.44	1.1±0.15	1.43±0.11	1.86±0.2	1.95±0.54	1.23±0.19	1.51±0.26	1.19±0.68	0.25-3.63		

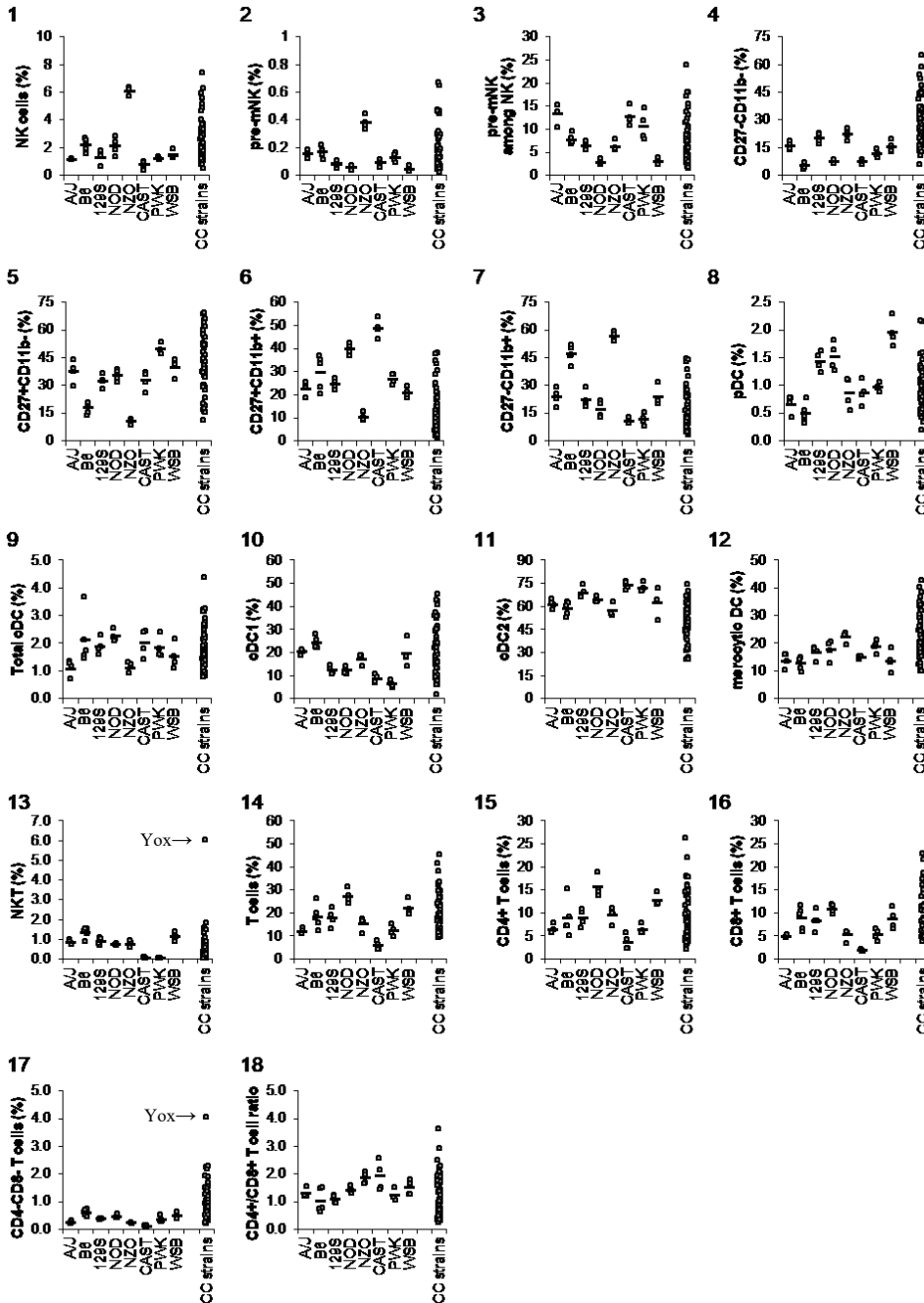
Table I
represent
mice ph
phenoty

er strains and over 60 CC strains. For
For each CC strain, a mean value
as the minimal and maximal value

Supplementary table I. Summary of statistically highest and lowest founder strains for each trait

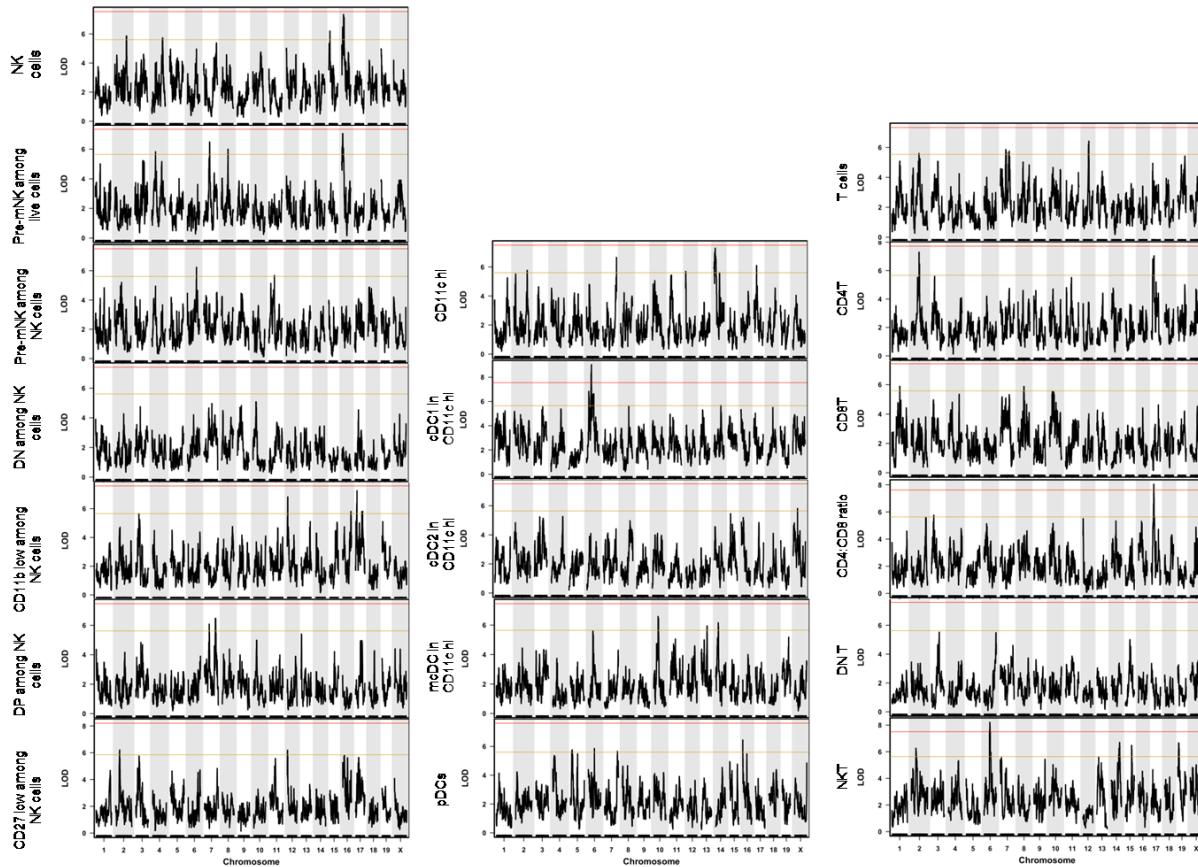
Trait	High group		p<0.05	Low group		p<0.05
total NK	NZO	vs	all	CAST, A/J	vs	B6, NOD, NZO
pre-mNK cells	NZO	vs	all	WSB	vs	A/J, B6, NZO, PWK
pre-mNK cells among NK cells	A/J, CAST	vs	B6, 129, NOD, NZO, WSB	WSB, NOD	vs	A/J, B6, CAST, PWK
CD27-CD11b- mNK cells	NZO	vs	A/J, B6, NOD, CAST, PWK, WSB	B6	vs	A/J, 129, NZO, PWK, WSB
CD27+CD11b- mNK cells	PWK	vs	all	NZO, B6	vs	A/J, 129, NOD, CAST, PWK, WSB
CD27+CD11b+ mNK cells	CAST	vs	all	NZO	vs	All
CD27-CD11b+ mNK cells	NZO	vs	all	CAST, PWK	vs	A/J, B6, 129, NZO, WSB
plasmacytoid DC	WSB	vs	all	B6, A/J, NZO, CAST	vs	129, NOD, WSB
total cDC	NOD		NS	NZO		NS
cDC1	B6	vs	129, NOD, NZO, CAST, PWK	PWK, CAST	vs	A/J, B6, NZO, WSB
cDC2	CAST	vs	A/J, B6, NZO, WSB	NZO	vs	129, CAST, PWK
merocytic DC	NZO	vs	A/J, B6, CAST, WSB	B6	vs	NZO, PWK
NKT	B6	vs	A/J, 129, NOD, NZO, CAST, PWK	PWK, CAST	vs	A/J, B6, 129, NOD, NZO, WSB
total T cells	NOD	vs	A/J, B6, 129, NZO, CAST, PWK	CAST	vs	B6, 129, NOD, NZO, WSB
CD4+ T cells	NOD	vs	A/J, B6, 129, NZO, CAST, PWK	CAST	vs	B6, 129, NOD, NZO, WSB
CD8+ T cells	NOD	vs	A/J, NZO, CAST, PWK	CAST	vs	B6, 129, NOD, WSB
CD4-CD8-T cells	B6	vs	A/J, 129, NZO, CAST, PWK	CAST	vs	B6, 129, NOD, PWK, WSB
CD4+/CD8+ T cell ratio	CAST, NZO	vs	B6, 129	B6, 129	vs	NZO, CAST

Annexe 6



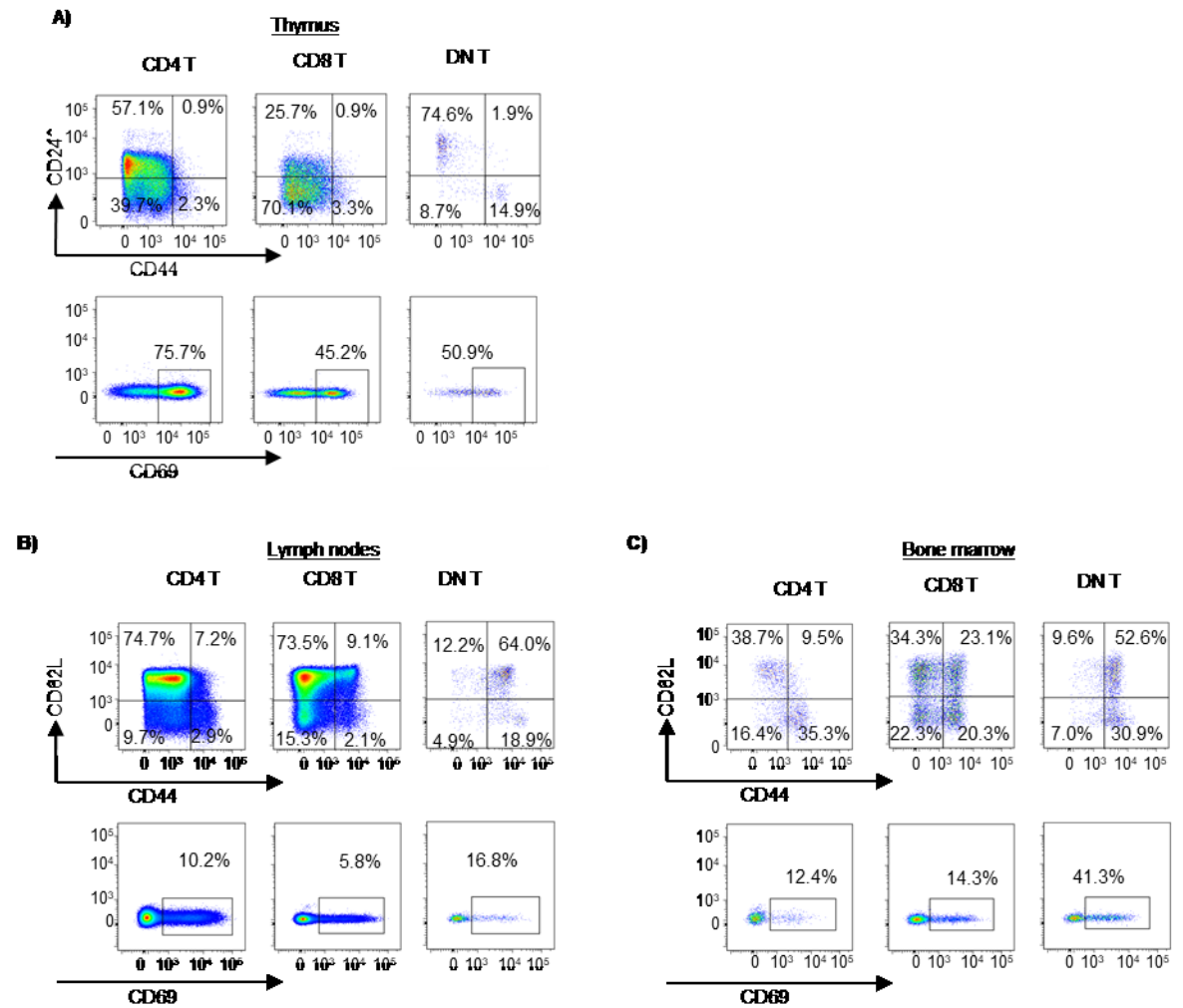
Diversité de phénotype dans les lignées du Collaborative Cross. Compilation des 18 phenotypes présentés à la table I de l'annexe V. Analyse par cytométrie en flux de 63-63 lignées du Collaborative Cross et des 8 lignées fondatrices. Chaque point représente une souris pour les lignées A/J, B6, 129S, NOD, NZO, CAST, PWK et WSB ; Chaque point représente la valeur moyenne des réplicats pour les lignées du Collaborative Cross (CC strains).

Annexe 7



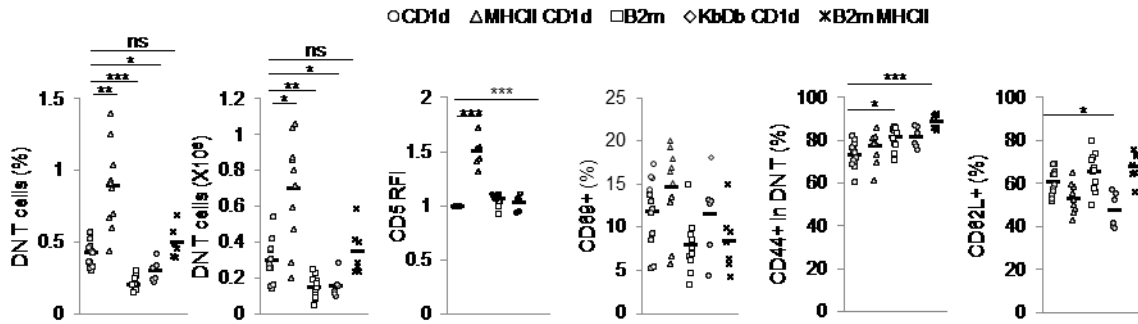
Association génétique de populations immunitaires à de nouveaux locus dans les lignées du Collaborative Cross. Analyse de liaison génétique de 18 phénotypes dans 71-72 lignées de souris, incluant 63-64 lignées du Collaborative Cross et les 8 lignées fondatrices. Panneau de gauche : populations de cellules NK ; Panneau central : population de cellules dendritiques ; Panneau de droite : populations de cellules T. Les seuils suggestif et hautement significatif sont représentés en jaune et rouge, respectivement. Les phénotypes atteignant un seuil significatif sont présentés dans l'Annexe V, figure 2.

Annexe 8



Les cellules DN T ne possèdent pas un phénotype activé dans le thymus, mais l'acquièrent en périphérie. Analyse de l'expression des marqueurs de surface CD44, CD69 et CD24 ou CD62L sur les cellules T CD4, T CD8 et DN T A) du thymus, B) des ganglions lymphatiques drainant la peau, C) de la moelle osseuse.

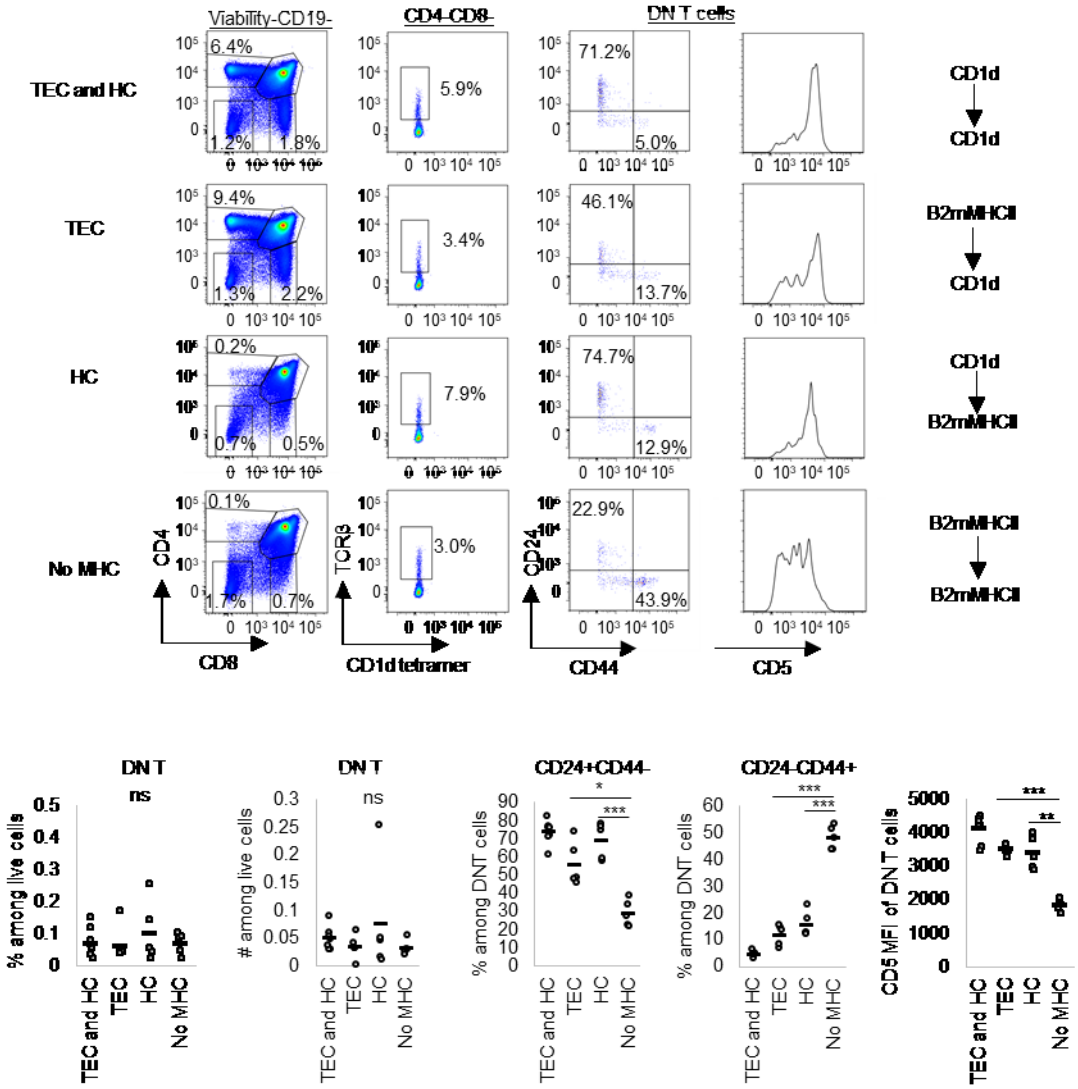
Annexe 9



Influence de la déficience en CMH sur la proportion et le phénotype des cellules DN T.

La proportion, le nombre et le phénotype des cellules DN T a été étudié dans différentes lignées de souris déficientes pour le CMH. RFI : intensité de fluorescence relative, normalisée pour chaque expérience sur la lignée CD1d contrôle.

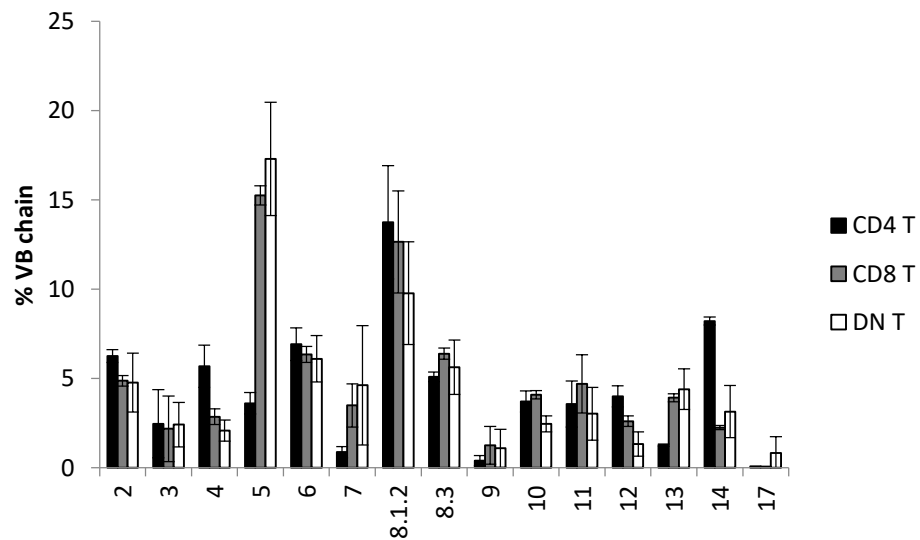
Annexe 10



Sélection des cellules DN T dépendantes du CMH sur les cellules hématopoïétiques et épithéliales. Analyse du type cellulaire pouvant sélectionner les cellules DN T dépendants du CMH par chimère hématopoïétique. Des chimères hématopoïétiques ont été générées en injectant de la moelle provenant de CD1d ko ou de β2mMHCII ko dans des souris CD1d ko ou β2mMHCII ko. Les groupes sont identifiés selon le type cellulaire exprimant les molécules de CMH, soit CD1d ko vers CD1d ko (TEC and HC), β2mMHCII ko vers CD1d ko (TEC), CD1d ko vers β2mMHCII ko (HC), ou β2mMHCII ko vers β2mMHCII ko (no MHC). Le thymus des souris receveuses a été analysé 8 semaines post-transfert. A) Profils de cytométrie en flux des thymocytes totaux, des thymocytes CD4-CD8- et des cellules DN T B)

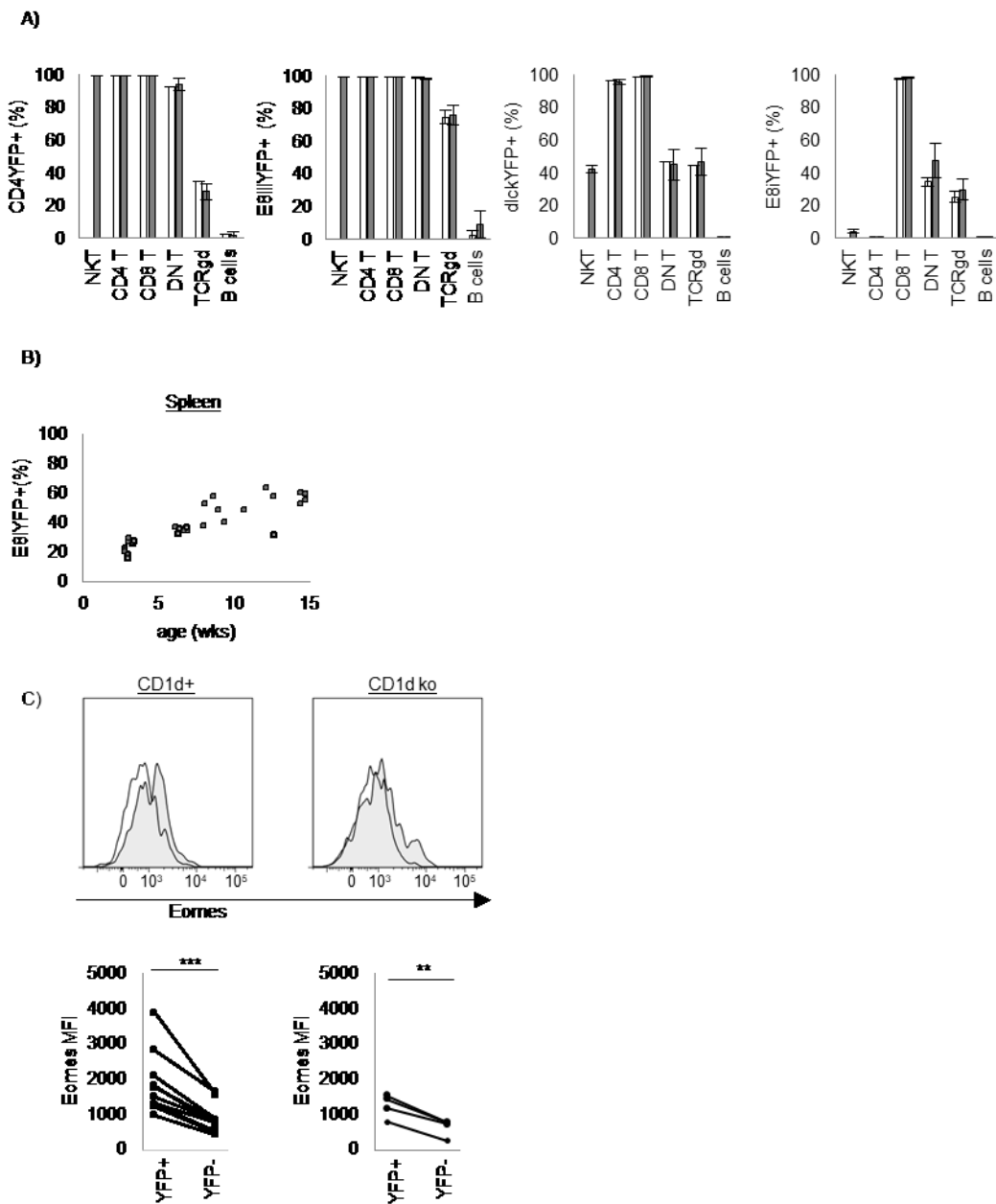
compilation des analyses de la proportion et du nombre de cellules DN T thymiques, de la proportion des sous-populations de cellules DN T portant les phénotypes CD24+CD44- (immatures) ou CD24-CD44+ (innate-like), et analyse de l'intensité de fluorescence de CD5, un marqueur de la force du signal TCR. Représentatif de 2-3 expériences.

Annexe 11



Répertoire TCRV β des cellules T CD4, des cellules T CD8 et des cellules DN T. La composition du répertoire V β a été déterminée par cytométrie en flux sur des splénocytes de souris CD1d déficientes. Le pourcentage des cellules TCR β ⁺ exprimant les chaînes V β respectives est représenté pour chaque type cellulaire.

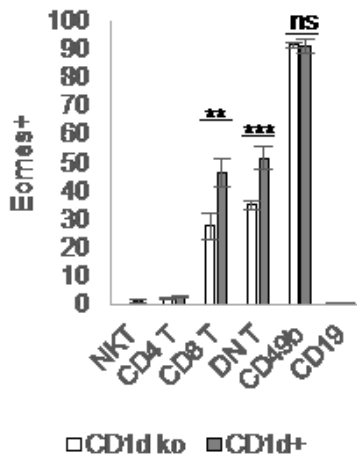
Annexe 12



Origine périphérique des cellules DN T étudié par lignée rapporteuse. A) Les lignées de souris rapporteuses utilisées à la figure 5 de l'article 4 ont été étudiées pour l'expression de YFP sur les cellules T périphériques. Au contraire des cellules DN T thymiques, les cellules DN T périphériques sont positives pour E8iYFP dans les souris CD1d ko (blanc) et dans les souris CD1d+ (gris). B) Cette expression de E8iYFP par les cellules DN T de la rate corrèle

avec l'âge chez des souris CD1d ko (cercles blancs) et CD1d+ (cercles gris). C) Les cellules DN T YFP+ et YFP- ont été comparées pour leur expression d'Eomes. Un profil représentatif et une compilation des données montrent la plus forte expression d'Eomes dans les cellules DN T YFP+ comparativement aux cellules DN T YFP-. Une étape de fixation préalable au marquage intracellulaire a permis de conserver à la fois un signal YFP et le signal Eomes[574].

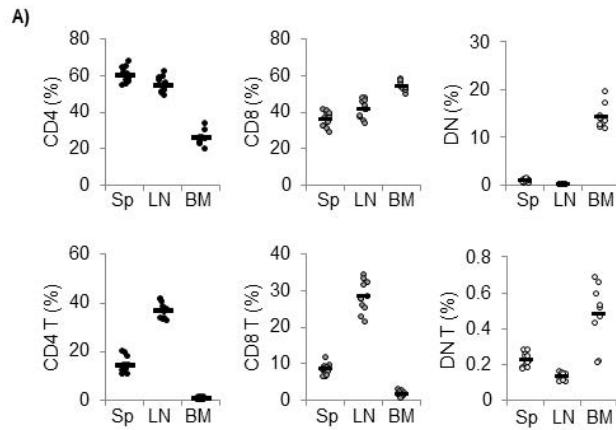
Annexe 13



Analyse de l'expression du facteur de transcription Eomes par les cellules DN T. Dans la rate de souris Eomes-GFP (Gris) et de souris Eomes-GFP CD1d ko (Blanc), les cellules DN T ont une expression d'Eomes similaire aux cellules T CD8, alors que les NKT sont négatifs. L'absence de CD1d influence significativement l'expression d'Eomes par les cellules DN T et par les cellules T CD8.

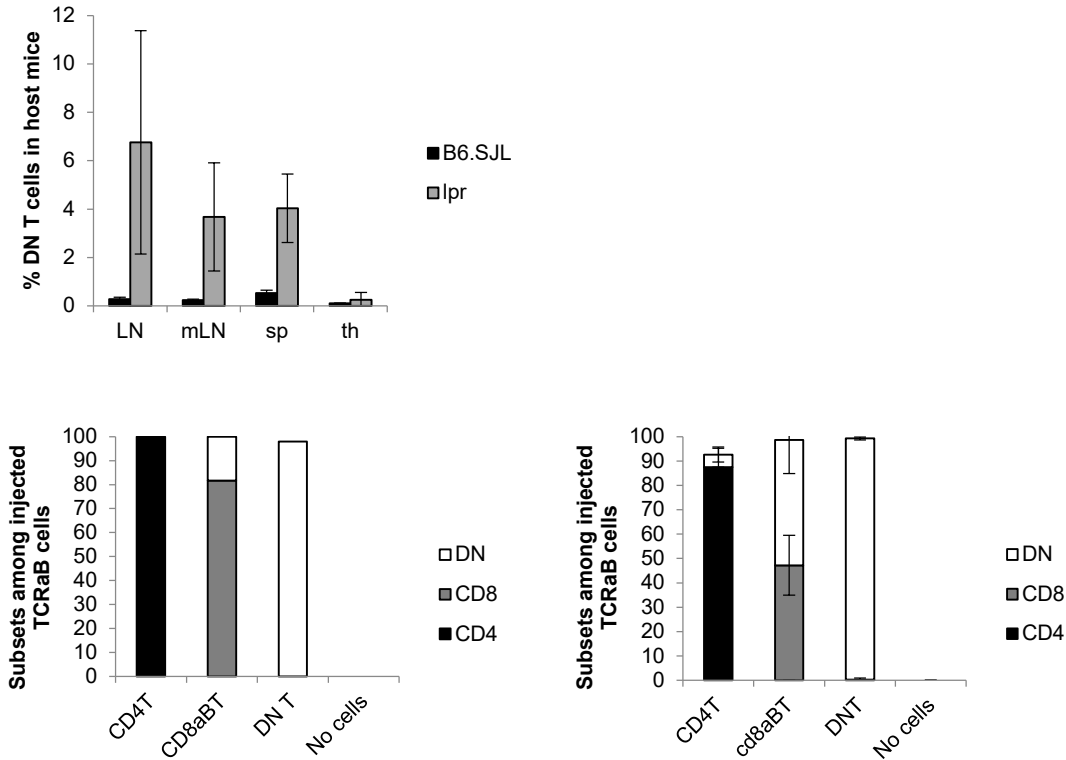
Populations cellulaires étudiées : NKT, dans les souris CD1d+ seulement, définies comme CD19⁻PBS57-CD1d tetramer⁺TCRβ⁺ ; CD4 T définies comme CD19⁻PBS57-CD1d tetramer⁻TCRβ⁺CD4⁺CD8α⁻ ; CD8 T définies comme CD19⁻PBS57-CD1d tetramer⁻TCRβ⁺CD4⁻CD8α⁺ ; DN T définies comme CD19⁻PBS57-CD1d tetramer⁻TCRβ⁺CD4⁻CD8α⁻ ; CD49b (cellules NK) définies comme CD19⁻PBS57-CD1d tetramer⁻TCRβ⁻CD49b⁺ et utilisées comme contrôle positif ; CD19 (cellules B) définies comme CD19⁺ et utilisées comme contrôle négatif.

Annexe 14



Enrichissement de cellules DN T parmi les cellules T de la moelle osseuse. Pourcentage de cellules CD4+, CD8+ et DN parmi les cellules TCRβ+ (haut) et pourcentage de cellules T CD4, T CD8 et DN T parmi les lymphocytes totaux (bas) sont montrés pour la rate (Sp), les ganglions lymphatiques drainant la peau (LN) and la moelle osseuse (BM) dans des souris RAG-GFP CD1d ko âgées de 6 à 10 semaines. Chaque point représente une souris. Représentatif de 5-6 expériences indépendantes.

Annexe 15



Analyse de transferts dans le modèle Fas^{lpr/lpr}. Comparaison de souris B6.SJL et B6.lpr ayant reçu des cellules T CD4, CD8 ou DN T d'origine B6.lpr. Les cellules hôtes et les cellules injectées sont distinguées par l'expression de CD45.1 ou CD45.2. Les cellules DN T s'accumulent davantage dans les organes lymphoïdes périphériques de la souris B6.lpr que dans le thymus, et la conversion des cellules T CD8 en cellules DN T est favorisée dans un hôte B6.lpr en comparaison d'un hôte wt.

Panneau du haut : proportion de cellules DN T provenant de la souris hôte et retrouvés dans les organes lymphoïdes selon le génotype (wt ou lpr) de la souris hôte.

Panneau du bas : phénotype CD4, CD8 ou DN des cellules T d'origine B6.lpr retrouvées 4 semaines post-injection dans des souris receveuses de génotype wt (gauche, lpr vers wt) ou lpr (droite, lpr vers lpr). Représentatif de n=2 pour les transferts lpr vers wt, et de n=3-6 pour les transferts lpr vers lpr.

Autres contributions

Articles à titre de première ou *co-première auteure

Collin, R., C. St-Pierre, L. Guilbault, V. Mullins-Dansereau, A. Policheni, F. Guimont-Desrochers, A. N. Pelletier, D. H. Gray, E. Drobetsky, C. Perreault, E. E. Hillhouse and S. Lesage (2017). "An Unbiased Linkage Approach Reveals That the p53 Pathway Is Coupled to NK Cell Maturation." *Journal of immunology*.

*Franckaert, D., ***R. Collin**, J. Dooley, R. H. Wallis, P. Poussier, A. Liston, E. E. Hillhouse and S. Lesage (2017). "An orthologous non-MHC locus in rats and mice is linked to CD4+ and CD8+ T-cell proportion." *Genes and Immunity*.

Articles à titre de co-auteur

Dugas, V., A. Liston, E. E. Hillhouse, **R. Collin**, G. Chabot-Roy, A. N. Pelletier, C. Beauchamp, K. Hardy and S. Lesage (2014). "Idd13 is involved in determining immunoregulatory DN T-cell number in NOD mice." *Genes Immun* **15**(2): 82-87.

Heremans, J., J. E. Garcia-Perez, E. Turro, S. M. Schlenner, I. Casteels, **R. Collin**, F. de Zegher, D. Greene, S. Humblet-Baron, S. Lesage, P. Matthys, C. J. Penkett, K. Put, K. Stirrups, C. Thys, C. Van Geet, E. Van Nieuwenhove, C. Wouters, I. Meyts, K. Freson and A. Liston (2018). "Abnormal differentiation of B cells and megakaryocytes in patients with Roifman syndrome." *J Allergy Clin Immunol*.

Hillhouse, E. E., **R. Collin**, G. Chabot-Roy, M.-J. Guyon, N. Tessier, M. Boulay, P. Liscourt and S. Lesage (2013). "Nearby Construction Impedes the Progression to Overt Autoimmune Diabetes in NOD Mice." *Journal of Diabetes Research* 2013: 1-7.

Hillhouse, E. E., A. Liston, **R. Collin**, E. Desautels, C. C. Goodnow and S. Lesage (2016). "TCR transgenic mice reveal the impact of type 1 diabetes loci on early and late disease checkpoints." *Immunology and Cell Biology* 94(7): 709-713.

McLachlan, S. M., H. A. Aliesky, B. Banuelos, S. Lesage, **R. Collin** and B. Rapoport (2017). "High-level intrathymic thyrotrophin receptor expression in thyroiditis-prone mice protects against the spontaneous generation of pathogenic thyrotrophin receptor autoantibodies." *Clinical and experimental immunology* 188(2): 243-253.

McLachlan, S. M., S. Lesage, **R. Collin**, B. Banuelos, H. A. Aliesky and B. Rapoport (2017). "Genes Outside the Major Histocompatibility Complex Locus Are Linked to the Development of Thyroid Autoantibodies and Thyroiditis in NOD.H2h4 Mice." *Endocrinology* 158(4): 702-713.

