

Université de Montréal

**Mécanismes cellulaires et moléculaires des fonctions  
tolérogéniques et immunogéniques des cellules dendritiques dans  
les réponses auto-immunes**

Par

**Echarki Zerif**

Département de Microbiologie-Infectiologie-Immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en Microbiologie-Immunologie

Mai, 2017

© Echarki Zerif, 2017

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Mécanismes cellulaires et moléculaires des fonctions  
tolérogéniques et immunogéniques des cellules dendritiques dans  
les réponses auto-immunes**

Présentée par : **Echarki Zerif**

Membres du jury :

**Dre. Ancuta Petronela : Président rapporteur**  
**Dr. Walid Mourad : Directeur de recherche**  
**Dr. Abdelaziz Amrani : Co-directeur de recherche**  
**Dre. Sylvie Girard : Membre du jury**  
**Dre. Maritza Jaramillo : Examineur externe**  
**Dr. Hassan Fahmi : Représentant du doyen**

## Résumé

La contribution des DCs dans l'initiation et la perpétuation des maladies auto-immunes est bien établie. Chez la souris Non Obèse Diabétique (NOD), modèle spontané du diabète de type 1 (DT1), plusieurs travaux ont rapportés des anomalies phénotypiques et fonctionnelles des DCs. Les DCs sont parmi les premières cellules qui infiltrent les îlots pancréatiques, produisent des quantités excessives de cytokines pro-inflammatoires et contribuent à l'activation des lymphocytes T auto-réactifs (Teff). Cette capacité accrue des DCs à activer les Teffs est régulée par plusieurs voies de signalisation intracellulaire. STAT5 est parmi les facteurs de transcription critiques dans la régulation des gènes associés au développement, la maturation et les fonctions des DCs. La prédisposition au DT1 chez la NOD est déterminée par plusieurs régions de susceptibilités au diabète (*idd1-20*). De façon intéressante, le gène *Stat5b* est localisé dans la région de susceptibilité *idd4* chez la souris NOD suggérant son implication dans le développement du diabète. En effet des études récentes ont identifiés un dysfonctionnement dans la voie de signalisation JAK-STAT5 chez les souris NOD, y compris la présence d'une mutation (L327M) au niveau du domaine de liaison à l'ADN de *Stat5b* qui altère sa liaison à l'ADN. Par ailleurs, les études réalisées dans notre laboratoire ont montré que le conditionnement des DCs au GM-CSF ou à la TSLP, qui activent la voie de signalisation Jak-Stat5, constitue une voie potentielle d'immunothérapie chez la souris NOD. Ces données suggèrent un rôle central de *Stat5b* dans la régulation des fonctions tolérogènes des cellules du système immunitaire.

Nous avons généré un modèle de souris NOD transgéniques (NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>) exprimant de façon constitutive la forme active de STAT5B de la souris C57BL/6 spécifiquement dans les DCs. Nos résultats ont montré que ces souris transgéniques ont développées une

protection totale contre le diabète auto-immun. Cette résistance au diabète à long terme est associée à l'acquisition des fonctions tolérogènes par les Stat5b-CA.DCs qui se manifestent par un phénotype mature tolérogène, marquées par une forte expression de molécules immunorégulatrices (PD-L1 et PD-L2) et une grande production de cytokines anti-inflammatoires (TGF- $\beta$ ) et une baisse significative de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12p70, TNF- $\alpha$  et d'IL-23). Par ailleurs, nous avons mis en évidence le rôle de STAT5B dans la régulation à la hausse d'IRF4 et l'implication du complexe STAT5B/EZH2 dans le contrôle de la régulation à la baisse d'IRF8. En effet, cette régulation différentielle de l'expression des gènes *Irf4* et *Irf8* est accompagnée du développement d'une sous population CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> DCs. Nos études ont démontré que le potentiel tolérogène des Stat5b-CA.DCs à rétablir et à maintenir la tolérance périphérique du système immunitaire vis-à-vis des auto-antigènes est associée à leur grande capacité d'induire la conversion et l'expansion des Tregs ainsi que la différenciation de deux populations cellulaires régulatrices Th2 et Tc2. Nous avons aussi démontré *in vivo* qu'une injection intraveineuse unique de Stat5-CA.DCs (spléniques ou générés de la moelle osseuse) ou de Tregs des souris transgéniques NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> a induit une protection totale contre le diabète chez les souris NOD receveuses. Notre étude apporte donc une évidence claire que la correction du défaut de la voie de signalisation Jak-Stat5b au sein des DC chez la souris NOD induit une protection à long terme contre le diabète. Finalement, cette voie de signalisation peut constituer une cible thérapeutique éventuelle non seulement dans le contexte du diabète de type 1 mais également dans d'autres maladies auto-immunes.

**Mots-clés :** Diabète de type 1, auto-immunité, NOD, cellules dendritiques, *Stat5b*, tolérance immunitaire, lymphocytes T régulateurs, immunothérapie.

## Abstract

The contribution of DCs in the initiation and progression of autoimmune diseases is well established. Several studies have reported that phenotypic and functional abnormalities of DCs, in Non Obese Diabetic (NOD), contribute to spontaneous type 1 diabetes (T1D) development. DCs are among the first cells that infiltrate the pancreatic islets, produce excessive amounts of pro-inflammatory cytokines, and contribute to the activation of T effector cells (Teff). This increased ability of DCs to activate Teff is regulated by several intracellular signaling pathways. STAT5 is among the critical transcription factors in the regulation of genes associated with the development, maturation and functions of DCs. The predisposition to T1D in NOD is determined by several regions of susceptibility to diabetes (*idd1-20*). Interestingly, the *Stat5b* gene is located in the *idd4* susceptibility region in NOD mice suggesting its involvement in the development of diabetes. Recent studies have identified a dysfunction in the Jak-Stat5 signaling pathway in NOD mice, including the presence of a mutation (L327M) at the DNA-binding domain of *Stat5b* which alters its binding to DNA. Furthermore, previous studies from our laboratory have shown that the GM-CSF- or TSLP-conditioned DCs, which activate the Jak-Stat5 signaling pathway, is a potential pathway for immunotherapy in NOD mice. These data suggest a central role for *Stat5b* in the regulation of tolerogenic functions of the immune cells.

Here, we generated a transgenic NOD mouse model (NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>) that constitutively express the active form of STAT5B from the C57BL/6 mouse specifically in DCs. Our results showed that these transgenic mice are completely protected against autoimmune diabetes. This long-term diabetes protection is associated with the acquisition of tolerogenic functions by Stat5b-CA.DCs, that exhibit a mature tolerogenic phenotype, overexpression of

immunoregulatory molecules (PD-L1 and PD-L2) and produce anti-inflammatory cytokines (TGF- $\beta$ ) and a significantly decrease their production of pro-inflammatory cytokines (IL-12p70, TNF- $\alpha$  and IL-23). Moreover, we have highlighted the role of STAT5B in the upregulation of IRF4 and also the involvement of the STAT5B/ EZH2 complex in downregulation of IRF8. This differential regulation of the *Irf4* and *Irf8* genes expression is accompanied by promoting the development of CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DC subset. Furthermore, we demonstrated that the tolerogenic Stat5b-CA.DCs were able to restore and maintain peripheral immune tolerance to autoantigens, which is associated with their high ability to induce conversion and expansion Tregs and to promote Th2 and Tc2 immune deviation. We also demonstrated that a single intravenous injection of Stat5-CA.DCs (splenic or bone marrow derived dendritic cells) or Tregs from transgenic mice NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> halted ongoing diabetes in recipient NOD mice. Thus, our study provides clear evidence that the correction of the Jak-Stat5b signaling pathway defect in DC of NOD mice induces long-term protection against diabetes suggesting that signaling pathway can be a potential therapeutic target not only in the context of type 1 diabetes but also in other autoimmune diseases.

**Keywords** : Type 1 diabetes, autoimmunity, NOD, dendritic cells, Stat5b, immune tolerance, regulatory T lymphocytes, immunotherapy.

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>ix</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xii</b>
<b>Chapitre I :</b>	
<b>Introduction</b> .....	<b>2</b>
<b>I- Les maladies auto-immunes (MAI)</b> .....	<b>2</b>
I-1 Généralité sur les maladies auto-immunes .....	2
I-2 La dérégulation du système immunitaire dans les maladies auto-immunes .....	4
I-2-1 La perte de la fonction suppressive des cellules T régulatrices (Treg).....	4
I-2-2 Mimétisme moléculaire .....	5
I-2-3 Modifications post-traductionnelles des protéines.....	6
<b>II- Le diabète de type 1 (DT1)</b> .....	<b>8</b>
II-1. Généralité sur le diabète de type 1 .....	8
II-2. Initiation et progression du diabète de type 1 .....	10
II-3 Prévention, prédiction et traitement du diabète de type 1 .....	14
II-4 Modèles d'études : les souris NOD (Non-obese diabetic).....	18
II-5 Auto-immunité, Tolérance et Tregs dans le diabète de type 1 .....	19
II-6 La prédisposition génétique au diabète de type 1 .....	21
II-7 Les facteurs environnementaux dans le diabète de type 1 .....	23

<b>III. Le rôle des cellules dendritiques dans la pathogenèse du DT1 .....</b>	<b>27</b>
III. 1. Ontogénèse et sous-populations de cellules dendritiques .....	27
III-2 Le rôle immunogène et tolérogènes des DCs dans le DT1.....	30
III-4 Les DCs et l’immunothérapie du diabète de type 1.....	35
III-4-1 Les modifications génétiques des DCs.....	36
III-4-2 Le conditionnement des DCs avec des molécules pharmacologiques .....	37
III-4-3 Contrôle de la maturation des DCs .....	38
<b>IV- Le rôle de facteur de transcription STAT5 dans l’auto-immunité.....</b>	<b>39</b>
<b>Rationnelle de recherche .....</b>	<b>44</b>
<b>Chapitre II :</b>	
<b>Constitutively Active Stat5b Signaling Confers Tolerogenic Functions to Dendritic Cells of NOD mice and Halts Diabetes Progression. ....</b>	<b>48</b>
<b>Chapitre III :</b>	
<b>Constitutively active Stat5b Transcription Factor Drives NOD bone marrow derived Dendritic Cells To Tolerogenic Statement.....</b>	<b>91</b>
<b>Chapitre VI :</b>	
<b>Discussion générale .....</b>	<b>123</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>137</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>139</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>i</b>



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Exemples proposés de mimétisme moléculaire en association avec certains maladies auto-immunes (Albert and Inman, 1999).....	6
<b>Tableau 2</b> : Exemples de certains MPT impliquées dans des maladies auto-immunes (Duan and Walther, 2015).....	8

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Perte de la balance entre les cellules effectrices T et les cellules T régulatrices (Chavele and Ehrenstein, 2011).....	5
<b>Figure 2</b> : Model d'initiation et de progression du diabète de type 1 (Daugherty and Gottardi, 2007).....	13
<b>Figure 3</b> : Ontogénèse des précurseurs de cellules dendritiques (Chopin et al., 2012) .....	28
<b>Figure 4</b> Schéma représentant le modèle proposé de la régulation transcriptionnelle du gène <i>Irf4</i> et <i>Irf8</i> par la forme dimérique et tétramérique de Stat5b.....	135

## Liste des abréviations

**MAI** : Maladie auto-immune.

**DT1**: Diabète de type 1.

**GM-CSF** : Granulocytes Macrophages Colony Stimulating Factor.

**ADN** : Acide désoxyribo-nucléique.

**BMDC** : Bone-marrow derived dendritic cells.

**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité.

**HLA** : Human leukocyte antigen (CMH humain).

**APS** : Cellule présentatrice d'antigène.

**FoxP3** : Forkhead box protein 3

**CTLA-4** : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4.

**PD-1** : Programmed cell death 1

**PD-L** : Programmed death ligand

**GAD** : Glutamate acid decarboxylase

**ct-STAT5** : Isoformes tronquées de STAT5 (Carboxy-truncated STAT5).

**DC** : Cellule dendritique (Dendritic cell).

**iDC** : Cellule dendritique immature.

**mDC** : Cellule dendritique mature.

**tolDC** : Cellule dendritique tolérogène.

**CD** : Cluster de différenciation

**EAE** : Encéphalite autoimmune expérimentale.

**Ig** : Immunoglobuline.

**IL-** : Interleukine.

**FBS** : Sérum bovin foetal (Foetal bovine serum).

**FITC** : Fluoréscéine isothiocyanate.

**GAS** : Gamma-activated sequence.

**GFP** : Green fluorescence protein.

**HRP** : *Horseradish peroxidase* (peroxydase de Raifort).

**IFN $\gamma$**  : Interféron gamma.

**IGRP** : Islet glucose-6-phosphatase related protein.

**IL-2R $\alpha$**  : Chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 (CD25).

**IPEX** : Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome.

**ITP** : Purpura thrombocytopénique idiopathique (Idiopathic thrombocytopenic purpura).

***i.v.*** : Intraveineuse.

**Jak** : Janus kinase.

**LPS** : Lipopolysaccharide.

**MSCV** : Murine stem cell vector.

**NRP-A7** : NOD-related peptide A7.

**NOD** : Non obèse diabétique (Non-obese diabetic).

**SCID** : Severe combined immune deficiency

**qPCR** : quantitative Polymerase chain reaction.

**STAT** : Signal transducers and activators of transcription.

**pSTAT** : phospho-STAT.

**TBS** : Tris-buffered saline.

**TCR** : T cell receptor.

**TGF- $\beta$**  : Transforming growth factor beta.

**TNF- $\alpha$**  : Tumor necrosis factor alpha

**IRF4** : Interferon regulatory factor 4

**IRF8** : Interferon regulatory factor 8

**EZH2** : Enhancer of zeste homolog 2

**TH** : T cell helper.

**TLR** : Toll-like receptor.

**TNF** : Tumor necrosis factor.

**Tr1** : Lymphocytes T régulateur de type 1.

**Treg** : Lymphocyte T régulateur.

**Tyr** : Tyrosine.

*À mes chers parents.*

## **Remerciements**

J'exprime toute ma reconnaissance aux membres du jury de cette thèse pour vos disponibilités, le temps et l'énergie qu'ils y ont consacré.

J'exprime ma gratitude à mon directeur et co-directeur de thèse, Dr Walid Mourad et Dr Abdelaziz Amrani pour leurs encouragements pendant cette thèse. Merci pour l'apport scientifique de grande qualité et l'ouverture d'esprit que vous m'avez offert.

Pour terminer, je voudrai exprimer une tendresse et reconnaissance particulière à mes proches et surtout à mon épouse Imane pour leur soutien et leur affection.

# **Chapitre I**

## **Introduction générale**

# **Introduction**

## **I- Les maladies auto-immunes (MAI)**

### **I-1 Généralité sur les maladies auto-immunes**

Dans des circonstances normales, les antigènes (Ag) du soi et non-soi sont bien différenciés par les systèmes immunitaires innés et adaptatifs de l'organisme. Un équilibre entre la réponse immunitaire et les mécanismes de régulation du système immunitaire permet de maintenir l'homéostasie du système immunitaire sous contrôle.

Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, Paul Ehrlich a réalisé qu'un dysfonctionnement du système immunitaire de l'organisme pouvait déclencher une réaction vis-à-vis de ses auto-antigènes. Il s'en est ainsi déduit que l'auto-immunité est le résultat d'une réponse immunitaire délétère contre les antigènes propres d'un individu. Ces maladies auto-immunes peuvent être classées selon le type de la réaction qui peut être spécifique d'un organe ou systémique. Une maladie auto-immune systémique résulte d'une réponse dirigée contre des antigènes propagés dans tout l'organisme. Ces maladies indiquent un déficit général de la régulation de l'immunité qui conduit à des cellules T et à des cellules B hyperactives. Les dommages tissulaires sont ainsi provoqués par des réponses immunitaires à médiation cellulaire causées essentiellement par des auto-anticorps. Une maladie auto-immune spécifique résulte d'une réponse dirigée contre un antigène dont la localisation est restreinte à un organe en particulier. Les cellules de l'organe cible peuvent être attaquées directement par des mécanismes humoraux (anticorps auto-réactifs) ou à médiation cellulaire (lymphocytes T auto-réactifs).



Ces maladies auto-immunes affectent environ 8% de la population mondiale totale (Cooper, Bynum et al. 2009). Recement, l'analyse des données épidimiologiques de 30 études réalisées depuis les 30 dernières années a révélé une prevalence des maladies auto-immunes de l'ordre  $12.5 \pm 7.9\%$  par année à travers le monde (Lerner et al., 2015). Les maladies auto-immunes représentent un lourd fardeau financier sur les personnes et leurs familles, en raison des coûts de traitement et d'autres services essentiels. Les maladies auto-immunes ont des conséquences économiques importantes sur les systèmes nationaux de soins de santé, compte tenu de l'utilisation accrue des services de soins de santé, de la perte de productivité et du soutien à long terme nécessaire pour surmonter les complications liées au développement de ces maladies. Au Canada, environ 4.2 million de canadiens souffrent d'une maladie auto-immune. Les complications de ces maladies entraînent de nombreux problèmes respiratoires et cardiovasculaires ce qui explique le taux élevé de décès à causes de ces maladies. Il est à noter que la majorité des pays consacrent 5 à 20 % de leurs dépenses totales de santé aux soins du diabète (Atlas du Diabète – Septième édition). Avec un tel impact socioéconomique, les maladies auto-immunes représentent un défi majeur pour les systèmes de soins de santé et un obstacle au développement économique durable.

Les MAI sont des maladies complexes, dont les mécanismes physiopathologiques ne sont pas totalement compris. À l'heure actuelle, il est admis que les MAI sont des maladies multifactorielles puisque la génétique, les contaminants xénobiotiques, les infections bactériennes ou virales se sont révélées être des agents étiologiques importants (Pollard, Hultman et al. 2010, Cho and Gregersen 2011).

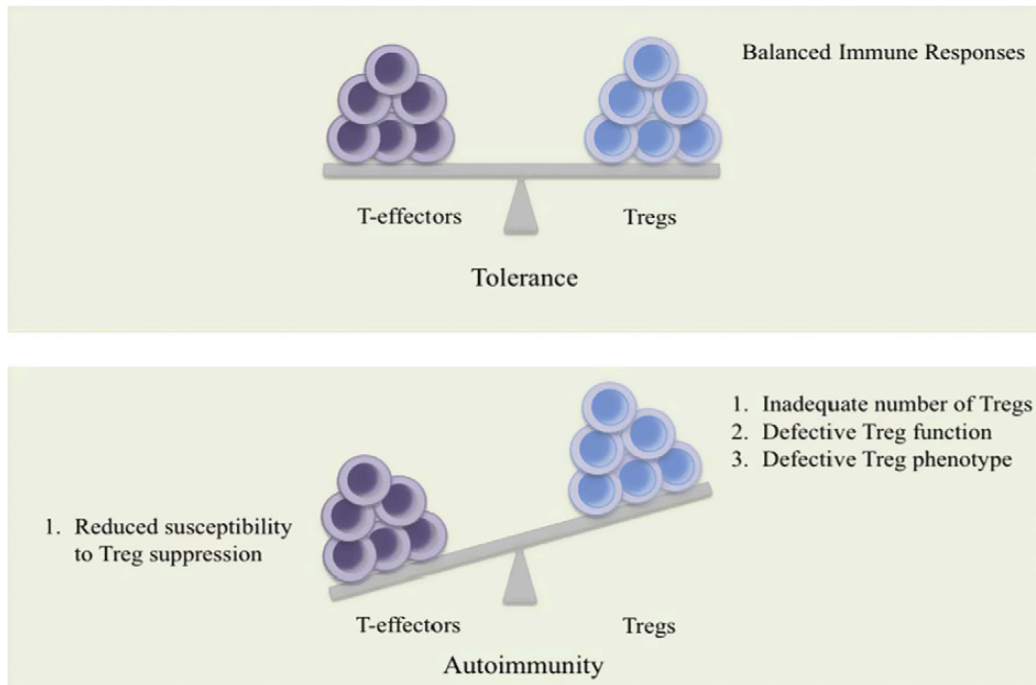
Il existe essentiellement trois facteurs capables d'affecter la tolérance immunitaire, qui sont décrites dans les sections suivantes: 1) la perte de la fonction suppressive du système

immunitaire (cellules T régulatrices), 2) une réactivité croisée d'une protéine du soi avec un anticorps anti-microbien spécifique (mimétisme moléculaire) et 3) une modification chimique des protéines du soi (modifications aberrantes post-traductionnelles).

## **I-2 La dérégulation du système immunitaire dans les maladies auto-immunes**

### **I-2-1 La perte de la fonction suppressive des cellules T régulatrices (Treg)**

Les lymphocytes Tregs (anciennement appelées cellules T suppresseurs) jouent un rôle crucial dans le contrôle et le maintien de la tolérance du système immunitaire (Bennett, Christie et al. 2001, Wildin, Ramsdell et al. 2001), en étant responsables de l'élimination des cellules T auto-réactives. Elles régulent négativement ou suppriment la réactivité des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> envers les auto-antigènes de l'organisme (Campbell and Koch 2011). En effet, si pour une raison quelconque, l'équilibre entre les cellules T effectrices (auxiliaires et cytotoxiques) et les lymphocytes Tregs est perturbé, la régulation du système immunitaire est perdue et par conséquent un processus de réaction immunitaire contre les auto-antigène peut être initié (Hori 2014) (**figure 1**). Ceci est une cause possible pour déclencher une pathologie autoimmune comme le diabète de type 1 (DT1), la sclérose en plaque (SP), le lupus érythémateux systémique et la polyarthrite rhumatoïde (Chavele and Ehrenstein 2011).



**Figure 1** : Perte de la balance entre les cellules effectrices T et les cellules T régulatrices (Chavele and Ehrenstein 2011).

### I-2-2 Mimétisme moléculaire

La théorie du mimétisme moléculaire repose essentiellement sur le fait que certains antigènes d'un agent infectieux viral ou bactérien peuvent partager des structures (épitopes) communes avec des antigènes du soi (**Tableau 1**). En effet, cette similarité peut induire une réaction croisée de l'Ag du soi et de l'Ag exogène, entraînant l'activation des lymphocytes auto-réactifs. Ce phénomène est appelé le mimétisme moléculaire. Ainsi, certaines infections virales sont parfois associées au déclenchement ou à l'exacerbation de maladies auto-immunes.

**TABLE 1. PROPOSED MOLECULAR MIMICRY IN AUTOIMMUNE DISEASES.\***

AUTOIMMUNE DISEASE	PROPOSED AUTOANTIGEN	PROPOSED PATHOGEN OR EPITOPE	IMMUNOLOGIC CROSS-REACTIVITY	ANIMAL MODEL†
Type 1 diabetes mellitus <sup>1,8</sup>	GAD65	Coxsackievirus P2-C	T cell (concept controversial in humans)	LCMV-RIP transgenic mouse
Rheumatoid arthritis <sup>9</sup>	HLA-DRB1	40-kd heat-shock protein (dnaJ)	T and B cells	—
Rheumatoid arthritis <sup>10</sup>	Heat-shock protein 60	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> heat shock protein 65	T and B cells	Adjuvant arthritis (rat)
Multiple sclerosis <sup>11,12</sup>	Myelin basic protein	Multiple viruses	T cell	LCMV-oligodendrocyte transgenic mouse
Spondyloarthropathies <sup>13-17</sup>	HLA-B27	Multiple gram-negative bacterial proteins	B cell	—
Graves' disease <sup>18,19</sup>	Thyrotropin receptor	<i>Yersinia enterocolitica</i>	B cell	—

\*LCMV denotes lymphocytic choriomeningitis virus, and RIP rat insulin promoter.

†This model is not specific for cross-reactivity between GAD65 and CoxP2-C.

**Tableau 1 :** Exemples proposés de mimétisme moléculaire en association avec certains maladies auto-immunes (Albert and Inman 1999).

Le mimétisme moléculaire a été reporté comme mécanisme d'activation des lymphocytes T autoréactifs dans le diabète de type 1 (DT1), la polyarthrite rhumatoïde (PR) et la sclérose en plaques (SP) (Oldstone 1987). Parmi les exemples de mimétisme moléculaire, on peut citer l'auto-antigène GAD impliqué dans le diabète auto-immun qui partage un épitope commun avec le virus Coxsackie.

### I-2-3 Modifications post-traductionnelles des protéines

Les modifications post-traductionnelles (MPT) sont des modifications chimiques des protéines, après leur synthèse ou pendant leur cycle de vie. On estime qu'entre 50 et 90% des protéines subissent des modifications post-traductionnelle *in vivo* (Doyle and Mamula 2001). Les MPT sont diverses et abondants et la plupart des protéines subissent un traitement

protéolytique et/ou la fixation (ou suppression) de groupes fonctionnels pour contrôler le repliement des protéines, la localisation, l'activité, la durée de vie et les interactions avec d'autres molécules.

Des exemples communs de MPT comprennent la glycosylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation, l'acétylation, la méthylation et les conversions d'acides aminés (**tableau 2**).

La plupart des MPT sont le résultat d'une action enzymatique naturellement contrôlée, mais des modifications peuvent également être à l'origine du vieillissement ou à l'exposition des protéines à un environnement chimiquement réactif. Lorsque les MPT sont introduites de manière non contrôlée, elles sont appelées MPT aberrants telles que les altérations dans les structures ou les séquences d'acides aminés qui peuvent générer des néo-épitopes à partir des protéines du soi et entraîner ainsi la perte de la reconnaissance immunitaire (Anderton 2004), ce qui déclenche une auto-réactivité du système immunitaire, conduisant finalement à des MAI (Doyle and Mamula 2005, Doyle and Mamula 2012).

PTM-type	PIN-characteristics	Protein	Ensembl ID	Disease
Glycosylation	high degree, high closeness centrality	Pro-epidermal growth factor	ENSP00000265171	Hypomagnesemia 4 (HOMG4) [MIM:611718][67]
		Transforming growth factor beta-1	ENSP00000221930	Camurati-Engelmann disease (CE) [MIM:131300][68]
		Interleukin-6	ENSP00000258743	Rheumatoid arthritis systemic juvenile (RASJ) [MIM:604302][69]
Phosphorylation	high degree, high closeness centrality	Cellular tumor antigen p53	ENSP00000269305	Esophageal cancer (ESCR) [MIM:133239][70]; Li-Fraumeni syndrome (LFS) [MIM:151623][71]
		RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	ENSP00000270202	Breast cancer (BC) [MIM:114480]; Colorectal cancer (CRC) [MIM:114500][72]; Proteus syndrome (PROTEUSS) [MIM:176920][73]
		Histone acetyltransferase p300	ENSP00000263253	Rubinstein-Taybi syndrome 2 (RSTS2) [MIM:613684][74]
Phosphorylation	low clustering coefficient	Autoimmune regulator	ENSP00000291582	Autoimmune polyendocrine syndrome 1, with or without metaphyseal dysplasia (APS1) [MIM:240300][75]
		ALK tyrosine kinase receptor	ENSP00000373700	Neuroblastoma 3 (NBLST3) [MIM:613014][76]
		Ataxin-2	ENSP00000366843	Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2) [MIM:183090][77]; Amyotrophic lateral sclerosis 13 (ALS13) [MIM:183090][78]

doi:10.1371/journal.pcbi.1004049.t004

**Tableau 2** : Exemples de certains MPT impliquées dans des maladies auto-immunes (Duan and Walther 2015).

## II- Le diabète de type 1 (DT1)

### II-1. Généralité sur le diabète de type 1

Il existe deux principaux types du diabète: le diabète de type 1 (DT1) et le diabète de type 2 (DT2). Bien que les symptômes soient similaires dans ces deux maladies, elles ont des étiologies très différentes. Alors que le diabète de type 2 résulte d'un manque de production

d'insuline ou d'une réduction de la sensibilité à l'insuline, le diabète de type 1 est le résultat d'un processus auto-immun dans lequel les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas subissent une destruction spécifique par des lymphocytes T auto-réactifs. Par conséquent l'insuline n'est plus synthétisée et sécrétée dans le sang par les cellules bêta du pancréas, entraînant une hyperglycémie.

L'Organisation Mondiale de la santé (OMS) estime que 422 millions d'adultes vivaient avec le diabète en 2014, comparé à 108 millions en 1980. Ce même rapport mondial de l'OMS sur le diabète souligne l'énorme ampleur du problème de santé publique du diabète.

Le diabète de type 1 (précédemment appelé diabète insulino-dépendant ou diabète juvénile) est une maladie auto-immune caractérisé par l'insulite, qui se manifeste au niveau des îlots de Langerhans par l'infiltration des cellules immunitaires et la présence d'une part des anticorps contre les cellules d'îlots et d'autre part par les lymphocytes T capables de reconnaître ces antigènes. En outre, la maladie survient fréquemment avec d'autres maladies auto-immunes, y compris la maladie cœliaque, la maladie d'Addison et les maladies de la thyroïde à savoir la thyroïdite de Hashimoto et de Graves (Barker 2006).

Les symptômes liés au diabète de type 1 comprennent la soif, la polydipsie (augmentation de la fréquence d'uriner) et la faim (van Belle, Coppieters et al. 2011). Plusieurs complications sont causées par cette maladie, y compris les lésions rénales, les lésions oculaires et la cécité, les maladies cardiaques et les accidents vasculaires cérébraux (van Belle, Coppieters et al. 2011).

Les maladies cardiovasculaires sont particulièrement préoccupantes pour les patients atteints

du diabète de type 1, car ils sont très sensibles aux maladies coronariennes. Il est possible que la cytokine IL-12 représente une caractéristique pathogène en induisant la conversion des lymphocytes T naïfs en Th 1, connus être impliqués dans le développement du diabète de type 1, jouent un rôle central dans le déclenchement des maladies cardiovasculaires associées. Il a été rapporté que les monocytes dans les artères athérosclérotiques produisent des niveaux plus élevés d'IL-12 que dans les artères saines. En outre, la production de l'IFN $\gamma$  induite par IL-12 est également connue pour exacerber l'athérosclérose, alors que le blocage de l'IL-12 diminue l'athérosclérose chez la souris (Hauer, Uyttenhove et al. 2005). En outre, les patients atteints du diabète de type 1 ont une variété de biomarqueurs inflammatoires dont les protéines c-réactive (CRP), la nitrotyrosine, les monocytes superoxydés, les cytokines inflammatoires, molécule vasculaire d'adhésion soluble (VCAM) (Devaraj, Cheung et al. 2007). En général, le diagnostic du diabète repose sur la détection d'auto-anticorps sériques dirigés contre les constituants des îlots de Langerhans notamment ; anti-cellules d'îlots (ICA), anti-insuline (IAA), anti-décarboxylase de l'acide glutamique (GAD) et Anti-IA2.

## **II-2. Initiation et progression du diabète de type 1**

On ignore quel signal déclenche le développement du diabète, mais il est admis que parmi les facteurs déclencheurs il y a les agents pathogènes, les commensaux et l'apoptose des cellules bêta du pancréas (Bettini and Vignali 2011). Le développement de la maladie suit une chronologie bien précise, le processus pathologique auto-immun est initié par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) dont les cellules dendritiques représentent la principale composante. La pathogénèse du diabète de type 1 commence par l'infiltration des îlots



pancréatiques par les APCs et les lymphocytes T. Cette infiltration bénigne au départ peut alors progresser vers une inflammation destructive des cellules bêta pancréatiques. Bien que les mécanismes de cette destruction n'ont pas été entièrement démontrés, il est bien établi qu'elle implique les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, les macrophages produisant les ROS, les cytokines capables d'induire l'apoptose cellulaire et la signalisation Fas/FasL. Les lymphocytes B, les cellules NK et les cellules NKT jouent également un rôle dans le développement et la progression de cette pathologie (Bending, Zaccane et al. 2012).

Malgré la diversité des cellules impliquées dans le processus de l'infiltration, on sait que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ainsi que les lymphocytes B sont nécessaires pour le développement de la maladie. Il a été rapporté que les souris NOD déficientes en lymphocytes B ne développent ni l'insulite ni diabète (Serreze, Chapman et al. 1996). De façon similaire, le diabète est également retardée ou inversée chez les souris NOD injectées par des anticorps neutralisant les lymphocytes B (Daugherty and Gottardi 2007). Cependant, le sérum des souris diabétiques ne transfère pas la maladie, suggérant que les lymphocytes B peuvent influencer le développement de la maladie par leur rôle de présentation d'antigènes plutôt que de cellules productrices d'anticorps (Bettini and Vignali 2011).

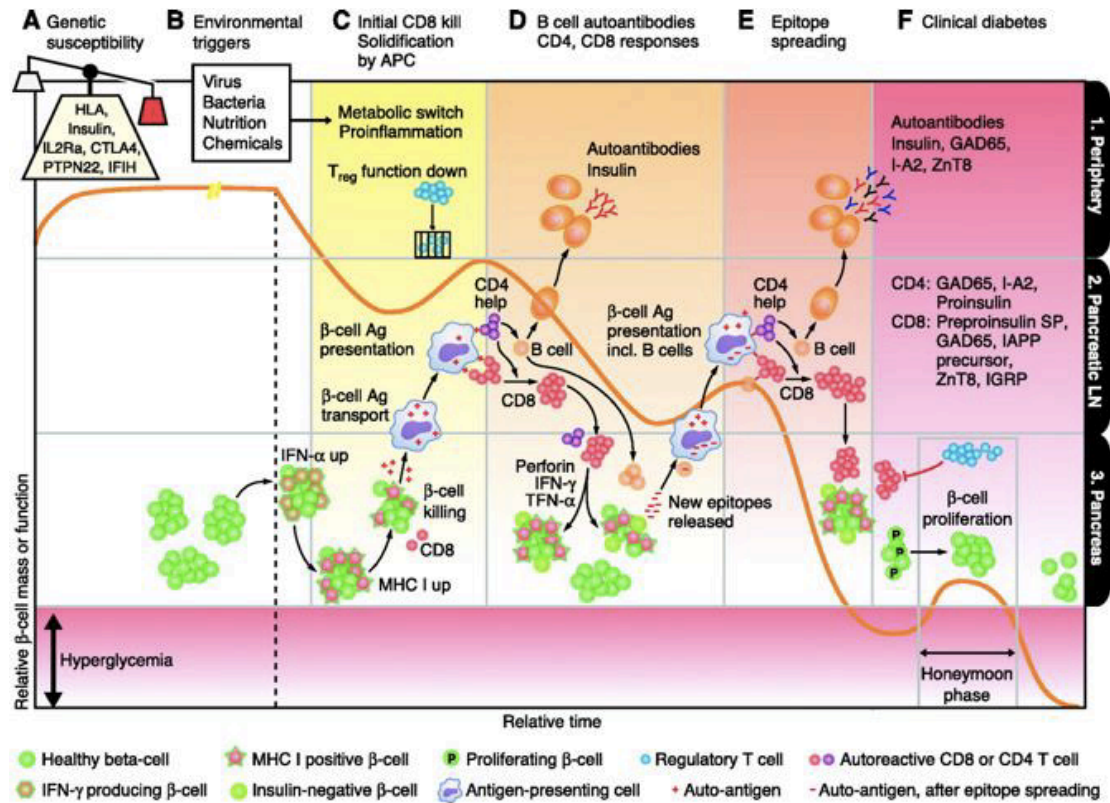
Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> jouent également un rôle central dans le développement de la maladie. En effet, il existe une corrélation entre la présence des lymphocytes CD8<sup>+</sup> auto-réactives et la destruction des cellules bêta du pancréas (Pinkse, Tysma et al. 2005). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> peuvent détruire les cellules bêta suite à l'interaction avec les molécules d'histocompatibilité de classe I (MHC I) exprimées sur les cellules bêta du pancréas (van Belle, Coppieters et al. 2011). Fait intéressant, les souris NOD qui ont été modifiées pour ne

pas exprimer de MHC I sur les cellules bêta du pancréas développent une insulite mais pas d'hyperglycémie ni de maladie subséquente (Hamilton-Williams, Palmer et al. 2003).

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> jouent également un rôle clé dans la pathogenèse du diabète. Le transfert adoptif des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez les souris NOD.SCID peut initier le diabète, bien que le développement du diabète soit retardé deux fois plus avec le transfert adoptif des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> isolés des souris pré-diabétiques par rapport à ceux des souris diabétiques (Christianson, Shultz et al. 1993). Une autre étude a révélé que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ne peuvent initier la maladie que lorsque des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont présent (Phillips, Parish et al. 2009). Ainsi, il a été suggéré que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> fournissent également de l'aide aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et aux lymphocytes B. les lymphocytes T sécrètent des cytokines qui créent un environnement pro-inflammatoire pathogène qui contribue à la maladie (van Belle, Coppieters et al. 2011). Dans l'ensemble, il ressort de ces études que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> et lymphocytes B agissent en synergie pour initier la maladie.

Notre compréhension sur la pathogenèse du diabète de type 1 a évolué. Dans le modèle classique proposé par George Eisenbarth, une personne présentant une susceptibilité génétique rencontre un déclencheur environnemental qui entraîne une destruction progressive des cellules bêta du pancréas. Seulement après la destruction de la majorité des cellules bêta (90-95%) qu'apparaissent les symptômes du diabète. Cependant, un modèle plus récent a été proposé pour mieux expliquer la physiopathologie du diabète de type 1 (**figure 2**). Ce modèle complexe, mis en évidence d'une part l'interaction entre la variabilité des gènes de

susceptibilité génétique et les facteurs environnementaux et d'autre part la perte de la régulation immunitaire menant au déclenchement et à la progression du diabète.



**Figure 2 :** Model d'initiation et de progression du diabète de type 1 (Daugherty and Gottardi 2007)

Chez les souris NOD, modèle d'étude du diabète de type 1, la progression de la maladie reflète ce qui se produit dans le diabète chez l'homme. Chez ces souris, la progression de la maladie suit une séquence chronologique d'événements précise: 1) à 3-4 semaines d'âge, les souris NOD présentent une peri-insulite dans laquelle les infiltrats mononucléaires entourent les îlots du pancréas mais ne sont pas encore envahissants; 2) à l'âge de 10 semaines, les

lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ainsi que les cellules NK, les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les macrophages se sont infiltrés dans les îlots entraînant une insulite (Anderson and Bluestone 2005, Bettini and Vignali 2011). Puisque les cellules dendritiques sont parmi les premières cellules à infiltrer les îlots de pancréas et jouent un rôle central dans la régulation des cellules immunitaires, une partie de cette introduction sera consacrée aux cellules dendritiques et le diabète auto-immun qui représente le sujet principal de cette thèse.

### **II-3 Prévention, prédiction et traitement du diabète de type 1**

Le diabète de type 1 est une maladie chronique dévastatrice qui nécessite des soins continus et a d'énormes répercussions socioéconomiques. Les traitements actuels pour le diabète de type 1 sont limités à l'administration de l'insuline par injections ou à l'aide de pompes (van Belle, Coppieters et al. 2011). Malgré l'impact des progrès technologiques sur les diagnostics et les traitements, le style de la vie moderne a rendu plus difficile les possibilités de contrôler la glycémie pour les patients diabétiques. Cependant, le DT1 peut être précocement diagnostiqué avec une certaine précision ce qui permet la possibilité de traitements préventifs. Une étude a révélé que chez les personnes ayant un facteur de risque pour le DT1, y compris avoir un parent avec le DT1 et avoir des auto-anticorps contre les cellules d'îlots du pancréas (ICA), les tests de tolérance au glucose peuvent prédire l'apparition de la maladie avec un score 0.66 de précision (Xu, Wu et al. 2010). Une autre étude a révélé que 89% des enfants qui ont développé le DT1 possèdent au moins deux ou plus d'auto-anticorps pancréatiques différents (Steck, Johnson et al. 2011). Par ailleurs, les enfants qui ont une persistance des niveaux élevés d'auto-anticorps d'insuline (IAA) ont une

probabilité de progression au DT1 de 100%. Autre auto-anticorps, tels que ceux dirigés contre la GAD65 ou l'IA2 (antigène d'îlot 2) / ICA512 (cellule d'îlot auto-anticorps 512), n'ont pas montré la même corrélation avec la progression de la maladie (Steck, Johnson et al. 2011). Enfin, les enfants génétiquement à haut risque, ceux qui ont le génotype HLA (DR3/4-DQ8), chez qui on a constaté que de multiples auto-anticorps à un âge précoce étaient beaucoup plus susceptibles de développer le diabète par rapport à ceux ayant des génotypes HLA à non risque (Ziegler, Rewers et al. 2013).

Dans le cadre du traitement du DT1, plusieurs cibles thérapeutiques ont fait l'objet de recherches extensives. Les résultats de ces recherches se sont révélés prometteurs chez les souris NOD. Par exemple les traitements effectués par l'anticorps anti-CD3, ont mené à une rémission complète de la maladie (Hayward and Shreiber 1989, Hayward and Shreiber 1992, Chatenoud, Primo et al. 1997). Cependant, plusieurs études ont montrées que le succès de cette thérapie par l'anti-CD3 dépend fortement du début du traitement (Chatenoud, Thervet et al. 1992, Chatenoud, Thervet et al. 1994, Kodama, Davis et al. 2005). En outre, il a été montré que l'administration de TNF- $\alpha$  protège contre la maladie. En effet, chez la souris NOD, le TNF- $\alpha$  est capable d'induire l'apoptose chez les lymphocytes T diabétogènes suite à leurs défauts au niveau de l'activation de NF- $\kappa$ B (Jacob, Aiso et al. 1990, Kodama, Davis et al. 2005), bien que d'autres études ont montré un effet exacerbant, ce qui suggère que le TNF- $\alpha$  peut agir sur une ou plusieurs voies qui sont modulées de manière différentielle lors de la progression de la maladie, entraînant des effets opposés sur l'incidence du diabète (Lee, Xu et al. 2005, Shoda, Young et al. 2005). Ces résultats contradictoires sont probablement liés aux différences de temps et de la durée de traitement. (Shoda, Young et al. 2005).

Chez la souris NOD, il ne semble pas que le succès des traitements préventifs dépend de traitement précoce, comme en témoigne le succès de plusieurs traitements qui ont commencé après 4 semaines d'âge, y compris le traitement par anti-CD3, anti-CTLA-4 et l'administration de TNF- $\alpha$  (Shoda, Young et al. 2005). En outre, l'administration orale de l'insuline ou de GAD65 a réduit l'incidence du diabète chez les souris NOD en inhibant l'infiltration des îlots pancréatiques et la production de l'IFN- $\gamma$  (Ramiya, Shang et al. 1997).

Nombreuses les thérapies qui ont été démontrées efficaces chez les souris NOD ont été transférées dans les essais cliniques chez l'homme. Il s'agit notamment de l'anti-CD3 chez les patients diabétiques récemment diagnostiqués qui a montré une réduction des besoins quotidiens à l'insuline (Herold, Hagopian et al. 2002, Herold, Gitelman et al. 2005, Keymeulen, Vandemeulebroucke et al. 2005). Bien que le traitement a été réalisé sur une courte période de six jours consécutifs ses effets protecteurs ont duré au moins 4 années. Ces études ont montré que les patients plus jeunes, âgés de 17 à 27 ans et les patients avec les premiers stades de la destruction des cellules bêta pancréatiques ont répondu mieux à la thérapie par rapport aux patients plus âgés et ceux qui se trouvent dans des stades plus avancés de la maladie (Jayasimhan, Mansour et al. 2014). Une autre étude a montré que le traitement par le plasmide pro-insuline a entraîné la préservation des niveaux élevés de peptide C et une réduction de l'infiltration des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Roep, Solvason et al. 2013). À l'inverse, l'injection sous cutané de GAD65 n'a eu aucun effet sur les taux de peptide C et sur l'incidence du diabète (Ludvigsson, Krisky et al. 2012).

Il est intéressant de noter que plusieurs études ont montré que la vitamine D (1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D) peut moduler les réponses immunitaires chez les souris NOD.

L'administration des doses élevées de vitamine D aux souris NOD a réduit l'incidence du diabète à 8% par rapport à 56% dans le groupe des souris contrôles (Mathieu, Waer et al. 1994). La 1,25-dihydroxyvitamine D3 est capable d'inhiber la production d'IL-12 et régule à la baisse l'activité de NF- $\kappa$ B dans les cellules dendritiques et les macrophages (D'Ambrosio, Cippitelli et al. 1998). La vitamine D a été utilisée également dans les essais cliniques humains. Cependant, dans une étude clinique, la dose de 0,25 mg de la vitamine D n'a eu aucun effet sur la fonction des cellules bêta pancréatiques chez les patients ayant un DT1 récemment diagnostiqués (Heuberger and Birchmeier 2010). Dans une autre étude, les femmes enceintes dont les enfants étaient à risque d'avoir le DT1 recevaient un supplément de la vitamine D. Ce traitement n'a pas été associée à la diminution du risque du DT1 pour leurs enfants plus tard dans la vie (Marjamaki, Niinisto et al. 2010).

Par ailleurs, une nouvelle stratégie de la thérapie qui a pris de l'ampleur ces dernières décennies, est la thérapie cellulaire. Le transfert adoptif des lymphocytes T régulateurs (Treg) chez les souris NOD nouvellement diabétiques a renversé la maladie (Tang, Henriksen et al. 2004, Tarbell, Yamazaki et al. 2004). Chez l'homme, l'administration des lymphocytes Tregs aux enfants récemment diabétiques a conduit à la préservation de la fonctions des cellules bêta pancréatiques avec une sécrétion des niveaux élevés de peptide C (Marek-Trzonkowska, Mysliwiec et al. 2012). Les différents traitements adoptés jusqu'à aujourd'hui, visent à restaurer la fonction des cellules bêta pancréatiques, tous avec des degrés de succès variables. Il est probable que des thérapies combinées seront nécessaires pour prévenir ou guérir complètement le DT1 (van Belle, Coppieters et al. 2011). Malgré plusieurs thérapies prometteuses, il reste qu'aujourd'hui le traitement du diabète de type 1 repose sur la thérapie par l'insuline.

## **II-4 Modèles d'études : les souris NOD (Non-obese diabetic)**

La souris NOD (non obèse diabétique) est le modèle animal le plus utilisé pour étudier le diabète de type 1. La souche NOD diabétique est caractérisée par la polyurie développée spontanément, la glycosurie, l'hyperglycémie, la carence en insuline, la cétonurie et la perte de poids. Les souris NOD développent généralement le DT1 à 12-28 semaines et les femelles présentent une incidence du diabète de 70 à 80% alors que cette incidence chez les mâles est de 20% à 30%, bien qu'il existe une variabilité entre les colonies (Kikutani and Makino 1992, Flemming 2011). Une partie de cette variabilité peut être due à des différences hormonales. En effet, il a été reporté que le traitement des souris NOD femelles par la dihydrotestostérone protège contre le diabète (Casteels, Gysemans et al. 1998). Par ailleurs, la composition de microbiome intestinal s'est avéré impliquer dans l'induction du diabète. Par exemple, la présence de bactéries filamenteuses segmentées (SFB) a été corrélée avec la protection contre le diabète chez les souris NOD femelles par rapport à aux souris NOD femelles dépourvues de SFB de la même colonie. Cependant, les souris NOD mâles qui sont SFB positives n'ont montré aucun changement au niveau de l'incidence au diabète par rapport aux souris NOD mâles contrôles (Kriegel, Sefik et al. 2011). Généralement, les souris meurent systématiquement dans les 1-2 mois suivant le début de la maladie (Kikutani and Makino 1992).

La pathogenèse du diabète chez les souris NOD est similaire à celle chez l'humain. elle présente des auto-antigènes pancréatiques similaires, y compris la décarboxylase d'acide glutamique (GAD), l'insuline, et ZnT8 (un transporteur de zinc) (Boitard 2012). Le processus de l'infiltration leucocytaire au niveau des îlots pancréatiques est semblable. Les souris NOD



sont susceptibles à d'autres maladies auto-immunes comme la thyroïdite auto-immune (Garchon, Bedossa et al. 1991) et l'anémie hémolytique (Baxter and Mandel 1991), semblables à celles de certains patients DT1 (Anderson and Bluestone 2005). En outre, les souris NOD ont une substitution d'acide non aspartique en position 57 de la chaîne bêta de CMH. Une substitution similaire est observée dans le *loci* de susceptibilité humaine dans la chaîne bêta DQ (Thayer, Wilson et al. 2010).

## **II-5 Auto-immunité, Tolérance et Tregs dans le diabète de type 1**

Le développement du système immunitaire sain supprime la plupart des lymphocytes T capables de reconnaître les auto-antigènes des cellules bêta pancréatiques (Xing and Hogquist 2012). Cependant, certains de ces lymphocytes T auto-réactifs se trouvent en périphérie chez les patients diabétiques ainsi que chez des individus en bonne santé. Par conséquence, d'autres mécanismes peuvent contrôler l'auto-réactivité de ces lymphocytes T à savoir l'ignorance, l'anergie, la suppression et l'immuno-régulation (Jaeckel, Mpofo et al. 2008).

Les cellules suppressives, caractérisées comme des cellules T CD4<sup>+</sup> et plus tard décrites comme cellules T régulatrices (Treg), ont été démontré capables de protéger les souris NOD contre le DT1 (Boitard 2012). Les Tregs sont l'objet principal de la recherche sur les cellules régulatrices, mais d'autres cellules, telles que les cellules NKT, peuvent aussi réguler l'auto-immunité du DT1 (Simoni, Diana et al. 2013). Par exemple, certaines études ont révélé que l'activation des cellules NKT avec de l'alpha-galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) entraînait un

changement vers un phénotype de type Th2 chez les souris traitées et conduit à la protection des îlots transplantés chez les souris diabétiques (Hong, Wilson et al. 2001, Sharif, Arreaza et al. 2001). Plusieurs données de la littérature indiquent que des défauts aussi bien du nombre que des fonctions des Tregs contribuent au développement de la maladie chez les souris NOD. Par exemple, des souris NOD déficientes en B7-1 et des souris déficientes en CD28 ont des pourcentages de Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> considérablement réduits et développe rapidement le DT1 (Salomon, Lenschow et al. 2000). D'autres travaux ont rapporté que la progression du diabète a été associé à la fois à des pourcentages réduites de Tregs dans les ganglions lymphatiques pancréatiques de souris NOD par rapport aux souris témoins (D'Angeli, Merzon et al. 2010) ainsi qu'à une diminution de l'activité suppressive des Tregs (Gregori, Giarratana et al. 2003, Tritt, Sgouroudis et al. 2008). Une autre étude a montré qu'aucune différence dans la proportion des Tregs entre la souris NOD et les trois souris contrôles C57BL/6, BALB/c et CBA (Berzins, Venanzi et al. 2003). Cependant, la fonction Treg et leur capacité à proliférer peuvent diminuer avec l'âge chez la souris NOD (Tritt, Sgouroudis et al. 2008). En outre, la diminution de l'activité suppressive des Tregs ainsi que la baisse progressive de la sensibilité des lymphocytes T diabétogéniques à l'immuno-régulation par les Tregs peut contribuer à la maladie (Gregori, Giarratana et al. 2003, You, Belghith et al. 2005). Malgré ces études qui indiquent clairement un rôle protecteur des Tregs dans le diabète auto-immun chez les souris NOD, les études sur les Tregs chez l'homme ont soulevé beaucoup de questions liées à la fréquence et à la fonction des Tregs dans le diabète auto-immun (Brusko, Wasserfall et al. 2005, Brusko and Atkinson 2007, Brusko, Hulme et al. 2007, Jaeckel, Mpofu et al. 2008). Par exemple, une étude a révélé un nombre réduit de Tregs dans les PBMC des patients diabétiques par rapport aux sujets sains (Kukreja, Cost et al. 2002), tandis que d'autres

investigations n'ont trouvé aucune différence (Brusko, Wasserfall et al. 2005, Lindley, Dayan et al. 2005, Putnam, Vendrame et al. 2005). De plus, une étude a révélé qu'aucune différence dans la capacité suppressive des Tregs chez les patients diabétiques et les sujets sains (Putnam, Vendrame et al. 2005). Plusieurs autres études chez les patients diabétiques ont révélé des différences qualitatives associées à la capacité suppressive et la production des cytokines pro-inflammatoires dans les populations de lymphocytes T (Brusko, Wasserfall et al. 2005, Lindley, Dayan et al. 2005).

## **II-6 La prédisposition génétique au diabète de type 1**

La prédisposition génétique au développement du diabète auto-immun est liée aux *loci* de susceptibilité appelé *idd* (*insulin-dependant diabetes*) qui constituent des facteurs de risques génétiques majeurs et qui sont modulés par les facteurs environnementaux (Bending, Zaccane et al. 2012). Le plus souvent, le DT1 est le résultat d'une interaction complexe entre plusieurs *loci* génétiques. Chez l'homme, les molécules CMH de classe II, HLA-DQ2 et HLA-DQ8 sont les facteurs de risque les plus importants dans le développement de la maladie (Bending, Zaccane et al. 2012). le *locus* du CMH contribue de 40% à la susceptibilité du DT1 (Boitard 2012). Les haplotypes de classe I, y compris le génotype HLA-A A1 et A2 ont également été associés au développement du DT1. Il existe une corrélation entre ces gènes lorsqu'ils sont combinés avec des haplotypes de classe II à haut risque, l'apparition précoce d'auto-anticorps pancréatiques et l'incidence élevée du DT1 (Robles, Eisenbarth et al. 2002). Ces gènes de susceptibilité de CMH ont été identifiés et se trouvent dans la région chromosomique appelée *IDDM 1* (*insulin-dependant diabetes 1*) (van Belle, Coppieters et al.

2011). Les gènes du CMH jouent un rôle important dans la susceptibilité à la maladie chez la souris NOD, notamment la molécule unique de CMH de classe II appelée H2<sup>g7</sup> (Anderson and Bluestone 2005, Atkinson 2005). Beaucoup d'autres gènes non-HLA ont été associés au développement du DT1 chez les humains indiquant que la maladie a une composante génétique complexe (Nejentsev, Smink et al. 2007). En plus, d'autres gènes sont aussi associés au DT 1 incluant la région 5' des gènes de l'insuline, *PTPN22* et *CTLA4* (Boitard 2012), *IL2RA* et le gène *IFIH1* (van Belle, Coppieters et al. 2011). Le gène de l'insuline est trouvé dans la région chromosomique *IDDM2* sur le chromosome 11 (Brand, Lowe et al. 2007, van Belle, Coppieters et al. 2011). Il a été signalé qu'une région polymorphe du gène de l'insuline était associée au développement du DT1 chez les Caucasiens (Bell, Horita et al. 1984). Le gène *PTPN22* code pour une protéine lymphoïde dite protéine tyrosine Phosphatase, qui déphosphoryle Lck, Zap70, Vav, et CD3 $\epsilon$ , qui sont impliquées dans le processus de la régulation négative de la signalisation TCR (Wu, Katrekar et al. 2006). Les mutations dans ce gène peuvent conduire à une signalisation aberrante des lymphocytes T et en l'occurrence à l'auto-immunité. Le gène *CTLA4* est un régulateur négatif important de la prolifération des lymphocytes T (Waterhouse, Penninger et al. 1995). Ce gène se trouve dans la région *IDDM 12* et joue un rôle dans le développement du DT1 ainsi dans d'autres maladies auto-immunes (Ueda, Howson et al. 2003, Lowe, Cooper et al. 2007). Il a été démontré que la suppression de *Ctla4* chez les souris conduisait à l'infiltration des lymphocytes dans différents organes, y compris le pancréas (Waterhouse, Penninger et al. 1995). Il y a aussi la variation de la chaîne alpha du récepteur IL-2, qui est impliqué dans la différenciation des Tregs et associée au développement du DT1 (Vella, Cooper et al. 2005, Daugherty and Gottardi 2007, Lowe, Cooper et al. 2007). Enfin, plusieurs études ont indiqué le lien entre le DT1 et le gène *IFIH1*.

Ce gène code pour une protéine de capteur cytoplasmique capable de reconnaître les virus picorna tels que le virus Coxsackie, qui peut jouer un rôle de facteur déclencheur dans le développement du diabète (van Belle, Coppieters et al. 2011). Des niveaux plus élevés de IFIH1 se retrouvent dans les PBMC des individus ayant des polymorphismes de ce gène (Liu, Wang et al. 2009). Certains polymorphismes de ce gène ont été considérés comme protecteur contre le DT1 (Nejentsev, Walker et al. 2009).

Le modèle d'étude de la souris NOD a apporté de nombreux éclaircissements sur la base génétique du DT1. Dans ce modèle, plusieurs segments chromosomiques ont été associés au développement du diabète. Ces *loci* génétiques appelé *idd* contiennent différents gènes associés au diabète de type 1. Fait intéressant, *idd5* chez les souris NOD a été montré contenir le gène *Ctla4* (Wicker, Chamberlain et al. 2004). Le gène d'*Il2* lui-même se trouve dans la région chromosomique *idd3* chez les souris NOD (Lyons, Armitage et al. 2000). Il est important de noter que malgré le fait que la mutation par substitution (R620W) dans le *Ptpn22* traduite par une dégradation rapide de la protéine a révélé son rôle comme facteur de risque génétique important pour l'auto-immunité chez l'homme, la suppression de l'expression *Ptpn22* chez des souris NOD conduit à la protection contre la maladie (Zheng and Kissler 2013).

## **II-7 Les facteurs environnementaux dans le diabète de type 1**

Les facteurs environnementaux ont longtemps été montré impliqués dans la pathogénie du diabète auto-immun en tant que déclencheurs de la maladie que des facteurs

potentiels de destruction des cellules bêta pancréatiques (Knip, Veijola et al. 2005, Peng and Hagopian 2006). Parmi les premières évidences du rôle des facteurs de l'environnement dans la survenue du diabète sont les études menées chez les jumeaux monozygotes chez qui seulement 50% par paire sont diabétique indiquant le rôle important de la composante environnementale dans le DT1 (Barnett, Eff et al. 1981, Kaprio, Tuomilehto et al. 1992, Knip and Simell 2012).

La prévalence de la maladie a augmenté au rythme de 3 à 4 % pendant ces dernières années et son apparition touche de plus en plus les enfants de moins de 5 ans (Lerner, Aaronson et al. 2015) Cette augmentation importante de la prévalence de diabète ne peut pas être expliquée seulement par la prédisposition génétique, mais essentiellement par les changements de l'environnement et de son interaction avec le génome. Sur la base des données épidémiologiques et des données générées chez le modèle de la souris NOD, on peut souligner parmi les facteurs environnementaux : les infections virales, l'alimentation, l'exposition à des toxines (Yoon, Austin et al. 1979, Huber, Stewart et al. 2001). En effet, dans une méta-analyse de 33 études, il a été constaté que l'infection par les entérovirus corrélait fortement avec le développement du DT1. Il y a eu environ 10 fois plus de fréquence d'infection par entérovirus chez les enfants atteints du DT1 par rapport aux enfants témoins (Yeung, Rawlinson et al. 2011). L'infection maternelle avec le virus Coxsackie pendant la grossesse a également été corrélée avec le développement du DT1 chez les enfants (Dahlquist, Frisk et al. 1995, Hyoty, Hiltunen et al. 1995, Elfving, Svensson et al. 2008). Les cellules bêta pancréatiques peuvent être directement infectées par le virus Coxsackie, ce qui provoque la perte de leurs fonctions (Tracy, Drescher et al. 2002, Dotta, Censini et al. 2007). Fait intéressant, une molécule trouvée dans le virus coxsackie est très similaire à la GAD, l'un

des auto-antigènes identifiés dans le DT1, ce qui suggère que le mimétisme moléculaire serait un des mécanismes impliqué dans le développement de réaction auto-immune contre les cellules bêta du pancréas dans le DT1 (Kaufman, Erlander et al. 1992). Une étude a rapporté une augmentation de la molécule HLA de classe I et de l'expression de l'IFN- $\alpha$  dans les îlots de pancréas des enfants diabétiques infectés par le virus coxsackie, suggérant le rôle de ce virus dans la maladie (Foulis, Farquharson et al. 1987). Cependant, une autre étude a rapporté que l'infection de la souris NOD par le virus coxsackie avant l'apparition de la maladie peut protéger contre le DT1. Ces données suggèrent que le moment de l'infection par le virus est crucial pour mener à la protection ou l'induction de la maladie (Tracy, Drescher et al. 2011). D'autres virus ont également été impliqués dans le DT1 à savoir, le cytomégalo virus (Pak, Eun et al. 1988), parvovirus (Kasuga, Harada et al. 1996), le virus de l'encéphalomyocardite (Craighead and McLane 1968) et le rotavirus (Honeyman, Coulson et al. 2000). Chez les patients diabétiques, il est difficile de déterminer si ces virus sont la cause principale du diabète ou si le diabète augmente la susceptibilité aux infections virales.

En conclusion, il est possible que certaines infections virales soient capables de déclencher le diabète, tandis que d'autres protègent contre la maladie. Par ailleurs, il a été montré qu'il existe des différences dans le microbiota intestinal entre les enfants chez qui on trouve des auto-anticorps positifs et les enfants témoins (de Goffau, Luopajarvi et al. 2013). Une autre étude a montré que les rapports de différents groupes bactériens chez les enfants diabétiques étaient significativement différents de ceux des enfants en bonne santé (Murri, Leiva et al. 2013). Il existe aussi d'autres facteurs non pathogènes qui ont été associés au développement du DT1 chez l'homme. Ceux-ci incluent la consommation de lait de vache (Karjalainen, Martin et al.

1992, Lempainen, Vaarala et al. 2009) et la gliadine et G1b1, deux protéines trouvées dans le blé (Catassi, Guerrieri et al. 1987, MacFarlane, Burghardt et al. 2003).

En effet, de nombreuses données générées avec des modèles animaux du DT1 soutiennent également l'effet de l'environnement sur le diabète auto-immun. L'incidence du diabète chez les souris NOD élevées dans un environnement sans agents pathogènes est plus grande par rapport à celles trouvées dans un environnement moins propre (Boitard 2012). De plus, divers agents pathogènes peuvent protéger les souris NOD contre la maladie, y compris les virus tel que le coxsackie B (Oldstone 1988, Filippi and von Herrath 2005) et les parasites tels que *Schistosoma mansoni* (Cooke, Tonks et al. 1999), et *Trichinella spiralis* ou *Heligmosmoides polygyrus* (Saunders, Raine et al. 2007). Enfin, les bactéries intestinales jouent un rôle important dans le développement du diabète. En effet, les souris NOD déficientes de *Myd88*, élevées dans des conditions dépourvues de germes pathogènes ont modifié la composition du microbiota intestinale et ne développent pas le diabète. Cependant, lorsque ces même souris sont élevées dans un milieu complètement sans germes, ces souris développent le diabète. bien que cela peut être atténué en transférant le microbiota de la NOD déficiente de *MyD88* élevée dans un milieu sans germes pathogènes indiquant le rôle primordial du microbiota dans le développement du DT1 (Wen, Ley et al. 2008).

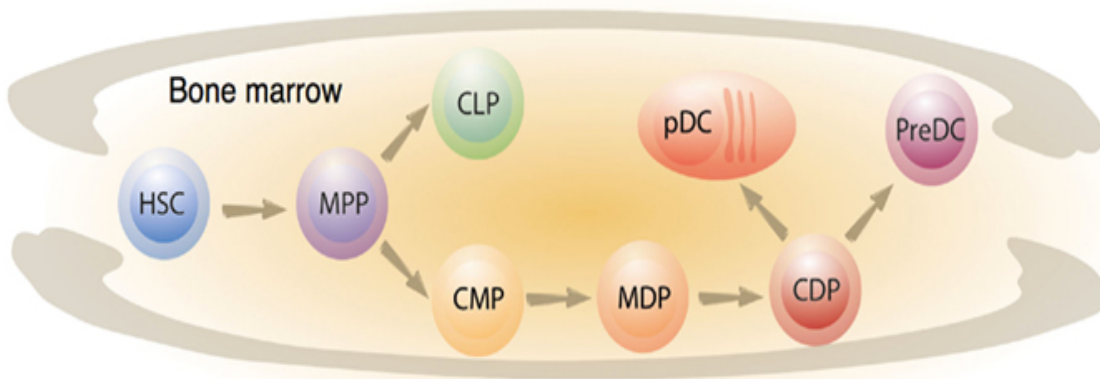


### III. Le rôle des cellules dendritiques dans la pathogenèse du DT1

#### III. 1. Ontogénèse et sous-populations de cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices d'antigènes les plus importantes (Banchereau, Briere et al. 2000). Ces cellules ont été initialement identifiées par Steinman et Cohn dans la rate de souris sur la base de leur morphologie qui les distingue des macrophages. Ils ont été par la suite considérés comme les stimulateurs les plus puissants des lymphocytes T (Randolph, Beaulieu et al. 1998). Ces travaux vont être la base de la recherche sur l'importance des DCs dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Les cellules dendritiques expriment des niveaux élevés du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et l'intégrine CD11c (Nussenzweig, Steinman et al. 1981, Nussenzweig, Steinman et al. 1982).

Les DCs prennent origine à partir des cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> (HSC) de la moelle osseuse. Ces dernières se différencient en progénitures myéloïdes communs (CMP) et en progénitures lymphoïdes communs (CLP). Les CMP donnent naissance aux lignées de macrophages, monocytes, polynucléaires et de progénitures communs de DC (CDP) (Fogg, Sibon et al. 2006, Waskow, Liu et al. 2008), alors que les CLP sont à l'origine des futurs thymocytes et précurseurs de lymphocytes B. Les CDP se différencient par la suite en deux grandes lignées distinctes : les DC plasmacytoïdes (pDC) qui proviendraient aussi des CLP (Reizis 2010), et les précurseurs de DC conventionnelles (Pre-cDC) qui se divisent ensuite en plusieurs sous-populations de DC dites conventionnelles ou classiques (Li, Zhang et al. 2009) (**figure 3**) qui migrent vers les différents tissus et organes lymphoïdes de l'organisme (Geissmann, Manz et al. 2010).



**Figure 3 :** Ontogénèse des précurseurs de cellules dendritiques (Chopin, Allan et al. 2012)

La classification des DCs en plusieurs sous population ne se base pas seulement sur leurs profils phénotypiques mais aussi sur leurs localisations et par leurs caractéristiques fonctionnelles (Shortman and Liu 2002). Le CD11c est le marqueur le plus en commun entre les DCs (Vremec, Pooley et al. 2000).

Chez la souris, on reconnaît les sous populations des DCs conventionnelles de type  $CD4^+CD8^-$ ,  $CD4^-CD8^+$  et  $CD4^-CD8^-$  qui sont retrouvées principalement dans la rate et les ganglions lymphatiques. Ces DCs sont dites résidentes des organes lymphoïdes. Il est généralement admis que les DCs  $CD8^+$  sont les plus efficace dans la présentation d'antigènes croisée aux lymphocytes T, tandis que les DCs  $CD8^-$  ne le sont pas malgré leur phénotype mature (Vremec and Shortman 1997, Vremec, Pooley et al. 2000). Ces antigènes sont souvent des auto-antigènes issus d'un processus de dégradations cellulaires ou tissulaires physiologiques ou pathologiques probablement suite à une infection virale, bactérienne ou

parasitaire. Les DCs conventionnelles se distinguent également par une forte expression d'un récepteur membranaire CD205, impliquée dans l'endocytose et la présentation antigénique via le CMH I et capable d'induire une tolérance immune des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Bonifaz, Bonnyay et al. 2002). Enfin, ces deux sous populations de DCs CD8<sup>-</sup> et DCs CD8<sup>+</sup> semblent avoir des fonctions différentes. Cette spécialisation dans la capture et la présentation d'antigène serait due à l'expression préférentielle de molécules de classe I et II impliquées dans les voies de présentation d'antigène (Dudziak, Kamphorst et al. 2007).

Les DCs plasmacytoides (pDC) représentent une population minoritaire des DCs qui est retrouvées essentiellement dans le sang et les organes lymphoïdes. Ces cellules se distinguent généralement par l'expression des marqueurs de surface B220 et PDCA-1 alors que les DCs d'origine myéloïdes expriment principalement le CD11b. Les pDCs sont connues pour sécréter de fortes quantités IFN de type 1 suite à la détection de motifs viraux via les TLR7 et TLR9. Ces cellules ont aussi la capacité de sécréter d'autres cytokines pro-inflammatoire telles que le TNF- $\alpha$  suite à leur activation via le TLR, et sont aussi capables de présenter l'antigène.

Finalement, d'autres sous types de DC spécialisées distinctes sont retrouvées au niveau de l'épiderme et les différents tissus mucosaux de l'organisme. Ces cellules dites de Langerhans sont caractérisées par la présence de granules de Birbeck qui contiennent essentiellement de la langerine (CD207: récepteur du groupe lectine de type C). Ce récepteur représente le marqueur phénotypique par excellence de ces cellules (Ludewig, Junt et al. 2001). D'autres DCs retrouvées dans les différents tissus périphériques tels que la peau, les poumons, le foie, les reins et au niveau de tractus gastro-intestinal. Ces DCs sont caractérisées par l'expression

de la molécule CD103<sup>+</sup> et sont impliquées dans le maintien de la tolérance orale des antigènes issus de l'alimentation et de la flore bactérienne commensale intestinale, tout en assurant une réponse immunitaire efficace contre les pathogènes (Kinnebrew, Buffie et al. 2012).

### **III-2 Le rôle immunogène et tolérogènes des DCs dans le DT1**

L'implication des DCs dans le développement du diabète a été proposée après avoir constaté la présence des cellules myéloïdes dans les îlots pancréatiques transplantés chez la souris (Lacy, Davie et al. 1979). En outre, la délétion de ces cellules dendritiques a facilité la survie du greffe des îlots de pancréas chez la souris, suggérant l'importance de ces cellules dans la présentation d'antigène dérivés de cellules bêta pancréatiques aux lymphocytes T, et l'induction de la réponse diabétogène (Faustman, Steinman et al. 1984). Des études supplémentaires ont confirmées que les auto-antigènes libérés après la mort des cellules bêta pancréatiques, suite à un processus physiologique de remodelage de tissus ou bien suite à une lésion médiée par une infection dans les îlots pancréatiques, sont présentés par les DCs aux lymphocytes T au niveau des ganglions lymphatiques pancréatiques pour initier la réponse diabétogène (Turley, Poirot et al. 2003, Marleau, Summers et al. 2008).

Chez la souris NOD, le développement du diabète est contrôlé par les gènes de susceptibilité qui sont situés à l'intérieur et à l'extérieur de l'inhabituel CMH H2<sup>g7</sup> (K<sup>d</sup>, I-A<sup>g7</sup>, E<sup>null</sup>, D<sup>b</sup>), qui caractérise la souche NOD. Ces haplotypes spécifiques de CMH exprimés au niveau des APC et notamment des DCs sont capables de présenter les auto-antigènes des cellules bêta pancréatiques via la molécule CMH de classe I (K<sup>d</sup>, D<sup>d</sup>) et CMH II (I-A<sup>g7</sup>). En effet, en raison

de ces anomalies et en association avec l'expression des différents *loci* de susceptibilité *idd*, les DC comme les autres APC sont incapables de contribuer dans l'établissement d'un environnement tolérogène pouvant aider à inhiber l'activité diabétogène des lymphocytes T effectrices (Driver, Serreze et al. 2011). Ces défauts d'induction de la tolérance immunitaire dont les DCs sont responsables, impliquent aussi les deux groupes principaux d'APC professionnelles : les lymphocytes B et les macrophages.

Plusieurs rapports ont suggéré que les DC provenant de souris NOD ont une capacité plus élevée à activer les lymphocytes T. De plus, ces DCs produisent beaucoup plus d'IL-12p70 en lien avec l'augmentation de l'expression de NF- $\kappa$ B et expriment plus de molécules de co-stimulation par rapport aux DCs des souris C57BL/6 (Poligone, Weaver et al. 2002, Steptoe, Ritchie et al. 2002). De plus, le nombre des DCs générées à partir de la moelle osseuse de souris NOD est bas comparativement à celui d'autres souches de souris contrôles (C57BL/6 et BALB/c) (Nikolic, Bunk et al. 2004). Ce faible nombre de DCs obtenu chez la souris NOD expliquerait probablement la faible capacité des DCs à induire une tolérance périphérique (Feili-Hariri and Morel 2001). En plus, le taux d'apoptose de DCs chez la souris NOD est plus élevé comparativement aux souris NOR (non obèse résistante, souris congéniques aux NOD mais qui ne développent pas le diabète de type1) (Prasad and Goodnow 2002, Nikolic, Bouma et al. 2005). En effet, ces études appuient un rôle diabétogène des DCs dans les étapes d'initiation du diabète.

Les DCs conventionnelle (cDC) peuvent jouer un rôle protecteur contre le DT1. Cette notion est fortement soutenue par le fait que les souris déficientes en cDC développent des maladies auto-immunes (Ohnmacht, Pullner et al. 2009). En effet, les cDC contrôlent à la fois la tolérance périphérique et centrale dans des conditions physiologiques et pathologiques car ces

cellules peuvent induire la délétion clonale, l'anergie des lymphocytes T ou l'expansion des cellules Tregs (Ueno, Klechevsky et al. 2007). Dans le contexte du DT1, les cDC peuvent induire l'expansion de cellules Tregs spécifiques à l'antigène. Ces cellules sont des acteurs clés dans la prévention contre le DT1 (Tang and Bluestone 2008) et sont des cibles thérapeutiques prometteuses dans la lutte contre cette maladie. Le traitement des souris NOD avec le G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor) augmente le nombre de cDC et de pDC dans la rate et favorise ensuite l'expansion des cellules Tregs qui suppriment les lymphocytes T diabétogènes par un mécanisme TGF- $\beta$  dépendant (Kared, Masson et al. 2005). Dans ce contexte, plusieurs études ont montré aussi que le GM-CSF (Gaudreau et al., 2007), la TSLP (Besin et al., 2008) et la FLT3, favorisent l'expansion de DCs tolérogènes qui jouent potentiellement un rôle central dans la protection contre le diabète.

Contrairement à leur rôle potentiellement diabétogène, les pDC pourraient également être protecteurs grâce à l'expression de différentes molécules impliquées dans l'induction de la tolérance telles que le PD-L1 et le PD-L2 (Programmed death-ligand), le ICOS-L (inducible costimulator ligand) et IDO (l'indoleamine 2,3 -dioxygénase) (Ito, Yang et al. 2007, Puccetti and Fallarino 2008, Lehuen, Diana et al. 2010, Matta, Raimondi et al. 2012). Une étude a décrit que les souris NOD jeunes semblent être défectueuses au niveau de l'expression IDO (Grohmann, Fallarino et al. 2003) et que la surexpression de IDO augmente la survie des greffons d'ilots pancréatiques (Alexander, Crawford et al. 2002). Ces études appuient le rôle de DCs tolérogènes dans l'établissement des mécanismes de tolérance centrale et périphérique et renforcent leur utilisation potentielle dans de nouvelles stratégies thérapeutiques.

### III-3 Les défauts des lymphocytes B et macrophages dans le DT1

#### III-3-1 Lymphocytes B

Le DT1 habituellement était considéré comme une pathologie auto-immune médiée par les lymphocytes T. Cependant, plusieurs études ont montré que la rupture de la tolérance ou l'anergie des lymphocytes B est également un facteur majeur de la maladie. Cette conclusion repose en partie sur le succès de la thérapie avec les anticorps anti-CD20 (Rituximab), qui consiste à neutraliser les cellules B, dont les résultats sont un retard de la progression de la maladie, la préservation de la fonction des cellules bêta pancréatiques chez les souris NOD et chez les nouveaux patients diabétiques (Hu, Rodriguez-Pinto et al. 2007, Xiu, Wong et al. 2008, Pescovitz, Greenbaum et al. 2009). Il a été montré que les lymphocytes B présentent un faible répertoire des récepteurs suite à des anomalies au niveau des réarrangements génétiques de la chaîne *IgK* chez les patients atteints du DT1 et SLE (lupus érythémateux disséminé) ce qui suggère que ces défauts dans le répertoire des récepteurs contribuent à la susceptibilité pour le DT1 (Panigrahi, Goodman et al. 2008). Les défauts intrinsèques des lymphocytes B chez la NOD comme chez l'humain contribuent à la rupture de la tolérance immunitaire. Les études réalisées chez la souris NOD transgénique qui exprime la molécule Ig capable de reconnaître l'antigène HEL (hen egg lysozyme) ou l'insuline (Silveira, Dombrowsky et al. 2004), ont montré le rôle diabétogène des lymphocytes B. Par ailleurs, d'autres études ont attribué les anomalies associées aux mécanismes de tolérances chez les lymphocytes B aux *loci* de susceptibilités *idd5*, *idd9* et *idd11* (Cox, Stolp et al. 2010). Il a été reporté aussi que les lymphocytes B infiltrés au niveau du pancréas chez la NOD présentent des niveaux élevés de CMH I et II ainsi que ceux de CD80 et CD86 (Hussain and Delovitch 2005).

### III-3-2 Les Macrophages

Le rôle des macrophages dans la pathogenèse de DT1 a été suggéré dans les premières études par Hutchings et Cooke (Hutchings and Cooke 1990). Tout d'abord, ces cellules sont détectées dans les infiltrats d'îlots de jeunes souris NOD et l'inhibition de cette infiltration par les macrophages dans le pancréas, en inhibant son récepteur d'adhérence (CR3 ou CD11b/CD18), empêche le développement de DT1 (Hutchings, Rosen et al. 1990). Les études *in vitro* et *in vivo* chez les rongeurs ont démontré que les macrophages pouvaient jouer un rôle pathogène pour les cellules beta pancréatiques grâce à leur production de cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (Arnush, Heitmeier et al. 1998, Dahlen, Dawe et al. 1998). En effet, les macrophages des souris NOD produisent des niveaux plus élevés de cytokines inflammatoires d'IL-12, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  après stimulation avec CD40L ou LPS comparativement aux macrophages des souris NOR résistante au diabète (Alleva, Pavlovich et al. 2000, Uno, Imagawa et al. 2007). En outre, les macrophages de souris NOD sont moins efficaces pour phagocyter les cellules apoptotiques conduisant à une accumulation de ces dernière ce qui favorise les réponses inflammatoires (O'Brien, Huang et al. 2002). Par conséquent, ces cellules apoptotiques et leurs dérivées ont été suggérés initier le développement du DT1 chez la NOD (Trudeau, Dutz et al. 2000) et ceci éventuellement en activant d'autres cellules innées telles que les cellules dendritiques. En conclusion, ces études appuient le rôle pathogène des macrophages dans les phases d'initiation et du développement du DT1.



### **III-4 Les DCs et l'immunothérapie du diabète de type 1**

Les DCs jouent un rôle important dans l'induction et le maintien de l'auto-tolérance. En effet, les DCs permettent de maintenir l'équilibre entre une tolérance dominante qui empêcherait l'organisme de se défendre contre des pathogènes dangereux et une tolérance assez faible qui favoriserait le développement des maladies auto-immunes. Dans le thymus, les DCs sont impliquées dans la sélection négative des lymphocytes T autoréactifs en leur présentant les antigènes du soi (Matzinger and Guerder 1989). Par ailleurs, la tolérance immune périphérique est assurée par plusieurs mécanismes qui empêchent l'activation des lymphocytes T auto-réactifs. Les DCs jouent un rôle crucial dans le maintien de cette tolérance périphérique et dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire. En effet, la déplétion des DCs entraîne une pathologie auto-immune systémique mortelle caractérisée par une perte de poids, une splénomégalie et une augmentation du nombre de lymphocytes T de type Th 1 et Th 17 (Ohnmacht, Pullner et al. 2009). Les DCs par leur rôle critique dans l'induction et le maintien de la tolérance du système immunitaire sont la cible thérapeutique la plus attractive. L'hétérogénéité des DCs et la plasticité de leurs fonctions ont fait de cet objectif thérapeutique un défi, du fait qu'il existe un équilibre entre les fonctions immuno-stimulantes et immuno-régulatrices de ces cellules (Morel, Feili-Hariri et al. 2003, Morelli and Thomson 2007, Morel and Turner 2011, Morel 2013). Des études ont été réalisées dans notre laboratoire ont montré que le conditionnement des DCs au GM-CSF ou à la TSLP leur confère un phénotype tolérogène, ceci pourra constituer une voie potentielle d'immunothérapie chez la souris NOD (Gaudreau, Guindi et al. 2007, Besin, Gaudreau et al. 2008).

Il a été démontré, il y a plus de 20 ans, que les DCs peuvent être utilisés comme des agents

thérapeutiques pour prévenir le diabète chez la souris NOD (Clare-Salzler, Brooks et al. 1992). Dans cette étude, les DCs isolées du PLN (pancreatic lymph nod) de la souris NOD puis transférés à des souris NOD pré-diabétiques sont capables d'induire une protection contre le diabète alors que les DCs issues d'autres organes lymphatiques ne les sont pas. Ces résultats suggèrent le rôle protecteur des DCs organe-spécifique chargées avec des auto-antigènes issus de cellules beta pancréatiques dans la thérapie par transfert adoptif.

Contrairement aux DCs immunogènes, impliqués dans l'activation de l'immunité adaptative contre les agents pathogènes et les tumeurs envahissantes, les DCs dites tolérogènes (tolDC) jouent un rôle essentiel dans la tolérance centrale et périphérique aux auto-antigènes (Lutz 2012). Les tolDC présentent des auto-antigènes aux lymphocytes T avec une co-stimulation inadéquate et une expression de cytokines immunosuppresseurs, conduisent à l'inhibition des lymphocytes T auto-réactives et à l'induction de Tregs (Jonuleit, Schmitt et al. 2001, Thomson and Robbins 2008). Trois approches différentes ont été abordées pour la génération des tolDC à des fins thérapeutiques :

#### **III-4-1 Les modifications génétiques des DCs**

Il a été démontré que la transduction de DCs avec FasL favorise la tolérance immunitaire par déléation des lymphocytes T auto-réactives (Kim, Kim et al. 2002). Les DCs transduites par IDO ont été capables de baisser la production des cytokines pro-inflammatoires et de supprimer la présentation d'auto-antigène des cellules beta pancréatiques (Pallotta, Orabona et al. 2014). En outre, la transduction des DCs avec le microRNA-23b a induit les propriétés tolérogènes des DCs en inhibant la voie de signalisation Notch1/NF-kB (Zheng, Jiang et al. 2012).

Récemment, des clusters de micro-ARN incluant miR-17, miR-133b et miR-203 ont été détectés dans les tolDCs (Stumpfova, Hezova et al. 2014), suggérant que ces micro-ARN peuvent être utilisés dans la génération des tolDCs. Dans d'autres études les DCs transfectées avec le gène codant pour l'IL-4 ou l'IL-10 ont été décrites comme ayant des propriétés tolérogènes en induisant respectivement un environnement de type Th2 au niveau des PLN et augmente la survie de greffes d'îlots de Langerhans chez la souris (Feili-Hariri, Falkner et al. 2003, Creusot, Yaghoubi et al. 2008, Zhu, Qiu et al. 2008). Par ailleurs, il a été rapporté que l'augmentation de l'activation de la voie signalisation Wnt5a lors de la différenciation des DCs humains dérivées de monocytes (MoDC) réduit l'expression de l'IL-12p70 et de TNF- $\alpha$ , mais augmente le niveau d'IL-10, favorisant ainsi une différenciation des DC avec des propriétés tolérogènes (Valencia, Hernandez-Lopez et al. 2011).

### **III-4-2 Le conditionnement des DCs avec des molécules pharmacologiques**

Cette approche consiste à utiliser des molécules pharmacologiques telles que, cyclosporine A, la rapamycin, le dexaméthasone, la vitamine A, la vitamine D et d'autres cytokines et facteurs de croissances. Les DC ont montré un phénotype tolérogène lorsqu'ils ont été traités simultanément avec de l'IL-4 et de l'acide rétinoïque, ce qui offre un traitement potentiel pour les maladies auto-immunes (Zhu, Buttrick et al. 2013). D'autres études réalisées chez la souris, ont rapporté que les DC traitées par IL-10 et TGF- $\beta$ 1 sont capables d'acquérir des caractéristiques tolérogéniques (Yarilin, Duan et al. 2002, Boks, Kager-Groenland et al. 2012). De plus, les DC traitées à la rapamycine pourraient induire des Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> *in vivo* (Turnquist, Raimondi et al. 2007, Pothoven, Kheradmand et al. 2010). Les DC traités avec du Dexaméthasone et/ou de la vitamine D3 ont la capacité

d'inhiber l'activité Th17 d'une part et d'autre part d'améliorer l'activité des Tregs produisant de l'IL-10, et ainsi favoriser une tolérance immunitaire *in vivo* (Stoop, Robinson et al. 2011).

### **III-4-3 Contrôle de la maturation des DCs**

Cette stratégie se base sur le contrôle de l'état de la maturation des DCs. Le traitement des DCs par le TNF- $\alpha$  induit la différenciation des DC immatures (imDC) en DC semi-matures (seDC). Ces dernières expriment moins de molécules de co-stimulation et augmentent leur production de cytokines de type Th2 (Lim, Kang et al. 2009). La maturation des DC en présence de certains dérivés de parasites invasifs PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) leur permettent de produire des quantités importantes de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et induisent les Tregs à en produire (van der Kleij, Latz et al. 2002). La 1,25-Dihydroxyvitamine D3 a été décrite comme un agent tolérogène qui a un effet préférentiellement sur les DCs. Elle est capable d'induire un phénotype immature associé à une réduction de la sécrétion d'IL-12p70 et à l'augmentation de la production d'IL-10 (Adorini 2003). Enfin, l'activation des voies de signalisations dans le cas du conditionnement des DC au GM-CSF ou à la TSLP engendre un effet phénotypique et fonctionnels semblables, permettant d'induire l'expansion de Tregs et la promotion de la réponse immune de type Th2 avec à terme une protection contre le diabète chez les souris receveuses (Gaudreau, Guindi et al. 2007, Besin, Gaudreau et al. 2008).

Les tolDCs générées peuvent partager certaines caractéristiques, comme le profil phénotypique et la possibilité de supprimer les réponses auto-immunes. Ces tolDCs peuvent aussi différer selon le phénotype et les mécanismes de régulation qu'ils utilisent pour moduler le système immunitaire. Toutes ces études ont mis en évidence le potentiel préventif et

éventuellement thérapeutique de DCs autologues modifiées ou traitées, dans la protection contre le diabète et certaines maladies auto-immunes.

La génération de DCs tolérogènes caractérisés par leur signature transcriptionnelle ciblant les facteurs de transcription représente une stratégie de choix pour une immunothérapie du diabète de type 1. Dans ce contexte, cette thèse exposera une nouvelle approche basée sur l'implication des mécanismes intracellulaires capables de rétablir et de maintenir la fonction tolérogène des DCs de la souris NOD capables de prévenir l'activation des lymphocytes T diabétogènes. Cette étude pourrait représenter l'une des approches les plus efficaces dans l'immunothérapie du diabète de type 1 chez l'humain.

#### **IV- Le rôle de facteur de transcription STAT5 dans l'auto-immunité**

Nous avons signalé précédemment que les DCs dérivés de la moelle osseuse de la souris NOD conditionnées par GM-CSF ou TSLP ont acquis des propriétés tolérogènes et que le traitement des souris NOD avec le GM-CSF ou avec la TSLP protège contre le DT1 (Gaudreau, Guindi et al. 2007, Besin, Gaudreau et al. 2008). En effet, la principale voie de signalisation induite par le GM-CSF et la TSLP est la voie JAK/STAT5 (Paukku and Silvennoinen 2004, Rochman, Kashyap et al. 2010) dont le gène *Stat5* est associé à une région de susceptibilité dite le locus *idd4*. D'où l'intérêt d'étudier le rôle de la molécule *Stat5* comme facteur de transcription lié à cette voie de signalisation. Parmi les sept gènes codant pour les membres de la famille de STAT (Signal transducers and activators of transcription) chez les mammifères (*Stat1-6*), STAT5 est codé par deux gènes, *Stat5a* et *Stat5b*. Ces deux gènes ont une similarité au niveau de la séquence protéique de ~ 91% chez l'humain et la souris. STAT5A et STAT5B jouent un rôle vital dans les réponses cellulaires suite à

l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT5 par de nombreuses cytokines et facteurs de croissance incluant : la prolactine, les hormones de croissance, l'IL-2, l'IL-3, l'IL-5, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15, l'IL-21, le GM-CSF, l'érythropoïétine, la thrombopoïétin et la TSLP. De ce fait, le STAT5 joue un double-rôle de transduction du signal et de facteur de la transcription (Lin, Li et al. 2012). La transduction du signal par les STAT se fait à la suite de la liaison du ligand à son récepteur, suivie de l'oligomérisation (ou la dimérisation) de ce dernier. Le rapprochement des chaînes du récepteur provoque la transphosphorylation des JAKs associées sur des résidus tyrosine, qui à leur tour phosphorylent les résidus tyrosines de la partie cytoplasmique du récepteur. Cette étape permet la formation de sites d'ancrage des protéines STAT5 latentes dans le cytoplasme, qui y sont recrutées via leur domaine SH2 puis phosphorylées au niveau de leur résidu tyrosine par les JAKs (Y694 pour STAT5A et Y699 pour STAT5B) (O'Shea, Gadina et al. 2002). Une fois les protéines STAT5 phosphorylées, elles sont capables de former des homo- ou des hétéro-dimères via la liaison du résidu tyrosine phosphorylé au domaine SH2 d'une autre molécule STAT. La formation des dimères subissent une translocation vers le noyau où ils se lient à des séquences d'ADN spécifiques TTCN3GAA appelé motif GAS ( $\gamma$ -interferon Activated Sequence) de divers gènes cibles, entraînant soit leurs activation ou leurs répression (Levy and Darnell 2002). Le *Stat5a* et le *Stat5b* jouent un rôle important dans de nombreuses réponses physiologiques, y compris la différenciation, la prolifération, l'oncogenèse et le développement des cellules immunitaires (Nosaka, Kawashima et al. 1999, Walker, Nelson et al. 2013, Owen and Farrar 2017). Il est important de noter que le *Stat5a* et le *Stat5b* sont hautement homologues. Les études réalisées avec des souris déficientes en *Stat5a* et/ou *Stat5b* ont fourni des preuves convaincantes que les deux paralogues de *Stat5* possèdent des fonctions redondantes et

d'autre distinctes. En effet, les souris *Stat5a*<sup>-/-</sup> ont, un défaut important dans le développement des glandes mammaires et dans la réponse à la prolactine (Liu, Robinson et al. 1997), une prolifération réduite de cellules souches hématopoïétiques (Zhang, Fukuda et al. 2000) et une diminution de la commutation isotopique d'anticorps (Kagami, Nakajima et al. 2000), tandis que les souris *Stat5b*<sup>-/-</sup> présentent des déficits de la signalisation des hormones de croissance engendrant des défauts de développement des caractères sexuels secondaires et une stérilité chez les souris mâles (Udy, Towers et al. 1997), un défaut au niveau de la réponse à l'hormone de croissance (Paukku and Silvennoinen 2004), une lymphopénie plus prononcée et des défauts importants dans la prolifération lymphocytaire (Imada, Bloom et al. 1998, Moriggl, Topham et al. 1999). D'autre part, la suppression de *Stat5a* et *Stat5b* a des effets exclusivement liés à la délétion des deux paralogues, tels que le recrutement d'éosinophiles (Kagami, Nakajima et al. 2000), l'infertilité, l'anémie et la létalité périnatale (Teglund, McKay et al. 1998, Socolovsky, Fallon et al. 1999, Cui, Riedlinger et al. 2004). Les profils de liaison à l'ADN à l'échelle du génome montre que les sites cibles de STAT5A et STAT5B se chevauchent principalement, mais il existe également des sites qui peuvent être liés de manière différentielle, ce qui implique une spécificité des deux paralogues (Liao, Schones et al. 2008, Yamaji, Kang et al. 2013, Kanai, Seki et al. 2014). Par ailleurs, il a été documenté que des patients atteints de mutations germinales de STA5B présentent un ensemble d'anomalies cliniques, suggérant que STAT5A ne peut pas compenser certaines fonctions vitales suite à l'absence de STAT5B (Kanai, Seki et al. 2014). L'inactivation simultanée des gènes *Stat5a* et *Stat5b* a démontré le rôle critique des deux protéines dans la prolifération des cellules myéloïdes et le lymphoïdes. En effet, les cellules myéloïdes, les mastocytes, les lymphocytes T périphériques, les lymphocytes B et NK ont montré une prolifération altérée

et/ou une létalité prénatale chez les souris *Stat5*<sup>-/-</sup> (Malin, McManus et al. 2010).

Nombreuses les études qui ont montré que STAT5B est capable de se lier au promoteur et au premier intron de gène *Foxp3* ce qui suggère son implication dans sa régulation et en l'occurrence dans le développement et le maintien de l'homéostasie des lymphocytes Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> et de l'auto-tolérance (Antov, Yang et al. 2003, Burchill, Yang et al. 2007, Yao, Kanno et al. 2007, Kanai, Seki et al. 2014). STAT5 joue également un rôle dans la différenciation de la réponse immune Th2 et l'homéostasie des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Zhu, Cote-Sierra et al. 2003). Certaines études ont montré le rôle anti-apoptotique de STAT5B via la régulation de l'expression des membres de la famille Bcl-2 et des caspases (Feldman, Rosenthal et al. 1997, Debierre-Grockiego 2004). Une autre étude a montré que le répertoire génétiques de la souris NOD est essentiel à la lymphomagenèse médiée par STAT5B dans un modèle des souris qui surexprime STAT5B de type sauvage (Chen, Yi et al. 2013). Les souris *Stat5a*<sup>-/-</sup> *Stat5b*<sup>-/-</sup> d'une manière très semblable aux souris déficientes en IL-2; développent des pathologies auto-immunes en corrélation avec un nombre très réduit de Tregs. Cette réduction du nombre de Tregs est liée à l'accélération du processus apoptotique chez ces cellules en absence de STAT5 (Snow, Abraham et al. 2003). En outre, il a été rapporté que chez un patient qui n'avait aucune expression détectable de STAT5B suite à une mutation faux-sens dans le gène *Stat5b*, qu'il y a une diminution du nombre et de la fonction suppressive des Tregs (Cohen, Nadeau et al. 2006). Ces travaux prouvent que l'expression de STAT5B est critique pour la maintenance de la tolérance immunitaire *in vivo*.

Contrairement au rôle établi de STAT3 chez les DCs, la fonction de STAT5 dans les DCs reste à définir. Il a été démontré que l'activation de STAT5 par le GM-CSF inhibe le développement de pDCs. Cette inhibition a été associée à la répression de l'expression d'*Irf8*



(Esashi, Wang et al. 2008). Il a été rapporté également que *Stat5b* contrôle le développement et la différenciation des DCs (Bontkes, Ruizendaal et al. 2006). Une autre étude a démontré que la stimulation des DCs par la TSLP nécessite STAT5 pour induire une réponse de type Th2. Cette observation a été reliée à une baisse dans l'expression de molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) ainsi qu'une diminution de la production de la chimiokine CCL17 (Bell, Kitajima et al. 2013). Récemment, une étude basée sur un modèle de souris qui expriment faiblement STAT5A et/ou STAT5B pour éviter la mortalité périnatale et les anomalies exacerbées dans le cas de la suppression complète des deux paralogues. Cette étude a révélé que STAT5B est nécessaire pour la régulation des réponses effectrices des lymphocytes et le maintien de la tolérance immunitaire. De manière intéressante, l'analyse des sites de liaisons de STAT5 à l'ADN (chip-seq) ainsi que l'analyse de transcriptome (RNA-seq) ont montré clairement que STAT5B est plus abondant et contribue majoritairement à la régulation génique chez les cellules lymphoïdes (Villarino, Laurence et al. 2016)

## Rationnelle de recherche

Chez la souris NOD, les gènes codant pour STAT5A et STAT5B sont situés au niveau de chromosome 11, dans les gènes de susceptibilité au diabète (*idd4*) (Copeland, Gilbert et al. 1995, McDuffie 2000). Les résultats de séquençage ont révélé une mutation unique (L327M) dans le domaine de liaison à l'ADN de STAT5B, dont la conséquence est une faible liaison de STAT5B à l'ADN et une expression altérée des gènes cibles (Davoodi-Semiromi, Laloraya et al. 2004). Une autre étude a montré que cette faible liaison à l'ADN est liée aussi à un défaut au niveau de l'expression de la protéine CRKL qui est un co-facteur de liaison pour STAT5B (Laloraya, Davoodi-Semiromi et al. 2006). Ces observations liées à la voie de signalisation GM-CSF ont été rapportées dans les lymphocytes T et les macrophages chez les souris NOD. En effet, cette mutation induit une réduction quantitative de l'expression des gènes cibles importants à l'homéostasie et la fonction des Treg : IL-2R $\beta$ , Pim1 et Foxp3 (Davoodi-Semiromi, Laloraya et al. 2004, Murawski, Litherland et al. 2006). En outre, il a été rapporté que le dysfonctionnement de STAT5 peut contribuer à la dérégulation de la signalisation GM-CSF et à l'activation de l'expression génique comme celui de la PGS2 chez les monocytes et les macrophages des souris NOD (Litherland, Xie et al. 2005). Cependant nos connaissances sur le rôle de *Stat5b* dans la régulation des fonctions des DCs de souris NOD est moins bien connu. Il existe également une forme tronquée naturelle de Stat5b (ct-Stat5b), qui fonctionne comme un isoforme dominant négatif (DN) lorsqu'il est surexprimé dans des cellules T *in vitro* (Simoncic, Lee-Loy et al. 2002). Il a aussi été rapporté que le Stat5b tronqué était associé au locus *idd4* chez les souris NOD (Davoodi-Semiromi, McDuffie et al. 2007). Il est intéressant de noter que la forme tronquée de ct-pSTAT5B représente la forme majoritaire dans les splénocytes chez la NOD mais pas chez C57BL/6. Cette forme serait à l'origine de

l'altération de la fonction suppressive des cellules Tregs (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) (Davoodi-Semiromi, McDuffie et al. 2007).

La régulation du programme transcriptionnelle des DCs est décisif dans le contrôle de leur signature tolérogénique ou immunogénique. STAT5 joue un rôle déterminant dans la régulation de l'expression de certains gènes codant pour les cytokines, leurs récepteurs ainsi que d'autres molécules de signalisation impliquées dans la régulation du système immunitaire comme certains facteurs de transcription. Cette régulation est due au fait que STAT5 est capable de reconnaître de façon spécifique la séquence TTCN<sub>3</sub>GAA  $\gamma$ -interferon-activated sequence (GAS) par sa forme dimérique tandis que l'interaction entre les formes dimériques via le domaine N-terminal forment des STAT5 tétramérique capables de se lier à plus qu'un motif GAS (Leonard and O'Shea 1998, Levy and Marie 2012, Lin, Li et al. 2012). Récemment, Line JX et al. ont montré clairement que les formes dimériques et tétramériques de STAT5 ont des fonctions spécifiques. Dans cette étude, il a été montré que les souris déficientes en la forme STAT5 tétramérique présentent une réduction de nombre des cellules NK, Tregs et une dérégulation de la voie de signalisation d'IL-2 (Lin, Li et al. 2012). Par ailleurs, les études réalisées dans notre laboratoire ont montré que le conditionnement des DC au GM-CSF ou à la TSLP constitue une voie potentielle d'immunothérapie chez la souris NOD (Gaudreau, Guindi et al. 2007, Besin, Gaudreau et al. 2008). Ceci pourra être une conséquence de l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT5. Ces données suggèrent un rôle central de STAT5B dans la régulation du système immunitaire (Kanai, Seki et al. 2014).

Le contrôle de la fonction tolérogène de DCs afin de maintenir la suppression des réponses des lymphocytes T auto-réactives représente le principal défi immunologique pour le

traitement du diabète de type 1. Les mécanismes de signalisation moléculaire sous-jacents à la régulation des caractéristiques des DCs immunogènes et tolérogènes commencent à émerger et sont encore mal définis. De plus, le ciblage des mécanismes intracellulaires qui contrôlent les fonctions tolérogène de DC afin d'empêcher l'activation des lymphocytes T diabétogènes, pourrait représenter une approche plus efficace pour l'intervention immunitaire dans le diabète de type 1.

Dans le but d'élucider les fonctions spécifiques de STAT5B chez les DCs dans les conditions physiologiques et pathologiques nous avons généré des souris NOD transgéniques (NOD CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>.) exprimant de façon constitutive la forme active de STAT5B de souris C57BL/6 spécifiquement dans les DCs. Ce modèle est un outil puissant pour étudier le rôle des cellules immunitaires exprimant *Stat5b-CA* dans la pathogenèse du diabète auto-immun. Le rôle de STAT5B dans les fonctions des DCs chez les souris NOD reste à définir. Dans ce travail, nous avons investigué le rôle de *Stat5b-CA* dans la génération des DCs tolérogènes qui sont des régulateurs clés de la tolérance immunitaire et qui participent à la maintenance de la tolérance centrale et périphérique aux auto-antigènes permettant une protection contre le diabète.

## **Chapitre II**

# **Constitutively Active Stat5b Signaling Confers Tolerogenic Functions to Dendritic Cells of NOD mice and Halts Diabetes Progression**

**Constitutively Active Stat5b Signaling Confers Tolerogenic Functions to Dendritic Cells of NOD mice and Halts Diabetes Progression.**

**Zerif Echarki<sup>1</sup>, Aida Maalem<sup>1</sup>, Simon Gaudreau<sup>1</sup>, Chantal Guindi<sup>1</sup>, Muhammad Ramzan<sup>1</sup>, Steeve V eroneau<sup>1</sup>, Denis Gris<sup>1</sup>, Jana Stankova<sup>1</sup>, Marek Rola-Pleszczynski<sup>1</sup>, Walid Mourad<sup>2</sup>, Gilles Dupuis<sup>1</sup> and Abdelaziz Amrani<sup>1†</sup>**

1. Department of Pediatric, Immunology Division, Centre de Recherche Clinique CHUS, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke,
2. Centre de Recherche-Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM), Montréal

**†Address correspondence and reprint requests to** Dr. Abdelaziz Amrani, Department of Pediatrics, Immunology Division, Centre de Recherche Clinique CHUS, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, 3001, 12<sup>th</sup> Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4. Telephone: (819) 346-1110 ext 14854. FAX: (819) 564-5215. E-mail: [Abdelaziz.Amrani@USherbrooke.ca](mailto:Abdelaziz.Amrani@USherbrooke.ca).

**Running title:** Stat5b-CA.DCs protect NOD mice from diabetes.

**Abbreviations used:** DCs, Dendritic cells; Stat5, Signal Transducer and Activator of Transcription 5; Tregs, regulatory T cells; NOD, nonobese diabetic; T1D, type 1 diabetes.

## ABSTRACT

Defects in dendritic cells (DCs) development and function lead to autoimmune disorders. Autoimmune diabetes in humans and NOD mice results from breakdown of self-tolerance, ending in T cell-mediated  $\beta$ -cell destruction. DCs dysfunction in NOD mice results in part from a defect in the JAK-STAT5 signaling pathway associated with the *idd4* susceptibility locus. The involvement of Stat5b in DCs tolerogenic functions remains unknown. We generated transgenic mice (NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>) expressing a constitutively active form of the Stat5b gene (Stat5b-CA) under control of CD11c promoter. All NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice were protected against diabetes. Protection was associated with increased pool and suppressive function of Tregs, promotion of Th2 and Tc2 immune response and decreased percentage of CD8<sup>+</sup> T cells. Splenic DCs of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice acquired a mature phenotype, promoted and induced better conversion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> T cells into Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells) than DCs of NOD mice. Stat5b-CA.DC educated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells delay diabetes onset whereas Stat5b-CA.DC educated Tregs blocked ongoing diabetes in 8-10 weeks old NOD recipient mice. Importantly, injection of Stat5b.CA.DC to 8-10-week old NOD mice halted diabetes progression and educated their splenocytes to lose their diabetogenic potential when transferred to NOD.SCID mice. This is the first report that an active form of Stat5b restored DCs tolerogenic functions that re-educated Tregs to re-establish and to sustain long-term protective immune response against diabetes in NOD mice.

## 1. Introduction

Dendritic cells (DCs) are professional antigen-presenting cells that play a central role in T-cell immune response and homeostasis (Banchereau, Briere et al. 2000). DCs contribute to peripheral tolerance by promoting homeostasis of peripheral regulatory T cells (Tregs) and/or by induction of T cell unresponsiveness. These tolerogenic properties are mediated essentially by their functional state. It has been reported that the absence of activation of immature DCs (iDCs) or low activation state of semimature DCs induce and maintain peripheral T cell tolerance. In contrast, hyperactivated mature DCs efficiently induce the development of effector T cell immunity (Lanzavecchia and Sallusto 2001). Type 1 diabetes (T1D) is a multigenic disease resulting from a breakdown of self-tolerance that leads to T cell-mediated pancreatic  $\beta$ -cell destruction (Todd and Wicker 2001, Anderson and Bluestone 2005, Driver, Serreze et al. 2011). Several lines of evidence have indicated that inappropriate activation of DCs and defects in the number and function of tolerogenic DCs and Tregs contribute to the breakdown of self-tolerance leading to T1D pathogenesis in humans and in the non obese diabetic (NOD) mouse model (Boudaly, Morin et al. 2002, Besin, Gaudreau et al. 2008, Lee, Lee et al. 2010, Morel and Turner 2011).

We have reported that bone marrow-derived DCs of NOD mice conditioned with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) acquired the signature of tolerogenic DCs and that treatment of NOD mice with GM-CSF or TSLP or, TSLP-treated DCs protected from diabetes by increasing and maintaining IL-10-producing tolerogenic DCs and Tregs (Gaudreau, Guindi et al. 2007, Besin, Gaudreau et al. 2008, Guindi, Menard et al. 2012). GM-CSF and TSLP are known to signal through the JAK1/2 pathway to activate the STAT transcription factor (Paukku and



Silvennoinen 2004, Rochman, Kashyap et al. 2010). Stat5 consists of two proteins, Stat5a and Stat5b that are encoded by two distinct genes and that share 95% homology in humans and mice (Mui, Wakao et al. 1995). Upon tyrosine phosphorylation, pStat5a and pStat5b form homo or heterodimers which translocate to the nucleus where they bind to specific DNA sequences in the promoter region of various genes, resulting in specific gene activation or repression (Levy and Darnell 2002). Stat5 plays important roles in many responses including orchestration of immunoregulation and immune cell development (Shuai and Liu 2003) such as development and maintenance of Treg homeostasis and function (Antov, Yang et al. 2003, Cohen, Nadeau et al. 2006, Yao, Kanno et al. 2007, Burchill, Yang et al. 2008), Th2 differentiation and CD8<sup>+</sup> T cell homeostasis (Zhu, Cote-Sierra et al. 2003). Stat5<sup>-/-</sup> mice displayed impaired proliferation and/or survival of myeloid cells, mast cells, peripheral T cells, NK and B cells (Kieslinger, Woldman et al. 2000, Sexl, Piekorz et al. 2000, Socolovsky, Nam et al. 2001). In addition, Stat5<sup>-/-</sup> mice failed to generate Tregs (Burchill, Goetz et al. 2003, Yao, Kanno et al. 2007) whereas mice expressing constitutively active form of Stat5b (Stat5b-CA) restricted to T and B cell had a marked increase in Treg number (Burchill, Goetz et al. 2003, Burchill, Yang et al. 2008). Conditional Stat5 deficiency in hematopoietic compartment leads to increased number of plasmacytoid (pDCs) and decreased number of conventional cDCs (Esashi, Wang et al. 2008, Li, Yang et al. 2012). DC-specific depletion of Stat5 has underlined the importance of Stat5 activation in DCs during TSLP-induced Th2 immune response (Bell, Kitajima et al. 2013). In autoimmune diabetes, genes encoding Stat5a and Stat5b map to chromosome 11 within the insulin-dependent diabetes interval 4 (*idd4*) (Copeland, Gilbert et al. 1995, McDuffie 2000). It has been reported that NOD.B6.*Idd4* murine congenic strains carrying the B6-*idd4* locus showed a significant

reduction of diabetes incidence (Grattan, Mi et al. 2002). Furthermore, sequencing studies have revealed a unique single mutation within the binding domain of S Stat5b DNA and, consequently, Stat5b had weak DNA binding and reduced expression of downstream genes (Davoodi-Semiromi, Laloraya et al. 2004). The weak DNA binding of Stat5b in the GM-CSF signaling pathway has been reported in T cells and macrophages in NOD mice. However, the role of Stat5b in homeostasis and tolerogenic function of DC in autoimmune diabetes remains largely unknown.

To investigate the role of Stat5b-CA in tolerogenic function of DCs that are crucial to induce and maintain protective immune response against diabetes, we have generated DC-specific transgenic NOD mice that expressed a constitutively active form of Stat5b specifically in DCs (called NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice here). We found that NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice were protected from diabetes. The protection was associated with increased Treg pool and a drastic decrease of CD8<sup>+</sup> T cells in secondary lymphoid organs. Stat5b-CA-expressing DCs (Stat5b-CA.DCs) acquired a mature phenotype, produced increased amounts of TGF $\beta$  but lesser quantities of IL-12p70, induced antigen specific Treg differentiation, enhanced Treg suppressive activity and promoted Th2/Tc2 immune deviation. We also demonstrated that Stat5b-CA.DCs educated Tregs were crucial to inhibit ongoing diabetes. Importantly, a single injection of CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> DCs to 8 - 10-week old NOD mice protected from diabetes and educated their splenocytes to lose their diabetogenic potential when transferred to NOD.SCID mice. To the best of our knowledge, our study is the first to highlight the important role of the Stat5b transcription factor in DCs tolerogenic function in autoimmune diabetes.

## **2. Research design and methods**

### **2.1. Mice and diabetes monitoring**

NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice were generated as follows. Stat5b-CA cDNA obtained from pMX-puro-Stat5b-CA (a gift from Dr. T Kitamura, University of Tokyo, Japan) was subcloned into pMYc-pIRES2-EGFP (Clontech [Laboratories Inc.](#), Mountain View, CA) to generate the Stat5b-CA-IRES2-EGFP construct. Stat5b-CA-IRES2-EGFP cDNA was subcloned into a vector containing the CD11c promoter (pCD11c) (a gift from Dr. K Karjalainen, Nanyang Technological University, Singapore). The transgene DNA sequence pCD11c-Stat5b-CA-IRES2-EGFP was separated from the vector, purified, sequenced and used to generate transgenic NOD mice at the JDRF Center of Immunological Tolerance in T1D facilities (Harvard Medical School, Boston, MA).

NOD, NOD-BDC2.5, and NOD.SCID mice were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). NOD-BDC2.5-Foxp3-GFP mice were obtained by backcrossing C57BL/6-Foxp3-GFP with NOD mice for more than 10 generations. 8.3-NOD mice obtained from Dr. P. Santamaria (University of Calgary, AB) have been described (Verdaguer, Schmidt et al. 1997). Mice were housed under pathogen-free conditions and the University of Sherbrooke institutional animal care committee all experiments. Animals were monitored for diabetes by the urine glucose test Uristix (Bayer, Minneapolis, MN) and blood glucose with an Advantage Accu-Check glucometer (Roche Diagnostics, IN) as described (Besin, Gaudreau et al. 2008).

### **2.2. Antibodies and flow cytometry**

mAb against, CD4 (RMA-5), CD25 (3C7), CD11c (clone HL3), CD11b (clone M1/70), B220

(clone RA3-6B2), I-A<sup>d</sup> (clone 39-10-8), CD80 (clone 16-10A1), CD86 (clone GL1) and CD40 (clone 1C10), CD8 $\alpha$  (clone 53-6.7), CD3 (clone 145-2C11), V $\beta$  8.1, 8.2 TCR (clone MR5-2) and streptavidin-PerCP were from BD Biosciences (Mountain View, CA). PCy5-anti-CD11c (clone N418), PE-anti-CD8a (clone 53-6.7), Alexa488- and PeCy7-anti-CD25 (clone PC61.5), APC-anti-CD4 (clone GK1.5), PE-anti-Foxp3 (clone FJK-16s), PE-anti-CTLA4 (clone UC10-4B9), and CD28 (clone 37.51) antibodies were from eBioscience (San Diego, CA). Anti-Stat5b and anti-pStat5 mAbs were from Cell Signaling technology (Beverly, MA). Splenic DCs were left unstimulated or stimulated with LPS (1  $\mu$ g/ml, 48h), washed with PBS and stained with anti-CD11c-PE in combination with PE-Cy5 anti-CD80, PE-Cy5 anti-CD86, Biotin anti-MHC II or PE-Cy5 anti CD40. Conjugated matched isotypes (Armenian hamster IgG2, Rat IgG2a, or mouse BALB/c IgG3) were used as negative controls. For intracellular staining, Tregs were fixed, permeabilized and stained with anti-CD4, anti-CD25 and anti-Foxp3 Abs using Foxp3 Staining Kit (eBioscience). Cells were analyzed on a FACSCalibur or a FACSCanto instrument (BD Biosciences, CA) and FACS data were analyzed using the CellQuest Pro (BD Biosciences) or FlowJo (Tree Star, Ashland, OR) software.

### **2.3. Dendritic and T cell isolation**

Splenic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and DCs were purified using Ab-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) as described (Gaudreau et al., 2007). Splenic CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Tregs and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>GFP<sup>-</sup> T cells from NOD-BDC2.5-Foxp3-GFP mice were purified using a FACSAria III cell sorter (BD Biosciences). Tregs and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells were purified from spleens of NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice using a Treg isolation

kit (Miltenyi Biotec). Bone marrow-derived DCs were generated as described (Guindi, Menard et al. 2012). Purity was > 95% for DCs and > 98% for T cells.

#### **2.4. Western Blots**

Splenic DCs were purified from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice, whole lysates prepared, proteins extracted and Western Blots carried out as described (Guindi, Menard et al. 2012).

#### **2.5. Proliferation assays**

CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were incubated ( $2 \times 10^4$  cells/well) with NRP-A7 or TUM peptide-pulsed (1 µg/ml) (Biochemistry Institute, Lausanne University, Switzerland) irradiated-splenic DCs ( $5 \times 10^3$  cells/well) for 3 days at 37°C. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells ( $2 \times 10^4$  cells/well) from DBC2.5 NOD mice were incubated with BDC2.5 mimotope 1040-31 peptide-pulsed (0.5 µg/ml) (Cederlane, Burlington, ON) irradiated-splenic DCs ( $5 \times 10^3$  cells/well) for 3 days at 37°C. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice were incubated with anti-CD3 (5 µg/ml) and anti-CD28 (2 µg/ml) mAbs for 3 days at 37°C. Supernatants were collected 48 h later for cytokine quantification using ELISA assays (R&D Systems, Minneapolis, MN). For proliferations essays, cells were pulsed with [<sup>3</sup>H] thymidine (1 µCi /well) during the last 18 h of cultures, harvested and radioactivity counted.

#### **2.6. Treg assays**

For Treg suppression assays, unstimulated or stimulated (with anti-CD3 (5 µg/ml) and IL-2 (20 U/ml) for 24 h) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells from NOD and from NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice were cultured with 8.3-CD8<sup>+</sup> T cells at 1:1, 2:1 and 4:1 ratios in the

presence of 1  $\mu\text{g/mL}$  of peptide-pulsed irradiated NOD APCs ( $1 \times 10^5$  splenocytes/well) and proliferation was determined as described (Gaudreau, Guindi et al. 2007). For Treg differentiation assays,  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{GFP}^-$  T-cells ( $2 \times 10^5$  cells/well) from NOD-BDC2.5-Foxp3-GFP mice were cultured in the presence of peptide-pulsed splenic DCs ( $5 \times 10^4$  cells) of NOD or NOD. $\text{CD11c}^{\text{Stat5b-CA}}$  mice. On days 4 and 7, converted Tregs were stained with anti-CD4, anti-CD25 and analyzed for GFP expression by FACS.

## **2. 7. T cell and dendritic cell adoptive transfer experiments**

Total splenic cells or  $\text{CD11c}^+$ -depleted splenic cells were prepared as described (Gaudreau, Guindi et al. 2007) and intravenously injected in 4 to 6 week-old NOD.SCID mice ( $7 \times 10^6$  cells/mouse). In DC transfer experiments, 8 - 10 week-old female NOD mice received one intravenous injection of splenic DCs ( $6 \times 10^6$  cells/mouse). In the case of Treg transfer experiments,  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  and Tregs were purified from splenocytes of NOD and NOD. $\text{CD11c}^{\text{Stat5b-CA}}$  mice and  $2 \times 10^6$  cells were injected intravenously to 8 -10 weeks old NOD mice. Recipient mice were monitored for diabetes starting 7 days post-transfer.

## **2.8. Histopathology**

Pancreata were fixed in formalin, embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin-eosin. Islet insulinitis was scored as described (Gaudreau, Guindi et al. 2007)

## **2.9. Statistical analyses**

Data were analyzed using the GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad, San Diego, CA) and are shown as the mean  $\pm$  SEM. Student's *t*-test,  $\chi^2$  tests, one-way ANOVA or two-way ANOVA tests were used to calculate *P* values.

### 3. Results

#### 3.1. NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice are protected from diabetes

To investigate the role of Stat5b activation in DC tolerogenic function, we generated transgenic NOD mice (NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>) in which constitutively active Stat5b and GFP were separately expressed under the control of the CD11c promoter. In these mice, the Stat5b transgene harbors histidine-to-arginine and serine-to-phenylalanine substitutions at positions 298 and 715, respectively. These substitutions generate constitutively active Stat5b (Stat5b-CA) (Onishi, Nosaka et al. 1998) whereas expression of GFP allows identification of a cohort of CD11c<sup>+</sup> cells that express Stat5b-CA. Transgene expression was assessed by analysis of GFP expression in the spleen of transgenic and littermate control mice. Results showed that CD11c<sup>+</sup> cells of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice expressed GFP whereas littermate controls did not (**Fig. 1A**). Western blot analysis further confirmed expression of constitutively active Stat5b in DCs of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice but barely detectable expression in DCs of control mice (**Fig. 1B**). The influence of Stat5b-CA expression in DCs on disease onset in NOD mice was assessed by monitoring diabetes and insulinitis development over time. Results showed that all NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice (n = 150) were protected from diabetes whereas more than 80% of littermate controls developed diabetes starting at 14 weeks of age (**Fig. 1C**). Histopathology of pancreas showed that lymphocytic infiltration was absent in > 85% of islets of 5 to 25 weeks old NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice and that 60% of islets were healthy at 36 weeks of age (**Fig. 1D and 1E**). In contrast, littermate controls displayed typical progression of islet inflammation, with both peri-insulinitis and invasive insulinitis (**Fig. 1D and 1E**). These results were taken as evidence that the expression of a constitutively active form of Stat5b in DCs protected NOD mice from diabetes development.

### 3.2. Stat5b-CA-expressing DCs phenotype and cytokine production

We first investigated whether constitutively active Stat5b-CA expression affected DCs expansion *in vivo*. Results showed similar percentage of splenic CD11c<sup>+</sup> cells (**Fig. 1A**) and significantly increased ( $p < 0.05$ ) numbers of splenic CD11c<sup>+</sup> DCs of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice as compared to control mice (**Fig. 2A**). Next, we examine the impact of Stat5b-CA on DC maturation and cytokine production. FACS analysis showed that non-stimulated splenic Stat5b-CA.DCs and control DCs expressed similar levels of MHC-II, CD80, CD86, and CD40 (**Fig. 2B and 2C**). Following LPS stimulation, Stat5b-CA.DCs exhibited higher levels of CD80 and CD86 than control DCs, whereas levels of MHC-II and CD40 were increased to the same extent (**Fig. 2B and 2C**). Quantification of cytokines released by DCs showed that, as previously reported (Gaudreau, Guindi et al. 2007), splenic DCs produced low or barely detectable similar amounts of IL-12p70 (**Fig. 2D**). However, IL-12p70 production by LPS-stimulated bone marrow-derived Stat5b-CA.DCs was significantly reduced when compared to bone marrow-derived control DCs (**Fig. 2E**). LPS-stimulated splenic Stat5b-CA.DCs produced less IL-10 as compared to control DCs (**Fig. 2F**). Importantly, un-stimulated and stimulated splenic Stat5b-CA.DCs secreted significantly ( $p < 0.01$ ) higher amounts of TGF $\beta$  than control DCs (**Fig. 2G**). These results showed that LPS-stimulated DCs of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice adopted a fully mature DC phenotype characterized with enhanced expression of CD80 and CD86. However, in contrast to fully mature LPS-stimulated DCs of NOD mice, Stat5b-CA.DCs reduced IL-12p70 and IL-10 production and increased TGF $\beta$  production.



### **3.3. Stat5b-CA.DCs induce antigen-specific autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells to produce Th2 cytokines and convert CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> T cells into Tregs.**

We next analyzed the capacity of Stat5b-CA.DCs to induce antigen-specific proliferation and the differentiation of autoreactive BDC2.5 CD4<sup>+</sup> T cells. Results showed the absence of differences in antigen-specific proliferation of BDC2.5 CD4<sup>+</sup> T cells in the presence of Stat5b-CA.DCs or control DCs (**Fig. 3A**). Quantification of cytokine production under these conditions showed similar amounts of IFN $\gamma$  or IL-2 secreted by BDC2.5 CD4<sup>+</sup> T cells primed with Stat5b-CA.DCs or control DCs (**Figs. 3B and 3C**). However, antigen-pulsed Stat5b-CA.DCs induced BDC2.5 CD4<sup>+</sup> T cells to produce significantly more IL-10 ( $p < 0.05$ ) and IL-4 ( $p < 0.01$ ) than BDC2.5 CD4<sup>+</sup> T cells cultured in the presence of control DCs (**Figs. 3D and 3E**). The finding that Stat5b-CA.DCs produced large amounts of TGF $\beta$  that is known to be involved in Treg differentiation, prompted us to examine the role of Stat5b-CA.DCs in *de novo* differentiation of naïve CD4<sup>+</sup> T cells into Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells). To this end, antigen-specific naïve splenic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> T cells purified from NOD.BDC2.5-Foxp3<sup>GFP</sup> reporter mice were cocultured with antigen-pulsed Stat5b-CA.DCs or with control DCs and analyzed for the presence of Tregs. Data showed that, after 7 days, peptide-pulsed Stat5b-CA.DCs induced significantly higher conversion of naïve BDC2.5 CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> T cells into BDC2.5 CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells as compared to control ( $4.41 \pm 0.18$  vs.  $3.47 \pm 1.65$   $p > 0.05$  at day 4,  $16.18 \pm 1.51$  vs.  $7.26 \pm 0.57$   $p < 0.01$  at day 7) (**Fig. 3F and 3G**). These results were consistent with the interpretation that Stat5b-CA.DCs acquired tolerogenic properties that induced reprogramming of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells to differentiate into non-inflammatory Th2 cytokines and enhanced their capacity to induce conversion of naïve CD4<sup>+</sup> T cell into Tregs *in vitro*.

### 3.4. Th2/Tc2 polarity of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>

The bulk of the *in vitro* data reported above and the observation of diabetes resistance in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice prompted us to examine the impact of Stat5b-CA.DCs on homeostasis and immune response of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Analysis of peripheral lymphoid organs showed significant increases in the overall cellularity of the spleen, PLN and MLN of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice as compared to control mice (**Fig. 4A**). Analysis for the presence of T cell subsets showed that the proportion of CD4<sup>+</sup> T cells was not changed (**Fig. 4B**) whereas their number was increased in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice (**Fig. 4C**). FACS analysis showed that the proportion of CD8<sup>+</sup> T cells was reduced by approximately 50% in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice compared to control (**Fig. 4D**) whereas absolute numbers of CD8<sup>+</sup> T cells were similar in both strain of mice (**Fig. 4E**). In addition to the influence of Tregs, immune deviation toward Th2 and/or Tc2 also plays an important role in the protection against diabetes development in NOD mice. The possibility that *in vivo* Stat5b-CA.DC-educated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were polarized into Th2 and/or Tc2 immune response was assessed by quantitating cytokine production by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> and control NOD mice after activation with a combination of anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. Results showed that CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice exhibited a higher proliferative response (**Fig. 4F and G**) and secreted markedly greater amounts of IL-10 and IL-4 than control mice (**Fig. 4H and I**). IL-4 and IL-10 were spontaneously (without *in vitro* stimulation) produced respectively by naive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and by CD8<sup>+</sup> T cells of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> whereas they were undetectable in unstimulated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells of control mice (**Fig. 4H and I**). These results suggested that *in vivo* Stat5b-CA.DC-

educated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells acquired the signature of Th2/Tc2 anti-inflammatory cytokine-producing cells.

### **3.5. Increased size of the pool and suppressive function of Tregs in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice**

The findings that Stat5b-CA.DCs induced Treg differentiation *in vitro* led us to investigate the *in vivo* impact of Stat5b-CA.DCs on Treg development and function. Detailed analysis of CD4<sup>+</sup> T cell subsets in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice showed increased percentages of Tregs in the spleen, PLN and MLN of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice as compared to control mice (**Fig. 5A and 5B**). When activated *in vitro*, Tregs of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> produced significantly higher amounts of IL-10 compared to activated-Tregs of control mice (**Fig. 5C**). Activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice produced also significantly more IL-10 and IL-4 than activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells of control mice (**Fig. 5C and 5D**), thereby confirming the Th2 polarity of Stat5b-CA.DC-educated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells. We next compared the suppressive functions of Tregs from NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> and control mice. Tregs and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cell suppressive activities were determined by suppression of antigen-specific proliferation of highly diabetogenic 8.3-CD8<sup>+</sup> T cells *in vitro*. Results showed that prior activation Stat5b-CA.DC-educated Tregs from NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice strongly inhibited the proliferation of 8.3-CD8<sup>+</sup> T cells, whereas non-activated Tregs of control mice and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> from both strains of mice had no suppressive activity (**Fig. 5E**). When activated with anti-CD3 and IL-2, Tregs of both groups of mice exhibited similar inhibitory effect of 8.3-CD8<sup>+</sup> T cell proliferation (**Fig. 5F**). Interestingly, activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells from NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice also suppressed, at low extent, 8.3-CD8<sup>+</sup> T cell proliferation (**Fig.**

**5F).** Overall, these data suggested that Stat5b-CA.DCs promoted Th2/Tc2 immune response, increased the size of the Treg pool and improved Treg suppressive activity in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice.

### **3.6. Stat5b-CA.DCs-educated splenocytes of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> do not transfer diabetes to NOD.SCID mice.**

The findings that the pool and the suppressive function of Tregs were enhanced in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice and that CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells acquired Th2/Tc2 immune response led us to investigate the tolerogenic function of Stat5b-CA.DC-educated T cells *in vivo* using adoptive transfer experiments. NOD.SCID mice were transfused with 8 x 10<sup>6</sup> spleen cells from NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> or control mice and recipients were monitored for diabetes development. Results showed that splenocytes of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice did not transfer diabetes into NOD.SCID mice (0/14 for 3 months post-transfer) (**Fig. 6A**). In marked contrast, recipients transfused with splenocytes of littermate control mice developed diabetes (10/10 within 4-8 weeks after transfer) (**Fig. 6A**). To further determine whether Stat5b-CA.DCs-educated splenic cells acquired intrinsic tolerogenic properties or required the continuous presence of Stat5-CA.DCs to sustain their *in vivo* tolerogenic function, splenocytes were depleted of CD11c<sup>+</sup> DCs before adoptive transfer experiments. Interestingly, CD11c<sup>+</sup> DC-depleted splenocytes of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice remained able (period extending more than 15 weeks after transfer) to provide long-term protection against diabetes (0/13) (**Fig. 6B**). Of significance, NOD.SCID recipients of CD11c<sup>+</sup> DC-depleted splenocytes of control NOD mice developed diabetes (10/10 within 5 - 8 weeks after transfer) (**Fig. 6B**). These results strongly suggested that Stat5b-CA.DCs had instructed T cells in

NOD mice to switch their potential differentiation toward an intrinsic tolerogenic function that actively contributed to prevent diabetes development.

### **3.7. Stat5b-CA.DC educated Tregs are major suppressors of ongoing diabetes in NOD mice.**

To determine if Th2 like T cells or Tregs of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice were responsible for diabetes protection, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells and Tregs were purified from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice and injected intravenously to 8-10 weeks old NOD mice. Recipient mice were monitored for diabetes up to 26 weeks post transfer. Results showed that all (8/8) NOD recipients transfused with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells of NOD mice became diabetic and that 5 of 7 of recipients of Tregs from NOD mice developed diabetes (**Fig. 7**). Transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells from NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice significantly delayed diabetes onset as compared to CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> cells ( $25.48 \pm 2.06$  vs.  $4.16 \pm 1.19$   $p < 0.0001$ ) or Tregs ( $25.48 \pm 2.06$  vs.  $9.28 \pm 2.18$   $p < 0.005$ ) from NOD mice whereas all (7/7) NOD recipients injected with Tregs from NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice did not develop diabetes (**Fig. 7**). These data indicated that Tregs educated in a Stat5b-CA.DC environment acquired efficient suppressive function that was crucial for diabetes resistance in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice.

### **3.8. Stat5b-CA.DC treatment halts spontaneously occurring diabetes**

We then asked whether the therapeutic potential of Stat5b-CA.DCs would halt and improve the condition of ongoing diabetes in NOD mice. To answer this question, 8 - 10 week-old NOD mice were given a single intravenous injection of Stat5b-CA.DCs or control DCs (6 x

$10^6$  cells/mouse in each case) and recipients monitored for diabetes. Results showed that all (8/8) of NOD mice that had received Stat5b-CA.DCs were protected from diabetes over a period extending to more than 32 weeks whereas all (6/6) NOD mice injected with control DCs developed diabetes (**Fig. 8A**). Results of transfer experiments using CD11c<sup>+</sup> DC-depleted splenocytes (**Fig. 6B**) showed that Stat5b-CA.DCs-educated T cells had acquired an intrinsic tolerogenic potential and, consequently did not transfer diabetes in NOD.*SCID* recipients after DC depletion. These observations were extended in a series of experiments where spleen cells of diabetes-resistant Stat5b-CA.DC-treated or control DC-treated NOD mice were adoptively transferred to NOD.*SCID* recipients, which were followed for diabetes development. Results showed that all (10/10) recipient mice injected with splenocytes obtained from control DC-injected NOD mice developed diabetes starting 5 weeks after transfer (**Fig. 8B**). Of importance, transfusion of recipient mice with splenocytes obtained from Stat5b-CA.DC-injected NOD mice did not result in diabetes development (0/13) (**Fig. 8B**). These data strongly supported the interpretation that Stat5b-CA.DCs improved ongoing diabetes as a result of education of pro-diabetogenic T cells to acquire an intrinsic tolerogenic function that was crucial to halt ongoing diabetes and to maintain a long-term protection against diabetes development in NOD mice.

#### 4. Discussion

This study is, to the best of our knowledge, the first report that transgenic NOD mice (NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice) expressing a tissue-specific constitutively active form of Stat5b

were protected from diabetes. DCs of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice secreted TGF $\beta$ , induced immune deviation of antigen-specific diabetogenic BDC-2.5 T cells toward IL-4- and IL-10-producing Th2 cells, as well as their conversion into Tregs *in vitro*. Stat5-CA.DCs of transgenic NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice educated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells to differentiate to non-inflammatory Th2 and Tc2 cells respectively, increased the pool of Tregs and enhanced their suppressive function. In addition, the continuous presence of Stat5-CA.DCs was not required for T cells of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice to sustain their anti-diabetogenic potential. Of importance, a single systemic injection of Stat5-CA.DCs or Stat5b-CA educated Tregs halted ongoing diabetes in recipient NOD mice.

Studies from other laboratories have established that alterations of the Stat5b pathway represent a key molecular event that leads to impaired immune tolerance in NOD mice (Davoodi-Semiromi, Laloraya et al. 2004, Laloraya, Davoodi-Semiromi et al. 2006, Davoodi-Semiromi, McDuffie et al. 2007). In addition, recent reports have shown that over-expression of the C57BL/6 Stat5b gene in NOD mice increased Treg population and reduced diabetes incidence, although these mice developed T cell lymphoma over a period of time (Jin, Purohit et al. 2012, Chen, Yi et al. 2013). In these studies, 85% of Stat5b transgenic NOD mice generated by backcrossing Stat5b transgenic C57BL/6 mice on a NOD background for seven generations were protected from diabetes, whereas only 44% of littermate controls became diabetic. These observations raised the possibility that some C57BL/6 protective genes may contribute to diabetes resistance. Although these observations showed the effect of the Stat5b transgene on Treg subset, they did not rule out the potential role of Stat5b expressing-DCs in mediating protection against diabetes. In this connection, NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice generated on a NOD background represents a powerful tool to investigate how DCs, a key immune-

regulating cells, expressing an active form of Stat5b impacts immunopathogenesis of T1D. These mice did not show any abnormalities during development, behavior and gross anatomical differences. In fact, NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice gained normal weight and, feeding and drinking habits were similar to wild type mice. These mice were also fertile and their progenitors developed normally. Here, we found that all NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice were prevented from diabetes development. These observations led to the conclusion that defects in the Stat5b pathway activation in DCs could be overcome by a constitutively active form of Stat5b, which re-established a tolerogenic immune response in NOD mice. Previous studies from a number of laboratories have shown that ectopic Stat5b-CA expression induces homeostatic expansion of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells and Tregs (Burchill, Goetz et al. 2003, Burchill, Yang et al. 2008). We have extended these observations to DCs and found that the number of splenic DCs was increased in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice, suggesting that Stat5b signaling promoted DC expansion.

It is generally accepted that, in addition to DCs lineage, their status of maturation determines their immunogenic or tolerogenic function (Cools, Ponsaerts et al. 2007). We have previously reported that semimature tolerogenic DCs induced Treg differentiation and were critical for protection from diabetes of TSLP- and GM-CSF-treated NOD mice (Gaudreau, Guindi et al. 2007, Besin, Gaudreau et al. 2008). Aside from the tolerogenic potential of immature DCs and semi-mature DCs, mature DCs have also been shown to be tolerogenic (Ezzelarab and Thomson 2011). We and others have shown that TSLP upregulated DCs markers without stimulating their production of inflammatory cytokines (Liu, Soumelis et al. 2007, Besin, Gaudreau et al. 2008). Stat5 has recently been shown to be required for TSLP-dependent DC maturation, including upregulation of the costimulatory molecules CD80, CD86 and CD40



(Bell, Kitajima et al. 2013). In agreement with these observations, DCs of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice exhibited the characteristics of mature DCs, namely expression of high levels of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86, secretion of high levels of TGF $\beta$  and low levels of IL-12p70. Secretion of a large amounts of TGF $\beta$  concomitant with low production of IL-12p70 by Stat5b-CA-expressing DCs are a hallmark of tolerogenic mature DCs. Tolerogenic DCs have been shown to be highly efficient in activating the suppressor function of Tregs (Pletinckx, Dohler et al. 2011, Lutz 2012) which are crucial in inhibition of autoreactive T cell effector function (Besin, Gaudreau et al. 2008, Davidson and Shevach 2011). In this connection, it has been reported that TGF $\beta$ -producing tolerogenic DCs induced conversion of naïve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells into Tregs (Morelli and Thomson 2007, Turner, Kane et al. 2009). It has also been shown that TGF- $\beta$  was required for mature bone marrow-derived DCs to promote Treg differentiation *in vitro* (Yamazaki, Bonito et al. 2007). Data reported here showed that Stat5b-CA.DCs induced an efficient antigen-specific Treg differentiation *in vitro*. This observation was further supported by the findings of increased pool of Tregs in the spleen, PLN and MLN of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice and their enhanced suppressive function. It is possible that the elevated levels of expression of CD80 and CD86 on Stat5b-CA.DCs contributed to sustain and expand newly converted Tregs since the interaction of CD80/CD86 with CD28 on Tregs is a major requirement for the peripheral homeostasis of Tregs (Salomon, Lenschow et al. 2000, Tang, Henriksen et al. 2003). This interpretation is supported by findings from another group who has reported that CD80/CD86 expressed on DCs was crucial for maintenance of the peripheral Treg pool (Bar-On, Birnberg et al. 2011) and by the fact that mature antigen-bearing DCs expressing high costimulatory markers induced Treg expansion *in vitro* and *in vivo* (Yamazaki, Iyoda et al. 2003, Fehervari and

Sakaguchi 2004). Diabetes protection and anatomical islet preservation were accompanied by a significant reduction in the proportion of CD8<sup>+</sup> T cells in spleen, PLN and MLN of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice. Although, the mechanisms of reduction in the proportion of CD8<sup>+</sup> T cell in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice was not investigated in our studies, it is tempting to speculate that enhanced Treg number and suppressive activity may reduce effector CD8<sup>+</sup> T cell proliferation and promote a harmless Tc1 response. The findings that activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice exert low suppress activity suggest that they contain a suppressive T cell subset that contributes to immune tolerance in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice. Interestingly, a fraction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells expressed inhibitory molecules such as CTLA-4 and PD1 (unpublished data). In support of this possibility, it has been shown that a fraction of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells expressed CTLA4 and PD1 that contributes to immune tolerance by inhibiting the development of colitis (Totsuka, Kanai et al. 2005). In agreement with this interpretation, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice were able to delay diabetes onset upon transfer in 8 -10 weeks old NOD mice.

In addition to the involvement of tolerogenic DCs in Treg differentiation, it has been reported that DCs induce tolerance by initiating a Th2/Tc2 immune response and by suppressing the inflammatory activity of Th1/Tc1 cells (Clare-Salzler, Brooks et al. 1992, Menges, Rossner et al. 2002) that are contributors to diabetes development in NOD mice. We found that Stat5b-CA.DC polarized antigen-specific diabetogenic BDC.2.5 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells to produce elevated amounts of Th2 cytokines such as IL-10 and IL-4 without affecting the production of IFN $\gamma$  and IL-2. These data are congruent with findings that CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice produced high amounts of Th2/Tc2 (IL-10 and IL-4) cytokines. These results are also in line with recent studies that showed that DCs require Stat5 activation

for the development and promotion of Th2 responses in the lung (Bell, Kitajima et al. 2013).

A key questions in relationship to type 1 diabetes was whether the tolerogenic functions gained by T cells under the influence of Stat5b-CA.DCs were able to control the development of diabetes and whether therapeutic treatment with Stat5b-CA.DCs could represent an effective strategy to halt ongoing diabetes. Studies from other laboratories have suggested that the pathology resulting from autoimmune diseases is regulated by the function and ratio of regulatory to non-regulatory T cells (Gregori, Giarratana et al. 2003, Korn, Reddy et al. 2007, D'Alise, Auyeung et al. 2008). Moreover, Tregs require cognate interactions with tolerogenic DCs for their activation *in vivo* (Cederbom, Hall et al. 2000, Yamazaki, Iyoda et al. 2003). Adoptive transfer experiments reported here showed that non-depleted and DC-depleted splenocytes of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice did not transfer diabetes into NOD.SCID mice. This observation suggested that NOD splenic cells educated in a Stat5b-CA.DCs environment acquired intrinsic tolerogenic properties. In agreement with this interpretation, we found that Stat5b-CA.DCs educated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells delayed diabetes onset and Tregs blunted ongoing diabetes in preclinical diabetic NOD mice. The relatively long preclinical period characterized by insulinitis that follows the onset of islet autoimmunity in NOD mice offers the opportunity to investigate the efficiency of DCs therapy to halt ongoing diabetes. We tested this possibility by injecting 8 - 10-week old NOD recipients with DCs from control or Stat5b-CA.DCs NOD mice. Importantly, transfer of Stat5b-CA.DCs protected all NOD mice recipients from diabetes and splenic cells of protected mice had lost their diabetogenic potential but acquired a tolerogenic function since they were no longer able to transfer diabetes in NOD.SCID mice. These *in vivo* data strengthened the central hypothesis that restoring Stat5b activation in DCs of NOD mice reprogrammed their immune system to

acquire a long term tolerance characterized by reoriented immune deviation toward Th2/Tc2 responses and increased number and suppressive function of Tregs known to be major contributors to thwart the breakdown of self tolerance in autoimmune diabetes.

Cell therapy in human, especially with dendritic cells, it is becoming a clinical reality in the treatment of autoimmune diseases. In DC therapy in type 1 diabetes, the critical factor will be to maintain the DCs in a functionally tolerogenic state when transferred to diabetic patient. Taking into consideration our present observations that expression of active form of STAT5b in DCs of T1D mouse model enhance Treg suppressive function and protect from diabetes; it also offers possible therapeutic targets in T1D. Therefore identifying a critical transcription factor target such as Stat5b that play critical role in restoring and maintaining DC tolerogenic function can be targeted in monocytes derived DCs from diabetic patient and used as DCs vaccine safe approach to reverse diabetes and/or to prevent islet transplantation in diabetic patients.

The molecular detail of the mechanisms by which Stat5b-CA affects DC transcriptional network in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice is not known. Stat5 modulates the activity of several transcription factors involved in DCs development and function such as, NF- $\kappa$ B, IRF8, IRF4, RelB and c/EBP $\beta$ . Recent reports have indicated that Stat5 influences DCs subset development and function through regulation of IRF4, IRF8 and RelB (Esashi, Wang et al. 2008, Sebastian, Serra et al. 2008). Although analysis of Stat5b-CA.DC transcriptional network and DCs subsets was not directly addressed in the present study, initial DC analysis revealed that Stat5b-CA.DCs expressed high levels of IRF4 and low levels of IRF8 (Echarki et al., unpublished data). Of interest, pDCs subset was dramatically extinguished in NOD.CD11c<sup>Stat5b</sup> mice (unpublished data). These observations are in line with previous reports that showed that Stat5 signaling inhibits pDCs development by suppressing the

transcription factor IRF8 (Esashi, Wang et al. 2008). Furthermore, a recent report has shown that the transcription factor IRF4 drives DCs to promote Th2 differentiation by directly activating *il-10* and *il-33 genes* (Williams, Tjota et al. 2013). Investigations of the detailed mechanisms that govern DCs subset development and functional diversity are currently under investigations in our laboratories.

In conclusion, our findings definitively addressed the ongoing question regarding the essential role of Stat5b in tolerogenic DCs function in autoimmune diabetes. Our data present conclusive evidence that a DC-restricted expression of a constitutively active form of Stat5b instructs T cells to acquire tolerogenic properties that restore and maintain long-term self-tolerance and protection from diabetes.

Conflict-of-interest disclosure

The authors declare no competing financial interests.

## REFERENCES

- [1] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ *et al.* Immunobiology of dendritic cells. Annual review of immunology, 2000;18:767-811.
- [2] Lanzavecchia A, Sallusto F. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. Current opinion in immunology, 2001;13:291-8.
- [3] Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. Annual review of immunology, 2005;23:447-85.
- [4] 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.
- [5] Todd JA, Wicker LS. Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models. Immunity, 2001;15:387-95.
- [6] Besin G, Gaudreau S, Menard M, Guindi C, Dupuis G, Amrani A. Thymic stromal lymphopoietin and thymic stromal lymphopoietin-conditioned dendritic cells induce regulatory T-cell differentiation and protection of NOD mice against diabetes. Diabetes, 2008;57:2107-17.
- [7] Boudaly S, Morin J, Berthier R, Marche P, Boitard C. Altered dendritic cells (DC) might be responsible for regulatory T cell imbalance and autoimmunity in nonobese diabetic (NOD) mice. Eur Cytokine Netw, 2002;13:29-37.
- [8] Lee MH, Lee WH, Todorov I, Liu CP. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells prevent type 1 diabetes preceded by dendritic cell-dominant invasive insulinitis by affecting chemotaxis and local invasiveness of dendritic cells. Journal of immunology, 2010;185:2493-501.
- [9] Morel PA, Turner MS. Dendritic cells and the maintenance of self-tolerance. Immunol Res, 2011;50:124-9.
- [10] Gaudreau S, Guindi C, Menard M, Besin G, Dupuis G, Amrani A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents diabetes development in NOD mice by inducing tolerogenic dendritic cells that sustain the suppressive function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. Journal of immunology, 2007;179:3638-47.
- [11] Guindi C, Menard M, Cloutier A, Gaudreau S, Besin G, Larivee P *et al.* Differential role of NF-kappaB, ERK1/2 and AP-1 in modulating the immunoregulatory functions of bone marrow-derived dendritic cells from NOD mice. Cellular immunology, 2012;272:259-68.
- [12] Paukku K, Silvennoinen O. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. Cytokine Growth Factor Rev, 2004;15:435-55.
- [13] Rochman Y, Kashyap M, Robinson GW, Sakamoto K, Gomez-Rodriguez J, Wagner KU *et al.* Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010;107:19455-60.

- [14] Mui AL, Wakao H, O'Farrell AM, Harada N, Miyajima A. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *EMBO J*, 1995;14:1166-75.
- [15] Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002;3:651-62.
- [16] Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2003;3:900-11.
- [17] Antov A, Yang L, Vig M, Baltimore D, Van Parijs L. Essential role for STAT5 signaling in CD25+CD4+ regulatory T cell homeostasis and the maintenance of self-tolerance. *Journal of immunology*, 2003;171:3435-41.
- [18] Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio CW *et al*. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity*, 2008;28:112-21.
- [19] Cohen AC, Nadeau KC, Tu W, Hwa V, Dionis K, Bezrodnik L *et al*. Cutting edge: Decreased accumulation and regulatory function of CD4+ CD25(high) T cells in human STAT5b deficiency. *Journal of immunology*, 2006;177:2770-4.
- [20] Yao Z, Kanno Y, Kerenyi M, Stephens G, Durant L, Watford WT *et al*. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood*, 2007;109:4368-75.
- [21] Zhu J, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity*, 2003;19:739-48.
- [22] Kieslinger M, Woldman I, Moriggl R, Hofmann J, Marine JC, Ihle JN *et al*. Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation. *Genes Dev*, 2000;14:232-44.
- [23] Sexl V, Piekorz R, Moriggl R, Rohrer J, Brown MP, Bunting KD *et al*. Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5. *Blood*, 2000;96:2277-83.
- [24] Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C, Lodish HF. Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood*, 2001;98:3261-73.
- [25] Burchill MA, Goetz CA, Prlic M, O'Neil JJ, Harmon IR, Bensinger SJ *et al*. Distinct effects of STAT5 activation on CD4+ and CD8+ T cell homeostasis: development of CD4+CD25+ regulatory T cells versus CD8+ memory T cells. *Journal of immunology*, 2003;171:5853-64.
- [26] Esashi E, Wang YH, Perng O, Qin XF, Liu YJ, Watowich SS. The signal transducer STAT5 inhibits plasmacytoid dendritic cell development by suppressing transcription factor IRF8. *Immunity*, 2008;28:509-20.
- [27] Li HS, Yang CY, Nallaparaju KC, Zhang H, Liu YJ, Goldrath AW *et al*. The signal transducers STAT5 and STAT3 control expression of Id2 and E2-2 during dendritic cell development. *Blood*, 2012;120:4363-73.
- [28] Bell BD, Kitajima M, Larson RP, Stoklasek TA, Dang K, Sakamoto K *et al*. The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses. *Nat Immunol*, 2013;14:364-71.

- [29] Copeland NG, Gilbert DJ, Schindler C, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. *et al.* Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics*, 1995;29:225-8.
- [30] McDuffie M. Derivation of diabetes-resistant congenic lines from the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol*, 2000;96:119-30.
- [31] Grattan M, Mi QS, Meagher C, Delovitch TL. Congenic mapping of the diabetogenic locus *Idd4* to a 5.2-cM region of chromosome 11 in NOD mice: identification of two potential candidate subloci. *Diabetes*, 2002;51:215-23.
- [32] Davoodi-Semiromi A, Laloraya M, Kumar GP, Purohit S, Jha RK, She JX. A mutant *Stat5b* with weaker DNA binding affinity defines a key defective pathway in nonobese diabetic mice. *The Journal of biological chemistry*, 2004;279:11553-61.
- [33] Verdaguer J, Schmidt D, Amrani A, Anderson B, Averill N, Santamaria P. Spontaneous autoimmune diabetes in monoclonal T cell nonobese diabetic mice. *The Journal of experimental medicine*, 1997;186:1663-76.
- [34] Onishi M, Nosaka T, Misawa K, Mui AL, Gorman D, McMahon M *et al.* Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Molecular and cellular biology*, 1998;18:3871-9.
- [35] Davoodi-Semiromi A, McDuffie M, Litherland S, Clare-Salzler M. Truncated pStat5B is associated with the *Idd4* locus in NOD mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007;356:655-61.
- [36] Laloraya M, Davoodi-Semiromi A, Kumar GP, McDuffie M, She JX. Impaired *Crkl* expression contributes to the defective DNA binding of *Stat5b* in nonobese diabetic mice. *Diabetes*, 2006;55:734-41.
- [37] Chen B, Yi B, Mao R, Liu H, Wang J, Sharma A *et al.* Enhanced T cell lymphoma in NOD.*Stat5b* transgenic mice is caused by hyperactivation of *Stat5b* in CD8+ thymocytes. *PLoS One*, 2013;8:e56600.
- [38] Jin Y, Purohit S, Chen X, Yi B, She JX. Over-expression of *Stat5b* confers protection against diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mice via up-regulation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 2012;424:669-74.
- [39] Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *Journal of leukocyte biology*, 2007;82:1365-74.
- [40] Ezzelarab M, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation. *Seminars in immunology*, 2011;23:252-63.
- [41] Liu YJ, Soumelis V, Watanabe N, Ito T, Wang YH, Malefyt Rde W *et al.* TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annual review of immunology*, 2007;25:193-219.
- [42] Lutz MB. Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction. *Frontiers in immunology*, 2012;3:123.
- [43] Pletinckx K, Dohler A, Pavlovic V, Lutz MB. Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. *Frontiers in immunology*, 2011;2:39.
- [44] Davidson TS, Shevach EM. Polyclonal Treg cells modulate T effector cell trafficking. *European journal of immunology*, 2011;41:2862-70.



- [45] Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol*, 2007;7:610-21.
- [46] Turner MS, Kane LP, Morel PA. Dominant role of antigen dose in CD4+Foxp3+ regulatory T cell induction and expansion. *Journal of immunology*, 2009;183:4895-903.
- [47] Yamazaki S, Bonito AJ, Spisek R, Dhodapkar M, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood*, 2007;110:4293-302.
- [48] Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 2000;12:431-40.
- [49] Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Ye J, Subudhi SK *et al.* Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of immunology*, 2003;171:3348-52.
- [50] Bar-On L, Birnberg T, Kim KW, Jung S. Dendritic cell-restricted CD80/86 deficiency results in peripheral regulatory T-cell reduction but is not associated with lymphocyte hyperactivation. *European journal of immunology*, 2011;41:291-8.
- [51] Fehervari Z, Sakaguchi S. Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Current opinion in immunology*, 2004;16:203-8.
- [52] Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K *et al.* Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 2003;198:235-47.
- [53] Totsuka T, Kanai T, Makita S, Fujii R, Nemoto Y, Oshima S *et al.* Regulation of murine chronic colitis by CD4+CD25- programmed death-1+ T cells. *European journal of immunology*, 2005;35:1773-85.
- [54] Clare-Salzler MJ, Brooks J, Chai A, Van Herle K, Anderson C. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by dendritic cell transfer. *The Journal of clinical investigation*, 1992;90:741-8.
- [55] Menges M, Rossner S, Voigtlander C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C *et al.* Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 2002;195:15-21.
- [56] D'Alise AM, Auyeung V, Feuerer M, Nishio J, Fontenot J, Benoist C *et al.* The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008;105:19857-62.
- [57] Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Adorini L. Dynamics of pathogenic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development. *Journal of immunology*, 2003;171:4040-7.
- [58] Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR *et al.* Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nature medicine*, 2007;13:423-31.

- [59] Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *European journal of immunology*, 2000;30:1538-43.
- [60] Sebastian C, Serra M, Yeramian A, Serrat N, Lloberas J, Celada A. Deacetylase activity is required for STAT5-dependent GM-CSF functional activity in macrophages and differentiation to dendritic cells. *Journal of immunology*, 2008;180:5898-906.
- [61] Williams JW, Tjota MY, Clay BS, Vander Lugt B, Bandukwala HS, Hrusch CL *et al.* Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nature communications*, 2013;4:2990.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> transgenic mice are protected from diabetes. A:** Splenocytes of NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice were labeled with anti-CD11c mAbs and analyzed for the presence of GFP by flow cytometry. The percentages of splenic DCs are shown as mean  $\pm$  SEM. Data are representative of at least 10 independent experiments. **B:** Immunoblots of pStat5 and total Stat5b protein expression in splenic DCs from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice. Actin levels are shown as loading controls. Data are representative of two independent experiments. **C:** Incidence of diabetes in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> (n = 173) and NOD (n = 150) mice. **D:** Insulinitis score in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> and NOD mice. A minimum of 30 islets per mouse were scored after heamatoxylin/eosin (H/E) staining (n = 5 mice per group). **E:** Representative H/E staining of pancreatic islet tissue of 5, 10, 15, 22, 26 and 30 week-old NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> and NOD mice.

**Figure 2. Phenotype and cytokine production by splenic DCs of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice. A:** Numbers of splenic DCs in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> and NOD mice. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 13 mice/group). **B and C:** Purified splenic DCs ( $1 \times 10^5$  cells/well) from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice were cultured for 2 days in the presence (+ LPS) or absence (- LPS) of LPS (1  $\mu$ g/ml). DCs were washed, labeled with anti-CD11c mAbs in combination with anti-I-A<sup>d</sup> (MHC class II), anti-CD80, anti-CD86 or anti-CD40 mAbs (bold lines) or with appropriate isotype control (IgG) antibody (dashed thin lines) and analyzed by FACS (**B**). Mean fluorescence intensities (MFI) values of FACS profiles are shown (**C**). Data are representative of four independent experiments. **D and E:** Quantification of IL-12p70 in

the supernatants of splenic DCs and BM.DCs, respectively. **F and G:** Quantification of IL-10 and TGF $\beta$  in the supernatants of splenic DCs. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. The asterisks (\*) indicate significance for  $p < 0.05$  (\*) and  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

**Figure 3. NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> splenic DCs induce antigen specific Th2 differentiation and Treg conversion.** **A:** Proliferative response of BDC2.5-CD4<sup>+</sup> T cells ( $4 \times 10^4$  cells/well) cultured for 72 h with splenic DCs ( $1 \times 10^4$  cells/well) of NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice pulsed with various concentrations of BDC2.5 AV10 peptide. **B to E:** Amounts of IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 and IL-4 in supernatants after 48 h of culture. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. Statistical significance is shown with asterisks for  $p < 0.05$  (\*) and  $p < 0.01$  (\*\*). **F and G:** Cells from spleen of BDC2.5-Foxp3-GFP TCR-Transgenic reporter mice were sorted as CD25<sup>-</sup>GFP<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (**F** left panel) and cultured ( $1 \times 10^5$  cells/well) with splenic NOD.DCs ( $2.5 \times 10^4$  cells/well) or Stat5b-CA.DCs that have been pulsed with BDC2.5 peptide (0.5  $\mu$ g/ml). After 4 and 7 days, cells were stained with anti-CD4 and anti-CD25 Abs and analyzed for GFP expression by flow cytometry. Flow cytometry plots depict a representative experiment, with mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. Significance is indicated by asterisks (\*\*) for  $p < 0.01$ .

**Figure 4. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice produce high levels of immunoregulatory Th2/Tc2 cytokines.** **A:** Total cell numbers in the spleen, PLN and MLN from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice. **B and C:** Proportions of CD4<sup>+</sup> T cells as determined by flow cytometry and total CD4<sup>+</sup> T cell numbers of in the spleen, MLN and PLN

from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice (n = 10 mice/group). **D and E:** Proportions of CD8<sup>+</sup> T cells as determined by flow cytometry and total CD8<sup>+</sup> T cell numbers in the spleen, MLN and PLN from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice. (n = 10 mice/group). **F to I:** Proliferation and amounts of IL-10 and IL-4 in supernatants of anti-CD3 (5 µg/ml) and anti-CD28 (2 µg/ml) stimulated CD4<sup>+</sup> (**F and H**) and CD8<sup>+</sup> (**G and I**) T cells from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice. Results are shown as the mean ± SEM of 3 independent experiments. Significance is indicated by asterisks (\*) for  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) and  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

**Figure 5. Increased pool and suppressive function of Tregs from NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice.** **A:** Representative FACS data of Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells) among CD4<sup>+</sup> T cells in different lymphoid organs of NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice. **B:** Percentage of Tregs among CD4<sup>+</sup> T cells in different lymphoid organs of NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice (10 to 12 mice/group). **C and D:** Production of IL-10 and IL-4 by anti-CD3 (5 µg/ml) and IL-2 (20 U/ml) activated Tregs and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice. **E and F:** Tregs and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells purified from spleens of NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice were left untreated (**E**) or activated with a combination of anti-CD3 (5 µg/ml) and IL-2 (20 U/ml) for 48 h (**F**) and co-cultured in the presence of diabetogenic 8.3-CD8<sup>+</sup> T cells at ratios 1:1, 2:1 and 4:1 in the presence of NRP-A7-pulsed irradiated APC from NOD mice. After 3 day of co-culture, 8.3-CD8<sup>+</sup> T cell proliferation was measured. Data represent the mean ± SEM of 3 independent experiments. Significance is indicated by asterisks (\*) for  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) and  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

**Figure 6. Splenocytes and DC of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice prevent the development of diabetes.**

**A:** Diabetes incidence in NOD.SCID recipients intravenously injected with splenocytes ( $8 \times 10^6$  cells/mouse) from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice. **B:** Diabetes incidence in NOD.SCID recipients intravenously injected with CD11c-depleted splenocytes ( $8 \times 10^6$  cells/mouse) from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice.

**Figure 7. Stat5b-CA educated Tregs are major suppressor of ongoing diabetes in NOD mice.**

Diabetes development in 8-10 weeks old NOD mice that had been injected intravenously with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells or Tregs ( $2 \times 10^6$  cells/mouse) purified from NOD or NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice.

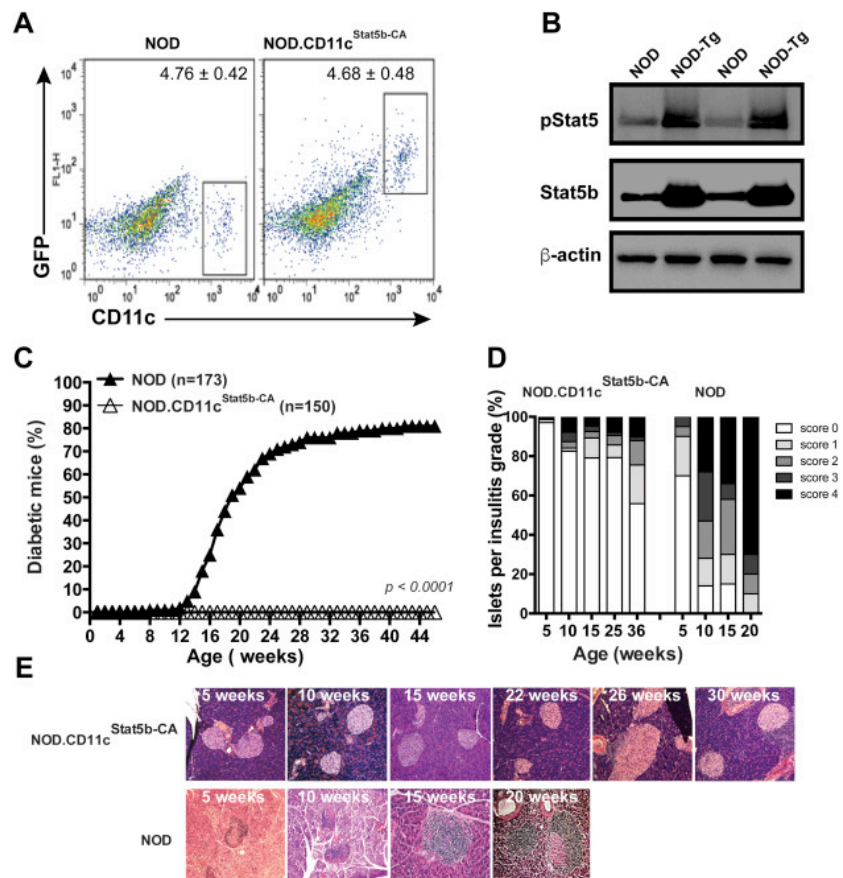
**Figure 8. Stat5b-CA.DC therapy halts ongoing diabetes in NOD mice.**

**A:** Diabetes onset in 8-10 weeks old NOD mice intravenously injected with splenic DCs ( $6 \times 10^6$  cells/mouse) purified from NOD or NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice. **B:** Diabetes onset in NOD.SCID recipient *i.v.* injected with splenocytes ( $8 \times 10^6$  cells/mouse) of NOD.DC-treated or Stat5b-CA.DC-treated NOD mice.

## **Acknowledgments**

We thank Dr. T. Kitamura for providing the STAT5b-CA cDNA and Dr. K. Karjalainen for providing pCD11c cDNA. We also acknowledge the collaboration of Dr. Martin Richter and Ms Isabelle Marois for assistance in flow cytometry and cell sorting experiments. This work was supported by a grant-in-aid from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) to AA (MOP-300762).

Figure 1.





**Figure. 2.**

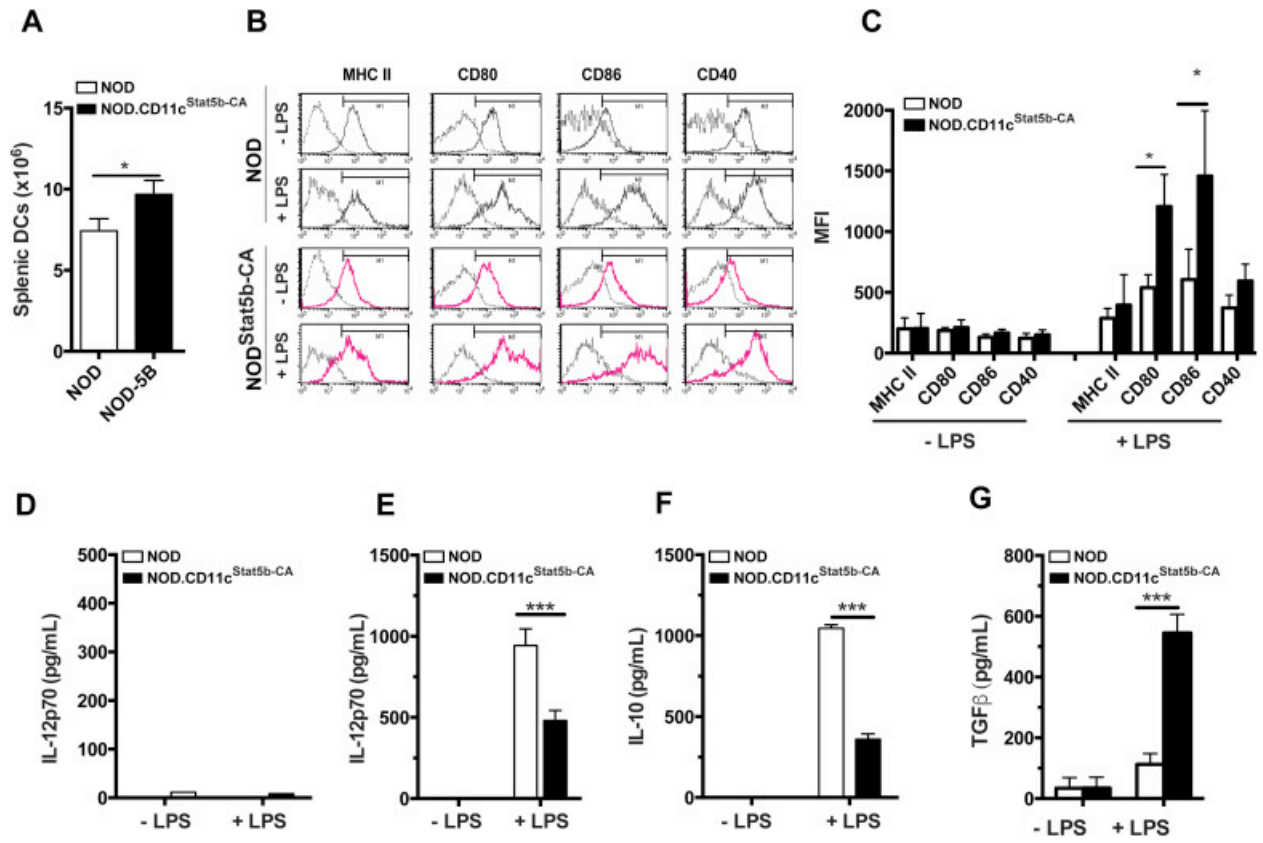
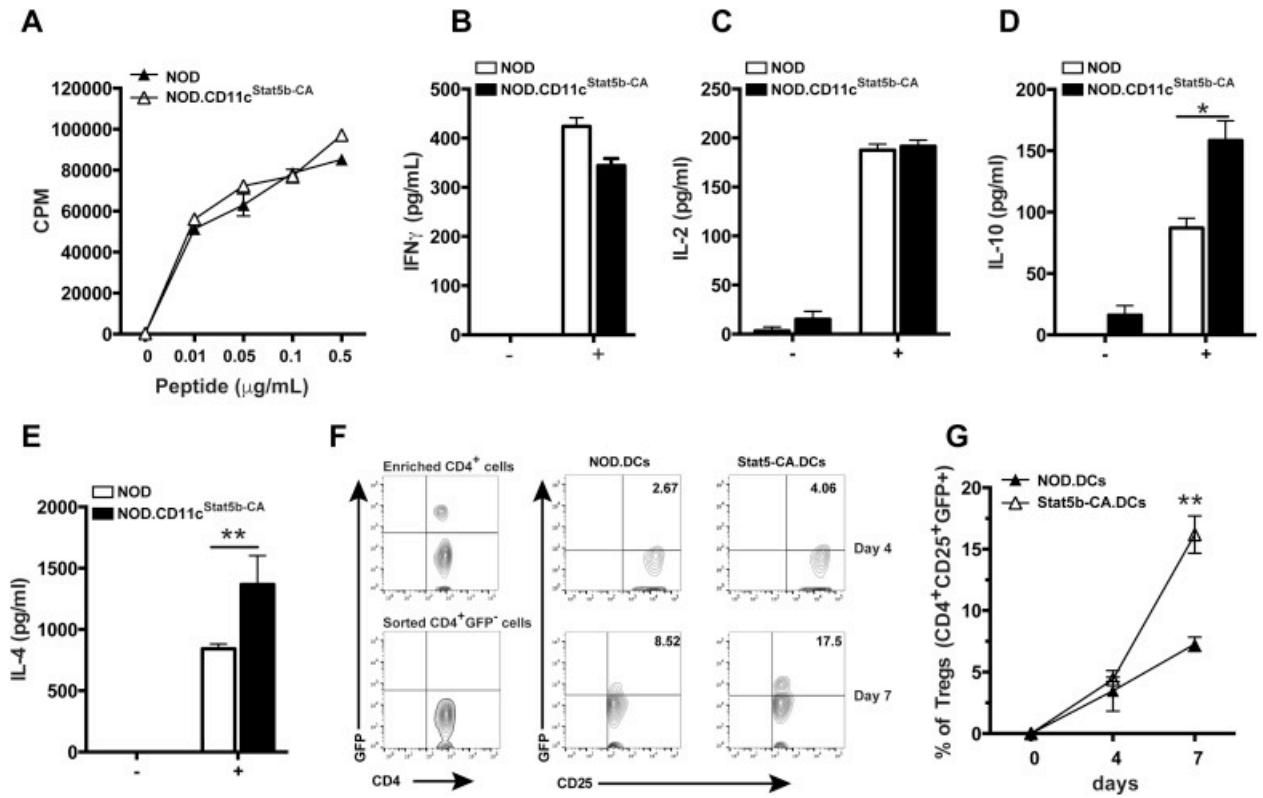


Figure 3.



**Figure 4.**

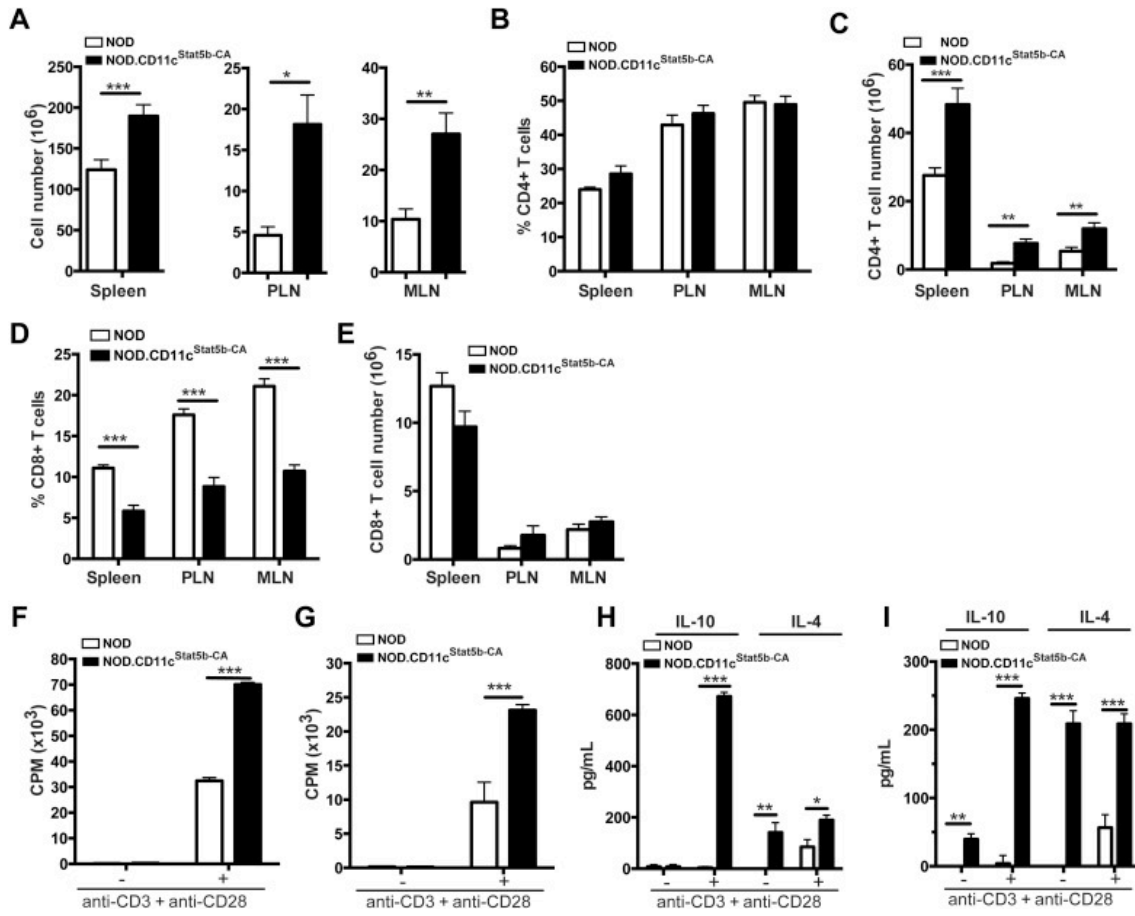


Figure 5.

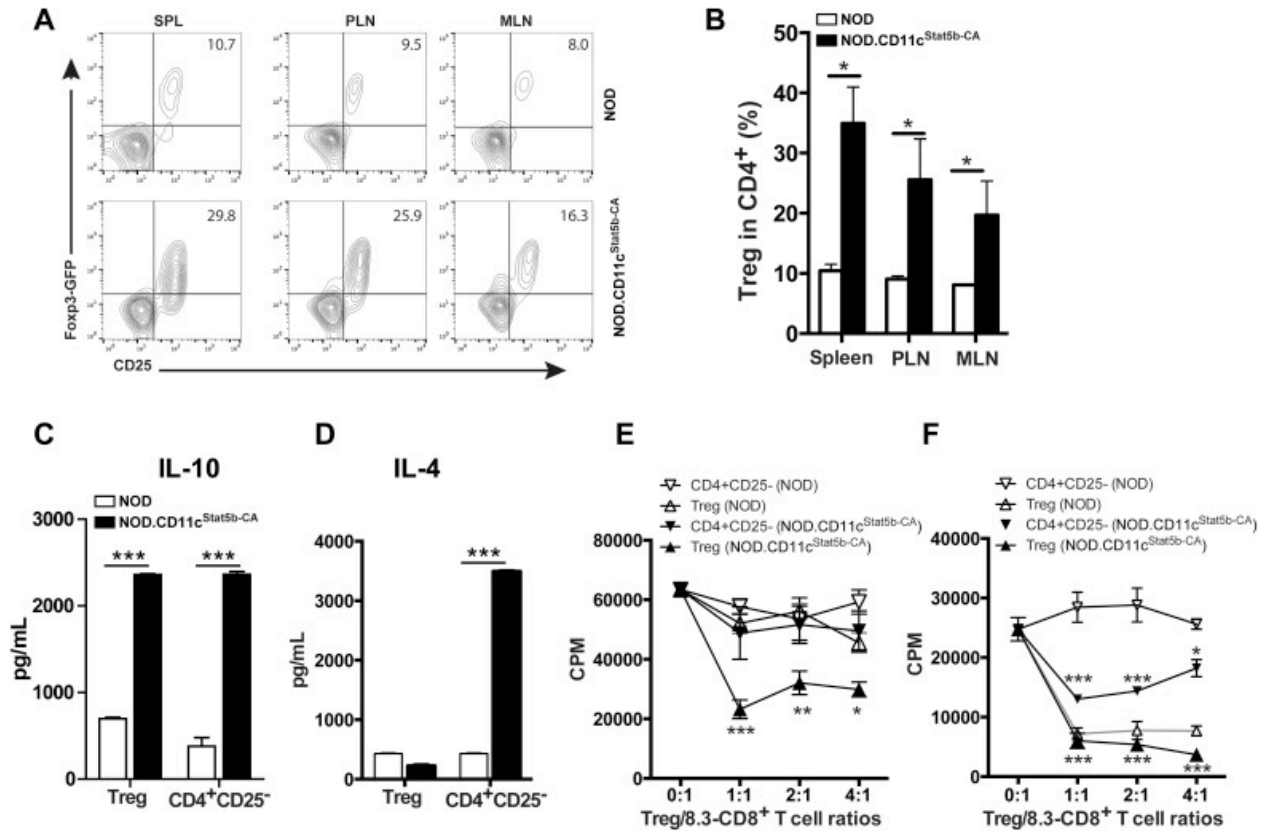


Figure.6.

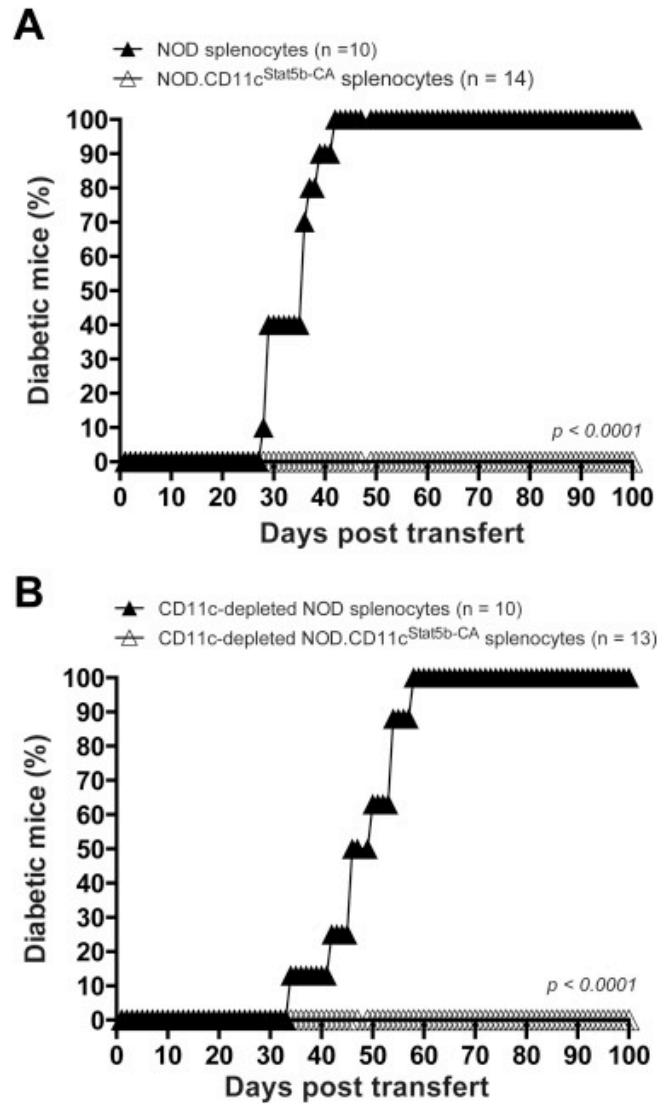


Figure.7.

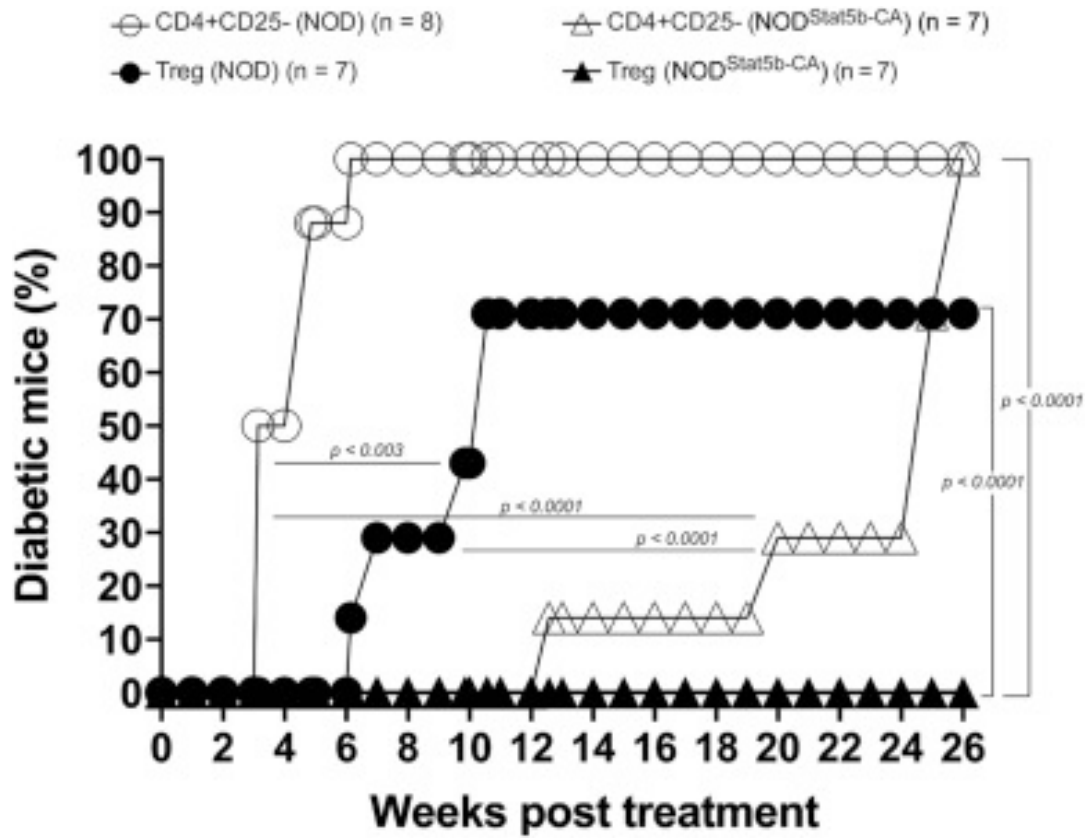
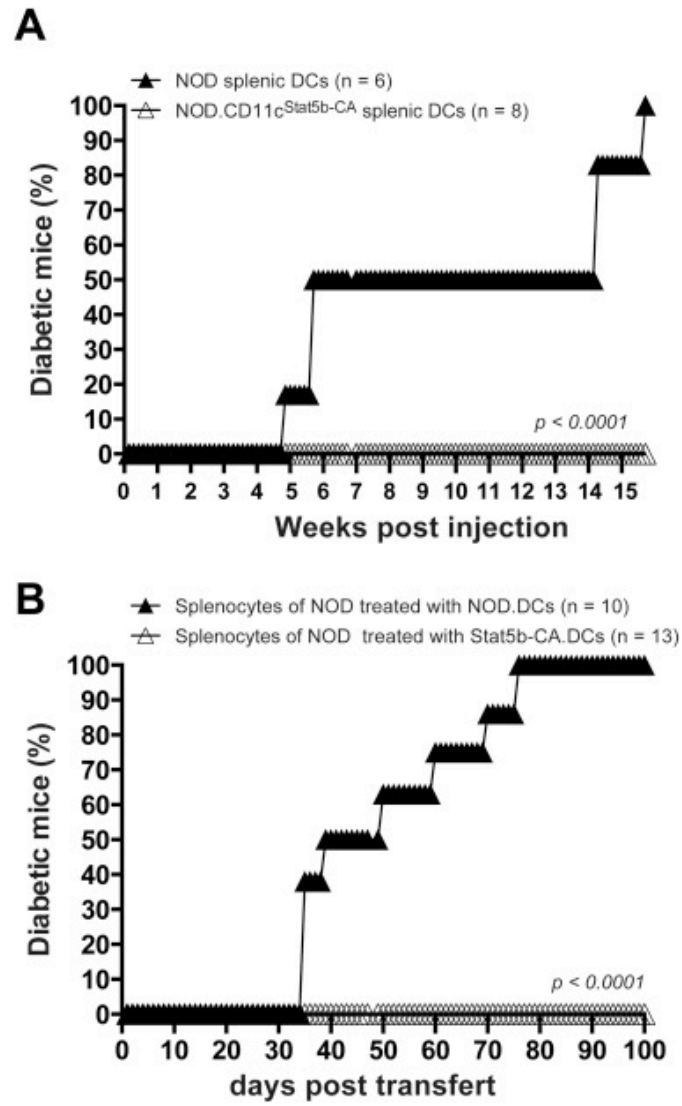


Figure.8.



## **Chapitre III**

# **Constitutively active Stat5b Transcription Factor Drives NOD bone marrow derived Dendritic Cells To Tolerogenic State**



# **Constitutively Active Stat5b Transcription Factor Drives NOD Bone Marrow Derived Dendritic Cells To Tolerogenic State**

**Echarki Zerif and Abdelaziz Amrani**

Department of Pediatric, Immunology division, Centre de Recherche Clinique du CHUS, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, 3001-12<sup>th</sup> Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4

**\*Address correspondence and reprint requests to** Dr. Abdelaziz Amrani, Department of Pediatrics, Immunology Division, Centre de Recherche CHUS, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, 3001, 12<sup>th</sup> Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4. Telephone: (819) 346-1110 ext 14854. FAX: (819) 564-5215. E-mail: Abdelaziz.Amrani@USherbrooke.ca

**Running title:** Active Stat5b promotes tolerogenic function of NOD bone marrow DCs

**Abbreviations used in this paper:** DCs, dendritic cells; Stat5b-CA, constitutively active Stat5b, IRF4, Interferon Regulatory Factor 4; and IRF8, Interferon Regulatory Factor 8.

## **Highlights:**

- I- Stat5b-CA.DCs display a mature phenotype and a tolerogenic signature
- II- Stat5b-CA.DCs display tolerogenic cytokine production and genes expression profile
- III- Stat5b-CA differentially regulates IRF4 and IRF8 expression in BMDC
- IV- Stat5-CA recruits Ezh2 to repress IRF8 but not IRF4
- V- Stat5b-CA.BMDC protect NOD mice against diabetes

## Abstract

Immunotherapy of autoimmune diseases using dendritic cells (DCs) as cellular adjuvant represents a novel and promising approach to the. Eliciting tolerogenic DC phenotype and function is crucial to halt development of autoreactive T cell responses and prevention of autoimmunity. We have reported that active form of STAT5b (Stat5b-CA) promote DC tolerogenic functions. However, the molecular mechanisms by which STAT5 modulates DCs tolerogenic function in NOD mice are not fully investigated. Here, we used bone-marrow derived DC from transgenic NOD mice carrying a constitutively active form of *Stat5b* under control of CD11c promoter to characterize their tolerogenic function at the molecular level. We found that Stat5b-CA expressing BMDCs (Stat5b-CA.BMDC) displayed high levels of CD80, CD86, MHC class II, PD-L1 and PD-L2 and produced high amounts of TGF $\beta$  but less amounts of TNF $\alpha$  and IL-23. Stat5b-CA.BMDCs upregulated *Irf4* and downregulated *Irf8* gene expression and promoted CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DC subset differentiation. Interestingly, we found that the histone methyltransferase Ezh2 interacted with Stat5b-CA complex that bound GAS sequences in the *Irf8* enhancer but Ezh2 was not found to interact with GAS sequence in the *Irf4* promoter. Importantly, a single injection of Stat5b-CA.BMDCs to 7-8 weeks old NOD mice halted progression of islet inflammation and protected from diabetes. Taken together, our data suggest that the active form of STAT5B induces tolerogenic DC function by modulating IRF4 and IRF8 expression through recruitment of Ezh2. This study highlights the importance of Ezh2 in the generation of tolerogenic DCs, a finding that could ultimately be useful in clinical immunotherapy of autoimmune diseases.

## Introduction

Activation of signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) is an important step in the signaling pathways of response to cytokines and growth factors. STAT5 is expressed in multiple cell types and plays a vital role in modulating gene expression, as well as being critical for development and cellular function (Leonard and O'Shea 1998, Levy and Darnell 2002). Molecular characterization of the *Stat5* gene has revealed that STAT was encoded by two paralogs closely linked genes that encoded *Stat5a* and *Stat5b* (Copeland, Gilbert et al. 1995, Liu, Robinson et al. 1995). These genes are highly homologous and tandemly linked on human chromosome 17 (Lin, Mietz et al. 1996) and murine chromosome 11 (Copeland, Gilbert et al. 1995). Studies in mice have outlined redundant and non-redundant roles for *Stat5a* and *Stat5b* genes in immune regulation and development (Liu, Robinson et al. 1997, Udy, Towers et al. 1997, Kanai, Seki et al. 2014). *Stat5a* and *Stat5b* are essential for normal lymphoid development, and function as critical signal mediators of CD8<sup>+</sup> T cell homeostasis (Kelly, Spolski et al. 2003, Yao, Cui et al. 2006, Kanai, Seki et al. 2014). However, *Stat5b* plays a more critical role in the case of natural killer (NK) cell development and function (Imada, Bloom et al. 1998, Moriggl, Topham et al. 1999). Active STAT5 binds to the TTCN<sub>3</sub>GAA  $\gamma$ -interferon activated sequence (GAS) single or tandem motif as dimers or tetramers (Leonard and O'Shea 1998, John, Vinkemeier et al. 1999, Lin, Li et al. 2012). *Stat5b* paralog appears to play a major role in the immune system (Lin, Li et al. 2012, Villarino, Laurence et al. 2016). In NOD mice, autoimmune response is due, at least in part, to molecular alteration in the *Stat5b* signaling pathway. It has been reported that DCs of NOD mice carry *Stat5b* mutation at the first residue in the DNA binding domain and that results in

a weak STAT5B DNA binding and reduced expression of downstream genes bearing upstream GAS consensus sequences (Davoodi-Semiromi, Laloraya et al. 2004).

We have reported that Stat5b-CA reprograms NOD DCs to acquire tolerogenic functions that induce and maintain protective immune response against type 1 diabetes in NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice (Zerif, Maalem et al. 2017). In the present study, we have generated bone marrow-derived DCs (Stat5b-CA.BMDCs) of NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice and have investigated the molecular mechanism that drives their tolerogenic function. We found that Stat5b-CA.BMDCs expressed high levels of CD80, CD86, CD40, MHC class II, as well as inhibitory molecules PD-L1 and PD-L2. Stat5b-CA.BMDCs produced elevated amounts of the anti-inflammatory cytokine TGF $\beta$  but low amounts of pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL-23. We also found that Stat5b-CA upregulated *Irf4* and downregulated *Irf8* gene expression and enhanced CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DC subset differentiation. Interestingly, we found that Ezh2 interacted with STAT5b complex that bound GAS sequences in the *Irf8* enhancer whereas Ezh2 did not interact with GAS sequence in the *Irf4* promoter. Of significance, a single injection of Stat5b-CA.BMDCs to 7-8 weeks old NOD mice protected from diabetes.

## **Materials and Methods**

### **Generation of bone marrow-derived DCs**

BMDCs were generated from femurs and tibias of transgenic (NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>) and NOD mice. Cells were resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated FCS, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu$ g/mL streptomycin. Bone marrow cells were differentiated in the presence of GM-CSF (5 ng/ml) and IL-4 (4,5 ng/ml) (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN) as previously reported (Gaudreau, Guindi et al. 2007). At day 7, non-

adherent cells were harvested and were left un-stimulated or exposed to GM-CSF (50 ng /ml) for 48 h.

### **Antibodies and flow cytometry analysis**

Unstimulated or stimulated BMDCs were washed twice with PBS and stained with anti-CD11c-APC-Cy7 (clone N418, Biolegend) in combination with anti-CD80-PE-Cy5 (clone 16-10A1) anti-CD86-PE-Cy5 (clone GL1), anti-CD40-PE-Cy5 (clone 1C10) or biotin anti-MHC II conjugated to streptavidin-PerCP, anti-CD11b-PE (clone M1/70), anti-PD-L1-PE (clone MIH5) or anti-PD-L2-PE (clone TY25) were from eBiosciences (San Diego, CA). Flow cytometry data collected on a CytoFLEX instrument (Beckman Coulter), were analyzed using the FlowJo 10.2 software (Tree Star Inc. Ashland, OR).

### **Real time PCR**

Gene expression was quantified by qPCR of RNA extracted from BMDCs using SYBR green Quantitect SYBR Green qPCR kit (Qiagen) as previously described in (Cloutier, Guindi et al. 2009). Primer sequences used are listed in the **Table 1**. Relative gene expression changes were calculated using the  $\Delta\Delta C_T$  method and expression normalization was done using the housekeeping gene  $\beta$ -actin.

### **Western blots**

BMDCs were washed in cold PBS and resuspended in lysis buffer (Tris 50 mM, NaCl 0.15 M, DTT 1 mM, Triton X-100 1% (v/v)) containing protease and phosphatase inhibitors. Cell lysates were fractionated on 10% SDS-PAGE gels, transferred to a nitrocellulose membrane

(Hybond-ECL Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC) and incubated overnight with anti-IRF4-biotin (clone M17), anti-IRF8-biotin (clone C19) (Santa Cruz Biotechnology, CA) or anti-Stat5b (clone EPR16671) (Abcam, Cambridge, MA, USA) followed by appropriate secondary antibodies and revealed by enhanced chemiluminescence (GE Health Care Canada Inc., Oakville, ON).

### **Cytokines quantification**

Supernatants from BMDC untreated cultures or from GM-CSF (50 ng/ml) stimulated cells were collected after 48 hours of culture and stored at -20°C until use. TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL-23 were quantified using ELISA assays (R&D Systems, Minneapolis, MN) following the instructions of the supplier.

### **Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP)**

Chromatin immunoprecipitates were prepared using the EZ-ChIP kit, according to the manufacturer's protocol (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Immunoprecipitations were performed with monoclonal anti-Stat5b or polyclonal anti-Ezh2 (Cell signaling, Danvers, MA, clone 4905S) and with isotype-matched control IgG Abs coupled to microbeads. Samples were subjected to qPCR of the regions containing the proximal GAS site in the promoters of *Irf4* and the enhancer of *Irf8*. Primers were 5'-CTTGGGATCTGCAGAGAAGCTGTG-3' (forward) and 5'-TTGGCGCGCACCATCCT-3' (reverse) for the *Irf4* promoter and 5'-CGCCCCGGAGTAAAGAGAG-3' (forward) and 5'-GCTAATTGAGGAGCGGGAGGGG-3' (reverse) for the *Irf8* enhancer. Fold enrichments

were calculated using the ChIP signal as the fold increase in signal relative to background signal (Tian, Yang et al. 2012).

### **Mice treatment with BM.DCs**

Eight weeks-old female NOD mice received one single intravenous injection (*i.v*) with  $10^7$  cells/mouse of BMDC.Stat5b-CA from NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> transgenic mice or BMDCs from control NOD mice. Diabetes was monitored by a urine glucose test using Uristix (Bayer, Minneapolis, MN) and confirmed by assessment of blood glucose levels with an Accu-Check Advantage monitoring system (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Diabetes was assessed up to 36 weeks in the case of BMDC.STAT5b-CA-treated mice and until diabetes appeared in the case of control-treated mice. The animals were considered diabetic following two positive Uristix readings and when blood glucose concentration was higher than 15 mmol/l.

### **Statistics**

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 7.0a software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Student's t-test was used for statistical analysis. Differences were considered significant for  $p < 0.05$ .

## Results

### **Bone marrow derived from NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice display a signature of tolerogenic mature DCs**

It has been reported that the capacity of DCs to induce tolerogenic or inflammatory responses is directly associated with their state of maturation. BMDCs generated from 6 to 8-week-old NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice were cultured in the absence or presence of GM-CSF (50 ng/mL) for 48 h and were analyzed by FACS for the expression of co-stimulatory and co-inhibitory markers. Results showed that Stat5b-CA.BMDCs exhibited high levels of MHC-II, CD80, CD86 and CD40 costimulatory molecules (**Figure 1 A**). Previous studies have shown that DCs can promote central or peripheral tolerance through different mechanisms, including the expression of PD-L1 and PD-L2 (Keir, Liang et al. 2006, McGrath and Najafian 2012). Here, FACS results showed that Stat5b-CA.BMDCs upregulated cell surface expression of both co-inhibitory molecules PD-L1 and PD-L2 (**Figure 1 B**). These data indicated, similarly to NOD BMDCs, NOD Stat5b-CA.BMDCs expressed high levels of CD80, CD86 and MHC class II markers. However, only Stat5b-CA.BMDCs upregulated their expression of inhibitory molecules PD-L1 and PD-L2.

### **Gene expression and cytokine production profiles displayed by NOD Stat5b-CA.BMDCs**

The tolerogenic state of DCs is essentially underlined by their capacity to enhance their anti-inflammatory cytokine profile while reducing their pro-inflammatory cytokine profile. To assess the regulation of cytokines expression in Stat5b-CA.BMDCs, we quantified the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines at the mRNA and protein levels. Results of qPCR showed that, *Il12a*, *Il23a* and *Il27a* but not *Il12b* gene expression were reduced



(**Figure 2A**) whereas *Tgfb* gene expression was increased (**Figure 2A**) in Stat5b-CA.BMDCs as compared to NOD BMDCs. Consistent with real time PCR results, quantification of cytokines showed that Stat5b-CA.BMDCs produced high amounts of TGF $\beta$  but low amounts of TNF $\alpha$  and IL-23 (**Figure 2B**). These results provided clear evidence that, Stat5b-CA-expressing BMDCs of NOD mice switched their pro-inflammatory cytokine profile to an anti-inflammatory cytokine profile.

### **Stat5b-CA differentially regulates IRF4 and IRF8 expression in BMDC of NOD mice**

Tolerogenic versus immunogenic potential of DCs depend on the type of cytokine environment and, especially, on the type of transcription factors involved in the signaling pathway that these cytokines activate. We have reported that CD4<sup>+</sup> T cells educated with DCs expressing Stat5b-CA exhibited a Th2 like immune response (Zerif, E et al. Autoimmunity 2017). IRF4 exerts its effects on T-cell differentiation through its modulation of DCs that stimulate Th2 responses. In contrast, IRF8 is required for the expression of IFN- $\gamma$  and the gene encoding IL-12 that promotes Th1 response (Tailor et al. 207; Wang et al 2000). Furthermore, IRF4 and IRF8 are differentially regulated through the Jak/Stat5 signaling pathway. These facts led us to investigate whether IRF4 and IRF8 transcription factors were differentially regulated in Stat5b-CA.BMDCs and NOD.BMDCs. Real time PCR analysis showed upregulation of *Irf4* and downregulation of *Irf8* gene expression in Stat5b-CA.BMDCs as compared to NOD.BMDCs (**Figure 3A**). Western blot and FACS analysis confirmed that IRF4 was highly expressed and that IRF8 expression was significantly reduced in Stat5b-CA.BMDCs compared to NOD BMDCs (**Figures: 3B and 3C**). Since IRF4 plays a critical role in the development of the CD11b<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DC subset (Suzuki,

Honma et al. 2004), we examined the expression of CD11b<sup>+</sup> marker in Stat5b-CA.BMDCs. FACS data showed that Stat5b-CA.BMDCs contained a high percentage of CD11b<sup>+</sup> DCs subset as compared to NOD BMDCs (**Figure 3D**). Taken together, these data clearly indicated that the active form of Stat5b upregulated IRF4 and downregulated IRF8 expression that was accompanied by an increased proportion of the CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> subset in Stat5b-CA.BMDCs.

### **The active form of Stat5b recruits Ezh2 to repress IRF8 but not IRF4 expression**

The optimal binding motif for STAT5 has been defined as the GAS motif TTCN<sub>3</sub>GAA. Whereas the dimeric form of STAT5 binds strongly to the GAS canonical motif, the tetrameric form STAT5 binds to two GAS motifs (John, Vinkemeier et al. 1999). Data base analysis of IRF4- and IRF8-encoding genes revealed that the *Irf8* gene contains two GAS motifs upstream of the 5' end whereas the *Irf4* gene contains only one GAS motif of the upstream 5' end. In addition, it has been reported that tetrameric STAT5 binding to intronic *Igk* enhancer Eki recruits Ezh2, which marks *Igk* with trimethylation of histone H3 at Lys27 (H3K27me3). This sequence of events results in repression of *Igk* germline transcription (Mandal, Powers et al. 2011). To determine whether a similar mechanism was involved here, we investigated whether STAT5B recruited Ezh2 to bind single or double GAS motifs upstream of the *Irf4* and the *Irf8* genes. We performed quantitative immunoprecipitation (ChIP) experiments using antibodies directed against STAT5B or Ezh2, followed by PCR amplification using primers specific for *Irf4* and *Irf8* (**Figure 4**). The results showed that STAT5B binds to the promoter of *Irf4* and to the enhancer of *Irf8* in Stat5b-CA.BMDCS and NOD BMDCs (**Figure 4**). However, DNA binding of STAT5B to the

promoter of *Irf4* (**Figure 4A**) and *Irf8* (**Figure 4B**) was significantly increased in Stat5b-CA.BMDCs as compared to NOD BMDCs. Because the consequences of STAT5-mediated gene repression or activation may vary depending on the context in which STAT5 binding occurs (Beck, Malay et al. 2011), we determined whether Stat5-CA recruited Ezh2 to the GAS motifs of *Irf4* and *Irf8* upstream sequence. We found that Ezh2 was recruited to DNA fragments corresponding to the enhancer of *Irf8* (**Figure 4C**) but not to *Irf4* promoter (**Figure 4D**). The selective Ezh2 inhibitor GSK343 (Sigma-Aldrich) was used to confirm whether Ezh2 concomitant recruitment of Ezh2 and Stat5-CA to GAS sequences in *Irf8* enhancer in Stat5-CA.BMDCs contributed to IRF8 repression. Stat5b-CA.BMDCs and NOD BMDCs were pre-incubated with the selective Ezh2 inhibitor GSK343 (Sigma) or vehicle control (DMSO), and IRF8 expression was determined by Western blotting. Results showed enhanced expression of IRF8 in the presence of GSK343, suggesting that Ezh2 recruitment played an important role in reducing IRF8 gene transcription (**Figure 4E**).

### **Induction of long-term protection against diabetes by Stat5b-CA.BMDC**

To investigate the capacity of tolerogenic Stat5b-CA.BMDCs to prevent diabetes development in NOD mice, 7 to 8 week old NOD mice were injected intravenously once with NOD.BMDCs or Stat5b-CA.BMDCs generated from NOD or NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> respectively. The animals were monitored for diabetes for more than 36 weeks. Results showed that NOD mice injected with Stat5b-CA.BMDCs were protected against diabetes development whereas mice injected with NOD.BMDCs were not protected from diabetes development over the period of observation (22 weeks) (**Figure 5**).

## Discussion

It has been reported that autoimmune diabetes in NOD mice results in part from a dysfunction of dendritic cells (DCs), which leads to a breakdown of self-tolerance (Boudaly, Morin et al. 2002, Lee, Lee et al. 2010, Morel and Turner 2011) that is a key event in the mechanisms underlying onset of autoimmune diseases. DCs can be reprogrammed to induce immune suppression under specific circumstances. To overcome Stat5 defect in DCs of diabetes-prone NOD mice, we generated transgenic mice (NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>) expressing a constitutively active form of the *Stat5b* gene specifically in DCs. This transgenic model allowed us to define the critical role of STAT5B as a transcription factor in reprogramming immunogenic BMDCs to tolerogenic BMDCs. Characterization of Stat5b-CA.BMDC from transgenic mice in comparison with BMDCs of NOD control mice showed that Stat5b-CA.BMDC exhibited a mature phenotype, expressed high level of PD-L1 and PD-L2 and produced large amounts of TGF- $\beta$  as compared to NOD BMDCs. In addition, Stat5b-CA enhanced IRF4 and repressed IRF8 expression through recruitment of the histone methyltransferase Ezh2. This effect was accompanied by an increase in the percentage of CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DC subset in Stat5b-CA.BMDCs. Finally, a single injection of tolerogenic Stat5b-CA.BMDCs protected NOD mice from development of diabetes.

We have reported that bone marrow-derived DCs of NOD mice conditioned with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or thymic stromal lymphopoietin (TSLP) acquired the signature of tolerogenic DCs. Of significant, NOD mice treated with GM-CSF or TSLP or, TSLP-treated DCs protected from diabetes by producing tolerogenic DCs and increasing the pool of Tregs (Gaudreau, Guindi et al. 2007, Besin, Gaudreau et al. 2008). GM-CSF and TSLP are known to signal through the JAK-Stat5b

signaling pathway, (Rochman, Kashyap et al. 2010, van de Laar, Coffey et al. 2012). Furthermore, the *Stat5b* gene is associated with the *idd4* susceptibility locus in NOD mice (Davoodi-Semiromi, McDuffie et al. 2007). We have also reported that Stat5b-CA promoted tolerogenic function of splenic DCs *in vivo*, which are critical in inducing and maintaining tolerogenic immune response against diabetes (Zerif, Maalem et al. 2017). Here, we present evidence that Stat5b-CA.BMDCs displayed a fully mature phenotype and expressed high levels of the PD-L1 and PD-L2 inhibitory molecules. It has been reported that PD-L1 and PD-L2 expressed on DCs interact with PD-1 on T cells. This interaction leads to inhibition of potentially diabetogenic peripheral T cells that have avoided negative thymic selection (Freeman, Long et al. 2000, Latchman, Wood et al. 2001, Martin-Orozco, Wang et al. 2006) and/or promotes Treg development and immunoregulatory function (Francisco, Salinas et al. 2009). Overall, elevated expression of these cell surface markers in Stat5b-CA.DCs suggests that Stat5b-CA confers tolerogenic properties to NOD BMDCs. Consistent with this interpretation, we found that Stat5b-CA.BMDC protected against diabetes. Several lines of evidence indicate that phenotypically mature DCs exhibiting high expression of costimulatory molecules do not always induce Th1 responses but instead promote Tregs, depending on the cytokines profile they produce (Sporri and Reis e Sousa 2005). An analysis of the profile of cytokines produced by Stat5b-CA.BMDC showed that these cells secreted high amounts of TGF $\beta$  and low amounts of TNF $\alpha$  and IL-23. It has been reported that TNF $\alpha$  and IL-23 produced by DCs are pathogenic in many autoimmune disorders (Harrington, Hatton et al. 2005, Langrish, Chen et al. 2005). Moreover, DCs producing high amount of anti-inflammatory cytokine TGF $\beta$ , a growth factor important for maintenance and survival of Tregs (Sanjabi, Zenewicz et al. 2009), were able to inhibit the induction and the synthesis of

pro-inflammatory cytokines such as IL-12p70 (Thomas, Wong et al. 2013). Indeed, TGFβ-secreting Stat5b-CA.BMDCs produced lesser amounts of IL-12 than NOD.BMDCs. Thus, Stat5b-CA is able to reprogram NOD.BMDCs to secrete less pro-inflammatory cytokines and to increase production of TGF-β that represents the signature of tolerogenic DCs. This anti-inflammatory environment is known to promote immune response deviation from Th1 towards type Th2 immunoregulatory response (Maeda and Shiraishi 1996), and to induce Treg differentiation (Yamazaki, Pearson et al. 2007). We also demonstrated that the tolerogenic properties acquired by Stat5b-CA.BMDC were also displayed by down-regulating *Il12a*, *Il27a* and *Il23a* gene expression that are involved in induction of the Th1 and Th17 immune responses respectively (Ouyang, Jacobson et al. 1999, Takeda, Hamano et al. 2003, Stockinger and Veldhoen 2007, Zelante, De Luca et al. 2007). Thus, in the current study, we provide evidence that Stat5b-CA.BMDCs acquired the signature of tolerogenic DCs, including increased expression of immunomodulatory molecules PD-L1 and PD-L2, production of the immunosuppressive cytokine TGF-β and decreased production of pro-inflammatory cytokines IL-12, TNFα and IL-23.

Recent studies have reported that Stat5 influences the development and function of DC subsets by controlling regulation of IRF4, IRF8 gene expression (Esashi, Wang et al. 2008, Sebastian, Serra et al. 2008). Data shown here revealed that Stat5b-CA upregulated *Irf4* and downregulated *Irf8* gene expression in BMDCs. This differential regulation of the *Irf4* and *Irf8* gene expression could explain why splenic DCs of the transgenic mouse NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> contained less pDCs and were predominantly conventional DCs (Zerif E et al. J. Autoimmunity 2017). Furthermore, it has been reported that the CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>B220<sup>-</sup> DC subset is particularly reduced in DCs that are *Stat5*-deficient (Bell,

Kitajima et al. 2013). Interestingly, we have found that a large proportion of Stat5b-CA.BMDC strongly expressed the CD11b marker. It has been also reported that IRF8 is necessary for the development of the subsets of CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> resident and migratory DCs, whereas IRF4 is critical for the generation of the subsets of CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> DCs (Suzuki, Honma et al. 2004, Tamura, Taylor et al. 2005, Vander Lugt, Khan et al. 2014). The analysis of the upstream sequences of the *Irf4* and *Irf8* genes show the presence of a single GAS motif in the *Irf4* promoter and two GAS motifs separated by 9 nucleotides in the *Irf8* enhancer region. Our data show that STAT5B directly binds to *Irf4* and *Irf8* GAS motifs and regulate *Irf4* and *Irf8* gene expression. In agreement with these observations, we found increased recruitment of STAT5B on these regulatory elements in Stat5b-CA.BMDC. These results can be explained either by the overexpression of Stat5b-CA and/or by the fact that Stat5b-CA is constitutively phosphorylated. In addition, previous studies have identified in NOD mice, the presence of a mutation (L327M) at the DNA binding domain of *Stat5b*, which alters STAT5B DNA binding activity (Davoodi-Semiromi, Laloraya et al. 2004, Litherland, Xie et al. 2005). Our results showed that Stat5b-CA restored a strong DNA binding activity in BMDC of NOD mice. Investigating the mechanism by which Stat5b upregulated *Irf4* and downregulated *Irf8* gene expression revealed that Ezh2 was recruited by Stat5b and that complex strongly bound to the DNA sequence region containing two GAS motifs in the *Irf8* enhancer. In contrast, Ezh2 was not recruited by Stat5b in the region that contains a single GAS motif at the *Irf4* promoter. Therefore, the recruitment of the Stat5b/Ezh2 complex may explain the low expression of IRF8 in Stat5b-CA.BMDC. In addition, our data are in agreement with the report showing that showed that the tetrameric form of Stat5 physically interacts with Ezh2 at the locus  $\kappa$  (*igk*) to induce repression of the immunoglobulin gene transcription following

changes in chromatin and the methylation of histone H3 at the lysine 27 (H3K27) (Mandal, Powers et al. 2011). We further confirmed the involvement of Ezh2 in the recruitment by Stat5b as a mechanism of downregulation of *Irf8* gene expression by using Ezh2 pharmacologic inhibitor (GSK343) and that inhibition of Ezh2 leads to the upregulation of *Irf8* gene transcription.

In conclusion, DCs represent a primary target for development of therapeutics in a many autoimmune diseases, including diabetes. In this context, our current findings identify Stat5b as a key regulator of BMDCs tolerogenic function and highlight the importance of regulation of IRF4 and IRF8 through Ezh2 as a potential mechanism that controls DC tolerogenic properties. Data reported in the present study may provide a way to design novel therapeutic targets for the treatment of type 1 diabetes and other autoimmune diseases.



## REFERENCES

1. Leonard WJ, O'Shea JJ (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16: 293-322.
2. Levy DE, Darnell JE, Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 651-662.
3. Liu X, Robinson GW, Gouilleux F, Groner B, Hennighausen L (1995) Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8831-8835.
4. Copeland NG, Gilbert DJ, Schindler C, Zhong Z, Wen Z, et al. (1995) Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics* 29: 225-228.
5. Lin JX, Mietz J, Modi WS, John S, Leonard WJ (1996) Cloning of human Stat5B. Reconstitution of interleukin-2-induced Stat5A and Stat5B DNA binding activity in COS-7 cells. *J Biol Chem* 271: 10738-10744.
6. Kanai T, Seki S, Jenks JA, Kohli A, Kawli T, et al. (2014) Identification of STAT5A and STAT5B target genes in human T cells. *PLoS One* 9: e86790.
7. Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, et al. (1997) Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* 11: 179-186.
8. Udy GB, Towers RP, Snell RG, Wilkins RJ, Park SH, et al. (1997) Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7239-7244.
9. Kelly J, Spolski R, Imada K, Bollenbacher J, Lee S, et al. (2003) A role for Stat5 in CD8+ T cell homeostasis. *J Immunol* 170: 210-217.
10. Yao Z, Cui Y, Watford WT, Bream JH, Yamaoka K, et al. (2006) Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1000-1005.

11. Imada K, Bloom ET, Nakajima H, Horvath-Arcidiacono JA, Udy GB, et al. (1998) Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. *J Exp Med* 188: 2067-2074.
12. Moriggl R, Topham DJ, Teglund S, Sexl V, McKay C, et al. (1999) Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity* 10: 249-259.
13. John S, Vinkemeier U, Soldaini E, Darnell JE, Jr., Leonard WJ (1999) The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5. *Mol Cell Biol* 19: 1910-1918.
14. Lin JX, Li P, Liu D, Jin HT, He J, et al. (2012) Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function. *Immunity* 36: 586-599.
15. Villarino A, Laurence A, Robinson GW, Bonelli M, Dema B, et al. (2016) Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) paralog dose governs T cell effector and regulatory functions. *Elife* 5.
16. Davoodi-Semiromi A, Laloraya M, Kumar GP, Purohit S, Jha RK, et al. (2004) A mutant Stat5b with weaker DNA binding affinity defines a key defective pathway in nonobese diabetic mice. *J Biol Chem* 279: 11553-11561.
17. Zerif E, Maalem A, Gaudreau S, Guindi C, Ramzan M, et al. (2017) Constitutively active Stat5b signaling confers tolerogenic functions to dendritic cells of NOD mice and halts diabetes progression. *J Autoimmun* 76: 63-74.
18. Gaudreau S, Guindi C, Menard M, Besin G, Dupuis G, et al. (2007) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents diabetes development in NOD mice by inducing tolerogenic dendritic cells that sustain the suppressive function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 179: 3638-3647.
19. Cloutier A, Guindi C, Larivee P, Dubois CM, Amrani A, et al. (2009) Inflammatory cytokine production by human neutrophils involves C/EBP transcription factors. *J Immunol* 182: 563-571.
20. Tian B, Yang J, Brasier AR (2012) Two-step cross-linking for analysis of protein-chromatin interactions. *Methods Mol Biol* 809: 105-120.

21. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, et al. (2006) Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 203: 883-895.
22. McGrath MM, Najafian N (2012) The role of coinhibitory signaling pathways in transplantation and tolerance. *Front Immunol* 3: 47.
23. Suzuki S, Honma K, Matsuyama T, Suzuki K, Toriyama K, et al. (2004) Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b<sup>high</sup>CD8 $\alpha$ - dendritic cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8981-8986.
24. Mandal M, Powers SE, Maienschein-Cline M, Bartom ET, Hamel KM, et al. (2011) Epigenetic repression of the Igk locus by STAT5-mediated recruitment of the histone methyltransferase Ezh2. *Nat Immunol* 12: 1212-1220.
25. Beck SM, Malay MB, Gagne DJ, Fowler DL, Landreneau RJ (2011) Experimental model of laparoscopic gastric ischemic preconditioning prior to transhiatal esophagectomy. *Surg Endosc* 25: 2470-2477.
26. Boudaly S, Morin J, Berthier R, Marche P, Boitard C (2002) Altered dendritic cells (DC) might be responsible for regulatory T cell imbalance and autoimmunity in nonobese diabetic (NOD) mice. *Eur Cytokine Netw* 13: 29-37.
27. Lee MH, Lee WH, Todorov I, Liu CP (2010) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells prevent type 1 diabetes preceded by dendritic cell-dominant invasive insulinitis by affecting chemotaxis and local invasiveness of dendritic cells. *J Immunol* 185: 2493-2501.
28. Morel PA, Turner MS (2011) Dendritic cells and the maintenance of self-tolerance. *Immunol Res* 50: 124-129.
29. Besin G, Gaudreau S, Menard M, Guindi C, Dupuis G, et al. (2008) Thymic stromal lymphopoietin and thymic stromal lymphopoietin-conditioned dendritic cells induce regulatory T-cell differentiation and protection of NOD mice against diabetes. *Diabetes* 57: 2107-2117.
30. Rochman Y, Kashyap M, Robinson GW, Sakamoto K, Gomez-Rodriguez J, et al. (2010) Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 19455-19460.

31. van de Laar L, Coffey PJ, Woltman AM (2012) Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* 119: 3383-3393.
32. Davoodi-Semiromi A, McDuffie M, Litherland S, Clare-Salzler M (2007) Truncated pStat5B is associated with the Idd4 locus in NOD mice. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 655-661.
33. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, et al. (2000) Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192: 1027-1034.
34. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, et al. (2001) PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2: 261-268.
35. Martin-Orozco N, Wang YH, Yagita H, Dong C (2006) Cutting Edge: Programmed death (PD) ligand-1/PD-1 interaction is required for CD8+ T cell tolerance to tissue antigens. *J Immunol* 177: 8291-8295.
36. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, et al. (2009) PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 206: 3015-3029.
37. Sporri R, Reis e Sousa C (2005) Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol* 6: 163-170.
38. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, et al. (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201: 233-240.
39. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, et al. (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123-1132.
40. Thomas DC, Wong FS, Zaccane P, Green EA, Wallberg M (2013) Protection of islet grafts through transforming growth factor-beta-induced tolerogenic dendritic cells. *Diabetes* 62: 3132-3142.

41. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA (2009) Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* 9: 447-453.
42. Maeda H, Shiraishi A (1996) TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J Immunol* 156: 73-78.
43. Yamazaki M, Pearson T, Brehm MA, Miller DM, Mangada JA, et al. (2007) Different mechanisms control peripheral and central tolerance in hematopoietic chimeric mice. *Am J Transplant* 7: 1710-1721.
44. Ouyang W, Jacobson NG, Bhattacharya D, Gorham JD, Fenoglio D, et al. (1999) The Ets transcription factor ERM is Th1-specific and induced by IL-12 through a Stat4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3888-3893.
45. Stockinger B, Veldhoen M (2007) Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 19: 281-286.
46. Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, et al. (2003) Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* 170: 4886-4890.
47. Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, Montagnoli C, Bozza S, et al. (2007) IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol* 37: 2695-2706.
48. Esashi E, Wang YH, Perng O, Qin XF, Liu YJ, et al. (2008) The signal transducer STAT5 inhibits plasmacytoid dendritic cell development by suppressing transcription factor IRF8. *Immunity* 28: 509-520.
49. Sebastian C, Serra M, Yeramian A, Serrat N, Lloberas J, et al. (2008) Deacetylase activity is required for STAT5-dependent GM-CSF functional activity in macrophages and differentiation to dendritic cells. *J Immunol* 180: 5898-5906.
50. Bell BD, Kitajima M, Larson RP, Stoklasek TA, Dang K, et al. (2013) The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses. *Nat Immunol* 14: 364-371.

51. Tamura T, Tailor P, Yamaoka K, Kong HJ, Tsujimura H, et al. (2005) IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity. *J Immunol* 174: 2573-2581.
52. Vander Lugt B, Khan AA, Hackney JA, Agrawal S, Lesch J, et al. (2014) Transcriptional programming of dendritic cells for enhanced MHC class II antigen presentation. *Nat Immunol* 15: 161-167.
53. Litherland SA, Xie TX, Grebe KM, Davoodi-Semiromi A, Elf J, et al. (2005) Signal transduction activator of transcription 5 (STAT5) dysfunction in autoimmune monocytes and macrophages. *J Autoimmun* 24: 297-310.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1. Stat5b-CA BMDCs display tolerogenic properties.

BMDCs ( $1 \times 10^5$  cells/well) from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice were cultured for 48 h in the absence or in the presence of 50 ng/ml GM-CSF. (A) Cell surface expression of CD80, CD86, CD40 and MHC II and, (B) PD-L1 and PD-L2 expression were determined by multicolor flow cytometry analysis. Numbers in the windows indicate the percentages of positive cells among the total population of BMDCs. Data are representative of 3 independent experiments.

### Figure 2. Cytokine profiles of BMDC derived from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice.

BMDCs ( $1 \times 10^5$  cells/well) from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice were cultured for 48 h in the absence or in the presence of GM-CSF (50 ng/ml). (A) Relative expression of *Il12a*, *Il12b*, *Il23a*, *Il27a*, and *Tgf $\beta$*  genes were determined by qPCR using the  $\Delta\Delta$ CT method. qPCR data are shown as relative expression compared to untreated BMDCs of NOD mice. (B) Quantification of TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , and IL-23 in the supernatants of BMDCs. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. The asterisks indicate statistically significant differences determined by the Student's *t*-test. (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$  and (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$ .

### Figure 3. Stat5b-CA differentially regulates IRF4 and IRF8 expression.

BMDCs from NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> were cultured for 48 h in the absence or in the presence of GM-CSF (50 ng/ml). (A) *Irf4* and *Irf8* mRNA expression levels were determined by qRT-PCR using the  $\Delta\Delta$ CT method. The data are shown as relative expression as compared

to untreated BMDCs from NOD mice. **(B)** Western blot analysis of IRF4, IRF8 and STAT5B.  $\beta$ -actin expression is shown as loading control. **(C and B)** proteins expression determined by flow cytometry of IRF4, IRF8 and CD11b respectively. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. The asterisks indicate statistically significant differences determined by the Student's *t*-test. (\*\*) $p < 0.01$ ; (\*\*\*) $p < 0.001$  and (\*\*\*\*) $p < 0.0001$ .

**Figure 4. Stat5b and Ezh2 recruitment on upstream sequences of *Irf4* and *Irf8* genes in BMDCs of NOD and NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>.**

BMDC were cultured in the absence or in the presence of GM-CSF (50 ng/ml) for 48h. ChIP experiments were performed using antibodies against **(A and B)** Stat5b or **(C and D)** Ezh2. DNA fragments of *Irf4* **(A and D)** and of *Irf8* **(B and C)** were quantified by qPCR. IgG was used as a negative control **(E)** Western blot analysis of IRF8 in BMDC pre-incubated with the Ezh2 inhibitor GSK343 (3  $\mu$ M) or vehicle (0.1% DMSO) and cultured for 48 h without or with GM-CSF (50 ng/ml). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of at least two independent experiments. The asterisks indicate statistically significant differences determined by the Student's *t*-test. (\*) $p < 0.05$ ; (\*\*) $p < 0.01$ ; and (\*\*\*) $p < 0.001$ .

**Figure 5. Inhibition of diabetes development by Stat5b-CA BMDCs treatment.**

Female NOD mice 8 week old, 6 mice per group) were injected *i.v* one time with BMDCs ( $10^7$  cells/mouse) derived from NOD or NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> mice. The animals were followed for diabetes development until 36 weeks of age.



## **Acknowledgments**

This work was supported by a grant-in-aid from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) to AA (MOP-300762).

**Table 1. List of the primers used for qPCR**

<b>Gene</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
<i>Il12a</i>	CTCCTAAACCACCTCAGTTTGGCCAGGGTC	TAGATGCTACAAGGCACAGGGTCATCATC
<i>Il12b</i>	CACTCATGGCCATGTGGGAGCTGGAGAAAAG	TCCGGAGTAATTTGGTGCCTTCACACCTCAG
<i>Il23a</i>	GCCCCGTATCCAGTGTGA	GCTGCCACTGCTGACTAG
<i>Il27a</i>	CTGTTGCTGCTACCCTTGCTT	CACTCCTGGCAATCGAGATTC
<i>Tgfb1</i>	TGACGTCACTGGAGTTGTACGG	GGTTCATGTCATGGATGGTGC
<i>Irf4</i>	TCGGCCAACAAGCTAGAAA	GGCCATGGTGAGCAAACACT
<i>Irf8</i>	CGTGGAAGACGAGGTTACGCTG	GCTGAATGGTGTGTGTCATAGGC
<i><math>\beta</math>-actin</i>	ACCCACACTGTGCCCATCTA	TCATGGATGCCACAGGATTC

Figure 1.

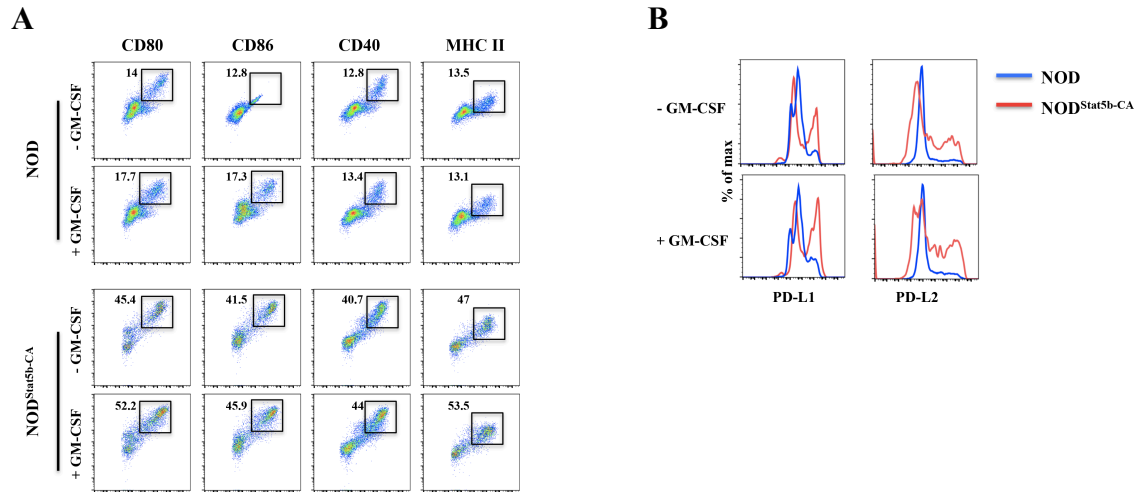
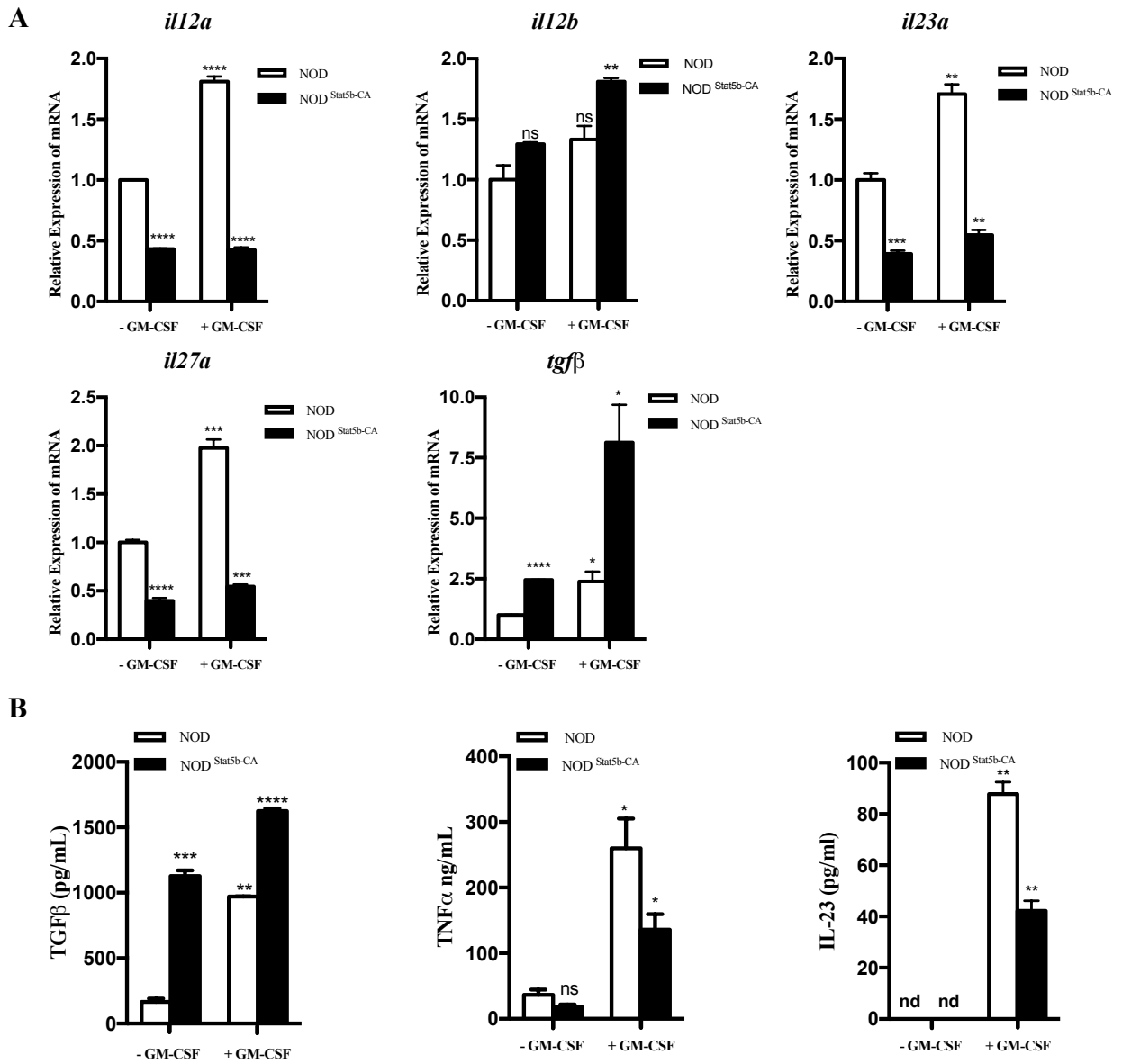
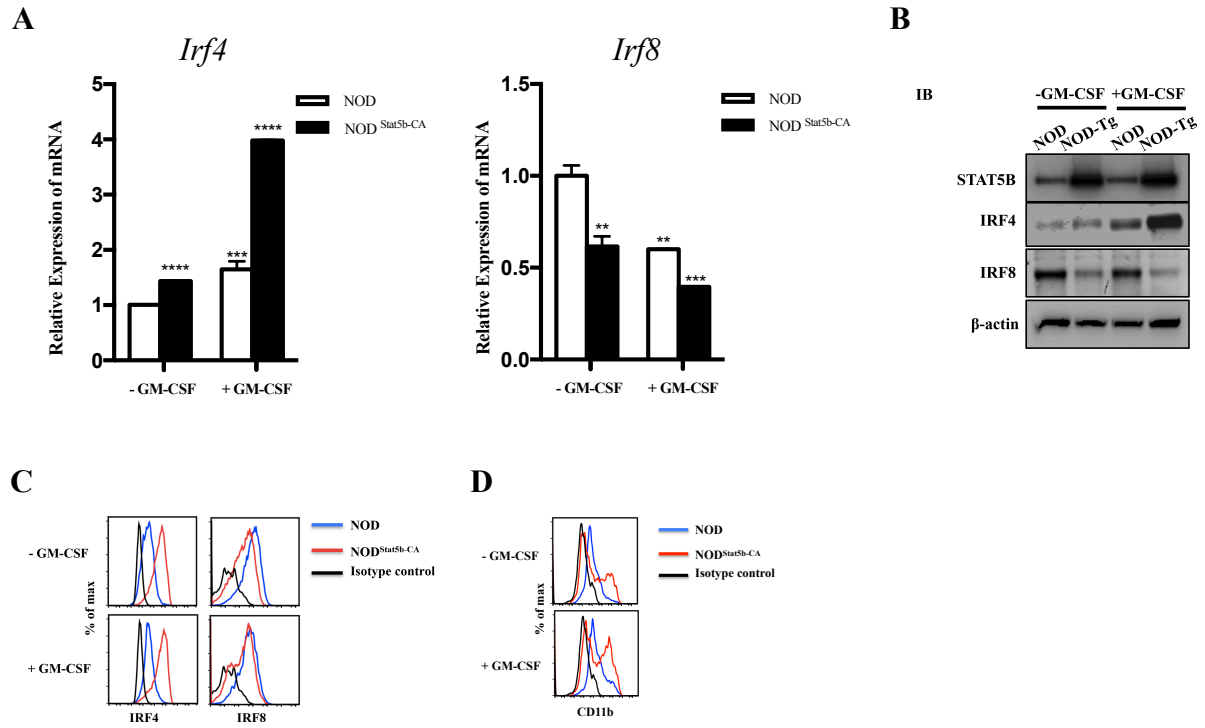


Figure 2.



**Figure 3.**



**Figure 4.**

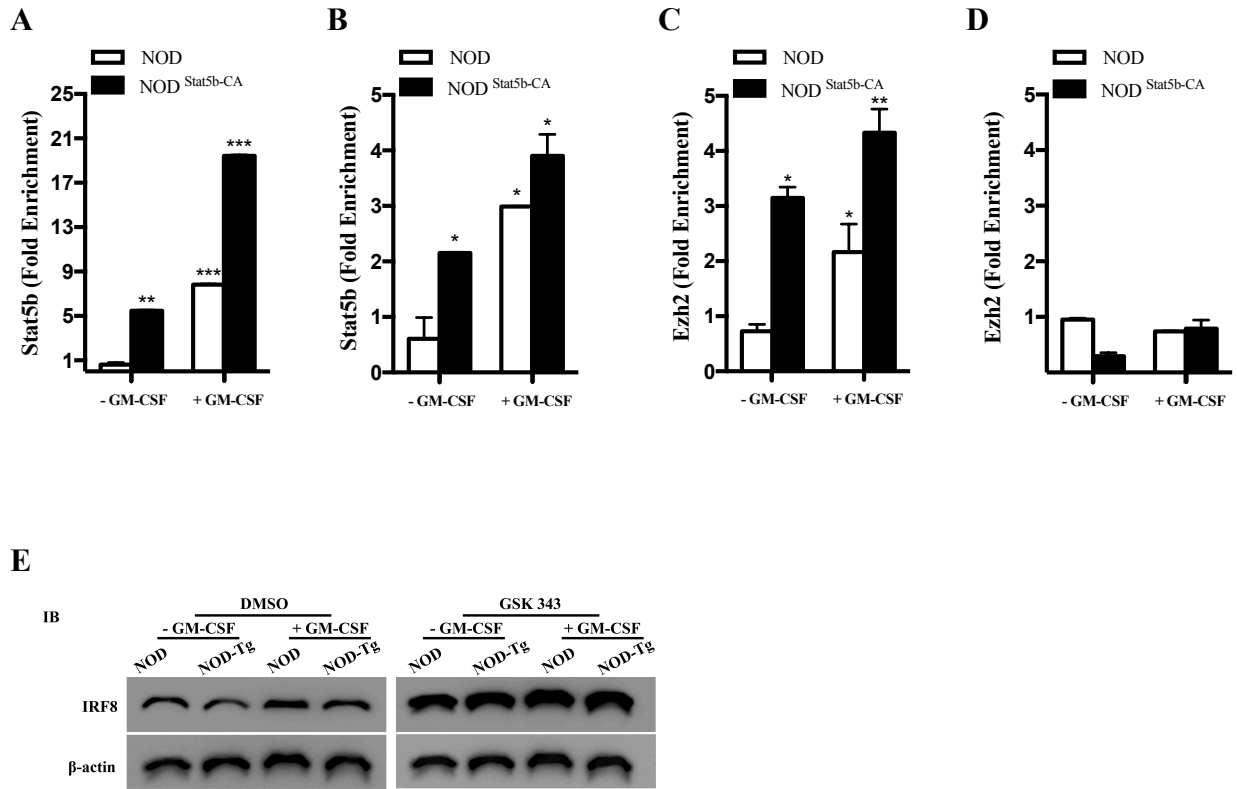
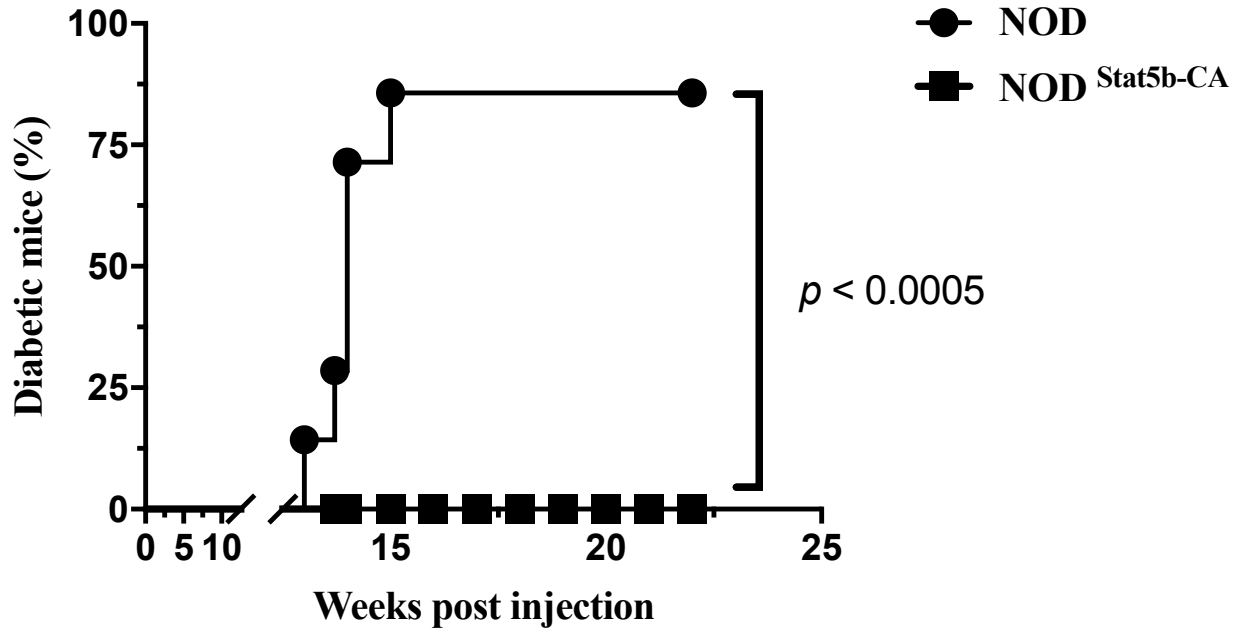


Figure 5.



## **Chapitre VI**

### **Discussion générale, conclusions et perspectives**



## Discussion générale

Le diabète de type 1 (DT1) est l'une des maladies auto-immunes les plus courantes, reconnues comme une des principales causes de décès et d'incapacité chez les humains. Selon les statistiques les plus récentes, plus que 30 millions de personnes à l'échelle mondiale sont affectées par le DT1. De plus, l'incidence de DT1 ne cesse d'augmenter dans tout les pays. Chez les hommes et chez les souris NOD diabétiques (Non Obese Diabetic), le DT1 résulte d'un processus auto-immuns dépendants des lymphocytes T dirigés contre les cellules beta de l'îlot pancréatique produisant de l'insuline (Hutchings, Rosen et al. 1990, Lo, Reilly et al. 1993, Tisch and McDevitt 1996, Delovitch and Singh 1997, Jun, Santamaria et al. 1999). Les souris NOD représentent un excellent modèle qui reflète de nombreuses caractéristiques de la pathogenèse de la maladie du DT1 humain. Les souris NOD partagent plus de 20 *loci* génétiques avec les patients diabétiques, qui confèrent une susceptibilité au diabète auto-immun. Les souris NOD développent initialement une infiltration leucocytaire des îlots pancréatiques (insulite) entre 4 et 5 semaines d'âge qui progresse vers le diabète chez environ 80% des femelles et 20% chez les males qui apparait entre 15 à 20 semaines d'âge.

Les études réalisés dans notre laboratoire ont montré que la génération des DCs *in vitro* avec deux principales molécules activatrices de la voie Jak/Stat5b à savoir le GM-CSF et la TSLP possèdent la signature des DCs tolérogènes (tolDCs) qui produisent une grande quantité d'IL-10 et que l'administration du GM-CSF ou de la TSLP protège les souris NOD contre le développement du diabète (Gaudreau, Guindi et al. 2007, Besin, Gaudreau et al. 2008). La résistance au diabète induite par GM-CSF ou TSLP a été associée à une augmentation du nombre de Tregs et de DCs spléniques qui possèdent la signature des tolDCs. Dans ces

travaux, il a été constaté que, la délétion des DCs des splénocytes de souris traitées par le GM-CSF avant transfert à des souris NOD.Scid a restauré l'activité diabétogène des lymphocytes T diabétogènes, favorisant ainsi le développement du diabète. De façon similaire, l'injection des DCs conditionnées par la TSLP à des souris NOD receveuses empêche le développement du diabète. Il a été rapporté par d'autres groupes que des altérations de la voie Stat5b représentent un évènement moléculaire clé qui entraîne une diminution de la tolérance immunitaire chez les souris NOD (Davoodi-Semiromi, Laloraya et al. 2004, Laloraya, Davoodi-Semiromi et al. 2006, Davoodi-Semiromi, McDuffie et al. 2007). Étant donné que le GM-CSF et la TSLP sont connus pour activer la voie de signalisation Stat5 (Paukku and Silvennoinen 2004), et que le défaut de STAT5B est apparu comme un élément qui contribue aux anomalies des DCs impliqués dans la pathogenèse du DT1 chez les souris NOD. Il est donc important de développer une nouvelle approche thérapeutique qui cible la voie de signalisation Jak/Stat5b chez les DCs dans le diabète auto-immun.

Pour étudier, le rôle de STAT5B dans la régulation de la fonction tolérogène des DCs, nous avons généré des souris transgéniques NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> exprimant le mutant Stat5b1\*6 (Stat5b-CA) sous le contrôle du promoteur CD11c. Cette étude est à notre connaissance, la première étude qui a montré que les souris transgéniques NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> étaient protégées contre le diabète. Récemment, des études ont montré que la surexpression ubiquitaire du gène *Stat5b* de la souris C57BL/6 sur le fond génétique des souris NOD à l'issu d'un croisement de sept génération, augmentait la population de Treg et réduisait l'incidence du diabète à 85%, bien que ces souris ont développé un lymphome (Jin, Purohit et al. 2012, Chen, Yi et al. 2013). Ces résultats ont soulevé la possibilité que certains gènes

protecteurs C57BL/6 puissent contribuer à la résistance au diabète chez ces souris transgéniques NOD. Bien que ces données aient montré l'effet du transgène *Stat5b* sur la sous-population de Treg, ils n'ont pas exclu le rôle potentiel de DCs dans la médiation de la protection contre le diabète. De ce fait, il nous a apparu qu'une analyse de type cellulaire spécifique de la fonction STAT5B est nécessaire pour investiguer son impact sur les fonctions des DCs. À cet égard, les souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> générées sur un fond génétique NOD représentent un excellent outil pour étudier le rôle immuno-régulateur de STAT5B dans les DC, ainsi que leur impact sur l'immuno-pathogenèse du diabète auto-immun. Nous avons constaté que ces souris n'ont montré aucune anomalie pendant leur développement, ni dans leur comportement et leur anatomie. En fait, les souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> étaient fertiles et leurs descendances se développaient normalement de façon similaire aux souris de type sauvage.

Les DCs des souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> (Stat5-CA.DCs) incluant les DCs différenciées *in vitro* (Stat5-CA.BMDCs) sont capables de sécréter une grande quantité de TGF- $\beta$ . Le TGF- $\beta$  est une cytokine multifonctionnelle impliquée dans le contrôle de diverses fonctions, y compris la prolifération et l'activation de différents types de cellules immunitaires (Wakefield, Winokur et al. 1990, Goudy, Burkhardt et al. 2003). En effet, il a été établi que les Tregs peuvent être induites dans la périphérie par l'utilisation de TGF- $\beta$  (Fontenot, Gavin et al. 2003, Goudy, Burkhardt et al. 2003). De ce fait les DCs de la souris transgénique NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> ont été capables *in vitro* d'induire la conversion des lymphocytes T antigènes spécifiques BDC-2.5 CD4<sup>+</sup> diabétogènes en Tregs d'une part et d'autre part une déviation immunitaire vers une réponse immune CD4<sup>+</sup> de type Th2 productrices d'IL-4 et d'IL-10.

Les Stat5-CA.DCs de souris transgéniques NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> sont aussi capables d'influencer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> pour les différencier en cellules non-inflammatoires Th2 et Tc2 respectivement, et d'autre part, augmenter le nombre de Tregs et améliorer leur fonction suppressive. En outre, la présence continue de Stat5-CA.DC ne semble pas nécessaire pour les cellules T de souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> pour maintenir leur potentiel anti-diabétogène. Fait important, une injection intraveineuse unique de Stat5-CA.DC ou de Tregs des souris transgéniques NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> a permis une protection totale contre le diabète chez les souris NOD receveuses.

Toutes les souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> ont été protégées contre le développement du diabète. Ces observations ont conduit à la conclusion que des défauts dans l'activation de la voie Stat5b dans les DCs ont été surmontés par l'expression de la forme constitutivement active de STAT5B, qui a pu rétablir une réponse immunitaire tolérogène chez les souris NOD. Des études antérieures ont montré que l'expression de Stat5b-CA spécifiquement dans les lymphocytes T et les lymphocytes B induit une expansion homéostatique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> et des Tregs (Burchill, Goetz et al. 2003, Burchill, Yang et al. 2008). De plus les données de la littérature supportent le rôle anti-apoptotique de Stat5b (Socolovsky, Fallon et al. 1999). En accord avec ces observations, le nombre de DC spléniques a été effectivement augmenté chez les souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>, suggérant que la signalisation Stat5b favorise l'expansion des DCs.

Il est généralement admis que, les sous types des DCs ainsi que leur statut de maturation détermine leur fonction immunogène ou tolérogène (Cools, Ponsaerts et al. 2007). Nous

avons précédemment montré que les DCs tolérogènes semi-matures sont capables d'induire une différenciation de Tregs et sont essentielles pour la protection contre le diabète de souris traitées par la TSLP et le GM-CSF (Gaudreau, Guindi et al. 2007, Besin, Gaudreau et al. 2008). Le potentiel tolérogène des DC immatures et des DC semi-matures est largement documenté. Néanmoins les DCs matures ont également été démontrées comme étant tolérogènes (Ezzelarab and Thomson 2011). Notre groupe et d'autres ont aussi montré que les DCs activées par la TSLP régulent à la hausse les molécules de co-stimulation et CMH de classe II des DCs sans stimuler leur production de cytokines pro-inflammatoires (Liu, Soumelis et al. 2007, Besin, Gaudreau et al. 2008). Récemment, il a été démontré que *Stat5* était nécessaire pour la maturation des DCs stimulées par la TSLP y compris la régulation positive des molécules co-stimulation CD80, CD86 (Bell, Kitajima et al. 2013).

En accord avec ces observations, nos résultats montrent que les DCs des souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> présentent les caractéristiques des DCs matures, à savoir l'expression des niveaux élevés de molécules de co-stimulations CD80 et CD86, et la sécrétion des niveaux élevés de TGF- $\beta$  mais de faibles niveaux d'IL-12p70. La sécrétion d'une grande quantité de TGF- $\beta$  accompagnée avec une faible production d'IL-12p70 par les Stat5-CA.DCs est une signature caractéristique des DCs matures et tolérogènes. Les DCs tolérogènes se révèlent être très efficaces pour activer la fonction suppressive des Tregs (Morelli and Thomson 2007, Turner, Kane et al. 2009). Ces dernières sont considérées cruciales dans l'inhibition de la fonction effectrice des lymphocytes T auto-réactives (Besin, Gaudreau et al. 2008, Davidson and Shevach 2011). En effet, il a été rapporté que les DCs tolérogènes productrices de TGF- $\beta$  induisent la conversion de cellules T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> naïves en Tregs (Morelli and Thomson 2007, Turner, Kane et al. 2009). Il a été également démontré que la TGF- $\beta$  était nécessaire

pour les DCs mature dérivées de la moelle osseuse pour favoriser la différenciation des Tregs *in vitro* (Yamazaki, Bonito et al. 2007).

Nous avons démontré dans cette étude le pouvoir des Stat5b-CA.DCs à induire une différenciation très efficace des Tregs de façon antigène-spécifique *in vitro*. Cette observation a été corroborée par une augmentation considérable du nombre de Tregs dans la rate, les PLN et les MLN chez les souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> et de leur potentiel suppressif *in vitro* et *in vivo*. Il est possible que les niveaux élevés d'expression de CD80 et CD86 de Stat5b-CA.DC contribuent au maintien et l'expansion des Tregs nouvellement converties puisque l'interaction de CD80/CD86 avec CD28 des Tregs est importante pour l'homéostasie périphérique des Tregs (Salomon, Lenschow et al. 2000, Tang, Henriksen et al. 2003). Cette interprétation est supporté par les résultats d'un autre groupe qui a montré que CD80 et CD86 exprimés sur les DC étaient nécessaires pour le maintien du pool de Treg périphérique (Bar-On, Birnberg et al. 2011) et par le fait même qu'une forte expression de molécules de co-stimulation chez les DCs peut induire une expansion des Tregs *in vitro* et *in vivo* (Yamazaki, Iyoda et al. 2003, Fehervari and Sakaguchi 2004).

Chez les souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> la protection contre le diabète se manifeste par la préservation anatomique des ilots et est accompagné par une réduction significative de la proportion de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans la rate, le PLN et le MLN. Bien que, dans cette étude, nous n'avons pas abordé la question sur les mécanismes impliqués dans la réduction de la proportion de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> chez les souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>, il est important de noter que le pool élevé de Tregs et leur forte activité suppressive pourraient participer à réduire la prolifération des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effectrice et promouvoir une réponse Tc2

non-inflammatoire. Nous avons montré également que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> des souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> possèdent une activité de suppression modérée, ce qui suggère qu'elles contiennent une sous-population de lymphocytes T suppressives de type Tr1 qui contribuent à la tolérance immunitaire chez les souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>. Fait intéressant, une fraction des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> exprime des molécules inhibitrices telles que CTLA-4 et PD1 (données non publiées). Dans le même contexte, il a été démontré qu'une population des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> périphériques exprime les deux molécules immuno-régulatrices CTLA-4 et PD1 qui contribuent à la tolérance immunitaire en inhibant le développement de la colite (Totsuka, Kanai et al. 2005). En accord avec ces observations, nous avons observé que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> des souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> retardent l'apparition du diabète lors du transfert adoptif chez des souris receveuses NOD de 8 à 10 semaines.

En plus de l'implication des DCs tolérogènes dans la différenciation des Tregs, il a été rapporté que les DCs induisent la tolérance immune en déclenchant une réponse immunitaire de type Th2/Tc2 et en supprimant l'activité inflammatoire des cellules Th1/Tc1 (Clare-Salzler, Brooks et al. 1992, Menges, Rossner et al. 2002) qui contribuent au développement du diabète chez les souris NOD. Nous avons montré que les Stat5b-CA.DCs activent de façon antigène-spécifiques les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> BDC.2.5 diabétogènes à produire des quantités élevées de cytokines de type Th2 qui produisent beaucoup d'IL-10 et d'IL-4 sans affecter la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2. Ces données sont cohérentes avec le fait que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> des souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> produisent des quantités élevées de cytokines de type Th2/Tc2 (IL-10 et IL-4). Ces résultats vont également dans le même

sens des données récentes qui montrent que l'activation de STAT5 chez les DCs est nécessaire pour le développement et la promotion des réponses Th2 dans le poumon (Bell, Kitajima et al. 2013).

Il est important de savoir si les fonctions tolérogènes acquises par les lymphocytes T sous l'influence de Stat5b-CA.DC sont capables de contrôler le développement du diabète et si un traitement thérapeutique avec Stat5b-CA.DC pourrait représenter une stratégie efficace pour empêcher le développement du diabète auto-immun. Les études réalisées par d'autres groupes, ont suggéré que la pathologie auto-immune est modulée par la fonction et la balance entre les lymphocytes T immuno-régulatrices et immunogènes (Gregori, Giarratana et al. 2003, Korn, Reddy et al. 2007, D'Alise, Auyeung et al. 2008). De plus, les Tregs nécessitent des interactions apparentées avec les DCs tolérogènes pour leur activation *in vivo* (Cederbom, Hall et al. 2000, Yamazaki, Iyoda et al. 2003). Les expériences de transfert adoptif réalisées dans nos travaux de recherche ont montré que les splénocytes totales de souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> ne transfèrent pas le diabète chez des souris NOD.SCID receveuses. Cette observation suggère que les splénocytes de la souris NOD ont acquis des propriétés tolérogènes intrinsèques quand elles se développent en présence des Stat5b-CA.DCs. En accord avec cette interprétation, nous avons constaté que les Stat5b-CA.DC non seulement influencent la fonction suppressive des Tregs qui sont capables d'empêcher le développement du diabète chez les souris NOD pré-diabétiques mais aussi d'influencer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> puisque ces dernières sont capables de retarder l'apparition du diabète.

La période préclinique est relativement longue et elle est caractérisée par une insulite suivie



de l'apparition des symptômes cliniques chez les souris NOD. Cette phase préclinique offre la possibilité d'étudier l'efficacité de la thérapie par les DCs pour empêcher le développement du diabète auto-immun. Nous avons testé cette possibilité en injectant des souris NOD de 8 à 10 semaines avec des DCs purifiées à partir de la rate des souris NOD contrôles ou de souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>. Nous avons montré que le transfert de Stat5b-CA.DC protège contre le diabète et que les cellules spléniques de souris protégées avaient perdu leur potentiel diabétogène et ont été capables d'acquérir une fonction tolérogène car ils ne pouvaient plus transférer le diabète à des souris NOD.SCID.

Ces données renforcent l'hypothèse principale selon laquelle la restauration de l'activation de STAT5B dans les DCs des souris NOD reprogramme leur système immunitaire pour acquérir une tolérance immunitaire à long terme caractérisée par une réorientation du système immunitaire vers des réponses de type Th2/Tc2 et une meilleure fonction suppressive de Tregs.

A la lumière des résultats obtenus *in vitro* avec les DCs générées à partir de la moelle osseuse (BMDCs) de souris NOD et des souris transgéniques NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>, nous avons pu confirmer l'implication de STAT5B dans l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation et du CMH de classe II chez les Stat5b-CA.BMDC. De plus, nous avons montré que ces Stat5b-CA.BMDC étaient capables d'exprimer fortement les deux molécules PD-L1 et le PD-L2 (Programmed death-ligand). Ces molécules immuno-régulatrices sont connues pour leur double rôle, via leur récepteur PD-1, dans l'inactivation des lymphocytes T auto-réactives et l'induction de la prolifération des Tregs (Shin, Yoshimura et al. 2005, Francisco, Salinas et al. 2009). L'adoption de ce phénotype tolérogène des Stat5b-

CA.BMDC est accompagnée d'une reprogrammation de leur profil de production de cytokines vers un profil de cytokines anti-inflammatoires caractérisé par une forte production de TGF- $\beta$  et une faible sécrétion d'IL-12p70, de TNF- $\alpha$  et d'IL-23. Cet environnement anti-inflammatoire est connu pour favoriser d'une part la déviation d'une réponse immunitaire de type Th1 vers une réponse immunitaire essentiellement de type Th2 (Maeda and Shiraishi 1996) et d'autre part la différenciation des Tregs (Yamazaki, Bonito et al. 2007). L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* expliquent le rôle de STAT5B dans le contrôle des propriétés tolérogéniques des DCs *in vivo* caractérisées notamment par l'induction d'une réponse non-inflammatoire de type Th2 et la conversion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> en Tregs.

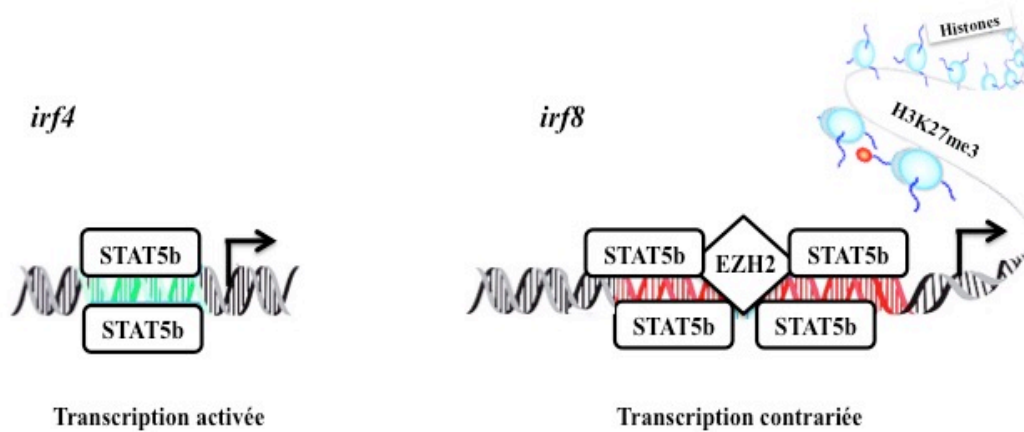
Ces propriétés tolérogéniques acquises par les Stat5b-CA.BMDC se manifestent aussi par une baisse de l'activité transcriptionnelle de certains gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que, l'IL-12, l'IL-27 et l'IL-23, impliquées dans l'induction des réponses de type Th1 et Th17 respectivement (Ouyang, Jacobson et al. 1999, Takeda, Hamano et al. 2003, Stockinger and Veldhoen 2007, Zelante, De Luca et al. 2007). Il a été rapporté que STAT5 module l'activité de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans le développement et la fonction de DCs, tels que NF- $\kappa$ B, IRF8, IRF4, RelB et c/EBP $\beta$ . Récemment, des études ont indiqué que STAT5 influence le développement et la fonction des sous-populations des DCs en fonction de l'expression d'IRF4, IRF8 et RelB (Esashi, Wang et al. 2008, Sebastian, Serra et al. 2008). Nous avons montré que les Stat5b-CA.BMDC expriment des niveaux élevés d'IRF4 et des niveaux faibles d'IRF8. Cette régulation différentielle des deux gènes *Irf4* et *Irf8* expliquerait pourquoi les DCs de la souris transgénique NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> sont majoritairement de type conventionnelles. De plus, une

large fraction des Stat5b-CA.BMDC a une expression élevée de marqueur CD11b. En effet, Il a été rapporté dans la littérature qu'IRF8 est nécessaire pour le développement des DCs CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> résidentes et migratrices, alors qu'IRF4 est critique pour la génération de leurs homologues CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>.(Suzuki, Honma et al. 2004, Tamura, Tailor et al. 2005, Vander Lugt, Khan et al. 2014). En outre, la signalisation via STAT5 a été démontrée impliquée dans l'inhibition de développement des DCs plasmacytoides en réprimant l'expression du facteur de transcription IRF8 (Esashi, Wang et al. 2008).

La régulation de programme transcriptionnelle des DCs est décisif dans le contrôle de leur signature tolérogénique ou immunogénique. Cette régulation est due au fait que STAT5 est capable de reconnaître de façon spécifique la séquence TTCN<sub>3</sub>GAA  $\gamma$ -interferon-activated sequence (GAS) par sa forme dimérique tandis que l'interaction entre les formes dimériques via le domaine N-terminal forment des STAT5 tétramérique capables de se lier à plus qu'un motif GAS (Leonard and O'Shea 1998, Levy and Marie 2012, Lin, Li et al. 2012). Récemment, Line JX et al. ont montré clairement que les formes dimériques et tétramériques de STAT5 ont des fonctions spécifiques distinctes. Les mécanismes moléculaires par lesquels le STAT5B contrôle l'activité transcriptionnelle des gènes *Irf4* et *Irf8* sont mal connus. L'analyse des séquences en amont de cadre de lecture de ces deux gènes montre la présence d'une seule séquence GAS sur le promoteur *Irf4* et deux séquences GAS séparés par 9 nucléotides pour *irf8*. Nous avons montré que STAT5B se lie à l'ADN au niveau des séquences régulatrices GAS des deux gènes *Irf4* et *Irf8*. Néanmoins, nous avons constaté qu'il y a plus de recrutement de STAT5B sur ces éléments régulateurs chez les Stat5b-CA.BMDC. Ce profil de recrutement de STAT5B chez les Stat5b-CA.BMDC pourra être expliqué d'une

part par la surexpression de STAT5B et d'autre part par le fait que *Stat5b* est constitutivement actif. De plus, les études précédentes ont identifiés, chez les souris NOD, la présence d'une mutation (L327M) au niveau de domaine de liaison à l'ADN de *Stat5b* qui altère la liaison de STAT5b à l'ADN (Davoodi-Semiromi, Laloraya et al. 2004, Litherland, Xie et al. 2005). Ainsi, la correction de la mutation au niveau du domaine de liaison à l'ADN de Stat5b-CA peut expliquer aussi l'augmentation de sa capacité de liaison à l'ADN.

Nous avons cherché à comprendre le mécanisme par lequel STAT5B régule l'expression de l'*Irf8* et nous avons montré que la protéine EZH2 (Enhancer of Zest Homolog 2) et STAT5B se lie à la région d'ADN contenant deux motifs GAS en aval du gène *Irf8*. Au contraire EZH2 n'est pas associé au complexe STAT5B dans la région qui contient un seul motif GAS au niveau de promoteur *Irf4*. En effet la présence de complexe STAT5B/EZH2 au niveau de la région activatrice de *Irf8* pourrait expliquer la faible expression d'IRF8 chez les Stat5b-CA.BMDC (**Figure 4**). Cette hypothèse est corroborée par les travaux de Marcus Clark et al. qui ont montré que la forme tétramérique de STAT5 interagit physiquement avec EZH2 au niveau du locus  $\kappa$  (Igk) pour induire la répression de transcription du gène k des immunoglobulines suite à des modifications au niveau de la chromatine et la méthylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 27 (H3K27) (Mandal, Powers et al. 2011). De plus cette hypothèse est confirmée par l'utilisation de l'inhibiteur pharmacologique GSK343 de Ezh2 qui a montré que inhiber Ezh2 permet la réactivation de transcription du gène *Irf8*.



**Figure 4** Schéma représentant le modèle proposé de la régulation transcriptionnelle du gène *Irf4* et *Irf8* par la forme dimérique et tétramérique de Stat5b.

La plupart des sites de liaison pour Stat5 dimérique ont été trouvés proches des promoteurs où Stat5 a servi d'activateur de transcription. Les Stat5 dimériques peuvent également se lier aux sites de liaison Stat adjacents de manière coopérative, par des interactions entre les domaines N-terminal des deux dimères. La plupart des sites de liaison des tétramères impliquent un site de liaison de haute affinité adjacent à un site de faible affinité, ce qui nécessite probablement un repliement de l'ADN pour permettre l'interaction dimère-dimère. Les sites de liaison des tétramères ont tendance à être situés dans des régions intragéniques et introniques, plutôt qu'au niveau des promoteurs (Levy and Marie 2012).

Il est généralement admis que l'activation des gènes s'accompagne souvent d'un recrutement de protéines activatrices conférant des modifications épigénétiques. La régulation des gènes qui sont Stat5 dépend a été corrélée avec le recrutement de la méthyltransférase ou de l'acétyltransférase conduisant à la méthylation ou l'acétylation des histones H3 et H4.

L'analyse des phénotypes et les données d'expression des gènes chez les souris déficientes en *Stat5* suggèrent que les protéines Stat5 peuvent conférer à la fois des fonctions d'activation et de répression (Hennighausen and Robinson 2008).

## Conclusions

Grâce à la génération d'un modèle original de souris transgéniques établi sur le fond génétique NOD, qui est caractérisé par la surexpression constitutive de STAT5B de façon spécifique chez les DCs, cette étude a montré le rôle clé de la voie de signalisation Jak/Stat5b dans les mécanismes de tolérance immunitaire chez la souris NOD. Cette voie de signalisation pourrait constituer un moyen de rétablissement de la tolérance et de la protection contre le diabète de type 1.

Nous avons montré que les souris transgéniques NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> sont protégées contre le diabète. Cette résistance au diabète à long terme est associée à des fonctions tolérogènes des DCs qui se manifestent par une grande production de cytokines anti-inflammatoires (TGF- $\beta$ ) et une baisse significative de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12p70, TNF- $\alpha$  et d'IL-23). Ce potentiel des DCs de la souris transgéniques NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> à créer un environnement tolérogène est associé à 1) un phénotype mature tolérogène des DCs, marquées par une forte expression de molécules PD-L1 et PD-L2. 2) un profil de production de cytokine anti-inflammatoire (TGF- $\beta$ ), 3) une grande capacité d'induire la conversion et l'expansion des Tregs, 4) l'expansion de deux populations cellulaires régulatrices de type Th2 et Tr1. 5) l'induction des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> à sécréter des cytokines régulatrices de type Tc2 et 6) le développement d'une sous population CD11b<sup>+</sup> DC suite à la reprogrammation transcriptionnelle de l'expression des gènes *Irf4* et *Irf8*.

Bien que la possibilité qu'une forme dimère ou tétramère de STAT5 peut être une solution pour discriminer entre la double activité de répression ou d'activation des gènes cibles. Cette

constatations ne semble pas exact pour interpréter l'ensemble des données de la littérature. En effet, la forme tétramérique de STAT5 a été liée à une fonction activatrice de la transcription (Nakajima, Liu et al. 1997, John, Vinkemeier et al. 1999). Cependant l'analyse à l'échelle de génome sur les sites de recrutement de STAT5 et l'expression de ses gènes cibles (Basham, Sathe et al. 2008, Mandal, Powers et al. 2011) ainsi que les résultats publiés par Line JX et al. sur le rôle des formes tétramériques dans le système immunitaire chez des souris déficientes en STAT5 tétramère (Lin, Li et al. 2012), l'ensemble de ces données ont montré que le recrutement d'un co-activateur versus un co-represseur par le STAT5 reste à définir.

Nos résultats viennent supporter l'idée que STAT5B peut agir directement sous sa forme tétramérique par le recrutement d'EZH2 pour réduire l'expression d'*Irf8* et directement par sa forme dimérique pour augmenter l'expression d'*Irf4*. Nos résultats montrent pour la première fois de façon évidente que STAT5B est capable de reprogrammer la machinerie transcriptionnelle à travers la régulation de deux facteurs de transcription IRF4 et IRF8 par deux mécanismes différents. Ces deux facteurs de transcription jouent un rôle capitale dans la différenciation et le développement des sous populations de DCs spécialisées.

Dans l'ensemble, ces populations régulatrices des lymphocytes T présentes dans les organes lymphoïdes secondaires des souris transgéniques contribuent notamment à l'inhibition de l'activité effectrice des lymphocytes T diabéto-gènes, ce qui permet la préservation de l'intégrité des îlots de Langerhans. Ces phénomènes suggèrent donc un rôle crucial et direct de STAT5B dans le contrôle de la signature tolérogène des cellules dendritiques. Ces dernières sont impliquées d'une part dans la déviation immune d'un profil Th1 vers un profil



Th2 et d'autre part dans la conversion, l'expansion et le maintien de l'homéostasie des Treg *in vivo*. En somme, les DCs tolérogènes ont un rôle fondamental dans la protection contre le développement des maladies auto-immunes notamment le diabète de type 1.

Enfin, notre étude apporte donc une évidence claire que les défauts de la voie de signalisation Jak/Stat5b au sein des DCs chez la souris NOD peuvent être une cible thérapeutique pour induire une protection à long terme contre le diabète et éventuellement dans le contexte d'autres maladies auto-immunes.

## Perspectives

### **1) Analyser les fonctions des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> hautement diabétogène dans les souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>.**

Chez les souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> la protection contre le diabète se manifeste par la préservation anatomique des ilots accompagnée d'une réduction significative de la proportion de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans la rate, les PLN et les MLN. Malgré que le nombre élevé et une meilleure activité suppressive des Treg dans la souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup> pourra expliquer cette correction, il serait important d'utiliser le modèle des souris transgéniques 8.3-NOD exprimant un TCR autoréactif pour analyser si de la correction de la signalisation de STAT5B affecte la sélection négative des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> au niveau du thymus ou bien si la réduction du nombre de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> chez les souris transgénique est le résultat d'une délétion de ces dernières au niveau périphériques.

### **2) Identifier les gènes candidats régulés par Stat5-CA à l'échelle de génome des DCs et les partenaires protéiques associées à cette régulation**

Il est également important d'investiguer les autres mécanismes moléculaires par lesquels Stat5b-CA induit la reprogrammation des fonctions tolégènes des DC qui contribuent à la protection du diabète chez les souris transgéniques NOD.CD11c<sup>Stat5b-CA</sup>. Le développement et la fonction des DC sont régulés par un programme transcriptionnel qui représente l'élément clé dans la contribution aux DC d'une signatures tolérogénique ou immunogénique. Il serait intéressant de réaliser un RNA-seq sur les cellules dendritique des souris NOD.CD11c<sup>Stat5b-</sup>

<sup>CA</sup> afin d'identifier l'ensemble des gènes affectés et leurs implication dans la protection du diabète.

La façon dont la protéine STAT5B exerce ses fonctions distinctes et spécifiques dans les différentes conditions physiologiques et pathologiques n'est pas encore complètement déterminée (Engblom, Kornfeld et al. 2007, Kornfeld, Grebien et al. 2008, Baumgartner, Cerny-Reiterer et al. 2009). La structure de STAT5B lui permet d'interagir avec d'autres protéines ce qui lui confère un rôle multiple et spécifique. Afin d'identifier les protéines partenaires de STAT5B, nous avons préalablement marqué Stat5b-CA par HAtag pour le distinguer de Stat5b endogène. Il serait donc intéressant de transfecter les BMDCs de la souris NOD avec le vecteur pCMV-HAtag-Stat5b-CA (STAT5B1\*6) or pCMV-His-Stat5b (STAT5B wt). Ensuite, faire une co-immunoprécipitation des complexes protéiques par un anticorps anti-HAtag or anti-His puis analyser par spectrométrie de masse pour déterminer de nouveaux partenaires potentiel de STAT5B qui pourrait être important dans la régulation des fonctions tolérogènes des DC-Stat5b-CA.

Enfin, dans un contexte de recherche transrationnelle, il serait intéressant, d'étudier le rôle de Stat5b-CA sur les fonctions tolérogènes des DC dérivés de monocytes de patients diabétiques. Ce volet de recherche peut représenter une approche importante dans le contexte d'immunothérapie avec les DC tolérogènes pour traiter le diabète ou pour assurer la survie à long terme les greffes d'îlots chez les patients diabétiques.

## Bibliographie

- Adorini, L. (2003). Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 987, 258-261.
- Albert, L.J., and Inman, R.D. (1999). Molecular mimicry and autoimmunity. *The New England journal of medicine* 341, 2068-2074.
- Alexander, A.M., Crawford, M., Bertera, S., Rudert, W.A., Takikawa, O., Robbins, P.D., and Trucco, M. (2002). Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. *Diabetes* 51, 356-365.
- Alleva, D.G., Pavlovich, R.P., Grant, C., Kaser, S.B., and Beller, D.I. (2000). Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone mouse strains: elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor- $\alpha$  and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice. *Diabetes* 49, 1106-1115.
- Anderson, M.S., and Bluestone, J.A. (2005). The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annual review of immunology* 23, 447-485.
- Anderton, S.M. (2004). Post-translational modifications of self antigens: implications for autoimmunity. *Current opinion in immunology* 16, 753-758.
- Antov, A., Yang, L., Vig, M., Baltimore, D., and Van Parijs, L. (2003). Essential role for STAT5 signaling in CD25+CD4+ regulatory T cell homeostasis and the maintenance of self-tolerance. *J Immunol* 171, 3435-3441.
- Arnush, M., Heitmeier, M.R., Scarim, A.L., Marino, M.H., Manning, P.T., and Corbett, J.A. (1998). IL-1 produced and released endogenously within human islets inhibits beta cell function. *The Journal of clinical investigation* 102, 516-526.
- Atkinson, M.A. (2005). ADA Outstanding Scientific Achievement Lecture 2004. Thirty years of investigating the autoimmune basis for type 1 diabetes: why can't we prevent or reverse this disease? *Diabetes* 54, 1253-1263.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 18, 767-811.
- Barker, J.M. (2006). Clinical review: Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91, 1210-1217.
- Barnett, A.H., Eff, C., Leslie, R.D., and Pyke, D.A. (1981). Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 20, 87-93.
- Baxter, A.G., and Mandel, T.E. (1991). Hemolytic anemia in non-obese diabetic mice. *European journal of immunology* 21, 2051-2055.
- Bell, B.D., Kitajima, M., Larson, R.P., Stoklasek, T.A., Dang, K., Sakamoto, K., Wagner, K.U., Kaplan, D.H., Reizis, B., Hennighausen, L., and Ziegler, S.F. (2013). The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses. *Nature immunology* 14, 364-371.

Bell, G.I., Horita, S., and Karam, J.H. (1984). A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 33, 176-183.

Bending, D., Zaccane, P., and Cooke, A. (2012). Inflammation and type one diabetes. *International immunology* 24, 339-346.

Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics* 27, 20-21.

Berzins, S.P., Venanzi, E.S., Benoist, C., and Mathis, D. (2003). T-cell compartments of prediabetic NOD mice. *Diabetes* 52, 327-334.

Besin, G., Gaudreau, S., Menard, M., Guindi, C., Dupuis, G., and Amrani, A. (2008a). Thymic stromal lymphopoietin and thymic stromal lymphopoietin-conditioned dendritic cells induce regulatory T-cell differentiation and protection of NOD mice against diabetes. *Diabetes* 57, 2107-2117.

Besin, G., Gaudreau, S., Menard, M., Guindi, C., Dupuis, G., and Amrani, A. (2008b). TSLP and TSLP-conditioned dendritic cells induce Treg differentiation and protection of NOD mice against diabetes. *Diabetes*.

Bettini, M., and Vignali, D.A. (2011). T cell-driven initiation and propagation of autoimmune diabetes. *Current opinion in immunology* 23, 754-760.

Boitard, C. (2012). Pancreatic islet autoimmunity. *Presse medicale* 41, e636-650.

Boks, M.A., Kager-Groenland, J.R., Haasjes, M.S., Zwaginga, J.J., van Ham, S.M., and ten Brinke, A. (2012). IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC. *Clinical immunology* 142, 332-342.

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine* 196, 1627-1638.

Bontkes, H.J., Ruizendaal, J.J., Kramer, D., Santegoets, S.J., Scheper, R.J., de Gruijl, T.D., Meijer, C.J., and Hooijberg, E. (2006). Constitutively active STAT5b induces cytokine-independent growth of the acute myeloid leukemia-derived MUTZ-3 cell line and accelerates its differentiation into mature dendritic cells. *Journal of immunotherapy* 29, 188-200.

Brand, O.J., Lowe, C.E., Heward, J.M., Franklyn, J.A., Cooper, J.D., Todd, J.A., and Gough, S.C. (2007). Association of the interleukin-2 receptor alpha (IL-2Ralpha)/CD25 gene region with Graves' disease using a multilocus test and tag SNPs. *Clinical endocrinology* 66, 508-512.

Brusko, T., and Atkinson, M. (2007). Treg in type 1 diabetes. *Cell biochemistry and biophysics* 48, 165-175.

Brusko, T.M., Hulme, M.A., Myhr, C.B., Haller, M.J., and Atkinson, M.A. (2007). Assessing the in vitro suppressive capacity of regulatory T cells. *Immunological investigations* 36, 607-628.

Brusko, T.M., Wasserfall, C.H., Clare-Salzler, M.J., Schatz, D.A., and Atkinson, M.A. (2005). Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 54, 1407-1414.

Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007). IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 178, 280-290.

Campbell, D.J., and Koch, M.A. (2011). Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nature reviews. Immunology* 11, 119-130.

Catassi, C., Guerrieri, A., Bartolotta, E., Coppa, G.V., and Giorgi, P.L. (1987). Antigliadin antibodies at onset of diabetes in children. *Lancet* 2, 158.

Chatenoud, L., Primo, J., and Bach, J.F. (1997). CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *Journal of immunology* 158, 2947-2954.

Chatenoud, L., Thervet, E., Primo, J., and Bach, J.F. (1992). [Remission of established disease in diabetic NOD mice induced by anti-CD3 monoclonal antibody]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 315, 225-228.

Chatenoud, L., Thervet, E., Primo, J., and Bach, J.F. (1994). Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 123-127.

Chavele, K.M., and Ehrenstein, M.R. (2011). Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS letters* 585, 3603-3610.

Chopin, M., Allan, R.S., and Belz, G.T. (2012). Transcriptional regulation of dendritic cell diversity. *Frontiers in immunology* 3, 26.

Christianson, S.W., Shultz, L.D., and Leiter, E.H. (1993). Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes* 42, 44-55.

Clare-Salzler, M.J., Brooks, J., Chai, A., Van Herle, K., and Anderson, C. (1992). Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by dendritic cell transfer. *The Journal of clinical investigation* 90, 741-748.

Cohen, A.C., Nadeau, K.C., Tu, W., Hwa, V., Dionis, K., Bezrodnik, L., Teper, A., Gaillard, M., Heinrich, J., Krensky, A.M., *et al.* (2006). Cutting edge: Decreased accumulation and regulatory function of CD4+ CD25(high) T cells in human STAT5b deficiency. *J Immunol* 177, 2770-2774.

Cooke, A., Tonks, P., Jones, F.M., O'Shea, H., Hutchings, P., Fulford, A.J., and Dunne, D.W. (1999). Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite immunology* 21, 169-176.

Cooper, G.S., Bynum, M.L., and Somers, E.C. (2009). Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *Journal of autoimmunity* 33, 197-207.

Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Schindler, C., Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E., Jr., Mui, A.L., Miyajima, A., Quelle, F.W., Ihle, J.N., and *et al.* (1995). Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics* 29, 225-228.

Cox, S.L., Stolp, J., Hallahan, N.L., Counotte, J., Zhang, W., Serreze, D.V., Basten, A., and Silveira, P.A. (2010). Enhanced responsiveness to T-cell help causes loss of B-lymphocyte tolerance to a beta-cell neo-self-antigen in type 1 diabetes prone NOD mice. *European journal of immunology* 40, 3413-3425.

Craighead, J.E., and McLane, M.F. (1968). Diabetes mellitus: induction in mice by encephalomyocarditis virus. *Science* *162*, 913-914.

Creusot, R.J., Yaghoubi, S.S., Kodama, K., Dang, D.N., Dang, V.H., Breckpot, K., Thielemans, K., Gambhir, S.S., and Fathman, C.G. (2008). Tissue-targeted therapy of autoimmune diabetes using dendritic cells transduced to express IL-4 in NOD mice. *Clin Immunol* *127*, 176-187.

Cui, Y., Riedlinger, G., Miyoshi, K., Tang, W., Li, C., Deng, C.X., Robinson, G.W., and Hennighausen, L. (2004). Inactivation of Stat5 in mouse mammary epithelium during pregnancy reveals distinct functions in cell proliferation, survival, and differentiation. *Molecular and cellular biology* *24*, 8037-8047.

D'Ambrosio, D., Cippitelli, M., Cocciolo, M.G., Mazzeo, D., Di Lucia, P., Lang, R., Sinigaglia, F., and Panina-Bordignon, P. (1998). Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *The Journal of clinical investigation* *101*, 252-262.

D'Angeli, M.A., Merzon, E., Valbuena, L.F., Tirschwell, D., Paris, C.A., and Mueller, B.A. (2010). Environmental factors associated with childhood-onset type 1 diabetes mellitus: an exploration of the hygiene and overload hypotheses. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* *164*, 732-738.

Dahlen, E., Dawe, K., Ohlsson, L., and Hedlund, G. (1998). Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *Journal of immunology* *160*, 3585-3593.

Dahlquist, G., Frisk, G., Ivarsson, S.A., Svanberg, L., Forsgren, M., and Diderholm, H. (1995). Indications that maternal coxsackie B virus infection during pregnancy is a risk factor for childhood-onset IDDM. *Diabetologia* *38*, 1371-1373.

Daugherty, R.L., and Gottardi, C.J. (2007). Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology* *22*, 303-309.

Davoodi-Semiromi, A., Laloraya, M., Kumar, G.P., Purohit, S., Jha, R.K., and She, J.X. (2004). A mutant Stat5b with weaker DNA binding affinity defines a key defective pathway in nonobese diabetic mice. *J Biol Chem* *279*, 11553-11561.

Davoodi-Semiromi, A., McDuffie, M., Litherland, S., and Clare-Salzler, M. (2007). Truncated pStat5B is associated with the Idd4 locus in NOD mice. *Biochem Biophys Res Commun* *356*, 655-661.

de Goffau, M.C., Luopajarvi, K., Knip, M., Ilonen, J., Ruohtula, T., Harkonen, T., Orivuori, L., Hakala, S., Welling, G.W., Harmsen, H.J., and Vaarala, O. (2013). Fecal microbiota composition differs between children with beta-cell autoimmunity and those without. *Diabetes* *62*, 1238-1244.

Debierre-Grockiego, F. (2004). Anti-apoptotic role of STAT5 in haematopoietic cells and in the pathogenesis of malignancies. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* *9*, 717-728.

Devaraj, S., Cheung, A.T., Jialal, I., Griffen, S.C., Nguyen, D., Glaser, N., and Aoki, T. (2007). Evidence of increased inflammation and microcirculatory abnormalities in patients with type 1 diabetes and their role in microvascular complications. *Diabetes* *56*, 2790-2796.

Dotta, F., Censini, S., van Halteren, A.G., Marselli, L., Masini, M., Dionisi, S., Mosca, F., Boggi, U., Muda, A.O., Del Prato, S., *et al.* (2007). Coxsackie B4 virus infection of beta cells

and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 5115-5120.

Doyle, H.A., and Mamula, M.J. (2001). Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends in immunology* *22*, 443-449.

Doyle, H.A., and Mamula, M.J. (2005). Posttranslational modifications of self-antigens. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1050*, 1-9.

Doyle, H.A., and Mamula, M.J. (2012). Autoantigenesis: the evolution of protein modifications in autoimmune disease. *Current opinion in immunology* *24*, 112-118.

Driver, J.P., Serreze, D.V., and Chen, Y.G. (2011). Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Seminars in immunopathology* *33*, 67-87.

Duan, G., and Walther, D. (2015). The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. *PLoS computational biology* *11*, e1004049.

Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumpheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.W., Park, C.G., *et al.* (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* *315*, 107-111.

Elfving, M., Svensson, J., Oikarinen, S., Jonsson, B., Olofsson, P., Sundkvist, G., Lindberg, B., Lernmark, A., Hyoty, H., and Ivarsson, S.A. (2008). Maternal enterovirus infection during pregnancy as a risk factor in offspring diagnosed with type 1 diabetes between 15 and 30 years of age. *Experimental diabetes research* *2008*, 271958.

Esashi, E., Wang, Y.H., Perng, O., Qin, X.F., Liu, Y.J., and Watowich, S.S. (2008). The signal transducer STAT5 inhibits plasmacytoid dendritic cell development by suppressing transcription factor IRF8. *Immunity* *28*, 509-520.

Faustman, D.L., Steinman, R.M., Gebel, H.M., Hauptfeld, V., Davie, J.M., and Lacy, P.E. (1984). Prevention of rejection of murine islet allografts by pretreatment with anti-dendritic cell antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *81*, 3864-3868.

Feili-Hariri, M., Falkner, D.H., Gambotto, A., Papworth, G.D., Watkins, S.C., Robbins, P.D., and Morel, P.A. (2003). Dendritic cells transduced to express interleukin-4 prevent diabetes in nonobese diabetic mice with advanced insulinitis. *Human gene therapy* *14*, 13-23.

Feili-Hariri, M., and Morel, P.A. (2001). Phenotypic and functional characteristics of BM-derived DC from NOD and non-diabetes-prone strains. *Clinical immunology* *98*, 133-142.

Feldman, G.M., Rosenthal, L.A., Liu, X., Hayes, M.P., Wynshaw-Boris, A., Leonard, W.J., Hennighausen, L., and Finbloom, D.S. (1997). STAT5A-deficient mice demonstrate a defect in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation and gene expression. *Blood* *90*, 1768-1776.

Filippi, C., and von Herrath, M. (2005). How viral infections affect the autoimmune process leading to type 1 diabetes. *Cellular immunology* *233*, 125-132.

Flemming, A. (2011). Diabetes: Mobilizing regulatory T cells against type 1 diabetes. *Nature reviews. Drug discovery* *10*, 657.

Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* *311*, 83-87.



Foulis, A.K., Farquharson, M.A., and Meager, A. (1987). Immunoreactive alpha-interferon in insulin-secreting beta cells in type 1 diabetes mellitus. *Lancet* 2, 1423-1427.

Garchon, H.J., Bedossa, P., Eloy, L., and Bach, J.F. (1991). Identification and mapping to chromosome 1 of a susceptibility locus for periinsulitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 353, 260-262.

Gaudreau, S., Guindi, C., Menard, M., Besin, G., Dupuis, G., and Amrani, A. (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents diabetes development in NOD mice by inducing tolerogenic dendritic cells that sustain the suppressive function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of immunology* 179, 3638-3647.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.

Gregori, S., Giarratana, N., Smiroldo, S., and Adorini, L. (2003). Dynamics of pathogenic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development. *Journal of immunology* 171, 4040-4047.

Grohmann, U., Fallarino, F., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2003). Tryptophan catabolism in nonobese diabetic mice. *Advances in experimental medicine and biology* 527, 47-54.

Hamilton-Williams, E.E., Palmer, S.E., Charlton, B., and Slattery, R.M. (2003). Beta cell MHC class I is a late requirement for diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6688-6693.

Hauer, A.D., Uyttenhove, C., de Vos, P., Stroobant, V., Renauld, J.C., van Berkel, T.J., van Snick, J., and Kuiper, J. (2005). Blockade of interleukin-12 function by protein vaccination attenuates atherosclerosis. *Circulation* 112, 1054-1062.

Hayward, A.R., and Shreiber, M. (1989). Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of insulinitis and diabetes. *Journal of immunology* 143, 1555-1559.

Hayward, A.R., and Shriber, M. (1992). Reduced incidence of insulinitis in NOD mice following anti-CD3 injection: requirement for neonatal injection. *Journal of autoimmunity* 5, 59-67.

Herold, K.C., Gitelman, S.E., Masharani, U., Hagopian, W., Bisikirska, B., Donaldson, D., Rother, K., Diamond, B., Harlan, D.M., and Bluestone, J.A. (2005). A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 54, 1763-1769.

Herold, K.C., Hagopian, W., Auger, J.A., Poumian-Ruiz, E., Taylor, L., Donaldson, D., Gitelman, S.E., Harlan, D.M., Xu, D., Zivin, R.A., and Bluestone, J.A. (2002). Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 346, 1692-1698.

Heuberger, J., and Birchmeier, W. (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a002915.

Honeyman, M.C., Coulson, B.S., Stone, N.L., Gellert, S.A., Goldwater, P.N., Steele, C.E., Couper, J.J., Tait, B.D., Colman, P.G., and Harrison, L.C. (2000). Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes* 49, 1319-1324.

Hong, S., Wilson, M.T., Serizawa, I., Wu, L., Singh, N., Naidenko, O.V., Miura, T., Haba, T., Scherer, D.C., Wei, J., *et al.* (2001). The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nature medicine* 7, 1052-1056.

Hori, S. (2014). Lineage stability and phenotypic plasticity of Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunological reviews* 259, 159-172.

Hu, C.Y., Rodriguez-Pinto, D., Du, W., Ahuja, A., Henegariu, O., Wong, F.S., Shlomchik, M.J., and Wen, L. (2007). Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *The Journal of clinical investigation* 117, 3857-3867.

Huber, A.H., Stewart, D.B., Laurents, D.V., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (2001). The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *The Journal of biological chemistry* 276, 12301-12309.

Hussain, S., and Delovitch, T.L. (2005). Dysregulated B7-1 and B7-2 expression on nonobese diabetic mouse B cells is associated with increased T cell costimulation and the development of insulinitis. *Journal of immunology* 174, 680-687.

Hutchings, P., Rosen, H., O'Reilly, L., Simpson, E., Gordon, S., and Cooke, A. (1990). Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages. *Nature* 348, 639-642.

Hutchings, P.R., and Cooke, A. (1990). The transfer of autoimmune diabetes in NOD mice can be inhibited or accelerated by distinct cell populations present in normal splenocytes taken from young males. *Journal of autoimmunity* 3, 175-185.

Hyoty, H., Hiltunen, M., Knip, M., Laakkonen, M., Vahasalo, P., Karjalainen, J., Koskela, P., Roivainen, M., Leinikki, P., Hovi, T., and *et al.* (1995). A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes* 44, 652-657.

Imada, K., Bloom, E.T., Nakajima, H., Horvath-Arcidiacono, J.A., Udy, G.B., Davey, H.W., and Leonard, W.J. (1998). Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. *The Journal of experimental medicine* 188, 2067-2074.

Ito, T., Yang, M., Wang, Y.H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O.A., Qin, X.F., Liu, Y.J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *The Journal of experimental medicine* 204, 105-115.

Jacob, C.O., Aiso, S., Michie, S.A., McDevitt, H.O., and Acha-Orbea, H. (1990). Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF-alpha and interleukin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 968-972.

Jaeckel, E., Mpofu, N., Saal, N., and Manns, M.P. (2008). Role of regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 40, 126-136.

Jayasimhan, A., Mansour, K.P., and Slattery, R.M. (2014). Advances in our understanding of the pathophysiology of Type 1 diabetes: lessons from the NOD mouse. *Clinical science* 126, 1-18.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Steinbrink, K., and Enk, A.H. (2001). Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends in immunology* 22, 394-400.

Kagami, S., Nakajima, H., Kumano, K., Suzuki, K., Suto, A., Imada, K., Davey, H.W., Saito, Y., Takatsu, K., Leonard, W.J., and Iwamoto, I. (2000). Both *stat5a* and *stat5b* are required for antigen-induced eosinophil and T-cell recruitment into the tissue. *Blood* 95, 1370-1377.

Kanai, T., Seki, S., Jenks, J.A., Kohli, A., Kawli, T., Martin, D.P., Snyder, M., Bacchetta, R., and Nadeau, K.C. (2014). Identification of STAT5A and STAT5B target genes in human T cells. *PloS one* 9, e86790.

Kaprio, J., Tuomilehto, J., Koskenvuo, M., Romanov, K., Reunanen, A., Eriksson, J., Stengard, J., and Kesaniemi, Y.A. (1992). Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia* 35, 1060-1067.

Kared, H., Masson, A., Adle-Biassette, H., Bach, J.F., Chatenoud, L., and Zavala, F. (2005). Treatment with granulocyte colony-stimulating factor prevents diabetes in NOD mice by recruiting plasmacytoid dendritic cells and functional CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells. *Diabetes* 54, 78-84.

Karjalainen, J., Martin, J.M., Knip, M., Ilonen, J., Robinson, B.H., Savilahti, E., Akerblom, H.K., and Dosch, H.M. (1992). A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 327, 302-307.

Kasuga, A., Harada, R., and Saruta, T. (1996). Insulin-dependent diabetes mellitus associated with parvovirus B19 infection. *Annals of internal medicine* 125, 700-701.

Kaufman, D.L., Erlander, M.G., Clare-Salzler, M., Atkinson, M.A., Maclaren, N.K., and Tobin, A.J. (1992). Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* 89, 283-292.

Keymeulen, B., Vandemeulebroucke, E., Ziegler, A.G., Mathieu, C., Kaufman, L., Hale, G., Gorus, F., Goldman, M., Walter, M., Candon, S., *et al.* (2005). Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *The New England journal of medicine* 352, 2598-2608.

Kikutani, H., and Makino, S. (1992). The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Advances in immunology* 51, 285-322.

Kim, S.H., Kim, S., Oligino, T.J., and Robbins, P.D. (2002). Effective treatment of established mouse collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express FasL. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 6, 584-590.

Kinnebrew, M.A., Buffie, C.G., Diehl, G.E., Zenewicz, L.A., Leiner, I., Hohl, T.M., Flavell, R.A., Littman, D.R., and Pamer, E.G. (2012). Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity* 36, 276-287.

Knip, M., and Simell, O. (2012). Environmental triggers of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2, a007690.

Knip, M., Veijola, R., Virtanen, S.M., Hyoty, H., Vaarala, O., and Akerblom, H.K. (2005). Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes* 54 Suppl 2, S125-136.

Kodama, S., Davis, M., and Faustman, D.L. (2005). The therapeutic potential of tumor necrosis factor for autoimmune disease: a mechanistically based hypothesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 1850-1862.

Kriegel, M.A., Sefik, E., Hill, J.A., Wu, H.J., Benoist, C., and Mathis, D. (2011). Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 11548-11553.

Kukreja, A., Cost, G., Marker, J., Zhang, C., Sun, Z., Lin-Su, K., Ten, S., Sanz, M., Exley, M., Wilson, B., *et al.* (2002). Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *The Journal of clinical investigation* *109*, 131-140.

Lacy, P.E., Davie, J.M., and Finke, E.H. (1979). Prolongation of islet allograft survival following in vitro culture (24 degrees C) and a single injection of ALS. *Science* *204*, 312-313.

Lee, L.F., Xu, B., Michie, S.A., Beilhack, G.F., Warganich, T., Turley, S., and McDevitt, H.O. (2005). The role of TNF-alpha in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: analysis of dendritic cell maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 15995-16000.

Lehuen, A., Diana, J., Zacccone, P., and Cooke, A. (2010). Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nature reviews. Immunology* *10*, 501-513.

Lempainen, J., Vaarala, O., Makela, M., Veijola, R., Simell, O., Knip, M., Hermann, R., and Ilonen, J. (2009). Interplay between PTPN22 C1858T polymorphism and cow's milk formula exposure in type 1 diabetes. *Journal of autoimmunity* *33*, 155-164.

Leonard, W.J., and O'Shea, J.J. (1998). Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* *16*, 293-322.

Levy, D.E., and Darnell, J.E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 651-662.

Levy, D.E., and Marie, I.J. (2012). STATus report on tetramers. *Immunity* *36*, 553-555.

Li, Q., Zhang, W., Miljanic, O.S., Sue, C.H., Zhao, Y.L., Liu, L., Knobler, C.B., Stoddart, J.F., and Yaghi, O.M. (2009). Docking in metal-organic frameworks. *Science* *325*, 855-859.

Liao, W., Schones, D.E., Oh, J., Cui, Y., Cui, K., Roh, T.Y., Zhao, K., and Leonard, W.J. (2008). Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. *Nature immunology* *9*, 1288-1296.

Lim, D.S., Kang, M.S., Jeong, J.A., and Bae, Y.S. (2009). Semi-mature DC are immunogenic and not tolerogenic when inoculated at a high dose in collagen-induced arthritis mice. *European journal of immunology* *39*, 1334-1343.

Lin, J.X., Li, P., Liu, D., Jin, H.T., He, J., Ata Ur Rasheed, M., Rochman, Y., Wang, L., Cui, K., Liu, C., *et al.* (2012). Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function. *Immunity* *36*, 586-599.

Lindley, S., Dayan, C.M., Bishop, A., Roep, B.O., Peakman, M., and Tree, T.I. (2005). Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* *54*, 92-99.

Liu, S., Wang, H., Jin, Y., Podolsky, R., Reddy, M.V., Pedersen, J., Bode, B., Reed, J., Steed, D., Anderson, S., *et al.* (2009). IFIH1 polymorphisms are significantly associated with type 1 diabetes and IFIH1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *Human molecular genetics* *18*, 358-365.

Liu, X., Robinson, G.W., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., and Hennighausen, L. (1997). Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes & development* *11*, 179-186.

Lowe, C.E., Cooper, J.D., Brusko, T., Walker, N.M., Smyth, D.J., Bailey, R., Bourget, K., Plagnol, V., Field, S., Atkinson, M., *et al.* (2007). Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nature genetics* 39, 1074-1082.

Ludewig, B., Junt, T., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2001). Dendritic cells in autoimmune diseases. *Current opinion in immunology* 13, 657-662.

Ludvigsson, J., Kriskey, D., Casas, R., Battelino, T., Castano, L., Greening, J., Kordonouri, O., Otonkoski, T., Pozzilli, P., Robert, J.J., *et al.* (2012). GAD65 antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 366, 433-442.

Lutz, M.B. (2012). Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction. *Frontiers in immunology* 3, 123.

Lyons, P.A., Armitage, N., Argentina, F., Denny, P., Hill, N.J., Lord, C.J., Wilusz, M.B., Peterson, L.B., Wicker, L.S., and Todd, J.A. (2000). Congenic mapping of the type 1 diabetes locus, *Idd3*, to a 780-kb region of mouse chromosome 3: identification of a candidate segment of ancestral DNA by haplotype mapping. *Genome research* 10, 446-453.

MacFarlane, A.J., Burghardt, K.M., Kelly, J., Simell, T., Simell, O., Altosaar, I., and Scott, F.W. (2003). A type 1 diabetes-related protein from wheat (*Triticum aestivum*). cDNA clone of a wheat storage globulin, *Glb1*, linked to islet damage. *The Journal of biological chemistry* 278, 54-63.

Malin, S., McManus, S., Cobaleda, C., Novatchkova, M., Delogu, A., Bouillet, P., Strasser, A., and Busslinger, M. (2010). Role of STAT5 in controlling cell survival and immunoglobulin gene recombination during pro-B cell development. *Nature immunology* 11, 171-179.

Marek-Trzonkowska, N., Mysliwiec, M., Dobyszyk, A., Grabowska, M., Techmanska, I., Juscinska, J., Wujtewicz, M.A., Witkowski, P., Mlynarski, W., Balcerska, A., *et al.* (2012). Administration of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-</sup> regulatory T cells preserves beta-cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes care* 35, 1817-1820.

Marjamaki, L., Niinisto, S., Kenward, M.G., Uusitalo, L., Uusitalo, U., Ovaskainen, M.L., Kronberg-Kippila, C., Simell, O., Veijola, R., Ilonen, J., *et al.* (2010). Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of advanced beta cell autoimmunity and type 1 diabetes in offspring. *Diabetologia* 53, 1599-1607.

Marleau, A.M., Summers, K.L., and Singh, B. (2008). Differential contributions of APC subsets to T cell activation in nonobese diabetic mice. *Journal of immunology* 180, 5235-5249.

Mathieu, C., Waer, M., Laureys, J., Rutgeerts, O., and Bouillon, R. (1994). Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Diabetologia* 37, 552-558.

Matta, B.M., Raimondi, G., Rosborough, B.R., Sumpter, T.L., and Thomson, A.W. (2012). IL-27 production and STAT3-dependent upregulation of B7-H1 mediate immune regulatory functions of liver plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology* 188, 5227-5237.

McDuffie, M. (2000). Derivation of diabetes-resistant congenic lines from the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol* 96, 119-130.

Morel, P.A. (2013). Dendritic cell subsets in type 1 diabetes: friend or foe? *Frontiers in immunology* 4, 415.

Morel, P.A., Feili-Hariri, M., Coates, P.T., and Thomson, A.W. (2003). Dendritic cells, T cell tolerance and therapy of adverse immune reactions. *Clinical and experimental immunology* 133, 1-10.

Morel, P.A., and Turner, M.S. (2011). Dendritic cells and the maintenance of self-tolerance. *Immunologic research* 50, 124-129.

Morelli, A.E., and Thomson, A.W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature reviews. Immunology* 7, 610-621.

Moriggl, R., Topham, D.J., Teglund, S., Sexl, V., McKay, C., Wang, D., Hoffmeyer, A., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Bunting, K.D., *et al.* (1999). Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity* 10, 249-259.

Murri, M., Leiva, I., Gomez-Zumaquero, J.M., Tinahones, F.J., Cardona, F., Soriguer, F., and Queipo-Ortuno, M.I. (2013). Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC medicine* 11, 46.

Nejentsev, S., Smink, L.J., Smyth, D., Bailey, R., Lowe, C.E., Payne, F., Masters, J., Godfrey, L., Lam, A., Burren, O., *et al.* (2007). Sequencing and association analysis of the type 1 diabetes-linked region on chromosome 10p12-q11. *BMC genetics* 8, 24.

Nejentsev, S., Walker, N., Riches, D., Egholm, M., and Todd, J.A. (2009). Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* 324, 387-389.

Nikolic, T., Bouma, G., Drexhage, H.A., and Leenen, P.J. (2005). Diabetes-prone NOD mice show an expanded subpopulation of mature circulating monocytes, which preferentially develop into macrophage-like cells in vitro. *Journal of leukocyte biology* 78, 70-79.

Nikolic, T., Bunk, M., Drexhage, H.A., and Leenen, P.J. (2004). Bone marrow precursors of nonobese diabetic mice develop into defective macrophage-like dendritic cells in vitro. *Journal of immunology* 173, 4342-4351.

Nussenzweig, M.C., Steinman, R.M., Unkeless, J.C., Witmer, M.D., Gutchinov, B., and Cohn, Z.A. (1981). Studies of the cell surface of mouse dendritic cells and other leukocytes. *The Journal of experimental medicine* 154, 168-187.

Nussenzweig, M.C., Steinman, R.M., Witmer, M.D., and Gutchinov, B. (1982). A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 161-165.

O'Brien, B.A., Huang, Y., Geng, X., Dutz, J.P., and Finegood, D.T. (2002). Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages from NOD mice is reduced. *Diabetes* 51, 2481-2488.

Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S.B., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., and Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 206, 549-559.

Oldstone, M.B. (1987). Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50, 819-820.

Oldstone, M.B. (1988). Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection. *Science* 239, 500-502.

Pak, C.Y., Eun, H.M., McArthur, R.G., and Yoon, J.W. (1988). Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* 2, 1-4.

Pallotta, M.T., Orabona, C., Bianchi, R., Vacca, C., Fallarino, F., Belladonna, M.L., Volpi, C., Mondanelli, G., Gargaro, M., Allegrucci, M., *et al.* (2014). Forced IDO1 expression in dendritic cells restores immunoregulatory signalling in autoimmune diabetes. *Journal of cellular and molecular medicine* 18, 2082-2091.

Panigrahi, A.K., Goodman, N.G., Eisenberg, R.A., Rickels, M.R., Naji, A., and Luning Prak, E.T. (2008). RS rearrangement frequency as a marker of receptor editing in lupus and type 1 diabetes. *The Journal of experimental medicine* 205, 2985-2994.

Paukku, K., and Silvennoinen, O. (2004). STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 435-455.

Peng, H., and Hagopian, W. (2006). Environmental factors in the development of Type 1 diabetes. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 7, 149-162.

Pescovitz, M.D., Greenbaum, C.J., Krause-Steinrauf, H., Becker, D.J., Gitelman, S.E., Goland, R., Gottlieb, P.A., Marks, J.B., McGee, P.F., Moran, A.M., *et al.* (2009). Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *The New England journal of medicine* 361, 2143-2152.

Phillips, J.M., Parish, N.M., Raine, T., Bland, C., Sawyer, Y., De La Pena, H., and Cooke, A. (2009). Type 1 diabetes development requires both CD4+ and CD8+ T cells and can be reversed by non-depleting antibodies targeting both T cell populations. *The review of diabetic studies : RDS* 6, 97-103.

Pinkse, G.G., Tysma, O.H., Bergen, C.A., Kester, M.G., Ossendorp, F., van Veelen, P.A., Keymeulen, B., Pipeleers, D., Drijfhout, J.W., and Roep, B.O. (2005). Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18425-18430.

Poligone, B., Weaver, D.J., Jr., Sen, P., Baldwin, A.S., Jr., and Tisch, R. (2002). Elevated NF-kappaB activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function. *Journal of immunology* 168, 188-196.

Pothoven, K.L., Kheradmand, T., Yang, Q., Houlihan, J.L., Zhang, H., Degutes, M., Miller, S.D., and Luo, X. (2010). Rapamycin-conditioned donor dendritic cells differentiate CD4CD25Foxp3 T cells in vitro with TGF-beta1 for islet transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10, 1774-1784.

Prasad, S.J., and Goodnow, C.C. (2002). Intrinsic in vitro abnormalities in dendritic cell generation caused by non-MHC non-obese diabetic genes. *Immunology and cell biology* 80, 198-206.

Puccetti, P., and Fallarino, F. (2008). Generation of T cell regulatory activity by plasmacytoid dendritic cells and tryptophan catabolism. *Blood cells, molecules & diseases* 40, 101-105.

Putnam, A.L., Vendrame, F., Dotta, F., and Gottlieb, P.A. (2005). CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *Journal of autoimmunity* 24, 55-62.

Ramiya, V.K., Shang, X.Z., Wasserfall, C.H., and Maclaren, N.K. (1997). Effect of oral and intravenous insulin and glutamic acid decarboxylase in NOD mice. *Autoimmunity* 26, 139-151.

Randolph, G.J., Beaulieu, S., Pope, M., Sugawara, I., Hoffman, L., Steinman, R.M., and Muller, W.A. (1998). A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the

migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6924-6929.

Reizis, B. (2010). Regulation of plasmacytoid dendritic cell development. *Current opinion in immunology* 22, 206-211.

Robles, D.T., Eisenbarth, G.S., Wang, T., Erlich, H.A., Bugawan, T.L., Babu, S.R., Barriga, K., Norris, J.M., Hoffman, M., Klingensmith, G., *et al.* (2002). Millennium award recipient contribution. Identification of children with early onset and high incidence of anti-islet autoantibodies. *Clinical immunology* 102, 217-224.

Rochman, Y., Kashyap, M., Robinson, G.W., Sakamoto, K., Gomez-Rodriguez, J., Wagner, K.U., and Leonard, W.J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19455-19460.

Roep, B.O., Solvason, N., Gottlieb, P.A., Abreu, J.R., Harrison, L.C., Eisenbarth, G.S., Yu, L., Leviten, M., Hagopian, W.A., Buse, J.B., *et al.* (2013). Plasmid-encoded proinsulin preserves C-peptide while specifically reducing proinsulin-specific CD8(+) T cells in type 1 diabetes. *Science translational medicine* 5, 191ra182.

Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J.A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431-440.

Saunders, K.A., Raine, T., Cooke, A., and Lawrence, C.E. (2007). Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. *Infection and immunity* 75, 397-407.

Serreze, D.V., Chapman, H.D., Varnum, D.S., Hanson, M.S., Reifsnyder, P.C., Richard, S.D., Fleming, S.A., Leiter, E.H., and Shultz, L.D. (1996). 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. *The Journal of experimental medicine* 184, 2049-2053.

Sharif, S., Arreaza, G.A., Zucker, P., Mi, Q.S., Sondhi, J., Naidenko, O.V., Kronenberg, M., Koezuka, Y., Delovitch, T.L., Gombert, J.M., *et al.* (2001). Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nature medicine* 7, 1057-1062.

Shoda, L.K., Young, D.L., Ramanujan, S., Whiting, C.C., Atkinson, M.A., Bluestone, J.A., Eisenbarth, G.S., Mathis, D., Rossini, A.A., Campbell, S.E., *et al.* (2005). A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation. *Immunity* 23, 115-126.

Shortman, K., and Liu, Y.J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature reviews. Immunology* 2, 151-161.

Silveira, P.A., Dombrowsky, J., Johnson, E., Chapman, H.D., Nemazee, D., and Serreze, D.V. (2004). B cell selection defects underlie the development of diabetogenic APCs in nonobese diabetic mice. *Journal of immunology* 172, 5086-5094.

Simoncic, P.D., Lee-Loy, A., Barber, D.L., Tremblay, M.L., and McGlade, C.J. (2002). The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. *Curr Biol* 12, 446-453.

Simoni, Y., Diana, J., Ghazarian, L., Beaudoin, L., and Lehuen, A. (2013). Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality? *Clinical and experimental immunology* 171, 8-19.



Snow, J.W., Abraham, N., Ma, M.C., Herndier, B.G., Pastuszak, A.W., and Goldsmith, M.A. (2003). Loss of tolerance and autoimmunity affecting multiple organs in STAT5A/5B-deficient mice. *J Immunol* 171, 5042-5050.

Socolovsky, M., Fallon, A.E., Wang, S., Brugnara, C., and Lodish, H.F. (1999). Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a<sup>-/-</sup>5b<sup>-/-</sup> mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 98, 181-191.

Steck, A.K., Johnson, K., Barriga, K.J., Miao, D., Yu, L., Hutton, J.C., Eisenbarth, G.S., and Rewers, M.J. (2011). 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* 34, 1397-1399.

Steptoe, R.J., Ritchie, J.M., and Harrison, L.C. (2002). Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice. *Journal of immunology* 168, 5032-5041.

Stoop, J.N., Robinson, J.H., and Hilkens, C.M. (2011). Developing tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: what can we learn from mouse models? *Annals of the rheumatic diseases* 70, 1526-1533.

Stumpfova, Z., Hezova, R., Meli, A.C., Slaby, O., and Michalek, J. (2014). MicroRNA profiling of activated and tolerogenic human dendritic cells. *Mediators of inflammation* 2014, 259689.

Tang, Q., and Bluestone, J.A. (2008). The Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature immunology* 9, 239-244.

Tang, Q., Henriksen, K.J., Bi, M., Finger, E.B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E.L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., and Bluestone, J.A. (2004). In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *The Journal of experimental medicine* 199, 1455-1465.

Tarbell, K.V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P., and Steinman, R.M. (2004). CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *The Journal of experimental medicine* 199, 1467-1477.

Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., and Ihle, J.N. (1998). Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93, 841-850.

Thayer, T.C., Wilson, S.B., and Mathews, C.E. (2010). Use of nonobese diabetic mice to understand human type 1 diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 39, 541-561.

Thomson, A.W., and Robbins, P.D. (2008). Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation. *Annals of the rheumatic diseases* 67 Suppl 3, iii90-96.

Tracy, S., Drescher, K.M., and Chapman, N.M. (2011). Enteroviruses and type 1 diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews* 27, 820-823.

Tracy, S., Drescher, K.M., Chapman, N.M., Kim, K.S., Carson, S.D., Pirruccello, S., Lane, P.H., Romero, J.R., and Leser, J.S. (2002). Toward testing the hypothesis that group B coxsackieviruses (CVB) trigger insulin-dependent diabetes: inoculating nonobese diabetic mice with CVB markedly lowers diabetes incidence. *Journal of virology* 76, 12097-12111.

Tritt, M., Sgouroudis, E., d'Hennezel, E., Albanese, A., and Piccirillo, C.A. (2008). Functional waning of naturally occurring CD4+ regulatory T-cells contributes to the onset of autoimmune diabetes. *Diabetes* 57, 113-123.

Trudeau, J.D., Dutz, J.P., Arany, E., Hill, D.J., Fieldus, W.E., and Finegood, D.T. (2000). Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes* 49, 1-7.

Turley, S., Poirot, L., Hattori, M., Benoist, C., and Mathis, D. (2003). Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *The Journal of experimental medicine* 198, 1527-1537.

Turnquist, H.R., Raimondi, G., Zahorchak, A.F., Fischer, R.T., Wang, Z., and Thomson, A.W. (2007). Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *Journal of immunology* 178, 7018-7031.

Udy, G.B., Towers, R.P., Snell, R.G., Wilkins, R.J., Park, S.H., Ram, P.A., Waxman, D.J., and Davey, H.W. (1997). Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7239-7244.

Ueda, H., Howson, J.M., Esposito, L., Heward, J., Snook, H., Chamberlain, G., Rainbow, D.B., Hunter, K.M., Smith, A.N., Di Genova, G., *et al.* (2003). Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423, 506-511.

Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspod, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J.W., Pascual, V., *et al.* (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunological reviews* 219, 118-142.

Uno, S., Imagawa, A., Okita, K., Sayama, K., Moriwaki, M., Iwahashi, H., Yamagata, K., Tamura, S., Matsuzawa, Y., Hanafusa, T., *et al.* (2007). Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* 50, 596-601.

Valencia, J., Hernandez-Lopez, C., Martinez, V.G., Hidalgo, L., Zapata, A.G., Vicente, A., Varas, A., and Sacedon, R. (2011). Wnt5a skews dendritic cell differentiation to an unconventional phenotype with tolerogenic features. *Journal of immunology* 187, 4129-4139.

van Belle, T.L., Coppieters, K.T., and von Herrath, M.G. (2011). Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiological reviews* 91, 79-118.

van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J.F., Kruize, Y.C., Schmitz, M., Kurt-Jones, E.A., Espevik, T., de Jong, E.C., Kapsenberg, M.L., Golenbock, D.T., *et al.* (2002). A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *The Journal of biological chemistry* 277, 48122-48129.

Vella, A., Cooper, J.D., Lowe, C.E., Walker, N., Nutland, S., Widmer, B., Jones, R., Ring, S.M., McArdle, W., Pembrey, M.E., *et al.* (2005). Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *American journal of human genetics* 76, 773-779.

Villarino, A., Laurence, A., Robinson, G.W., Bonelli, M., Dema, B., Afzali, B., Shih, H.Y., Sun, H.W., Brooks, S.R., Hennighausen, L., *et al.* (2016). Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) paralog dose governs T cell effector and regulatory functions. *eLife* 5.

Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *Journal of immunology* *164*, 2978-2986.

Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *Journal of immunology* *159*, 565-573.

Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Guernonprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., Shengelia, T., Yao, K., and Nussenzweig, M. (2008). The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nature immunology* *9*, 676-683.

Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., and Mak, T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science* *270*, 985-988.

Wen, L., Ley, R.E., Volchkov, P.Y., Stranges, P.B., Avanesyan, L., Stonebraker, A.C., Hu, C., Wong, F.S., Szot, G.L., Bluestone, J.A., *et al.* (2008). Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* *455*, 1109-1113.

Wicker, L.S., Chamberlain, G., Hunter, K., Rainbow, D., Howlett, S., Tiffen, P., Clark, J., Gonzalez-Munoz, A., Cumiskey, A.M., Rosa, R.L., *et al.* (2004). Fine mapping, gene content, comparative sequencing, and expression analyses support Ctl4 and Nramp1 as candidates for Idd5.1 and Idd5.2 in the nonobese diabetic mouse. *Journal of immunology* *173*, 164-173.

Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., *et al.* (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature genetics* *27*, 18-20.

Wu, J., Katrekar, A., Honigberg, L.A., Smith, A.M., Conn, M.T., Tang, J., Jeffery, D., Mortara, K., Sampang, J., Williams, S.R., *et al.* (2006). Identification of substrates of human protein-tyrosine phosphatase PTPN22. *The Journal of biological chemistry* *281*, 11002-11010.

Xing, Y., and Hogquist, K.A. (2012). T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *4*.

Xiu, Y., Wong, C.P., Bouaziz, J.D., Hamaguchi, Y., Wang, Y., Pop, S.M., Tisch, R.M., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions. *Journal of immunology* *180*, 2863-2875.

Xu, P., Wu, Y., Zhu, Y., Dagne, G., Johnson, G., Cuthbertson, D., Krischer, J.P., Sosenko, J.M., Skyler, J.S., and Diabetes Prevention Trial-Type 1 Study, G. (2010). Prognostic performance of metabolic indexes in predicting onset of type 1 diabetes. *Diabetes care* *33*, 2508-2513.

Yamaji, D., Kang, K., Robinson, G.W., and Hennighausen, L. (2013). Sequential activation of genetic programs in mouse mammary epithelium during pregnancy depends on STAT5A/B concentration. *Nucleic acids research* *41*, 1622-1636.

Yao, Z., Kanno, Y., Kerenyi, M., Stephens, G., Durant, L., Watford, W.T., Laurence, A., Robinson, G.W., Shevach, E.M., Moriggl, R., *et al.* (2007). Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* *109*, 4368-4375.

Yarilin, D., Duan, R., Huang, Y.M., and Xiao, B.G. (2002). Dendritic cells exposed in vitro to TGF-beta1 ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis. *Clinical and experimental immunology* 127, 214-219.

Yeung, W.C., Rawlinson, W.D., and Craig, M.E. (2011). Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *Bmj* 342, d35.

Yoon, J.W., Austin, M., Onodera, T., and Notkins, A.L. (1979). Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *The New England journal of medicine* 300, 1173-1179.

You, S., Belghith, M., Cobbold, S., Alyanakian, M.A., Gouarin, C., Barriot, S., Garcia, C., Waldmann, H., Bach, J.F., and Chatenoud, L. (2005). Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells. *Diabetes* 54, 1415-1422.

Zhang, S., Fukuda, S., Lee, Y., Hangoc, G., Cooper, S., Spolski, R., Leonard, W.J., and Broxmeyer, H.E. (2000). Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *The Journal of experimental medicine* 192, 719-728.

Zheng, J., Jiang, H.Y., Li, J., Tang, H.C., Zhang, X.M., Wang, X.R., Du, J.T., Li, H.B., and Xu, G. (2012). MicroRNA-23b promotes tolerogenic properties of dendritic cells in vitro through inhibiting Notch1/NF-kappaB signalling pathways. *Allergy* 67, 362-370.

Zheng, P., and Kissler, S. (2013). PTPN22 silencing in the NOD model indicates the type 1 diabetes-associated allele is not a loss-of-function variant. *Diabetes* 62, 896-904.

Zhu, B., Buttrick, T., Bassil, R., Zhu, C., Olah, M., Wu, C., Xiao, S., Orent, W., Elyaman, W., and Khoury, S.J. (2013). IL-4 and retinoic acid synergistically induce regulatory dendritic cells expressing Aldh1a2. *Journal of immunology* 191, 3139-3151.

Zhu, H., Qiu, W., Lei, P., Zhou, W., Wen, X., He, F., Li, L., Dai, H., Shen, G., and Gong, F. (2008). IL-10 gene modified dendritic cells inhibit T helper type 1-mediated alloimmune responses and promote immunological tolerance in diabetes. *Cellular & molecular immunology* 5, 41-46.

Zhu, J., Cote-Sierra, J., Guo, L., and Paul, W.E. (2003). Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* 19, 739-748.

Ziegler, A.G., Rewers, M., Simell, O., Simell, T., Lempainen, J., Steck, A., Winkler, C., Ilonen, J., Veijola, R., Knip, M., *et al.* (2013). Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *Jama* 309, 2473-2479.

Adorini, L. (2003). "Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes." *Ann N Y Acad Sci* 987: 258-261.

Albert, L. J. and R. D. Inman (1999). "Molecular mimicry and autoimmunity." *N Engl J Med* 341(27): 2068-2074.

Alexander, A. M., Crawford, S., Bertera, W. A., Rudert, O., Takikawa, P. D., Robbins and M. Trucco (2002). "Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes." *Diabetes* 51(2): 356-365.

Alleva, D. G., R. P. Pavlovich, C. Grant, S. B. Kaser and D. I. Beller (2000). "Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone

mouse strains: elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor-alpha and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice." *Diabetes* **49**(7): 1106-1115.

Anderson, M. S. and J. A. Bluestone (2005). "The NOD mouse: a model of immune dysregulation." *Annu Rev Immunol* **23**: 447-485.

Anderton, S. M. (2004). "Post-translational modifications of self antigens: implications for autoimmunity." *Curr Opin Immunol* **16**(6): 753-758.

Antov, A., L. Yang, M. Vig, D. Baltimore and L. Van Parijs (2003). "Essential role for STAT5 signaling in CD25+CD4+ regulatory T cell homeostasis and the maintenance of self-tolerance." *J Immunol* **171**(7): 3435-3441.

Arnush, M., M. R. Heitmeier, A. L. Scarim, M. H. Marino, P. T. Manning and J. A. Corbett (1998). "IL-1 produced and released endogenously within human islets inhibits beta cell function." *J Clin Invest* **102**(3): 516-526.

Atkinson, M. A. (2005). "ADA Outstanding Scientific Achievement Lecture 2004. Thirty years of investigating the autoimmune basis for type 1 diabetes: why can't we prevent or reverse this disease?" *Diabetes* **54**(5): 1253-1263.

Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.

Bar-On, L., T. Birnberg, K. W. Kim and S. Jung (2011). "Dendritic cell-restricted CD80/86 deficiency results in peripheral regulatory T-cell reduction but is not associated with lymphocyte hyperactivation." *Eur J Immunol* **41**(2): 291-298.

Barker, J. M. (2006). "Clinical review: Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening." *J Clin Endocrinol Metab* **91**(4): 1210-1217.

Barnett, A. H., C. Eff, R. D. Leslie and D. A. Pyke (1981). "Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs." *Diabetologia* **20**(2): 87-93.

Basham, B., M. Sathe, J. Grein, T. McClanahan, A. D'Andrea, E. Lees and A. Rascole (2008). "In vivo identification of novel STAT5 target genes." *Nucleic Acids Res* **36**(11): 3802-3818.

Baumgartner, C., S. Cerny-Reiterer, K. Sonneck, M. Mayerhofer, K. V. Gleixner, R. Fritz, M. Kerényi, C. Boudot, F. Gouilleux, J. W. Kornfeld, C. Sillaber, R. Moriggl and P. Valent (2009). "Expression of activated STAT5 in neoplastic mast cells in systemic mastocytosis: subcellular distribution and role of the transforming oncoprotein KIT D816V." *Am J Pathol* **175**(6): 2416-2429.

Baxter, A. G. and T. E. Mandel (1991). "Hemolytic anemia in non-obese diabetic mice." *Eur J Immunol* **21**(9): 2051-2055.

Beck, S. M., M. B. Malay, D. J. Gagne, D. L. Fowler and R. J. Landreneau (2011). "Experimental model of laparoscopic gastric ischemic preconditioning prior to transhiatal esophagectomy." *Surg Endosc* **25**(8): 2470-2477.

Bell, B. D., M. Kitajima, R. P. Larson, T. A. Stoklasek, K. Dang, K. Sakamoto, K. U. Wagner, D. H. Kaplan, B. Reizis, L. Hennighausen and S. F. Ziegler (2013). "The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses." *Nat Immunol* **14**(4): 364-371.

Bell, G. I., S. Horita and J. H. Karam (1984). "A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus." *Diabetes* **33**(2): 176-183.

Bending, D., P. Zacccone and A. Cooke (2012). "Inflammation and type one diabetes." *Int Immunol* **24**(6): 339-346.

Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance and H. D. Ochs (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." *Nat Genet* **27**(1): 20-21.

Berzins, S. P., E. S. Venanzi, C. Benoist and D. Mathis (2003). "T-cell compartments of prediabetic NOD mice." *Diabetes* **52**(2): 327-334.

Besin, G., S. Gaudreau, M. Menard, C. Guindi, G. Dupuis and A. Amrani (2008). "Thymic stromal lymphopoietin and thymic stromal lymphopoietin-conditioned dendritic cells induce regulatory T-cell differentiation and protection of NOD mice against diabetes." *Diabetes* **57**(8): 2107-2117.

Besin, G., S. Gaudreau, M. Menard, C. Guindi, G. Dupuis and A. Amrani (2008). "TSLP and TSLP-conditioned dendritic cells induce Treg differentiation and protection of NOD mice against diabetes." *Diabetes*.

Bettini, M. and D. A. Vignali (2011). "T cell-driven initiation and propagation of autoimmune diabetes." *Curr Opin Immunol* **23**(6): 754-760.

Boitard, C. (2012). "Pancreatic islet autoimmunity." *Presse Med* **41**(12 P 2): e636-650.

Boks, M. A., J. R. Kager-Groenland, M. S. Haasjes, J. J. Zwaginga, S. M. van Ham and A. ten Brinke (2012). "IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC." *Clin Immunol* **142**(3): 332-342.

Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig and R. M. Steinman (2002). "Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance." *J Exp Med* **196**(12): 1627-1638.

Bontkes, H. J., J. J. Ruizendaal, D. Kramer, S. J. Santegoets, R. J. Scheper, T. D. de Gruijl, C. J. Meijer and E. Hooijberg (2006). "Constitutively active STAT5b induces cytokine-independent growth of the acute myeloid leukemia-derived MUTZ-3 cell line and accelerates its differentiation into mature dendritic cells." *J Immunother* **29**(2): 188-200.

Boudaly, S., J. Morin, R. Berthier, P. Marche and C. Boitard (2002). "Altered dendritic cells (DC) might be responsible for regulatory T cell imbalance and autoimmunity in nonobese diabetic (NOD) mice." *Eur Cytokine Netw* **13**(1): 29-37.

Brand, O. J., C. E. Lowe, J. M. Heward, J. A. Franklyn, J. D. Cooper, J. A. Todd and S. C. Gough (2007). "Association of the interleukin-2 receptor alpha (IL-2Ralpha)/CD25 gene region with Graves' disease using a multilocus test and tag SNPs." *Clin Endocrinol (Oxf)* **66**(4): 508-512.

Brusko, T. and M. Atkinson (2007). "Treg in type 1 diabetes." *Cell Biochem Biophys* **48**(2-3): 165-175.

Brusko, T. M., M. A. Hulme, C. B. Myhr, M. J. Haller and M. A. Atkinson (2007). "Assessing the in vitro suppressive capacity of regulatory T cells." *Immunol Invest* **36**(5-6): 607-628.

Brusko, T. M., C. H. Wasserfall, M. J. Clare-Salzler, D. A. Schatz and M. A. Atkinson (2005). "Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes." *Diabetes* **54**(5): 1407-1414.

Burchill, M. A., C. A. Goetz, M. Prlic, J. J. O'Neil, I. R. Harmon, S. J. Bensinger, L. A. Turka, P. Brennan, S. C. Jameson and M. A. Farrar (2003). "Distinct effects of STAT5 activation on CD4+ and CD8+ T cell homeostasis: development of CD4+CD25+ regulatory T cells versus CD8+ memory T cells." *J Immunol* **171**(11): 5853-5864.

Burchill, M. A., J. Yang, K. B. Vang, J. J. Moon, H. H. Chu, C. W. Lio, A. L. Vegoe, C. S. Hsieh, M. K. Jenkins and M. A. Farrar (2008). "Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire." *Immunity* **28**(1): 112-121.

Burchill, M. A., J. Yang, C. Vogtenhuber, B. R. Blazar and M. A. Farrar (2007). "IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells." *J Immunol* **178**(1): 280-290.

Campbell, D. J. and M. A. Koch (2011). "Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells." *Nat Rev Immunol* **11**(2): 119-130.

Casteels, K. M., C. A. Gysemans, M. Waer, R. Bouillon, J. M. Laureys, J. Depovere and C. Mathieu (1998). "Sex difference in resistance to dexamethasone-induced apoptosis in NOD mice: treatment with 1,25(OH)2D3 restores defect." *Diabetes* **47**(7): 1033-1037.

Catassi, C., A. Guerrieri, E. Bartolotta, G. V. Coppa and P. L. Giorgi (1987). "Antigliadin antibodies at onset of diabetes in children." *Lancet* **2**(8551): 158.

Cederbom, L., H. Hall and F. Ivars (2000). "CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells." *Eur J Immunol* **30**(6): 1538-1543.

Chatenoud, L., J. Primo and J. F. Bach (1997). "CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice." *J Immunol* **158**(6): 2947-2954.

Chatenoud, L., E. Thervet, J. Primo and J. F. Bach (1992). "[Remission of established disease in diabetic NOD mice induced by anti-CD3 monoclonal antibody]." *C R Acad Sci III* **315**(6): 225-228.

Chatenoud, L., E. Thervet, J. Primo and J. F. Bach (1994). "Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(1): 123-127.

Chavele, K. M. and M. R. Ehrenstein (2011). "Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis." *FEBS Lett* **585**(23): 3603-3610.

Chen, B., B. Yi, R. Mao, H. Liu, J. Wang, A. Sharma, S. Peiper, W. J. Leonard and J. X. She (2013). "Enhanced T cell lymphoma in NOD.Stat5b transgenic mice is caused by hyperactivation of Stat5b in CD8+ thymocytes." *PLoS One* **8**(2): e56600.

Cho, J. H. and P. K. Gregersen (2011). "Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease." *N Engl J Med* **365**(17): 1612-1623.

Chopin, M., R. S. Allan and G. T. Belz (2012). "Transcriptional regulation of dendritic cell diversity." *Front Immunol* **3**: 26.

Christianson, S. W., L. D. Shultz and E. H. Leiter (1993). "Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors." *Diabetes* **42**(1): 44-55.

Clare-Salzler, M. J., J. Brooks, A. Chai, K. Van Herle and C. Anderson (1992). "Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by dendritic cell transfer." *J Clin Invest* **90**(3): 741-748.

Cloutier, A., C. Guindi, P. Larivee, C. M. Dubois, A. Amrani and P. P. McDonald (2009). "Inflammatory cytokine production by human neutrophils involves C/EBP transcription factors." *J Immunol* **182**(1): 563-571.

Cohen, A. C., K. C. Nadeau, W. Tu, V. Hwa, K. Dionis, L. Bezrodnik, A. Teper, M. Gaillard, J. Heinrich, A. M. Krensky, R. G. Rosenfeld and D. B. Lewis (2006). "Cutting edge: Decreased accumulation and regulatory function of CD4<sup>+</sup> CD25(high) T cells in human STAT5b deficiency." *J Immunol* **177**(5): 2770-2774.

Cooke, A., P. Tonks, F. M. Jones, H. O'Shea, P. Hutchings, A. J. Fulford and D. W. Dunne (1999). "Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice." *Parasite Immunol* **21**(4): 169-176.

Cools, N., P. Ponsaerts, V. F. Van Tendeloo and Z. N. Berneman (2007). "Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells." *J Leukoc Biol* **82**(6): 1365-1374.

Cooper, G. S., M. L. Bynum and E. C. Somers (2009). "Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases." *J Autoimmun* **33**(3-4): 197-207.

Copeland, N. G., D. J. Gilbert, C. Schindler, Z. Zhong, Z. Wen, J. E. Darnell, Jr., A. L. Mui, A. Miyajima, F. W. Quelle, J. N. Ihle and et al. (1995). "Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes." *Genomics* **29**(1): 225-228.

Cox, S. L., J. Stolp, N. L. Hallahan, J. Counotte, W. Zhang, D. V. Serreze, A. Basten and P. A. Silveira (2010). "Enhanced responsiveness to T-cell help causes loss of B-lymphocyte tolerance to a beta-cell neo-self-antigen in type 1 diabetes prone NOD mice." *Eur J Immunol* **40**(12): 3413-3425.

Craighead, J. E. and M. F. McLane (1968). "Diabetes mellitus: induction in mice by encephalomyocarditis virus." *Science* **162**(3856): 913-914.

Creusot, R. J., S. S. Yaghoubi, K. Kodama, D. N. Dang, V. H. Dang, K. Breckpot, K. Thielemans, S. S. Gambhir and C. G. Fathman (2008). "Tissue-targeted therapy of autoimmune diabetes using dendritic cells transduced to express IL-4 in NOD mice." *Clin Immunol* **127**(2): 176-187.

Cui, Y., G. Riedlinger, K. Miyoshi, W. Tang, C. Li, C. X. Deng, G. W. Robinson and L. Hennighausen (2004). "Inactivation of Stat5 in mouse mammary epithelium during pregnancy reveals distinct functions in cell proliferation, survival, and differentiation." *Mol Cell Biol* **24**(18): 8037-8047.

D'Alise, A. M., V. Auyeung, M. Feuerer, J. Nishio, J. Fontenot, C. Benoist and D. Mathis (2008). "The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(50): 19857-19862.

D'Ambrosio, D., M. Cippitelli, M. G. Cocciolo, D. Mazzeo, P. Di Lucia, R. Lang, F. Sinigaglia and P. Panina-Bordignon (1998). "Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene." *J Clin Invest* **101**(1): 252-262.

D'Angeli, M. A., E. Merzon, L. F. Valbuena, D. Tirschwell, C. A. Paris and B. A. Mueller (2010). "Environmental factors associated with childhood-onset type 1 diabetes



mellitus: an exploration of the hygiene and overload hypotheses." *Arch Pediatr Adolesc Med* **164**(8): 732-738.

Dahlen, E., K. Dawe, L. Ohlsson and G. Hedlund (1998). "Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse." *J Immunol* **160**(7): 3585-3593.

Dahlquist, G., G. Frisk, S. A. Ivarsson, L. Svanberg, M. Forsgren and H. Diderholm (1995). "Indications that maternal coxsackie B virus infection during pregnancy is a risk factor for childhood-onset IDDM." *Diabetologia* **38**(11): 1371-1373.

Daugherty, R. L. and C. J. Gottardi (2007). "Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions." *Physiology (Bethesda)* **22**: 303-309.

Davidson, T. S. and E. M. Shevach (2011). "Polyclonal Treg cells modulate T effector cell trafficking." *Eur J Immunol* **41**(10): 2862-2870.

Davoodi-Semiromi, A., M. Laloraya, G. P. Kumar, S. Purohit, R. K. Jha and J. X. She (2004). "A mutant Stat5b with weaker DNA binding affinity defines a key defective pathway in nonobese diabetic mice." *J Biol Chem* **279**(12): 11553-11561.

Davoodi-Semiromi, A., M. McDuffie, S. Litherland and M. Clare-Salzler (2007). "Truncated pStat5B is associated with the Idd4 locus in NOD mice." *Biochem Biophys Res Commun* **356**(3): 655-661.

de Goffau, M. C., K. Luopajarvi, M. Knip, J. Ilonen, T. Ruohtula, T. Harkonen, L. Orivuori, S. Hakala, G. W. Welling, H. J. Harmsen and O. Vaarala (2013). "Fecal microbiota composition differs between children with beta-cell autoimmunity and those without." *Diabetes* **62**(4): 1238-1244.

Debierre-Grockiego, F. (2004). "Anti-apoptotic role of STAT5 in haematopoietic cells and in the pathogenesis of malignancies." *Apoptosis* **9**(6): 717-728.

Delovitch, T. L. and B. Singh (1997). "The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD." *Immunity* **7**(6): 727-738.

Devaraj, S., A. T. Cheung, I. Jialal, S. C. Griffen, D. Nguyen, N. Glaser and T. Aoki (2007). "Evidence of increased inflammation and microcirculatory abnormalities in patients with type 1 diabetes and their role in microvascular complications." *Diabetes* **56**(11): 2790-2796.

Dotta, F., S. Censini, A. G. van Halteren, L. Marselli, M. Masini, S. Dionisi, F. Mosca, U. Boggi, A. O. Muda, S. Del Prato, J. F. Elliott, A. Covacci, R. Rappuoli, B. O. Roep and P. Marchetti (2007). "Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(12): 5115-5120.

Doyle, H. A. and M. J. Mamula (2001). "Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity." *Trends Immunol* **22**(8): 443-449.

Doyle, H. A. and M. J. Mamula (2005). "Posttranslational modifications of self-antigens." *Ann N Y Acad Sci* **1050**: 1-9.

Doyle, H. A. and M. J. Mamula (2012). "Autoantigenesis: the evolution of protein modifications in autoimmune disease." *Curr Opin Immunol* **24**(1): 112-118.

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**(1): 67-87.

Duan, G. and D. Walther (2015). "The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks." *PLoS Comput Biol* **11**(2): e1004049.

Dudziak, D., A. O. Kamphorst, G. F. Heidkamp, V. R. Buchholz, C. Trumpfheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H. W. Lee, C. G. Park, R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig (2007). "Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo." *Science* **315**(5808): 107-111.

Elfving, M., J. Svensson, S. Oikarinen, B. Jonsson, P. Olofsson, G. Sundkvist, B. Lindberg, A. Lernmark, H. Hyoty and S. A. Ivarsson (2008). "Maternal enterovirus infection during pregnancy as a risk factor in offspring diagnosed with type 1 diabetes between 15 and 30 years of age." *Exp Diabetes Res* **2008**: 271958.

Engblom, D., J. W. Kornfeld, L. Schwake, F. Tronche, A. Reimann, H. Beug, L. Hennighausen, R. Moriggl and G. Schutz (2007). "Direct glucocorticoid receptor-Stat5 interaction in hepatocytes controls body size and maturation-related gene expression." *Genes Dev* **21**(10): 1157-1162.

Esashi, E., Y. H. Wang, O. Perng, X. F. Qin, Y. J. Liu and S. S. Watowich (2008). "The signal transducer STAT5 inhibits plasmacytoid dendritic cell development by suppressing transcription factor IRF8." *Immunity* **28**(4): 509-520.

Ezzelarab, M. and A. W. Thomson (2011). "Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation." *Semin Immunol* **23**(4): 252-263.

Faustman, D. L., R. M. Steinman, H. M. Gebel, V. Hauptfeld, J. M. Davie and P. E. Lacy (1984). "Prevention of rejection of murine islet allografts by pretreatment with anti-dendritic cell antibody." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(12): 3864-3868.

Fehervari, Z. and S. Sakaguchi (2004). "Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells." *Curr Opin Immunol* **16**(2): 203-208.

Feili-Hariri, M., D. H. Falkner, A. Gambotto, G. D. Papworth, S. C. Watkins, P. D. Robbins and P. A. Morel (2003). "Dendritic cells transduced to express interleukin-4 prevent diabetes in nonobese diabetic mice with advanced insulinitis." *Hum Gene Ther* **14**(1): 13-23.

Feili-Hariri, M. and P. A. Morel (2001). "Phenotypic and functional characteristics of BM-derived DC from NOD and non-diabetes-prone strains." *Clin Immunol* **98**(1): 133-142.

Feldman, G. M., L. A. Rosenthal, X. Liu, M. P. Hayes, A. Wynshaw-Boris, W. J. Leonard, L. Hennighausen and D. S. Finbloom (1997). "STAT5A-deficient mice demonstrate a defect in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation and gene expression." *Blood* **90**(5): 1768-1776.

Filippi, C. and M. von Herrath (2005). "How viral infections affect the autoimmune process leading to type 1 diabetes." *Cell Immunol* **233**(2): 125-132.

Flemming, A. (2011). "Diabetes: Mobilizing regulatory T cells against type 1 diabetes." *Nat Rev Drug Discov* **10**(9): 657.

Fogg, D. K., C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D. R. Littman, A. Cumano and F. Geissmann (2006). "A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells." *Science* **311**(5757): 83-87.

Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 330-336.

Foulis, A. K., M. A. Farquharson and A. Meager (1987). "Immunoreactive alpha-interferon in insulin-secreting beta cells in type 1 diabetes mellitus." *Lancet* **2**(8573): 1423-1427.

Francisco, L. M., V. H. Salinas, K. E. Brown, V. K. Vanguri, G. J. Freeman, V. K. Kuchroo and A. H. Sharpe (2009). "PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells." *J Exp Med* **206**(13): 3015-3029.

Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood and T. Honjo (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." *J Exp Med* **192**(7): 1027-1034.

Garchon, H. J., P. Bedossa, L. Eloy and J. F. Bach (1991). "Identification and mapping to chromosome 1 of a susceptibility locus for periinsulinitis in non-obese diabetic mice." *Nature* **353**(6341): 260-262.

Gaudreau, S., C. Guindi, M. Menard, G. Besin, G. Dupuis and A. Amrani (2007). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents diabetes development in NOD mice by inducing tolerogenic dendritic cells that sustain the suppressive function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* **179**(6): 3638-3647.

Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad and K. Ley (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." *Science* **327**(5966): 656-661.

Goudy, K. S., B. R. Burkhardt, C. Wasserfall, S. Song, M. L. Campbell-Thompson, T. Brusko, M. A. Powers, M. J. Clare-Salzler, E. S. Sobel, T. M. Ellis, T. R. Flotte and M. A. Atkinson (2003). "Systemic overexpression of IL-10 induces CD4+CD25+ cell populations in vivo and ameliorates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice in a dose-dependent fashion." *J Immunol* **171**(5): 2270-2278.

Grattan, M., Q. S. Mi, C. Meagher and T. L. Delovitch (2002). "Congenic mapping of the diabetogenic locus *Idd4* to a 5.2-cM region of chromosome 11 in NOD mice: identification of two potential candidate subloci." *Diabetes* **51**(1): 215-223.

Gregori, S., N. Giarratana, S. Smiroldo and L. Adorini (2003). "Dynamics of pathogenic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development." *J Immunol* **171**(8): 4040-4047.

Grohmann, U., F. Fallarino, R. Bianchi, C. Vacca, C. Orabona, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti and P. Puccetti (2003). "Tryptophan catabolism in nonobese diabetic mice." *Adv Exp Med Biol* **527**: 47-54.

Guindi, C., M. Menard, A. Cloutier, S. Gaudreau, G. Besin, P. Larivee, P. P. McDonald, G. Dupuis and A. Amrani (2012). "Differential role of NF-kappaB, ERK1/2 and AP-1 in modulating the immunoregulatory functions of bone marrow-derived dendritic cells from NOD mice." *Cell Immunol* **272**(2): 259-268.

Hamilton-Williams, E. E., S. E. Palmer, B. Charlton and R. M. Slattery (2003). "Beta cell MHC class I is a late requirement for diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6688-6693.

Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* **6**(11): 1123-1132.

Hauer, A. D., C. Uyttenhove, P. de Vos, V. Stroobant, J. C. Renauld, T. J. van Berkel, J. van Snick and J. Kuiper (2005). "Blockade of interleukin-12 function by protein vaccination attenuates atherosclerosis." *Circulation* **112**(7): 1054-1062.

Hayward, A. R. and M. Shreiber (1989). "Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of insulinitis and diabetes." *J Immunol* **143**(5): 1555-1559.

Hayward, A. R. and M. Shreiber (1992). "Reduced incidence of insulinitis in NOD mice following anti-CD3 injection: requirement for neonatal injection." *J Autoimmun* **5**(1): 59-67.

Hennighausen, L. and G. W. Robinson (2008). "Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B." *Genes Dev* **22**(6): 711-721.

Herold, K. C., S. E. Gitelman, U. Masharani, W. Hagopian, B. Bisikirska, D. Donaldson, K. Rother, B. Diamond, D. M. Harlan and J. A. Bluestone (2005). "A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes." *Diabetes* **54**(6): 1763-1769.

Herold, K. C., W. Hagopian, J. A. Auger, E. Poumian-Ruiz, L. Taylor, D. Donaldson, S. E. Gitelman, D. M. Harlan, D. Xu, R. A. Zivin and J. A. Bluestone (2002). "Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus." *N Engl J Med* **346**(22): 1692-1698.

Heuberger, J. and W. Birchmeier (2010). "Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(2): a002915.

Honeyman, M. C., B. S. Coulson, N. L. Stone, S. A. Gellert, P. N. Goldwater, C. E. Steele, J. J. Couper, B. D. Tait, P. G. Colman and L. C. Harrison (2000). "Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes." *Diabetes* **49**(8): 1319-1324.

Hong, S., M. T. Wilson, I. Serizawa, L. Wu, N. Singh, O. V. Naidenko, T. Miura, T. Haba, D. C. Scherer, J. Wei, M. Kronenberg, Y. Koezuka and L. Van Kaer (2001). "The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice." *Nat Med* **7**(9): 1052-1056.

Hori, S. (2014). "Lineage stability and phenotypic plasticity of Foxp3(+) regulatory T cells." *Immunol Rev* **259**(1): 159-172.

Hu, C. Y., D. Rodriguez-Pinto, W. Du, A. Ahuja, O. Henegariu, F. S. Wong, M. J. Shlomchik and L. Wen (2007). "Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice." *J Clin Invest* **117**(12): 3857-3867.

Huber, A. H., D. B. Stewart, D. V. Laurents, W. J. Nelson and W. I. Weis (2001). "The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover." *J Biol Chem* **276**(15): 12301-12309.

Hussain, S. and T. L. Delovitch (2005). "Dysregulated B7-1 and B7-2 expression on nonobese diabetic mouse B cells is associated with increased T cell costimulation and the development of insulinitis." *J Immunol* **174**(2): 680-687.

Hutchings, P., H. Rosen, L. O'Reilly, E. Simpson, S. Gordon and A. Cooke (1990). "Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages." *Nature* **348**(6302): 639-642.

Hutchings, P. R. and A. Cooke (1990). "The transfer of autoimmune diabetes in NOD mice can be inhibited or accelerated by distinct cell populations present in normal splenocytes taken from young males." *J Autoimmun* **3**(2): 175-185.

Hyoty, H., M. Hiltunen, M. Knip, M. Laakkonen, P. Vahasalo, J. Karjalainen, P. Koskela, M. Roivainen, P. Leinikki, T. Hovi and et al. (1995). "A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group." *Diabetes* **44**(6): 652-657.

Imada, K., E. T. Bloom, H. Nakajima, J. A. Horvath-Arcidiacono, G. B. Udy, H. W. Davey and W. J. Leonard (1998). "Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity." *J Exp Med* **188**(11): 2067-2074.

Ito, T., M. Yang, Y. H. Wang, R. Lande, J. Gregorio, O. A. Perng, X. F. Qin, Y. J. Liu and M. Gilliet (2007). "Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand." *J Exp Med* **204**(1): 105-115.

Jacob, C. O., S. Aiso, S. A. Michie, H. O. McDevitt and H. Acha-Orbea (1990). "Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF-alpha and interleukin 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(3): 968-972.

Jaekel, E., N. Mpofo, N. Saal and M. P. Manns (2008). "Role of regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes mellitus." *Horm Metab Res* **40**(2): 126-136.

Jayasimhan, A., K. P. Mansour and R. M. Slattery (2014). "Advances in our understanding of the pathophysiology of Type 1 diabetes: lessons from the NOD mouse." *Clin Sci (Lond)* **126**(1): 1-18.

Jin, Y., S. Purohit, X. Chen, B. Yi and J. X. She (2012). "Over-expression of Stat5b confers protection against diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mice via up-regulation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." *Biochem Biophys Res Commun* **424**(4): 669-674.

John, S., U. Vinkemeier, E. Soldaini, J. E. Darnell, Jr. and W. J. Leonard (1999). "The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5." *Mol Cell Biol* **19**(3): 1910-1918.

Jonuleit, H., E. Schmitt, K. Steinbrink and A. H. Enk (2001). "Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells." *Trends Immunol* **22**(7): 394-400.

Jun, H. S., P. Santamaria, H. W. Lim, M. L. Zhang and J. W. Yoon (1999). "Absolute requirement of macrophages for the development and activation of beta-cell cytotoxic CD8+ T-cells in T-cell receptor transgenic NOD mice." *Diabetes* **48**(1): 34-42.

Kagami, S., H. Nakajima, K. Kumano, K. Suzuki, A. Suto, K. Imada, H. W. Davey, Y. Saito, K. Takatsu, W. J. Leonard and I. Iwamoto (2000). "Both stat5a and stat5b are required for antigen-induced eosinophil and T-cell recruitment into the tissue." *Blood* **95**(4): 1370-1377.

Kanai, T., S. Seki, J. A. Jenks, A. Kohli, T. Kawli, D. P. Martin, M. Snyder, R. Bacchetta and K. C. Nadeau (2014). "Identification of STAT5A and STAT5B target genes in human T cells." *PLoS One* **9**(1): e86790.

Kaprio, J., J. Tuomilehto, M. Koskenvuo, K. Romanov, A. Reunanen, J. Eriksson, J. Stengard and Y. A. Kesaniemi (1992). "Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland." *Diabetologia* **35**(11): 1060-1067.

Kared, H., A. Masson, H. Adle-Biassette, J. F. Bach, L. Chatenoud and F. Zavala (2005). "Treatment with granulocyte colony-stimulating factor prevents diabetes in NOD mice

by recruiting plasmacytoid dendritic cells and functional CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells." *Diabetes* **54**(1): 78-84.

Karjalainen, J., J. M. Martin, M. Knip, J. Ilonen, B. H. Robinson, E. Savilahti, H. K. Akerblom and H. M. Dosch (1992). "A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus." *N Engl J Med* **327**(5): 302-307.

Kasuga, A., R. Harada and T. Saruta (1996). "Insulin-dependent diabetes mellitus associated with parvovirus B19 infection." *Ann Intern Med* **125**(8): 700-701.

Kaufman, D. L., M. G. Erlander, M. Clare-Salzler, M. A. Atkinson, N. K. Maclaren and A. J. Tobin (1992). "Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus." *J Clin Invest* **89**(1): 283-292.

Keir, M. E., S. C. Liang, I. Guleria, Y. E. Latchman, A. Qipo, L. A. Albacker, M. Koulmanda, G. J. Freeman, M. H. Sayegh and A. H. Sharpe (2006). "Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance." *J Exp Med* **203**(4): 883-895.

Kelly, J., R. Spolski, K. Imada, J. Bollenbacher, S. Lee and W. J. Leonard (2003). "A role for Stat5 in CD8+ T cell homeostasis." *J Immunol* **170**(1): 210-217.

Keymeulen, B., E. Vandemeulebroucke, A. G. Ziegler, C. Mathieu, L. Kaufman, G. Hale, F. Gorus, M. Goldman, M. Walter, S. Candon, L. Schandene, L. Crenier, C. De Block, J. M. Seigneurin, P. De Pauw, D. Pierard, I. Weets, P. Rebello, P. Bird, E. Berrie, M. Frewin, H. Waldmann, J. F. Bach, D. Pipeleers and L. Chatenoud (2005). "Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes." *N Engl J Med* **352**(25): 2598-2608.

Kieslinger, M., I. Woldman, R. Moriggl, J. Hofmann, J. C. Marine, J. N. Ihle, H. Beug and T. Decker (2000). "Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation." *Genes Dev* **14**(2): 232-244.

Kikutani, H. and S. Makino (1992). "The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains." *Adv Immunol* **51**: 285-322.

Kim, S. H., S. Kim, T. J. Oligino and P. D. Robbins (2002). "Effective treatment of established mouse collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express FasL." *Mol Ther* **6**(5): 584-590.

Kinnebrew, M. A., C. G. Buffie, G. E. Diehl, L. A. Zenewicz, I. Leiner, T. M. Hohl, R. A. Flavell, D. R. Littman and E. G. Pamer (2012). "Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense." *Immunity* **36**(2): 276-287.

Knip, M. and O. Simell (2012). "Environmental triggers of type 1 diabetes." *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(7): a007690.

Knip, M., R. Veijola, S. M. Virtanen, H. Hyoty, O. Vaarala and H. K. Akerblom (2005). "Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes." *Diabetes* **54 Suppl 2**: S125-136.

Kodama, S., M. Davis and D. L. Faustman (2005). "The therapeutic potential of tumor necrosis factor for autoimmune disease: a mechanistically based hypothesis." *Cell Mol Life Sci* **62**(16): 1850-1862.

Korn, T., J. Reddy, W. Gao, E. Bettelli, A. Awasthi, T. R. Petersen, B. T. Backstrom, R. A. Sobel, K. W. Wucherpfennig, T. B. Strom, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2007). "Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation." *Nat Med* **13**(4): 423-431.

Kornfeld, J. W., F. Grebien, M. A. Kerényi, K. Friedbichler, B. Kovacic, B. Zankl, A. Hoelbl, H. Nivarti, H. Beug, V. Sexl, M. Muller, L. Kenner, E. W. Mullner, F. Gouilleux and R. Moriggl (2008). "The different functions of Stat5 and chromatin alteration through Stat5 proteins." *Front Biosci* **13**: 6237-6254.

Kriegel, M. A., E. Sefik, J. A. Hill, H. J. Wu, C. Benoist and D. Mathis (2011). "Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(28): 11548-11553.

Kukreja, A., G. Cost, J. Marker, C. Zhang, Z. Sun, K. Lin-Su, S. Ten, M. Sanz, M. Exley, B. Wilson, S. Porcelli and N. Maclaren (2002). "Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes." *J Clin Invest* **109**(1): 131-140.

Lacy, P. E., J. M. Davie and E. H. Finke (1979). "Prolongation of islet allograft survival following in vitro culture (24 degrees C) and a single injection of ALS." *Science* **204**(4390): 312-313.

Laloraya, M., A. Davoodi-Semiromi, G. P. Kumar, M. McDuffie and J. X. She (2006). "Impaired Crkl expression contributes to the defective DNA binding of Stat5b in nonobese diabetic mice." *Diabetes* **55**(3): 734-741.

Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *J Exp Med* **201**(2): 233-240.

Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2001). "The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics." *Curr Opin Immunol* **13**(3): 291-298.

Latchman, Y., C. R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A. J. Long, J. A. Brown, R. Nunes, E. A. Greenfield, K. Bourque, V. A. Boussiotis, L. L. Carter, B. M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T. Honjo, A. H. Sharpe and G. J. Freeman (2001). "PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation." *Nat Immunol* **2**(3): 261-268.

Lee, L. F., B. Xu, S. A. Michie, G. F. Beilhack, T. Warganich, S. Turley and H. O. McDevitt (2005). "The role of TNF-alpha in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: analysis of dendritic cell maturation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(44): 15995-16000.

Lee, M. H., W. H. Lee, I. Todorov and C. P. Liu (2010). "CD4+ CD25+ regulatory T cells prevent type 1 diabetes preceded by dendritic cell-dominant invasive insulinitis by affecting chemotaxis and local invasiveness of dendritic cells." *J Immunol* **185**(4): 2493-2501.

Lehuen, A., J. Diana, P. Zacccone and A. Cooke (2010). "Immune cell crosstalk in type 1 diabetes." *Nat Rev Immunol* **10**(7): 501-513.

Lempainen, J., O. Vaarala, M. Makela, R. Veijola, O. Simell, M. Knip, R. Hermann and J. Ilonen (2009). "Interplay between PTPN22 C1858T polymorphism and cow's milk formula exposure in type 1 diabetes." *J Autoimmun* **33**(2): 155-164.

Leonard, W. J. and J. J. O'Shea (1998). "Jaks and STATs: biological implications." *Annu Rev Immunol* **16**: 293-322.

Levy, D. E. and J. E. Darnell, Jr. (2002). "Stats: transcriptional control and biological impact." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 651-662.

Levy, D. E. and I. J. Marie (2012). "STATus report on tetramers." *Immunity* **36**(4): 553-555.

Li, H. S., C. Y. Yang, K. C. Nallaparaju, H. Zhang, Y. J. Liu, A. W. Goldrath and S. S. Watowich (2012). "The signal transducers STAT5 and STAT3 control expression of Id2 and E2-2 during dendritic cell development." *Blood* **120**(22): 4363-4373.

Li, Q., W. Zhang, O. S. Miljanic, C. H. Sue, Y. L. Zhao, L. Liu, C. B. Knobler, J. F. Stoddart and O. M. Yaghi (2009). "Docking in metal-organic frameworks." *Science* **325**(5942): 855-859.

Liao, W., D. E. Schones, J. Oh, Y. Cui, K. Cui, T. Y. Roh, K. Zhao and W. J. Leonard (2008). "Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression." *Nat Immunol* **9**(11): 1288-1296.

Lim, D. S., M. S. Kang, J. A. Jeong and Y. S. Bae (2009). "Semi-mature DC are immunogenic and not tolerogenic when inoculated at a high dose in collagen-induced arthritis mice." *Eur J Immunol* **39**(5): 1334-1343.

Lin, J. X., P. Li, D. Liu, H. T. Jin, J. He, M. Ata Ur Rasheed, Y. Rochman, L. Wang, K. Cui, C. Liu, B. L. Kelsall, R. Ahmed and W. J. Leonard (2012). "Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function." *Immunity* **36**(4): 586-599.

Lin, J. X., J. Mietz, W. S. Modi, S. John and W. J. Leonard (1996). "Cloning of human Stat5B. Reconstitution of interleukin-2-induced Stat5A and Stat5B DNA binding activity in COS-7 cells." *J Biol Chem* **271**(18): 10738-10744.

Lindley, S., C. M. Dayan, A. Bishop, B. O. Roep, M. Peakman and T. I. Tree (2005). "Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes." *Diabetes* **54**(1): 92-99.

Litherland, S. A., T. X. Xie, K. M. Grebe, A. Davoodi-Semiromi, J. Elf, N. S. Belkin, L. L. Moldawer and M. J. Clare-Salzler (2005). "Signal transduction activator of transcription 5 (STAT5) dysfunction in autoimmune monocytes and macrophages." *J Autoimmun* **24**(4): 297-310.

Liu, S., H. Wang, Y. Jin, R. Podolsky, M. V. Reddy, J. Pedersen, B. Bode, J. Reed, D. Steed, S. Anderson, P. Yang, A. Muir, L. Steed, D. Hopkins, Y. Huang, S. Purohit, C. Y. Wang, A. K. Steck, A. Montemari, G. Eisenbarth, M. Rewers and J. X. She (2009). "IFIH1 polymorphisms are significantly associated with type 1 diabetes and IFIH1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells." *Hum Mol Genet* **18**(2): 358-365.

Liu, X., G. W. Robinson, F. Gouilleux, B. Groner and L. Hennighausen (1995). "Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19): 8831-8835.

Liu, X., G. W. Robinson, K. U. Wagner, L. Garrett, A. Wynshaw-Boris and L. Hennighausen (1997). "Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis." *Genes Dev* **11**(2): 179-186.

Liu, Y. J., V. Soumelis, N. Watanabe, T. Ito, Y. H. Wang, W. Malefyt Rde, M. Omori, B. Zhou and S. F. Ziegler (2007). "TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation." *Annu Rev Immunol* **25**: 193-219.

Lo, D., C. R. Reilly, B. Scott, R. Liblau, H. O. McDevitt and L. C. Burkly (1993). "Antigen-presenting cells in adoptively transferred and spontaneous autoimmune diabetes." *Eur J Immunol* **23**(7): 1693-1698.



Lowe, C. E., J. D. Cooper, T. Brusko, N. M. Walker, D. J. Smyth, R. Bailey, K. Bourget, V. Plagnol, S. Field, M. Atkinson, D. G. Clayton, L. S. Wicker and J. A. Todd (2007). "Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes." *Nat Genet* **39**(9): 1074-1082.

Ludewig, B., T. Junt, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (2001). "Dendritic cells in autoimmune diseases." *Curr Opin Immunol* **13**(6): 657-662.

Ludvigsson, J., D. Krisky, R. Casas, T. Battelino, L. Castano, J. Greening, O. Kordonouri, T. Otonkoski, P. Pozzilli, J. J. Robert, H. J. Veeze, J. Palmer, U. Samuelsson, H. Elding Larsson, J. Aman, G. Kardell, J. Neiderud Helsingborg, G. Lundstrom, E. Albinsson, A. Carlsson, M. Nordvall, H. Fors, C. G. Arvidsson, S. Edvardson, R. Hanas, K. Larsson, B. Rathsman, H. Forsgren, H. Desaix, G. Forsander, N. O. Nilsson, C. G. Akesson, P. Keskinen, R. Veijola, T. Talvitie, K. Raile, T. Kapellen, W. Burger, A. Neu, I. Engelsberger, B. Heidtmann, S. Bechtold, D. Leslie, F. Chiarelli, A. Cicognani, G. Chiumello, F. Cerutti, G. V. Zuccotti, A. Gomez Gila, I. Rica, R. Barrio, M. Clemente, M. J. Lopez Garcia, M. Rodriguez, I. Gonzalez, J. P. Lopez, M. Oyarzabal, H. M. Reeser, R. Nuboer, P. Stouthart, N. Bratina, N. Bratanic, M. de Kerdanet, J. Weill, N. Ser, P. Barat, A. M. Bertrand, J. C. Carel, R. Reynaud, R. Coutant and S. Baron (2012). "GAD65 antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus." *N Engl J Med* **366**(5): 433-442.

Lutz, M. B. (2012). "Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction." *Front Immunol* **3**: 123.

Lyons, P. A., N. Armitage, F. Argentina, P. Denny, N. J. Hill, C. J. Lord, M. B. Wilusz, L. B. Peterson, L. S. Wicker and J. A. Todd (2000). "Congenic mapping of the type 1 diabetes locus, *Idd3*, to a 780-kb region of mouse chromosome 3: identification of a candidate segment of ancestral DNA by haplotype mapping." *Genome Res* **10**(4): 446-453.

MacFarlane, A. J., K. M. Burghardt, J. Kelly, T. Simell, O. Simell, I. Altsaar and F. W. Scott (2003). "A type 1 diabetes-related protein from wheat (*Triticum aestivum*). cDNA clone of a wheat storage globulin, *Glb1*, linked to islet damage." *J Biol Chem* **278**(1): 54-63.

Maeda, H. and A. Shiraishi (1996). "TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice." *J Immunol* **156**(1): 73-78.

Malin, S., S. McManus, C. Cobaleda, M. Novatchkova, A. Delogu, P. Bouillet, A. Strasser and M. Busslinger (2010). "Role of STAT5 in controlling cell survival and immunoglobulin gene recombination during pro-B cell development." *Nat Immunol* **11**(2): 171-179.

Mandal, M., S. E. Powers, M. Maienschein-Cline, E. T. Bartom, K. M. Hamel, B. L. Kee, A. R. Dinner and M. R. Clark (2011). "Epigenetic repression of the *Igk* locus by STAT5-mediated recruitment of the histone methyltransferase *Ezh2*." *Nat Immunol* **12**(12): 1212-1220.

Marek-Trzonkowska, N., M. Mysliwiec, A. Dobyszyk, M. Grabowska, I. Techmanska, J. Juscinska, M. A. Wujtewicz, P. Witkowski, W. Mlynarski, A. Balcerska, J. Mysliwska and P. Trzonkowski (2012). "Administration of CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-</sup> regulatory T cells preserves beta-cell function in type 1 diabetes in children." *Diabetes Care* **35**(9): 1817-1820.

Marjamaki, L., S. Niinisto, M. G. Kenward, L. Uusitalo, U. Uusitalo, M. L. Ovaskainen, C. Kronberg-Kippila, O. Simell, R. Veijola, J. Ilonen, M. Knip and S. M. Virtanen (2010).

"Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of advanced beta cell autoimmunity and type 1 diabetes in offspring." *Diabetologia* **53**(8): 1599-1607.

Marleau, A. M., K. L. Summers and B. Singh (2008). "Differential contributions of APC subsets to T cell activation in nonobese diabetic mice." *J Immunol* **180**(8): 5235-5249.

Martin-Orozco, N., Y. H. Wang, H. Yagita and C. Dong (2006). "Cutting Edge: Programmed death (PD) ligand-1/PD-1 interaction is required for CD8+ T cell tolerance to tissue antigens." *J Immunol* **177**(12): 8291-8295.

Mathieu, C., M. Waer, J. Laureys, O. Rutgeerts and R. Bouillon (1994). "Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D3." *Diabetologia* **37**(6): 552-558.

Matta, B. M., G. Raimondi, B. R. Rosborough, T. L. Sumpter and A. W. Thomson (2012). "IL-27 production and STAT3-dependent upregulation of B7-H1 mediate immune regulatory functions of liver plasmacytoid dendritic cells." *J Immunol* **188**(11): 5227-5237.

Matzinger, P. and S. Guerder (1989). "Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell?" *Nature* **338**(6210): 74-76.

McDuffie, M. (2000). "Derivation of diabetes-resistant congenic lines from the nonobese diabetic mouse." *Clin Immunol* **96**(2): 119-130.

McGrath, M. M. and N. Najafian (2012). "The role of coinhibitory signaling pathways in transplantation and tolerance." *Front Immunol* **3**: 47.

Menges, M., S. Rossner, C. Voigtlander, H. Schindler, N. A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler and M. B. Lutz (2002). "Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity." *J Exp Med* **195**(1): 15-21.

Morel, P. A. (2013). "Dendritic cell subsets in type 1 diabetes: friend or foe?" *Front Immunol* **4**: 415.

Morel, P. A., M. Feili-Hariri, P. T. Coates and A. W. Thomson (2003). "Dendritic cells, T cell tolerance and therapy of adverse immune reactions." *Clin Exp Immunol* **133**(1): 1-10.

Morel, P. A. and M. S. Turner (2011). "Dendritic cells and the maintenance of self-tolerance." *Immunol Res* **50**(2-3): 124-129.

Morelli, A. E. and A. W. Thomson (2007). "Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance." *Nat Rev Immunol* **7**(8): 610-621.

Moriggl, R., D. J. Topham, S. Teglund, V. Sexl, C. McKay, D. Wang, A. Hoffmeyer, J. van Deursen, M. Y. Sangster, K. D. Bunting, G. C. Grosveld and J. N. Ihle (1999). "Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells." *Immunity* **10**(2): 249-259.

Mui, A. L., H. Wakao, A. M. O'Farrell, N. Harada and A. Miyajima (1995). "Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs." *EMBO J* **14**(6): 1166-1175.

Murawski, M. R., S. A. Litherland, M. J. Clare-Salzler and A. Davoodi-Semiromi (2006). "Upregulation of Foxp3 expression in mouse and human Treg is IL-2/STAT5 dependent: implications for the NOD STAT5B mutation in diabetes pathogenesis." *Ann N Y Acad Sci* **1079**: 198-204.

Murri, M., I. Leiva, J. M. Gomez-Zumaquero, F. J. Tinahones, F. Cardona, F. Soriguer and M. I. Queipo-Ortuno (2013). "Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study." *BMC Med* **11**: 46.

Nakajima, H., X. W. Liu, A. Wynshaw-Boris, L. A. Rosenthal, K. Imada, D. S. Finbloom, L. Hennighausen and W. J. Leonard (1997). "An indirect effect of Stat5a in IL-2-induced proliferation: a critical role for Stat5a in IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain induction." *Immunity* **7**(5): 691-701.

Nejentsev, S., L. J. Smink, D. Smyth, R. Bailey, C. E. Lowe, F. Payne, J. Masters, L. Godfrey, A. Lam, O. Burren, H. Stevens, S. Nutland, N. M. Walker, A. Smith, R. Twells, B. J. Barratt, C. Wright, L. French, Y. Chen, P. Deloukas, J. Rogers, I. Dunham and J. A. Todd (2007). "Sequencing and association analysis of the type 1 diabetes-linked region on chromosome 10p12-q11." *BMC Genet* **8**: 24.

Nejentsev, S., N. Walker, D. Riches, M. Egholm and J. A. Todd (2009). "Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes." *Science* **324**(5925): 387-389.

Nikolic, T., G. Bouma, H. A. Drexhage and P. J. Leenen (2005). "Diabetes-prone NOD mice show an expanded subpopulation of mature circulating monocytes, which preferentially develop into macrophage-like cells in vitro." *J Leukoc Biol* **78**(1): 70-79.

Nikolic, T., M. Bunk, H. A. Drexhage and P. J. Leenen (2004). "Bone marrow precursors of nonobese diabetic mice develop into defective macrophage-like dendritic cells in vitro." *J Immunol* **173**(7): 4342-4351.

Nosaka, T., T. Kawashima, K. Misawa, K. Ikuta, A. L. Mui and T. Kitamura (1999). "STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells." *EMBO J* **18**(17): 4754-4765.

Nussenzweig, M. C., R. M. Steinman, J. C. Unkeless, M. D. Witmer, B. Gutchinov and Z. A. Cohn (1981). "Studies of the cell surface of mouse dendritic cells and other leukocytes." *J Exp Med* **154**(1): 168-187.

Nussenzweig, M. C., R. M. Steinman, M. D. Witmer and B. Gutchinov (1982). "A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(1): 161-165.

O'Brien, B. A., Y. Huang, X. Geng, J. P. Dutz and D. T. Finegood (2002). "Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages from NOD mice is reduced." *Diabetes* **51**(8): 2481-2488.

O'Shea, J. J., M. Gadina and R. D. Schreiber (2002). "Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway." *Cell* **109** **Suppl**: S121-131.

Ohnmacht, C., A. Pullner, S. B. King, I. Drexler, S. Meier, T. Brocker and D. Voehringer (2009). "Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity." *J Exp Med* **206**(3): 549-559.

Oldstone, M. B. (1987). "Molecular mimicry and autoimmune disease." *Cell* **50**(6): 819-820.

Oldstone, M. B. (1988). "Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection." *Science* **239**(4839): 500-502.

Onishi, M., T. Nosaka, K. Misawa, A. L. Mui, D. Gorman, M. McMahon, A. Miyajima and T. Kitamura (1998). "Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation." *Mol Cell Biol* **18**(7): 3871-3879.

Ouyang, W., N. G. Jacobson, D. Bhattacharya, J. D. Gorham, D. Fenoglio, W. C. Sha, T. L. Murphy and K. M. Murphy (1999). "The Ets transcription factor ERM is Th1-specific and induced by IL-12 through a Stat4-dependent pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3888-3893.

Owen, D. L. and M. A. Farrar (2017). "STAT5 and CD4 + T Cell Immunity." *F1000Res* **6**: 32.

Pak, C. Y., H. M. Eun, R. G. McArthur and J. W. Yoon (1988). "Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes." *Lancet* **2**(8601): 1-4.

Pallotta, M. T., C. Orabona, R. Bianchi, C. Vacca, F. Fallarino, M. L. Belladonna, C. Volpi, G. Mondanelli, M. Gargaro, M. Allegrucci, V. N. Talesa, P. Puccetti and U. Grohmann (2014). "Forced IDO1 expression in dendritic cells restores immunoregulatory signalling in autoimmune diabetes." *J Cell Mol Med* **18**(10): 2082-2091.

Panigrahi, A. K., N. G. Goodman, R. A. Eisenberg, M. R. Rickels, A. Naji and E. T. Luning Prak (2008). "RS rearrangement frequency as a marker of receptor editing in lupus and type 1 diabetes." *J Exp Med* **205**(13): 2985-2994.

Paukku, K. and O. Silvennoinen (2004). "STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5." *Cytokine Growth Factor Rev* **15**(6): 435-455.

Peng, H. and W. Hagopian (2006). "Environmental factors in the development of Type 1 diabetes." *Rev Endocr Metab Disord* **7**(3): 149-162.

Pescovitz, M. D., C. J. Greenbaum, H. Krause-Steinrauf, D. J. Becker, S. E. Gitelman, R. Goland, P. A. Gottlieb, J. B. Marks, P. F. McGee, A. M. Moran, P. Raskin, H. Rodriguez, D. A. Schatz, D. Wherrett, D. M. Wilson, J. M. Lachin, J. S. Skyler and C. D. S. G. Type 1 Diabetes TrialNet Anti (2009). "Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function." *N Engl J Med* **361**(22): 2143-2152.

Phillips, J. M., N. M. Parish, T. Raine, C. Bland, Y. Sawyer, H. De La Pena and A. Cooke (2009). "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* **6**(2): 97-103.

Pinkse, G. G., O. H. Tysma, C. A. Bergen, M. G. Kester, F. Ossendorp, P. A. van Veelen, B. Keymeulen, D. Pipeleers, J. W. Drijfhout and B. O. Roep (2005). "Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51): 18425-18430.

Pletinckx, K., A. Dohler, V. Pavlovic and M. B. Lutz (2011). "Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells." *Front Immunol* **2**: 39.

Poligone, B., D. J. Weaver, Jr., P. Sen, A. S. Baldwin, Jr. and R. Tisch (2002). "Elevated NF-kappaB activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function." *J Immunol* **168**(1): 188-196.

Pollard, K. M., P. Hultman and D. H. Kono (2010). "Toxicology of autoimmune diseases." *Chem Res Toxicol* **23**(3): 455-466.

Pothoven, K. L., T. Kheradmand, Q. Yang, J. L. Houlihan, H. Zhang, M. Degutes, S. D. Miller and X. Luo (2010). "Rapamycin-conditioned donor dendritic cells differentiate CD4CD25Foxp3 T cells in vitro with TGF-beta1 for islet transplantation." *Am J Transplant* **10**(8): 1774-1784.

Prasad, S. J. and C. C. Goodnow (2002). "Intrinsic in vitro abnormalities in dendritic cell generation caused by non-MHC non-obese diabetic genes." *Immunol Cell Biol* **80**(2): 198-206.

Puccetti, P. and F. Fallarino (2008). "Generation of T cell regulatory activity by plasmacytoid dendritic cells and tryptophan catabolism." *Blood Cells Mol Dis* **40**(1): 101-105.

Putnam, A. L., F. Vendrame, F. Dotta and P. A. Gottlieb (2005). "CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in human autoimmune diabetes." *J Autoimmun* **24**(1): 55-62.

Ramiya, V. K., X. Z. Shang, C. H. Wasserfall and N. K. Maclaren (1997). "Effect of oral and intravenous insulin and glutamic acid decarboxylase in NOD mice." *Autoimmunity* **26**(3): 139-151.

Randolph, G. J., S. Beaulieu, M. Pope, I. Sugawara, L. Hoffman, R. M. Steinman and W. A. Muller (1998). "A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 6924-6929.

Reizis, B. (2010). "Regulation of plasmacytoid dendritic cell development." *Curr Opin Immunol* **22**(2): 206-211.

Robles, D. T., G. S. Eisenbarth, T. Wang, H. A. Erlich, T. L. Bugawan, S. R. Babu, K. Barriga, J. M. Norris, M. Hoffman, G. Klingensmith, L. Yu, M. Rewers and Y. Diabetes Autoimmunity Study in the (2002). "Millennium award recipient contribution. Identification of children with early onset and high incidence of anti-islet autoantibodies." *Clin Immunol* **102**(3): 217-224.

Rochman, Y., M. Kashyap, G. W. Robinson, K. Sakamoto, J. Gomez-Rodriguez, K. U. Wagner and W. J. Leonard (2010). "Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(45): 19455-19460.

Roep, B. O., N. Solvason, P. A. Gottlieb, J. R. Abreu, L. C. Harrison, G. S. Eisenbarth, L. Yu, M. Leviten, W. A. Hagopian, J. B. Buse, M. von Herrath, J. Quan, R. S. King, W. H. Robinson, P. J. Utz, H. Garren, B. H. T. Investigators and L. Steinman (2013). "Plasmid-encoded proinsulin preserves C-peptide while specifically reducing proinsulin-specific CD8(+) T cells in type 1 diabetes." *Sci Transl Med* **5**(191): 191ra182.

Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe and J. A. Bluestone (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." *Immunity* **12**(4): 431-440.

Sanjabi, S., L. A. Zenewicz, M. Kamanaka and R. A. Flavell (2009). "Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity." *Curr Opin Pharmacol* **9**(4): 447-453.

Saunders, K. A., T. Raine, A. Cooke and C. E. Lawrence (2007). "Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection." *Infect Immun* **75**(1): 397-407.

Sebastian, C., M. Serra, A. Yeramian, N. Serrat, J. Lloberas and A. Celada (2008). "Deacetylase activity is required for STAT5-dependent GM-CSF functional activity in macrophages and differentiation to dendritic cells." *J Immunol* **180**(9): 5898-5906.

Serreze, D. V., H. D. Chapman, D. S. Varnum, M. S. Hanson, P. C. Reifsnyder, S. D. Richard, S. A. Fleming, E. H. Leiter and L. D. Shultz (1996). "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* **184**(5): 2049-2053.

Sexl, V., R. Piekorz, R. Moriggl, J. Rohrer, M. P. Brown, K. D. Bunting, K. Rothhammer, M. F. Roussel and J. N. Ihle (2000). "Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5." *Blood* **96**(6): 2277-2283.

Sharif, S., G. A. Arreaza, P. Zucker, Q. S. Mi, J. Sondhi, O. V. Naidenko, M. Kronenberg, Y. Koezuka, T. L. Delovitch, J. M. Gombert, M. Leite-De-Moraes, C. Gouarin, R. Zhu, A. Hameg, T. Nakayama, M. Taniguchi, F. Lepault, A. Lehuen, J. F. Bach and A. Herbelin (2001). "Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes." *Nat Med* **7**(9): 1057-1062.

Shin, T., K. Yoshimura, T. Shin, E. B. Crafton, H. Tsuchiya, F. Housseau, H. Koseki, R. D. Schulick, L. Chen and D. M. Pardoll (2005). "In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses." *J Exp Med* **201**(10): 1531-1541.

Shoda, L. K., D. L. Young, S. Ramanujan, C. C. Whiting, M. A. Atkinson, J. A. Bluestone, G. S. Eisenbarth, D. Mathis, A. A. Rossini, S. E. Campbell, R. Kahn and H. T. Kreuzel (2005). "A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation." *Immunity* **23**(2): 115-126.

Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." *Nat Rev Immunol* **2**(3): 151-161.

Shuai, K. and B. Liu (2003). "Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system." *Nat Rev Immunol* **3**(11): 900-911.

Silveira, P. A., J. Dombrowsky, E. Johnson, H. D. Chapman, D. Nemazee and D. V. Serreze (2004). "B cell selection defects underlie the development of diabetogenic APCs in nonobese diabetic mice." *J Immunol* **172**(8): 5086-5094.

Simoncic, P. D., A. Lee-Loy, D. L. Barber, M. L. Tremblay and C. J. McGlade (2002). "The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3." *Curr Biol* **12**(6): 446-453.

Simoni, Y., J. Diana, L. Ghazarian, L. Beaudoin and A. Lehuen (2013). "Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality?" *Clin Exp Immunol* **171**(1): 8-19.

Snow, J. W., N. Abraham, M. C. Ma, B. G. Herndier, A. W. Pastuszak and M. A. Goldsmith (2003). "Loss of tolerance and autoimmunity affecting multiple organs in STAT5A/5B-deficient mice." *J Immunol* **171**(10): 5042-5050.

Socolovsky, M., A. E. Fallon, S. Wang, C. Brugnara and H. F. Lodish (1999). "Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a<sup>-/-</sup>5b<sup>-/-</sup> mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction." *Cell* **98**(2): 181-191.

Socolovsky, M., H. Nam, M. D. Fleming, V. H. Haase, C. Brugnara and H. F. Lodish (2001). "Ineffective erythropoiesis in Stat5a<sup>(-/-)</sup>5b<sup>(-/-)</sup> mice due to decreased survival of early erythroblasts." *Blood* **98**(12): 3261-3273.

Sporri, R. and C. Reis e Sousa (2005). "Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4<sup>+</sup> T cell populations lacking helper function." *Nat Immunol* **6**(2): 163-170.

Steck, A. K., K. Johnson, K. J. Barriga, D. Miao, L. Yu, J. C. Hutton, G. S. Eisenbarth and M. J. Rewers (2011). "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* **34**(6): 1397-1399.

Steptoe, R. J., J. M. Ritchie and L. C. Harrison (2002). "Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice." *J Immunol* **168**(10): 5032-5041.

Stockinger, B. and M. Veldhoen (2007). "Differentiation and function of Th17 T cells." *Curr Opin Immunol* **19**(3): 281-286.

Stoop, J. N., J. H. Robinson and C. M. Hilkens (2011). "Developing tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: what can we learn from mouse models?" *Ann Rheum Dis* **70**(9): 1526-1533.

Stumpfova, Z., R. Hezova, A. C. Meli, O. Slaby and J. Michalek (2014). "MicroRNA profiling of activated and tolerogenic human dendritic cells." *Mediators Inflamm* **2014**: 259689.

Suzuki, S., K. Honma, T. Matsuyama, K. Suzuki, K. Toriyama, I. Akitoyo, K. Yamamoto, T. Suematsu, M. Nakamura, K. Yui and A. Kumatori (2004). "Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b<sup>high</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> dendritic cell development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(24): 8981-8986.

Takeda, A., S. Hamano, A. Yamanaka, T. Hanada, T. Ishibashi, T. W. Mak, A. Yoshimura and H. Yoshida (2003). "Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment." *J Immunol* **170**(10): 4886-4890.

Tamura, T., P. Taylor, K. Yamaoka, H. J. Kong, H. Tsujimura, J. J. O'Shea, H. Singh and K. Ozato (2005). "IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity." *J Immunol* **174**(5): 2573-2581.

Tang, Q. and J. A. Bluestone (2008). "The Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation." *Nat Immunol* **9**(3): 239-244.

Tang, Q., K. J. Henriksen, M. Bi, E. B. Finger, G. Szot, J. Ye, E. L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi and J. A. Bluestone (2004). "In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes." *J Exp Med* **199**(11): 1455-1465.

Tang, Q., K. J. Henriksen, E. K. Boden, A. J. Tooley, J. Ye, S. K. Subudhi, X. X. Zheng, T. B. Strom and J. A. Bluestone (2003). "Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells." *J Immunol* **171**(7): 3348-3352.

Tarbell, K. V., S. Yamazaki, K. Olson, P. Toy and R. M. Steinman (2004). "CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes." *J Exp Med* **199**(11): 1467-1477.

Teglund, S., C. McKay, E. Schuetz, J. M. van Deursen, D. Stravopodis, D. Wang, M. Brown, S. Bodner, G. Grosveld and J. N. Ihle (1998). "Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses." *Cell* **93**(5): 841-850.

Thayer, T. C., S. B. Wilson and C. E. Mathews (2010). "Use of nonobese diabetic mice to understand human type 1 diabetes." *Endocrinol Metab Clin North Am* **39**(3): 541-561.

Thomas, D. C., F. S. Wong, P. Zaccane, E. A. Green and M. Wallberg (2013). "Protection of islet grafts through transforming growth factor-beta-induced tolerogenic dendritic cells." *Diabetes* **62**(9): 3132-3142.

Thomson, A. W. and P. D. Robbins (2008). "Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation." *Ann Rheum Dis* **67 Suppl 3**: iii90-96.

Tian, B., J. Yang and A. R. Brasier (2012). "Two-step cross-linking for analysis of protein-chromatin interactions." *Methods Mol Biol* **809**: 105-120.

Tisch, R. and H. McDevitt (1996). "Insulin-dependent diabetes mellitus." *Cell* **85**(3): 291-297.

Todd, J. A. and L. S. Wicker (2001). "Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models." *Immunity* **15**(3): 387-395.

Totsuka, T., T. Kanai, S. Makita, R. Fujii, Y. Nemoto, S. Oshima, R. Okamoto, A. Koyanagi, H. Akiba, K. Okumura, H. Yagita and M. Watanabe (2005). "Regulation of murine chronic colitis by CD4+CD25- programmed death-1+ T cells." *Eur J Immunol* **35**(6): 1773-1785.

Tracy, S., K. M. Drescher and N. M. Chapman (2011). "Enteroviruses and type 1 diabetes." *Diabetes Metab Res Rev* **27**(8): 820-823.

Tracy, S., K. M. Drescher, N. M. Chapman, K. S. Kim, S. D. Carson, S. Pirruccello, P. H. Lane, J. R. Romero and J. S. Leser (2002). "Toward testing the hypothesis that group B coxsackieviruses (CVB) trigger insulin-dependent diabetes: inoculating nonobese diabetic mice with CVB markedly lowers diabetes incidence." *J Virol* **76**(23): 12097-12111.

Tritt, M., E. Sgouroudis, E. d'Hennezel, A. Albanese and C. A. Piccirillo (2008). "Functional waning of naturally occurring CD4+ regulatory T-cells contributes to the onset of autoimmune diabetes." *Diabetes* **57**(1): 113-123.

Trudeau, J. D., J. P. Dutz, E. Arany, D. J. Hill, W. E. Fieldus and D. T. Finegood (2000). "Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes?" *Diabetes* **49**(1): 1-7.

Turley, S., L. Poirot, M. Hattori, C. Benoist and D. Mathis (2003). "Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model." *J Exp Med* **198**(10): 1527-1537.

Turner, M. S., L. P. Kane and P. A. Morel (2009). "Dominant role of antigen dose in CD4+Foxp3+ regulatory T cell induction and expansion." *J Immunol* **183**(8): 4895-4903.

Turnquist, H. R., G. Raimondi, A. F. Zahorchak, R. T. Fischer, Z. Wang and A. W. Thomson (2007). "Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance." *J Immunol* **178**(11): 7018-7031.

Udy, G. B., R. P. Towers, R. G. Snell, R. J. Wilkins, S. H. Park, P. A. Ram, D. J. Waxman and H. W. Davey (1997). "Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7239-7244.

Ueda, H., J. M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D. B. Rainbow, K. M. Hunter, A. N. Smith, G. Di Genova, M. H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R. C. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H. E. Rance, V. Everett, L. J. Smink, A. C. Lam, H. J. Cordell, N. M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motzo, F. Cucca, J. F. Hess, M. L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadi, R. Nithiyanthan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K. M. Gillespie, D. E. Undlien, K. S. Ronningen, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D. A. Savage, A. P. Maxwell, D. J. Carson, C. C. Patterson, J. A. Franklyn, D. G. Clayton, L. B. Peterson, L. S. Wicker, J. A. Todd and S. C. Gough (2003). "Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease." *Nature* **423**(6939): 506-511.



Ueno, H., E. Klechevsky, R. Morita, C. Aspod, T. Cao, T. Matsui, T. Di Pucchio, J. Connolly, J. W. Fay, V. Pascual, A. K. Palucka and J. Banchereau (2007). "Dendritic cell subsets in health and disease." *Immunol Rev* **219**: 118-142.

Uno, S., A. Imagawa, K. Okita, K. Sayama, M. Moriwaki, H. Iwahashi, K. Yamagata, S. Tamura, Y. Matsuzawa, T. Hanafusa, J. Miyagawa and I. Shimomura (2007). "Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes." *Diabetologia* **50**(3): 596-601.

Valencia, J., C. Hernandez-Lopez, V. G. Martinez, L. Hidalgo, A. G. Zapata, A. Vicente, A. Varas and R. Sacedon (2011). "Wnt5a skews dendritic cell differentiation to an unconventional phenotype with tolerogenic features." *J Immunol* **187**(8): 4129-4139.

van Belle, T. L., K. T. Coppieters and M. G. von Herrath (2011). "Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies." *Physiol Rev* **91**(1): 79-118.

van de Laar, L., P. J. Coffey and A. M. Woltman (2012). "Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy." *Blood* **119**(15): 3383-3393.

van der Kleij, D., E. Latz, J. F. Brouwers, Y. C. Kruize, M. Schmitz, E. A. Kurt-Jones, T. Espevik, E. C. de Jong, M. L. Kapsenberg, D. T. Golenbock, A. G. Tielens and M. Yazdanbakhsh (2002). "A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization." *J Biol Chem* **277**(50): 48122-48129.

Vander Lugt, B., A. A. Khan, J. A. Hackney, S. Agrawal, J. Lesch, M. Zhou, W. P. Lee, S. Park, M. Xu, J. DeVoss, C. J. Spooner, C. Chalouni, L. Delamarre, I. Mellman and H. Singh (2014). "Transcriptional programming of dendritic cells for enhanced MHC class II antigen presentation." *Nat Immunol* **15**(2): 161-167.

Vella, A., J. D. Cooper, C. E. Lowe, N. Walker, S. Nutland, B. Widmer, R. Jones, S. M. Ring, W. McArdle, M. E. Pembrey, D. P. Strachan, D. B. Dunger, R. C. Twells, D. G. Clayton and J. A. Todd (2005). "Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms." *Am J Hum Genet* **76**(5): 773-779.

Verdaguer, J., D. Schmidt, A. Amrani, B. Anderson, N. Averill and P. Santamaria (1997). "Spontaneous autoimmune diabetes in monoclonal T cell nonobese diabetic mice." *J Exp Med* **186**(10): 1663-1676.

Villarino, A., A. Laurence, G. W. Robinson, M. Bonelli, B. Dema, B. Afzali, H. Y. Shih, H. W. Sun, S. R. Brooks, L. Hennighausen, Y. Kanno and J. J. O'Shea (2016). "Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) paralog dose governs T cell effector and regulatory functions." *Elife* **5**.

Vremec, D., J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu and K. Shortman (2000). "CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen." *J Immunol* **164**(6): 2978-2986.

Vremec, D. and K. Shortman (1997). "Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes." *J Immunol* **159**(2): 565-573.

Wakefield, L. M., T. S. Winokur, R. S. Hollands, K. Christopherson, A. D. Levinson and M. B. Sporn (1990). "Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer

plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution." *J Clin Invest* **86**(6): 1976-1984.

Walker, S. R., E. A. Nelson, J. E. Yeh, L. Pinello, G. C. Yuan and D. A. Frank (2013). "STAT5 outcompetes STAT3 to regulate the expression of the oncogenic transcriptional modulator BCL6." *Mol Cell Biol* **33**(15): 2879-2890.

Waskow, C., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, P. Guermonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao and M. Nussenzweig (2008). "The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues." *Nat Immunol* **9**(6): 676-683.

Waterhouse, P., J. M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K. P. Lee, C. B. Thompson, H. Griesser and T. W. Mak (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4." *Science* **270**(5238): 985-988.

Wen, L., R. E. Ley, P. Y. Volchkov, P. B. Stranges, L. Avanesyan, A. C. Stonebraker, C. Hu, F. S. Wong, G. L. Szot, J. A. Bluestone, J. I. Gordon and A. V. Chervonsky (2008). "Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes." *Nature* **455**(7216): 1109-1113.

Wicker, L. S., G. Chamberlain, K. Hunter, D. Rainbow, S. Howlett, P. Tiffen, J. Clark, A. Gonzalez-Munoz, A. M. Cumiskey, R. L. Rosa, J. M. Howson, L. J. Smink, A. Kingsnorth, P. A. Lyons, S. Gregory, J. Rogers, J. A. Todd and L. B. Peterson (2004). "Fine mapping, gene content, comparative sequencing, and expression analyses support Ctl4 and Nramp1 as candidates for Idd5.1 and Idd5.2 in the nonobese diabetic mouse." *J Immunol* **173**(1): 164-173.

Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby and M. E. Brunkow (2001). "X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy." *Nat Genet* **27**(1): 18-20.

Williams, J. W., M. Y. Tjota, B. S. Clay, B. Vander Lugt, H. S. Bandukwala, C. L. Hrusch, D. C. Decker, K. M. Blaine, B. R. Fixsen, H. Singh, R. Sciammas and A. I. Sperling (2013). "Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation." *Nat Commun* **4**: 2990.

Wu, J., A. Katrekar, L. A. Honigberg, A. M. Smith, M. T. Conn, J. Tang, D. Jeffery, K. Mortara, J. Sampang, S. R. Williams, J. Buggy and J. M. Clark (2006). "Identification of substrates of human protein-tyrosine phosphatase PTPN22." *J Biol Chem* **281**(16): 11002-11010.

Xing, Y. and K. A. Hogquist (2012). "T-cell tolerance: central and peripheral." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(6).

Xiu, Y., C. P. Wong, J. D. Bouaziz, Y. Hamaguchi, Y. Wang, S. M. Pop, R. M. Tisch and T. F. Tedder (2008). "B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions." *J Immunol* **180**(5): 2863-2875.

Xu, P., Y. Wu, Y. Zhu, G. Dagne, G. Johnson, D. Cuthbertson, J. P. Krischer, J. M. Sosenko, J. S. Skyler and G. Diabetes Prevention Trial-Type 1 Study (2010). "Prognostic performance of metabolic indexes in predicting onset of type 1 diabetes." *Diabetes Care* **33**(12): 2508-2513.

Yamaji, D., K. Kang, G. W. Robinson and L. Hennighausen (2013). "Sequential activation of genetic programs in mouse mammary epithelium during pregnancy depends on STAT5A/B concentration." *Nucleic Acids Res* **41**(3): 1622-1636.

Yamazaki, M., T. Pearson, M. A. Brehm, D. M. Miller, J. A. Mangada, T. G. Markees, L. D. Shultz, J. P. Mordes, A. A. Rossini and D. L. Greiner (2007). "Different mechanisms control peripheral and central tolerance in hematopoietic chimeric mice." *Am J Transplant* **7**(7): 1710-1721.

Yamazaki, S., A. J. Bonito, R. Spisek, M. Dhodapkar, K. Inaba and R. M. Steinman (2007). "Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors." *Blood* **110**(13): 4293-4302.

Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba and R. M. Steinman (2003). "Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells." *J Exp Med* **198**(2): 235-247.

Yao, Z., Y. Cui, W. T. Watford, J. H. Bream, K. Yamaoka, B. D. Hissong, D. Li, S. K. Durum, Q. Jiang, A. Bhandoola, L. Hennighausen and J. J. O'Shea (2006). "Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(4): 1000-1005.

Yao, Z., Y. Kanno, M. Kerenyi, G. Stephens, L. Durant, W. T. Watford, A. Laurence, G. W. Robinson, E. M. Shevach, R. Moriggl, L. Hennighausen, C. Wu and J. J. O'Shea (2007). "Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3." *Blood* **109**(10): 4368-4375.

Yarilin, D., R. Duan, Y. M. Huang and B. G. Xiao (2002). "Dendritic cells exposed in vitro to TGF-beta1 ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis." *Clin Exp Immunol* **127**(2): 214-219.

Yeung, W. C., W. D. Rawlinson and M. E. Craig (2011). "Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies." *BMJ* **342**: d35.

Yoon, J. W., M. Austin, T. Onodera and A. L. Notkins (1979). "Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis." *N Engl J Med* **300**(21): 1173-1179.

You, S., M. Belghith, S. Cobbold, M. A. Alyanakian, C. Gouarin, S. Barriot, C. Garcia, H. Waldmann, J. F. Bach and L. Chatenoud (2005). "Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells." *Diabetes* **54**(5): 1415-1422.

Zelante, T., A. De Luca, P. Bonifazi, C. Montagnoli, S. Bozza, S. Moretti, M. L. Belladonna, C. Vacca, C. Conte, P. Mosci, F. Bistoni, P. Puccetti, R. A. Kastelein, M. Kopf and L. Romani (2007). "IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance." *Eur J Immunol* **37**(10): 2695-2706.

Zerif, E., A. Maalem, S. Gaudreau, C. Guindi, M. Ramzan, S. Veroneau, D. Gris, J. Stankova, M. Rola-Pleszczynski, W. Mourad, G. Dupuis and A. Amrani (2017). "Constitutively active Stat5b signaling confers tolerogenic functions to dendritic cells of NOD mice and halts diabetes progression." *J Autoimmun* **76**: 63-74.

Zhang, S., S. Fukuda, Y. Lee, G. Hangoc, S. Cooper, R. Spolski, W. J. Leonard and H. E. Broxmeyer (2000). "Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling." *J Exp Med* **192**(5): 719-728.

Zheng, J., H. Y. Jiang, J. Li, H. C. Tang, X. M. Zhang, X. R. Wang, J. T. Du, H. B. Li and G. Xu (2012). "MicroRNA-23b promotes tolerogenic properties of dendritic cells in vitro through inhibiting Notch1/NF-kappaB signalling pathways." *Allergy* **67**(3): 362-370.

Zheng, P. and S. Kissler (2013). "PTPN22 silencing in the NOD model indicates the type 1 diabetes-associated allele is not a loss-of-function variant." *Diabetes* **62**(3): 896-904.

Zhu, B., T. Buttrick, R. Bassil, C. Zhu, M. Olah, C. Wu, S. Xiao, W. Orent, W. Elyaman and S. J. Khoury (2013). "IL-4 and retinoic acid synergistically induce regulatory dendritic cells expressing Aldh1a2." *J Immunol* **191**(6): 3139-3151.

Zhu, H., W. Qiu, P. Lei, W. Zhou, X. Wen, F. He, L. Li, H. Dai, G. Shen and F. Gong (2008). "IL-10 gene modified dendritic cells inhibit T helper type 1-mediated alloimmune responses and promote immunological tolerance in diabetes." *Cell Mol Immunol* **5**(1): 41-46.

Zhu, J., J. Cote-Sierra, L. Guo and W. E. Paul (2003). "Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation." *Immunity* **19**(5): 739-748.

Ziegler, A. G., M. Rewers, O. Simell, T. Simell, J. Lempainen, A. Steck, C. Winkler, J. Ilonen, R. Veijola, M. Knip, E. Bonifacio and G. S. Eisenbarth (2013). "Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children." *JAMA* **309**(23): 2473-2479.