

Université de Montréal

**Étude fonctionnelle et génétique d'une population de
lymphocytes T CD4-CD8- impliquée dans la résistance
au diabète auto-immun chez la souris**

par

Véronique Dugas

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de Ph.D.

en Microbiologie et Immunologie

25 Mai, 2011

© Véronique Dugas, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Étude fonctionnelle et génétique d'une population de lymphocytes T CD4-CD8- impliquée
dans la résistance au diabète auto-immun chez la souris

Présentée par :
Véronique Dugas

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Françoise Le Deist, président-rapporteur
Dre Sylvie Lesage, directeur de recherche
Dr Constantin Polychronakos, membre du jury
Dr Abdelaziz Amrani, examinateur externe
Dr Jean-Sébastien Delisle, représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Le diabète auto-immun résulte de la destruction des cellules bêta pancréatiques sécrétrices d'insuline par les lymphocytes T du système immunitaire. Il s'ensuit une déficience hormonale qui peut être comblée par des injections quotidiennes d'insuline d'origine exogène, toutefois il demeure à ce jour impossible de guérir les patients atteints de la maladie. De façon générale, un système immunitaire sain reconnaît une multitude d'antigènes différents et assure ainsi notre défense à l'égard de différents pathogènes ou encore de cellules tumorales. Il arrive cependant que, pour des raisons génétiques et/ou environnementales, les lymphocytes T puissent s'activer de façon aberrante suite à la reconnaissance d'antigènes provenant du soi. C'est ce bris de tolérance qui mène au développement de pathologies auto-immunes telles que le diabète auto-immun.

Afin de limiter l'auto-immunité, des mécanismes de sélection stricts permettent d'éliminer la majorité des lymphocytes T présentant une forte affinité envers des antigènes du soi lors de leur développement dans le thymus. Certains de ces lymphocytes réussissent toutefois à échapper à l'apoptose et migrent en périphérie afin d'y circuler en quête d'un antigène spécifiquement reconnu. Il est alors primordial que des mécanismes périphériques assurent le maintien de la tolérance immunitaire en faisant obstacle à l'activation et à la prolifération des lymphocytes T auto-réactifs. L'une des avenues afin d'inhiber le développement de réponses immunitaires aberrantes est la génération de lymphocytes T régulateurs. Ces cellules, d'origine thymique ou périphérique, peuvent arborer différents phénotypes et agissent via de multiples mécanismes afin d'inactiver et/ou éliminer les cellules impliquées dans l'apparition de pathologies auto-immunes.

L'utilisation de modèles murins transgéniques a permis la mise en évidence d'une population peu caractérisée de lymphocytes T au potentiel régulateur. En effet, la proportion de ces cellules T n'exprimant pas les corécepteurs CD4 et CD8 (double négatives, DN) a été inversement corrélée à la prédisposition à l'auto-immunité chez ces

souris. L'objectif principal de cette thèse est de démontrer la fonction immuno-régulatrice des lymphocytes T DN, tout en investiguant les facteurs génétiques responsables du maintien de cette population cellulaire.

Nous avons observé que les lymphocytes T DN exercent une activité cytotoxique à l'égard des lymphocytes B de façon spécifique à l'antigène, via la libération de granules cytolytiques contenant du granzyme B et de la perforine. Par ailleurs, nous avons établi qu'un unique transfert adoptif de ces cellules est suffisant afin d'inhiber le développement du diabète auto-immun chez des hôtes transgéniques prédisposés à la maladie. Le recours à des souris déficientes pour l'expression du gène *CD47* a permis de constater que la voie de signalisation *CD47-Sirp α* est essentielle dans le maintien de la proportion des lymphocytes T DN. De plus, le locus murin de prédisposition au diabète auto-immun *Idd13*, qui contient le gène *Sirp α* , a été identifié pour son rôle dans la régulation de la proportion de ces cellules. Finalement, une analyse génétique a révélé que d'autres intervalles génétiques sont impliqués dans le contrôle de la population des lymphocytes T DN. Parmi ceux-ci, un locus situé en région proximale du chromosome 12 a été validé grâce à la création de souris congéniques. Grâce aux résultats présentés dans cette thèse, notre compréhension de la biologie ainsi que de la régulation des lymphocytes T DN est approfondie. Ces connaissances constituent un pas important vers la création de thérapies cellulaires novatrices permettant de prévenir et de guérir diverses pathologies auto-immunes.

Mots-clés : Diabète auto-immun, Souris transgénique, Tolérance immunitaire, Lymphocyte T Double Négatif

ABSTRACT

Autoimmune diabetes results from the destruction of the insulin-secreting pancreatic beta cells by the T lymphocytes of the immune system. This leads to a hormonal deficiency that can be regulated with daily injections of exogenous insulin. However, to date, there is no cure for autoimmune diabetes. A healthy immune system generally recognizes a multitude of antigens in order to ensure our defence against different pathogens and tumor cells. Yet, depending on genetic and/or environmental factors, individuals may develop T cells that are aberrantly activated following the recognition of self-antigens. This break in tolerance leads to the development of autoimmune pathologies, such as autoimmune diabetes.

In order to limit autoimmunity, rigorous selection mechanisms eliminate the vast majority of the T lymphocytes that present a high affinity for self-antigens during their thymic development. However, some of these auto-reactive lymphocytes escape from the elimination processes and migrate to the periphery where they might encounter a self-antigen. It is then essential that peripheral mechanisms maintain the immune tolerance by abrogating the activation and the proliferation of these self-specific T lymphocytes. One of the means to inhibit aberrant immune responses is the generation of regulatory T lymphocytes. These cells, which can be of thymus or peripheral origin, display various phenotypes and can mediate their action through several mechanisms in order to inactivate and/or eliminate the cells that are implicated in the development of autoimmune diseases.

The use of transgenic mouse models made it possible to identify a poorly characterized population of T lymphocytes that exhibit a regulatory potential, namely CD4-CD8- (double negative, DN T cells). Indeed, the proportion of DN T cells in lymphoid organs is inversely correlated to autoimmune predisposition. The main objective of this thesis is to determine the immunoregulatory function of the DN T cells, as well as to reveal the genetic factors underlying the regulation of the proportion of DN T cells.

We observed that through the release of cytolytic granules containing granzyme B and perforin, DN T lymphocytes exert a cytotoxic activity towards B cells in an antigen-specific manner. In addition, we have established that a single injection of those DN T cells is sufficient to inhibit the development of autoimmune diabetes in highly susceptible transgenic mice. The use of *CD47* deficient mice also demonstrated that the CD47-Sirp α pathway is essential to maintain DN T cell proportion. Also, we identified that the autoimmune diabetes susceptibility locus *Idd13*, which contains *Sirp α* , participates in defining the proportion of DN T cells. Finally, a genetic analysis revealed that other loci are implicated in the control of the DN T cell population. Among those, the role of a locus situated in the proximal region of chromosome 12 has been validated through the generation of congenic mice. The results presented in this thesis have allowed us to enhance our understanding of the biology and genetic regulation of DN T lymphocytes. This knowledge constitutes an important step towards the creation of innovative cellular therapies that may prevent and cure a diversity of autoimmune pathologies.

Keywords : Autoimmune diabetes, Transgenic mouse, Immune tolerance, Double Negative T lymphocyte

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiv
 CHAPITRE 1	
Introduction	1
1.1 Le diabète de type 1 : généralités et pathologie	1
1.1.1 Les maladies auto-immunes	1
1.1.2 Incidence, pathologie et traitement	1
1.2 Les facteurs de prédisposition à la maladie.....	6
1.2.1 Les facteurs environnementaux.....	8
1.2.1.1 L'alimentation.....	8
1.2.1.2 Les infections et autres	8
1.2.2 La génétique	11
1.2.2.1 Étude de traits génétiques complexes	12
1.2.2.2 Le locus du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH).....	13
1.2.2.2.1 Le CMH-II.....	14
1.2.2.2.2 Le CMH-I.....	16
1.2.2.2.3 Autres gènes du CMH (CMH-III)	17
1.2.2.3 Les gènes situés à l'extérieur du locus du CMH	18
1.2.2.3.1 L'insuline	18

1.2.2.3.2 <i>PTPN22</i>	18
1.2.2.3.3 <i>CTLA-4</i>	19
1.2.2.3.4 <i>IL-2Rα</i>	19
1.2.2.3.5 Autres régions associées au risque de développer le T1D	20
1.3 Les modèles animaux d'étude du diabète auto-immun.....	23
1.3.1 Le rat <i>BioBreeding</i> (BB)	24
1.3.2 La souris <i>Non-Obese Diabetic</i> (NOD)	24
1.3.3 Les modèles induits	26
1.3.4 Les modèles génétiquement modifiés	27
1.3.4.1 Les animaux congéniques.....	27
1.3.4.1.1 Contribution de l' <i>Idd-13</i>	30
1.3.4.2 Les modèles « <i>knock-out</i> » et « <i>knock-in</i> ».....	31
1.3.4.2.1 La souris déficiente pour <i>CD47</i>	33
1.3.4.3 Les animaux transgéniques.....	34
1.3.4.3.1 Le système TCR3A9 :insHEL	36
1.4 Le rôle du système immunitaire dans la pathogénèse.....	38
1.4.1 Les lymphocytes T	38
1.4.1.1 Rôles des lymphocytes T dans la pathogénèse de la maladie.....	38
1.4.1.2 Mécanismes de tolérance centrale des lymphocytes T $\alpha\beta$	39
1.4.1.3 Mécanismes de tolérance périphérique des lymphocytes T $\alpha\beta$	43
1.4.1.3.1 Différentes populations de lymphocytes T régulateurs (Tregs).....	44
1.4.1.3.2 Les lymphocytes T CD4-CD8- (DN).....	46
1.4.2 Les lymphocytes B	49
1.4.3 Implication des autres cellules du système immunitaire	51
1.5 Raisonnement, hypothèse et objectifs	54

CHAPITRE 2

Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes	55
2.1 Présentation de l'article et contribution personnelle	55
2.2 Abstract	57
2.3 Introduction	58
2.4 Materials and methods	60
2.5 Results	63
2.6 Discussion	69
2.7 Acknowledgments	72
2.8 References	73
2.9 Figures and Tables	79

CHAPITRE 3

<i>Idd13</i> is involved in defining immunoregulatory DN T cell number	90
3.1 Présentation de l'article et contribution personnelle	90
3.2 Abstract	92
3.3 Introduction	93
3.4 Results	95
3.5 Discussion	100
3.6 Materials and methods	103
3.7 Acknowledgments	105
3.8 References	106
3.9 Figures	109

CHAPITRE 4

Genetic association of regulatory DN T cell niche	115
4.1 Présentation de l'article et contribution personnelle	115
4.2 Abstract	117

4.3 Introduction	118
4.4 Materials and methods	120
4.5 Results	122
4.6 Discussion	125
4.7 Acknowledgments.....	127
4.8 References	128
4.9 Figures.....	131

CHAPITRE 5

Discussion.....	136
5.1 Lymphocytes T DN : Que sont-ils?	136
5.2 Lymphocytes T DN : Que font-ils?.....	144
5.3 Lymphocytes T DN : Comment restaurer leur nombre?.....	150
5.3.1 Expansion et transfert.....	150
5.3.2 Régulation et thérapie génique	152
5.4 Modèle	158
5.5 Conclusion	159

BIBLIOGRAPHIE..... 161

ANNEXES xvi

Annexe 1: Absence of CD47 <i>in vivo</i> influences thymic dendritic cell subset proportion but not negative selection of thymocytes	xvi
Annexe 2: IL-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice	xlvii
Annexe 3: Immunogenetics : Tolerance and Autoimmunity Chapter 2: T cells	lxxviii
Annexe 4: DN T cell eliminate activated B cells <i>in vivo</i>	xciv
Annexe 5: The proportion of Sirp α^{hi} macrophages is reduced in NOD. <i>H2^k</i> mice.....	xcv

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Représentation du pancréas, des îlots de Langerhans et des cellules bêta productrices d'insuline.
- Figure 2 : Représentation de l'effet synergique de différents facteurs génétiques et environnementaux prédisposant au développement de pathologies auto-immunes.
- Figure 3 : Structure des gènes formant le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) chez l'homme et la souris.
- Figure 4 : Liste des loci et gènes autres que le CMH associés à la prédisposition au diabète de type 1 ainsi que leur risque relatif.
- Figure 5 : Représentation des régions génétiques associées à la prédisposition au diabète de type 1 chez l'homme.
- Figure 6 : Méthode de création de souris congéniques homozygotes pour une région (locus X) associée à la résistance à une maladie donnée.
- Figure 7 : Migration et éducation des thymocytes de stade DN, DP et SP à travers les différentes zones du thymus.
- Figure 8 : Sélection positive et négative des thymocytes selon l'affinité avec laquelle ils reconnaissent un complexe CMH-peptide.
- Figure 9 : Différentes populations de lymphocytes T régulateurs.
- Figure 10 : Modèle décrivant le mécanisme d'action des lymphocytes T DN par le groupe de L. Zhang.
- Figure 11 : Modèle général de la réponse immunitaire altérée par des facteurs génétiques et environnementaux menant au développement du diabète de type 1.

Figure 12 : Schéma représentant comment l'accumulation de facteurs peut mener au développement de pathologies immunitaires.

Figure 13 : Représentation des étapes menant à la génération d'un centre germinatif, ainsi qu'à la différenciation de plasmocytes et de cellules B mémoires.

Figure 14 : Modèle représentant le développement ainsi que le rôle des lymphocytes T DN dans la prévention du diabète auto-immun.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AIRE : *Autoimmune regulator*

ADN: Acide désoxyribonucléique

α GalCer : *alpha-galactosyl ceramide*

ARN: Acide ribonucléique

BB : *BioBreeding*

BCR: Récepteur de Cellule B

β 2m: Bêta-2 microglobuline

C4: Fraction du complément 4

CD : *Cluster of differentiation*

CFSE: *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CFTR : *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CNV: *Copy number variation*

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

cTEC: Cellule épithéliale thymique du cortex

CTLA-4 : *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*

DC : Cellules dendritiques

DN : Double négatif (CD4⁻ CD8⁻)

DP : Double positif (CD4⁺ CD8⁺)

ENU : *Ethyl nitrosourea*

EOMES: *Eomesodermin*

FAS: *Apoptosis stimulating fragment*

FLICE: *FADD-Like interleukin-beta-converting enzyme*

Foxp3 : *Forkhead box P3*

GAD: *Glutamic acid decarboxylase*

GWAS : *Genome wide association study*

HLA : *Human leucocyte antigen*

HEL: *Hen egg lysozyme*

ICOS: *Inducible T-cell co-stimulator*

Idd : *Insulin-dependant diabetes*

IDDM : *Insulin-dependant diabetes mellitus*

IFN- γ : Interféron gamma

IL : Interleukine

Ins: Insuline

iTreg : Lymphocyte T régulateur induit

Lck: *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*

VCML: Virus de la ChorioMéningite Lymphocytaire

LOD : *Logarithm of odds*

LPS : Lipopolysaccharide

LYP: *Lymphopenia gene*

M-CSF : *Macrophage colony-stimulating factor*

mTEC: Cellule épithéliale thymique de la médulla

NK: Cellule tueuse naturelle

NKT: Cellule T tueuse naturelle

NOD : *Non-Obese Diabetic*

NZB : *New Zealand Black*

nTreg: Lymphocyte T régulateur naturel

OT-I: Souris transgénique pour le TCR reconnaissant le complexe OVA-CMH-I

OT-II: Souris transgénique pour le TCR reconnaissant le complexe OVA-CMH-II

OVA : Ovalbumine

PD-1: *Programmed death 1*

PTPN22 : *Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*

QTL : *Quantitative trait locus*

ROS : *Reactive oxygen species*

RT-1: Complexe majeur d'histocompatibilité du rat

Sirp α : *Signal-regulatory protein alpha*

SNP : *Single nucleotide polymorphism*

SP : Simple positif (CD4+ CD8- ou CD4- CD8+)

TCR : Récepteur de cellule T

TGF-b: *Transforming growth factor beta*

TNF- α : *Tumor-necrosis factor alpha*

Tr1: Lymphocyte T régulateur de type 1

TRA: *Tissue-restricted antigen*

Treg : Lymphocyte T régulateur

VNTR: *Variable number of tandem repeat*

ZAP-70: *Zeta-chain-associated protein kinase 70*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier la personne qui m'a accordé sa confiance en faisant de moi sa première étudiante au doctorat il y a près de 5 ans déjà, ma directrice de recherche, Dr Sylvie Lesage. Merci de m'avoir offert un projet de recherche que j'ai adoré. Tu as constamment été présente pour moi durant toutes ces années, même lorsque cela signifiait me laisser me débrouiller par mes propres moyens. Merci pour ton support et ta compréhension lors des moments plus difficiles. J'ai énormément appris grâce à toi, et je pourrai longtemps me vanter d'avoir étudié sous la supervision d'une scientifique aussi chevronnée et respectée.

Je dois un merci tout spécial à Claudine Beauchamp, à qui j'ai succédé pour ce merveilleux projet de recherche. Ta présence m'a été d'un soutien inestimable, autant d'un point de vue scientifique que moral. Tu as été une compagne de travail fantastique et tu demeures une amie très chère.

Un gros merci à tous les membres actuels et passés du labo 26-34. C'est grâce à vous si les moments difficiles n'ont pas semblés insurmontables. Vous m'avez souvent rendu service, et travailler avec vous a été un plaisir. Merci d'avoir écouté toutes mes histoires sans maugréer et d'avoir participé aux délires du vendredi. J'ai une pensée particulière pour Geneviève, Erin et surtout Fanny, avec qui j'ai partagé des expériences inoubliables.

Plusieurs personnes ont activement participé à la réalisation de mon projet de doctorat, et je tiens à souligner leur contribution. Merci Marie-Josée d'avoir si bien pris soin de mes précieuses souris et de m'avoir souvent donné un coup de main pour mille et une petites choses. Ton efficacité et ta gentillesse ont fait toute la différence. Merci à

Nathalie et Martine pour le temps passé à trier des cellules « qui n'existent pas » et à régler les problèmes de cytomètre. Merci aussi à Mathieu qui, en plus de me tenir virtuellement compagnie pendant ma rédaction, a accepté de corriger certaines sections de ma thèse en un temps record.

Si j'ai eu la chance d'entreprendre un doctorat, c'est sans aucun doute grâce au soutien de ma famille. Un énorme merci à ceux qui sont toujours présents, ainsi qu'à celui que je n'aurai pas la chance de remercier de vive voix. Tu as fait de nombreux sacrifices pour moi, et j'espère sincèrement que tu sais à quel point ta présence a été déterminante. Merci à mes parents, qui m'ont toujours encouragée à croire que je pouvais obtenir tout ce dont je rêvais. Merci aussi pour votre appui inconditionnel, même lorsque moi-même je savais que j'avais tort. Merci à mes 2 petites sœurs à la fois si similaires et différentes de moi, et qui comptent maintenant parmi mes amies les plus précieuses. J'apprécie énormément votre jugement et votre façon de voir les choses.

Je remercie Jean-C, qui s'est fait un devoir de fournir les coups de pied au derrière trop souvent justifiés. Tu as cru en moi, et tu me pousses à être meilleure tous les jours. Tu es définitivement mon compétiteur favori. Merci d'être présent.

Je veux finalement remercier tous mes amis, qui ont tellement contribué à alléger les périodes pendant lesquelles je me disais « À quoi bon? ». Vous êtes les meilleurs. Merci à Sophie d'être toujours à mes côtés après toutes ces années, ce malgré mon manque de disponibilité occasionnel. Tu es une référence pour moi, et je suis extrêmement choyée d'avoir une amie aussi fidèle.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Le diabète de type 1 : généralités et pathologie

1.1.1 Les maladies auto-immunes

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune résultant de la destruction des cellules bêta pancréatiques localisées au niveau des îlots de Langerhans. Par définition, une pathologie auto-immune est caractérisée par une activité aberrante du système immunitaire à l'égard de composantes du soi [1, 2]. Il s'ensuit une atteinte qui peut être spécifiquement induite par la production d'anticorps dirigés contre des antigènes exposés à la surface des cellules, la formation de complexe immuns ou encore la destruction cellulaire par les lymphocytes T. Les désordres auto-immuns sont source de maladies systémiques, comme l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux, ou encore spécifiques à un organe, comme le diabète de type 1 [3].

1.1.2 Incidence, pathologie et traitement

Le diabète de type 1 fait figure d'exception en ce qui concerne le risque de développer la maladie en fonction du sexe. En effet, les femmes sont de façon générale plus fortement prédisposées au développement de pathologies auto-immunes, alors qu'elles représentent un peu moins de 50% des patients atteints de diabète auto-immun [4, 5]. Les causes de cette divergence demeurent nébuleuses, toutefois il a été constaté que les hommes sont particulièrement surreprésentés parmi les patients ayant été diagnostiqués à un âge supérieur à 14 ans. De même, on retrouve une plus forte proportion d'homme atteints de la maladie dans les régions arborant une forte incidence de diabète de type 1, telle que l'Île-du-Prince-Édouard [6]. En 2000, une étude mondiale a d'ailleurs classé le Canada parmi les pays présentant les plus hauts taux de patients atteints de diabète de type 1, avec une

incidence atteignant les 24 individus / 100 000 [7]. Alors qu'au Québec le nombre de cas diagnostiqués est demeuré statistiquement constant entre 1989 et 2000 [8], l'incidence globale du diabète de type 1 n'a cessé d'augmenter depuis les années 1950. Une étude récente prédit même que le nombre de cas chez les enfants âgés de moins de 5 ans doublera en Europe entre 2005 et 2020 [9]. De toute évidence, le rythme effréné de progression à l'échelle mondiale de cette forme de diabète requiert que l'on investigue les causes et mécanismes sous-jacents à l'apparition de la maladie, qui demeure à ce jour impossible à prévenir ou guérir.

Le pancréas est une glande à la fois exocrine et endocrine, et qui de ce fait participe activement au processus de digestion ainsi qu'à la régulation de la glycémie [10]. En effet, le pancréas est principalement constitué d'amas cellulaires nommés acinus, lesquels sont constitués de cellules acineuses entourant de petites structures bien définies; les îlots de Langerhans (Figure 1). Alors que les cellules acineuses ont pour rôle principal la sécrétion d'enzymes digestives, la fonction hormonale du pancréas est assurée par les différentes populations cellulaires constituant les îlots pancréatiques. Parmi celles-ci, on retrouve les cellules alpha responsables de la sécrétion de glucagon, les cellules delta productrices de somatostatine, les cellules PP libérant le polypeptide pancréatique et, finalement, les cellules bêta qui représentent environ 70% de la masse des îlots et qui permettent la génération d'insuline. Le glucagon et l'insuline sont directement responsables de la régulation de la glycémie sanguine, par rétro-inhibition. En effet, le glucagon est généré en réponse à une faible concentration de glucose, afin d'agir sur les hépatocytes qui assurent la conversion du glycogène en glucose. La production de glucagon est inhibée lorsque la concentration de glucose devient trop importante, ce qui stimule la sécrétion d'insuline. Cette hormone accélère la diffusion du glucose dans les cellules, permet la conversion de glucose en glycogène et participe à la synthèse des protéines et des acides gras. À son tour, l'insuline est inhibée lorsque la glycémie est rétablie et/ou devient trop faible.

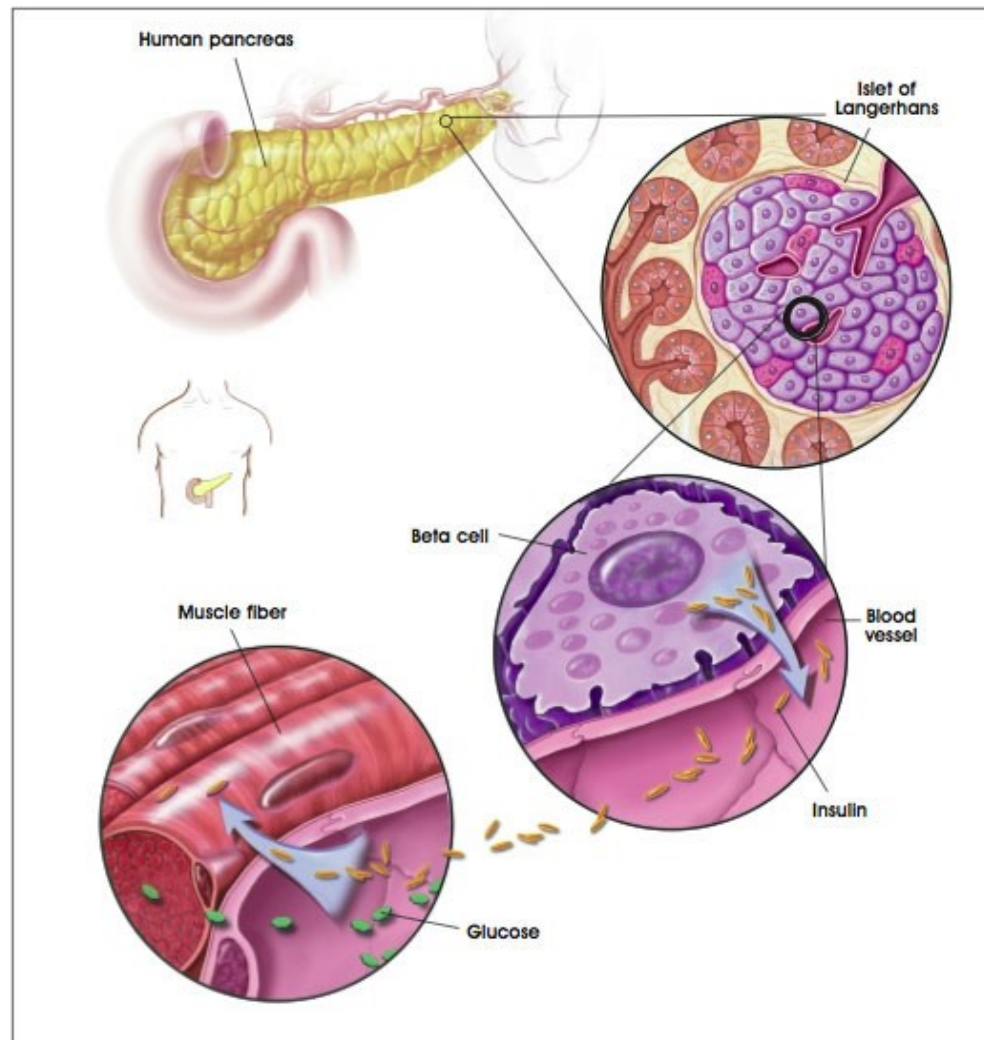


Figure 1 : Représentation du pancréas, des îlots de Langerhans et des cellules bêta productrices d'insuline [11].

Chez les patients atteints de diabète de type 1, on observe une destruction progressive des cellules bêta du pancréas par les lymphocytes T. Au moment du diagnostic, la masse de cellules bêta représente généralement de 10 à 33% de sa valeur initiale, ce qui devient insuffisant pour fournir l'apport nécessaire d'insuline suite à l'absorption de quantités importantes de glucides [12]. Les symptômes associés à un taux de glucose très élevé peuvent inclure la fatigue, la soif, une sensation de sécheresse au niveau buccal, une

respiration rapide, des nausées et des douleurs gastriques. Non-traité, le diabète de type 1 est fatal. Le seul traitement disponible pour les gens atteints de la maladie consiste en l'adoption de nouvelles habitudes de vie jumelée à l'injection régulière d'insuline recombinante humaine ou de l'un de ses analogues, ce qui permet d'imiter l'action du pancréas [13]. Il a été démontré qu'un suivi rigoureux des jeunes patients ainsi que leur adhérence à un programme misant sur la vérification régulière du taux de sucre, l'administration d'insuline à des moments déterminés et le maintien d'une diète stricte permettent un contrôle accru de la glycémie [14], un paramètre qui est associé à une diminution des complications liées à la maladie [15]. Ceux-ci incluent la perte de vision associée à une rétinopathie [16], de l'hypertension et des atteintes cardiovasculaires [17], la néphropathie [18] ainsi que la neuropathie [19].

Malgré l'amélioration de la qualité et de l'espérance de vie des patients atteints du diabète de type 1 grâce à l'administration d'insuline exogène, ce traitement demeure contraignant et uniquement palliatif. C'est pourquoi de nombreux laboratoires de recherche ont tenté au cours des dernières décennies de mettre au point la greffe d'îlots de Langerhans dans le but de réinstaurer la sécrétion endogène d'insuline et ainsi de permettre la guérison des patients [20]. En 2000, le groupe du Dr Rajotte publiait le premier protocole permettant d'atteindre chez les patients transplantés une indépendance à l'insuline injectable [21]. La réussite initiale du « Protocole d'Edmonton » a rapidement créé un engouement international et de nombreux centres ont adopté cette technique d'allo-transplantation. Malheureusement, une étude parue en 2005 est venue modérer la fébrilité face à ce traitement puisque, 5 ans après les transplantations, plus de 90% des patients étaient à nouveau dépendants d'insuline exogène [22]. À ce jour, les facteurs limitant la réussite des protocoles de transplantation d'îlots de Langerhans concernent principalement la disponibilité des organes, l'apoptose des cellules bêta, le site d'implantation, l'allo- et/ou la xéno-tolérance, l'auto-immunité ainsi que l'immunosuppression. Par ailleurs, des études

visant plutôt la maîtrise des effecteurs responsables de la destruction des îlots ont aussi obtenu des résultats mitigés. Ces études seront abordées plus loin dans le présent texte.

1.2 Les facteurs de prédisposition à la maladie

Puisque les méthodes actuelles ne permettent pas la guérison des patients atteints du diabète de type 1, il devient primordial de dépister les gens prédisposés au développement de la maladie afin d'en prévenir l'apparition. Une étude comparative de jumeaux monozygotes et dizygotes a permis d'établir hors de tout doute qu'une composante génétique est liée au développement de la maladie [23]. En effet, il est plus fréquent que la paire de jumeaux soit atteinte de la maladie si ceux-ci sont génétiquement identiques. Toutefois, chez les jumeaux identiques dont l'un développe le diabète de type 1, le taux de concordance quant à l'apparition de la maladie avant l'âge de 60 ans n'est évalué qu'à 65% [24], indiquant que des facteurs liés à l'environnement sont aussi responsables de la susceptibilité à la maladie. De plus, l'ascension fulgurante de l'incidence du diabète observée au cours des dernières décennies ne peut vraisemblablement pas s'expliquer par des altérations au niveau de gènes de susceptibilité [25, 26]. Deux composantes principales interagissent ainsi afin d'influencer la prédisposition à la maladie : la génétique et l'environnement (Figure 2).

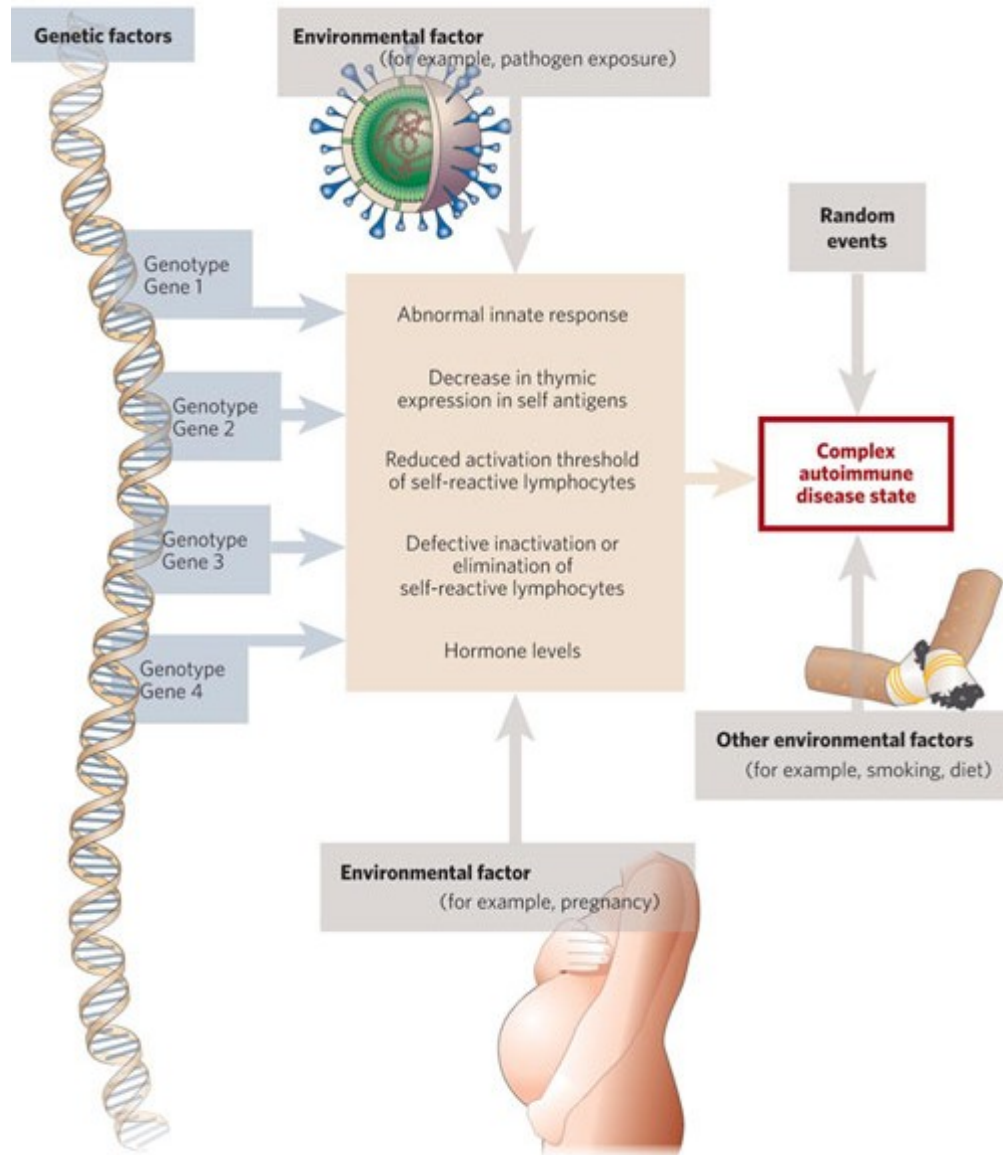


Figure 2 : Représentation de l'effet synergique de différents facteurs génétiques et environnementaux prédisposant au développement de pathologies auto-immunes. Adapté de [27].

1.2.1 Les facteurs environnementaux

Afin de dresser un portrait global des différents facteurs influençant la prédisposition au diabète de type 1, l'étude géo-épidémiologique s'avère d'une valeur inestimable puisqu'elle permet d'évaluer à la fois l'impact de la génétique, de l'ethnicité et des paramètres socio-économiques [28]. En effet, ce type d'étude a permis d'identifier certains gènes et allèles de prédisposition à la maladie détaillés plus loin. L'émigration de groupes ethniques a aussi contribué à établir le rôle des facteurs environnementaux. Par exemple, il a été démontré qu'au Royaume-Uni, l'incidence du diabète de type 1 est similaire entre les enfants d'origines caucasienne et sud-asiatique, alors que cette incidence est nettement inférieure en Asie du Sud [29, 30]. De plus, une étude suédoise a démontré que l'incidence de la maladie était inversement proportionnelle aux revenus familiaux et au niveau d'éducation, et que c'est dans les villes les plus peuplées que le risque de développer le diabète de type 1 était le plus faible [31]. De nombreux groupes ont aussi tenté d'associer le mode de vie rural ou urbain à la probabilité de développer la maladie; alors que la majorité observe une différence dans l'incidence chez les individus vivant en campagne ou en ville, la condition liée à l'augmentation de la prédisposition varie grandement d'une étude à l'autre [31-37]. Ainsi, même si la contribution de facteurs environnementaux s'avère évidente, les causes exactes prédisposant à la maladie demeurent nébuleuses.

1.2.1.1 L'alimentation

L'un des premiers facteurs environnementaux étudié pour son rôle quant à la susceptibilité au diabète de type 1 a été l'alimentation. Plus particulièrement, certains groupes ont proposé une association entre l'introduction hâtive de lait de vache à l'alimentation des enfants et le risque de développer la maladie [38, 39]. En effet, on retrouve dans le lait bovin des protéines allergènes structurellement similaires à des protéines sécrétées par les cellules d'îlots de Langerhans, ce qui favorise le risque de réactivité croisée [40, 41]. En revanche, il a été montré en 1996 que la génération

d'anticorps contre différentes protéines du lait telles que l' α -caséine, la β -caséine, la β -lactoglobuline et l'albumine de sérum bovin n'est pas restreinte aux patients atteints de diabète de type 1 [42]. On a récemment découvert que le rôle joué par l'administration de lait de vache en bas âge est fortement modulé par la présence de d'allèles de susceptibilité liés au gène PTPN22, ce qui pourrait expliquer les divergences de résultats obtenus dans les études précédentes [43]. De façon aussi controversée, d'autres aliments sont soupçonnés de favoriser le développement du diabète 1, tels que le gluten [44-46] et les nitrates présents dans l'eau de consommation [47-49].

1.2.1.2 Les infections et autres

Outre l'alimentation, les infections sont considérées comme des instigatrices probables de diverses pathologies auto-immunes [50]. Par exemple, des infections au virus Coxackie B [51-53] ou par *Streptococcus pyogenes* [54, 55] ont été associées à la myocardite, alors que l'agent étiologique de l'arthrite observée chez les patients atteints de la maladie de Lyme est *Borrelia burgdorferi* [56]. De façon générale, on croit que l'infection par un agent pathogène peut déclencher une réaction immune dommageable à l'individu via quatre différents mécanismes : le mimétisme moléculaire, l'expansion des épitopes, l'activation indirecte due à l'inflammation et la présentation d'antigènes cryptiques [50].

En ce qui concerne le diabète de type 1, de multiples virus ont été associés à l'initiation de la pathogénèse [57]. Parmi les plus communément cités, des protéines de capsidie provenant de l'entérovirus Coxackie B ont été retrouvées dans les îlots de Langerhans de patients nouvellement diagnostiqués [58]. De plus, une association a été établie entre la présence d'ARN du virus au niveau sérique et le risque de développer le diabète de type 1 [59]. Par ailleurs, la proportion des individus ayant été infectés par un virus de la famille de l'herpès, le cytomégalovirus, est significativement plus grande chez

les patients souffrant de la maladie, lorsque comparée à celle de contrôles sains [60]. Le développement de la rubéole à un stade congénital a aussi été associé à la prédisposition au diabète auto-immun [61]. S'il est impossible de corréler tous les cas de diabète de type 1 à des infections virales antérieures, il apparaît tout de même que celles-ci constituent un élément déclencheur impliqué dans le développement de la maladie chez certains individus.

Alors que l'infection par certains pathogènes mène à l'auto-immunité, il est tentant de proposer que les micro-organismes puissent aussi contribuer à la résistance aux maladies auto-immunes. « L'hypothèse de l'hygiène », décrite en 1989 par le Dr Strachan, prétend que la réduction de la taille des familles et l'augmentation considérable des standards de propreté au 20^e siècle ont entraîné une diminution de l'exposition des jeunes enfants aux microbes environnementaux, causant ainsi l'émergence de troubles du système immunitaire [62]. Des résultats obtenus chez l'animal appuient cette théorie. En effet, il a été démontré que l'administration de probiotiques ou l'infection par divers agents microbiens tels que *Salmonella typhimurium* préviennent l'apparition du diabète auto-immun chez la souris NOD prédisposée à la maladie [63, 64]. Ainsi, alors que certains pathogènes déclenchent une réponse exacerbée du système immunitaire pouvant mener à la destruction tissulaire, il semble que la colonisation et/ou l'infection par d'autres micro-organismes favorisent la création d'un environnement non-inflammatoire assurant la tolérance aux antigènes du soi.

Finalement, de nombreux autres facteurs environnementaux contribuent sans doute à moduler la susceptibilité des individus au diabète de type 1. Par exemple, alors qu'on suggère aux parents de jeunes enfants de limiter l'exposition au soleil, on sait maintenant qu'un apport approprié en vitamine D réduit significativement le risque de développer le diabète de type 1 [65]. De plus, il a été démontré qu'une interaction entre certains polymorphismes au niveau du récepteur de la vitamine D et des allèles majeurs de susceptibilité au diabète de type 1 induit une augmentation de la prédisposition à la maladie

[66], mettant encore une fois en évidence la contribution synergique de l'environnement et de la génétique.

1.2.2 La génétique

Le diabète de type 1 est une pathologie dite multigénique, c'est-à-dire une maladie pour laquelle de nombreux facteurs génétiques contribuent à la prédisposition. Chacune des régions chromosomiques associées à sa susceptibilité participe ainsi à expliquer une mince fraction du risque relatif au développement du diabète auto-immun. Il existe toutefois au moins deux gènes pour lesquels une seule mutation est suffisante afin d'entraîner le développement d'une forme rare et fulgurante de pathologie auto-immune pouvant inclure la destruction des cellules bêta du pancréas: les gènes *AIRE* et *Foxp3*. En effet, les patients atteints d'une déficience au niveau du gène *AIRE* développent une maladie morbide caractérisée par des infiltrations lymphocytaires au niveau de plusieurs organes [67, 68]. Environ 20% de ces patients subissent une destruction généralisée des îlots pancréatiques menant au diabète. Les patients présentant une mutation au niveau du gène *Foxp3*, quant à eux, souffrent d'atteintes sévères au niveau du système endocrinien, du tractus intestinal et de la peau [69]. Dans les deux cas énoncés, les gènes impliqués sont d'importants régulateurs de la tolérance immunitaire, et leur altération résulte en des pathologies généralisées pour lesquelles le diabète ne représente que l'une des manifestations. Les sections suivantes discuteront plutôt des régions et/ou gènes pour lesquels des polymorphismes ont été spécifiquement associés à la prédisposition au diabète de type 1.

1.2.2.1 Étude de traits génétiques complexes

L'étude des déterminants génétiques d'une pathologie s'avère beaucoup plus ardue dans les cas de maladies dites complexes, ou multigéniques, que celles pour lesquelles un

seul gène est impliqué. En effet, les patients atteints d'une maladie monogénique comme la fibrose kystique par exemple, présentent tous une/plusieurs mutation(s) au niveau d'un seul gène, *CFTR* dans le cas énoncé [70]. L'héritabilité du trait est alors généralement régie par les lois de Mendel, et la probabilité de transmission dépend du caractère récessif ou dominant de la mutation. Par ailleurs, les individus souffrant de maladies génétiques complexes présentent des mutations ou des allèles de prédisposition au niveau de plusieurs gènes simultanément. De plus, il n'est pas nécessaire de présenter des défauts au niveau de tous les gènes associés à la maladie afin que celle-ci se développe. Ces caractéristiques impliquent que pour l'obtention d'un phénotype donné, par exemple le développement du diabète de type 1, on puisse observer une multitude de génotypes différents. La découverte des gènes impliqués dans son développement et la détection des individus prédisposés à la maladie sont ainsi particulièrement laborieuses.

À l'aide de marqueurs moléculaires, il est possible d'identifier des polymorphismes disséminés à travers le génome et surreprésentés chez les patients atteints de la maladie lorsque comparés à des individus sains. Alors que les séquences microsatellites ont été largement utilisées au cours des années 1990 afin de déceler les divergences génétiques inter-individus [71], il est aujourd'hui plus courant d'effectuer des analyses de polymorphismes de nucléotide unique (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*). En effet, ce type de mutation impliquant un seul nucléotide est responsable de 90% de la variation génétique chez l'homme [72, 73], et les techniques actuelles permettent de détecter plus de 500 000 SNPs répartis sur chacun des chromosomes [74]. Ces puissants outils génétiques ont favorisé le développement d'études de grande envergure appelées GWAS, pour *Genome Wide Association Studies*. Celles-ci comparent dans leur intégralité le génotype de milliers de patients à celui d'un nombre similaire d'individus sains, en recherche de régions pour lesquelles un polymorphisme est représenté différemment entre les deux populations. La principale limitation de ce type d'analyse réside dans la taille de l'intervalle génétique mis en évidence par le ou les SNPs, qui peut comprendre de nombreux gènes. Ainsi,

l'identification d'un SNP associé au risque de développer la maladie doit souvent être suivie d'un séquençage de la région, ou encore de l'évaluation de gènes candidats à proximité [75]. Par ailleurs, la proximité d'un gène à un autre qui est fortement associé à la pathologie peut mener à l'identification d'un faux positif, due au phénomène de déséquilibre de liaison [76]. Finalement, l'identification et la validation d'un gène candidat constituent une première étape à la suite de laquelle il convient de déterminer en quoi l'altération génétique affecte l'expression ou la fonction de la protéine cible, dans le but de comprendre son rôle biologique dans la pathologie.

1.2.2.2 Le locus du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)

Chez l'homme, le facteur génétique responsable du plus haut risque de développer le diabète de type 1 est associé au locus du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), sur le chromosome 6 [77]. Il s'agit de l'*IDDM1*, puisque cette région génétique a été la première identifiée quant à son rôle dans le développement de la maladie. Cette région, nommée HLA pour *Human Leucocyte Antigen*, comprend plus de 200 gènes ségrégués en trois sections codant pour différentes classes de molécules (Figure 3) [2, 78]. Les gènes de classe I et II du CMH génèrent des glycoprotéines exprimées soit à la surface de presque toutes les cellules nucléées (CMH-I), ou encore spécifiquement par les cellules présentatrices d'antigènes (CMH-II). Dans les deux cas, il s'agit de glycoprotéines essentielles à l'apprêtement et à la présentation antigénique, qui participent activement à la sélection thymique des lymphocytes T, de même qu'à leur activation en présence de pathogènes. Les gènes de classe III du CMH codent quant à eux pour différentes protéines impliquées dans la réponse immunitaire et inflammatoire.

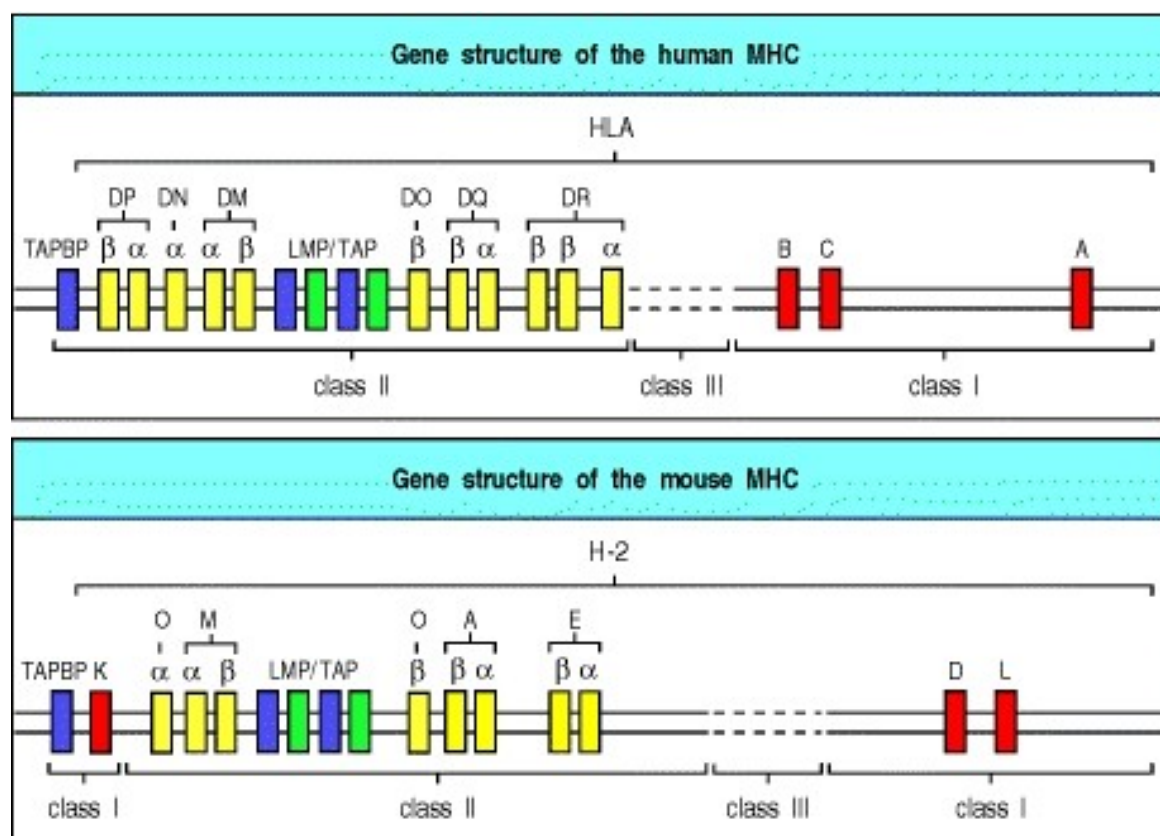


Figure 3 : Structure des gènes formant le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) chez l'homme et la souris. Tiré de [2].

1.2.2.2.1 Le CMH-II

Il a été démontré que les gènes ayant le plus d'impact quant à la prédisposition au diabète de type 1 sont situés au niveau du locus du CMH-II. La molécule de CMH-II est composée d'un hétérodimère, les chaînes alpha et bêta, qui peuvent être codées par les gènes HLA-DP, -DQ ou -DR [2]. La fonction principale de la molécule de CMH-II est de fixer et de présenter aux lymphocytes T CD4+ des peptides d'origine exogène ou intravésiculaire. Ces peptides sont apprêtés de façon intracellulaire par les cellules présentatrices d'antigènes et peuvent provenir de pathogènes, mais aussi de protéines sécrétées ou de débris apoptotiques libérés de cellules environnantes. Le caractère polygénique (HLA-DP, -

DQ et DR) et polymorphique du CMH-II confère à la molécule la capacité d'adopter une multitude de conformations, lui permettant ainsi de s'adapter à une vaste gamme de peptides. Ainsi, un individu porteur d'allèles donnés pour les gènes HLA-DP, -DQ et -DR générera des molécules en mesure de lier des peptides différents de son voisin. Cette caractéristique, déterminante d'un point de vue évolutif, est aussi directement liée à la propension d'un individu à présenter certains antigènes du soi aux lymphocytes T du système immunitaire.

Les plus fortes associations entre le CMH-II et la prédisposition au diabète concernent les molécules HLA-DR et HLA-DQ [79]. La chaîne alpha de la molécule HLA-DR est monomorphique, c'est-à-dire qu'elle ne diffère pas entre les individus. Ainsi, toute variation de conformation observée au niveau de cette molécule est conférée par les différents allèles de la chaîne bêta. Différentes combinaisons d'haplotypes pour HLA-DR et HLA-DQ mènent à une réduction ou à une augmentation du risque de développer la maladie [79-81], la hausse la plus frappante étant constatée chez les individus HLA-DR3/DR4-DQ8 (pour lesquels l'haplotype détaillé est HLA-DRB1*03/DRB1*04-DQA1*0301, DQB1*0302) [82, 83]. Les porteurs de ces allèles de prédisposition présentent environ une chance sur vingt de développer des auto-anticorps dirigés contre les îlots de Langerhans avant l'âge de 7 ans [82, 84]. La susceptibilité à la maladie dépendante de HLA-DQ a été liée à l'absence d'un résidu d'acide aspartique en position 57 de la chaîne bêta[85]. En effet, la présence de cet acide aminé est responsable de la grande stabilité de la conformation de l'hétérodimère [86], propriété associée à un faible risque de développer le diabète de type 1 [87]. L'haplotype HLA-DQ2, lui aussi corrélé à une forte prédisposition à la maladie, génère une structure particulière de la poche 9 modifiant l'ancrage peptidique, et qui est similaire à celle observée chez les patients porteurs de l'haplotype HLA-DQ8 [88]. Finalement, plusieurs groupes ont observé de faibles associations entre le polymorphisme lié à la HLA-DP et la susceptibilité au diabète de type 1 [89-91].

1.2.2.2.2 Le CMH-I

Alors que l'expression du CMH-II est quasi-exclusivement limitée aux cellules présentatrices d'antigène professionnelles, le CMH-I se retrouve à la surface de presque toutes les cellules nucléées saines. Brièvement, les protéines retrouvées dans le cytosol sont continuellement digérées par le protéasome, puis les peptides ainsi générés sont dirigés vers le réticulum endoplasmique, où ils sont chargés sur des molécules de CMH-I nouvellement synthétisées [2]. Le complexe est ensuite amené à la surface de la cellule afin de permettre une présentation du peptide aux lymphocytes T CD8⁺ du système immunitaire. La présentation par le CMH-I est impliquée dans la réponse antivirale et anti-tumorale. La molécule est composée d'une chaîne alpha qui peut être codée par les gènes polymorphiques HLA-A, -B ou -C, ainsi que de la β 2-microglobuline (β 2m).

Bien que relativement faible lorsque comparé au CMH-II, le risque associé au CMH-I a été bien documenté au cours des dernières années. Toutefois, puisque les gènes associés au CMH-I et -II sont situés de façon très rapprochée au niveau du locus 6p21, il s'est avéré ardu de confirmer si HLA-A, -B ou -C pouvaient avoir un impact sur la prédisposition au diabète de type 1 de façon indépendante des gènes -DQ et -DR. Il a malgré tout été démontré que les variants des gènes HLA-A et HLA-B sont impliqués dans la susceptibilité à la maladie, et ce, indépendamment du CMH-II [92-95]. Les allèles HLA-A*24 et HLA-B*39 ont été associés en particulier à un risque de plus de 1,5 fois plus élevé de développer le diabète de type 1 [94]. Le mécanisme par lequel le polymorphisme des molécules de CMH-I détermine la prédisposition à la maladie reste à être confirmé. Toutefois de nombreux épitopes d'antigènes d'îlots présentés par le CMH-I ayant la capacité d'activer les lymphocytes T cytotoxiques ont été identifiés. De plus, il a été démontré que l'affinité de liaison entre le peptide et la molécule HLA est inversement corrélée à l'activation de la cellule CD8⁺ [96].

1.2.2.2.3 Autres gènes du CMH (CMH-III)

Au centre du locus du CMH se trouvent une série de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse immunitaire. Bien qu'elles ne soient pas directement engagées dans la présentation antigénique, ces protéines font partie d'un complexe nommé CMH-III. La protéine C4, par exemple, est clivée lors de l'activation des voies du complément afin de former les sous-unités C4a et C4b, respectivement impliquées dans l'inflammation ainsi que dans la poursuite de la cascade et la réponse innée [2]. Il a été démontré qu'un polymorphisme responsable d'une déficience en C4 est associé à un risque plus élevé de développer le diabète de type 1 [97-99]. Par ailleurs, il a aussi été observé que les niveaux de TNF- α circulant, une cytokine inflammatoire codée par un gène situé dans l'intervalle du CMH-III, sont accrus chez les individus subissant un stress au niveau des îlots de Langerhans [100]. Un polymorphisme lié au gène codant cette cytokine a aussi été génétiquement associé au risque de développer le lupus érythémateux [101], et pourrait donc possiblement être utilisé en tant que marqueur prédictif du développement du diabète de type 1. Récemment, une étude génétique excluant le rôle joué par les gènes appartenant au CMH-I et -II a permis d'établir hors de tout doute l'association entre des gènes situés dans le locus du CMH-III et la prédisposition à la maladie [98]. De nouveaux gènes candidats, tels que *Notch4*, méritent aussi d'être étudiés pour leur rôle dans la pathologie du diabète de type 1.

1.2.2.3 Les gènes situés à l'extérieur du locus du CMH

1.2.2.3.1 L'insuline

La sécrétion d'insuline, lorsque fortement inhibée, mène invariablement au développement du diabète. Ainsi, il n'est pas étonnant qu'un polymorphisme au niveau du

gène codant cette hormone puisse influencer la susceptibilité d'un individu à souffrir de la maladie. Le locus situé sur le chromosome 11, nommé *IDDM2*, a été identifié pour la première fois en 1984 par le groupe du Dr Karam [102]. Par la suite, il a été démontré que le polymorphisme impliqué dans la prédisposition au diabète auto-immun était localisé au niveau 5' du gène de l'insuline (*INS*), plus précisément à l'intérieur d'une région nommée VNTR, puisque constituée de *Variable Number of Tandem Repeats* [103]. Le polymorphisme observé à cette région promotrice a alors été associé à la quantité d'ARN messager d'insuline retrouvé chez les individus. Plusieurs groupes ont ensuite démontré que les allèles de classe III de VNTR sont responsables d'une expression accrue de pro-insuline thymique, permettant la sélection adéquate des lymphocytes T [104-106]. En retour, c'est l'expression homozygote d'allèles de classe I de VNTR qui, en limitant l'expression de la protéine au niveau du thymus, induit le plus haut risque de développer la maladie [107].

1.2.2.3.2 *PTPN22*

Le gène *PTPN22*, encodant la tyrosine-phosphatase lymphoïde LYP, est situé sur le chromosome 1 en position p13. Cette enzyme, exprimée par les lymphocytes, s'associe à la kinase Csk afin d'inhiber l'activation des cellules T via la déphosphorylation de Lck, Fyn et ZAP-70 [108, 109]. Il a été démontré en 2004 que la substitution d'un seul nucléotide du gène *PTPN22* est suffisante afin de modifier le site de liaison de LYP à Csk, tout en augmentant la fonction inhibitrice de LYP de façon indépendante de Csk [109, 110]. Un mécanisme a été proposé afin d'expliquer la susceptibilité accrue à l'auto-immunité observée chez les individus possédant le polymorphisme de gain de fonction de LYP. En effet, l'action inhibitrice de cette enzyme limite l'activation de thymocytes potentiellement auto-réactifs, permettant ainsi leur sélection et export vers la périphérie. Récemment, ce variant a aussi été associé à un plus jeune âge au diagnostic [111].

1.2.2.3.3 *CTLA-4*

De nombreux loci distribués sur le chromosome 2 sont associés au développement du diabète de type 1. Parmi ceux-ci, un intervalle situé en position q33 a été identifié en 1996 et a rapidement été associé à *CTLA-4* [112]. Cette région étant riche en gènes impliqués dans la réponse immunitaire, de nombreux groupes ont toutefois cherché à exclure le rôle de protéines telles que *CD28* ou *ICOS* dans le contrôle du risque de développer la pathologie [113-116]. Toutes études confondues, il semble clair que *CTLA-4* représente un gène candidat par excellence pour lequel un polymorphisme prédispose au diabète auto-immun. En effet, il a été démontré que le polymorphisme prédisposant est associé à une plus faible expression de l'ARN messager de la forme épissée soluble de la protéine [116]. Comme *CTLA-4* agit en tant que régulateur négatif de l'activation des lymphocytes T, il est proposé qu'une diminution de son expression puisse contribuer à une réponse immunitaire exacerbée.

1.2.2.3.4 *IL-2R α*

Le gène *CD25* code pour la chaîne alpha du récepteur de la cytokine IL-2. L'association de ce gène au développement du diabète de type 1 est connue depuis 2005 chez l'homme [117]. Il a par la suite été proposé que plusieurs substitutions de nucléotides puissent mener à des allèles prédisposants de l'*IL-2R α* , certaines d'entre elles n'ayant toutefois pas été validées lors une méta-analyse récente. [118, 119]. De plus, une association a été établie entre les polymorphismes augmentant le risque de développer le diabète de type 1 et de faibles niveaux d'*IL-2R α* circulants. Récemment, il a été démontré qu'un défaut au niveau du récepteur d'IL-2 était associé à une perte d'expression du facteur de transcription Foxp3 par les cellules T régulatrices [120]. Les effets connus liés à la perte de fonction des lymphocytes régulateurs responsables du maintien de la tolérance périphérique sur le développement de pathologies auto-immunes seront décrits plus loin.

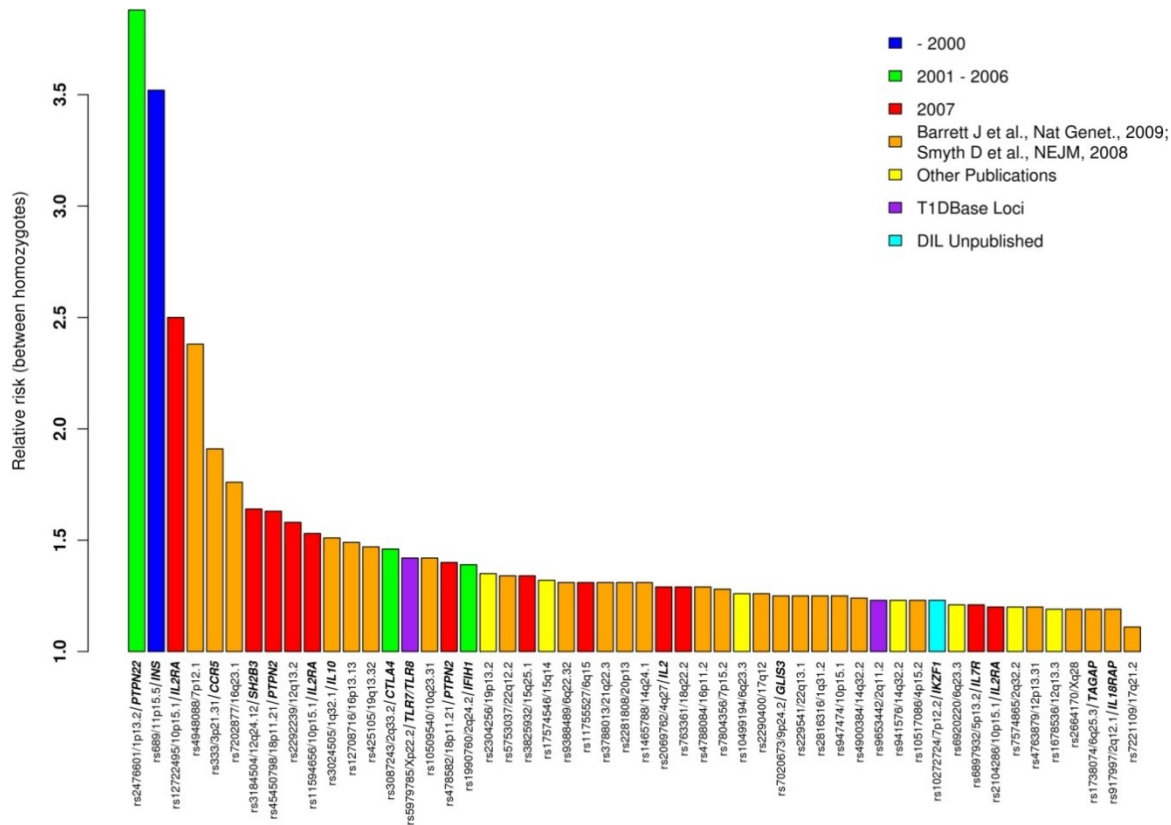


Figure 4 : Liste des loci et gènes autres que le CMH associés à la prédisposition au diabète de type 1 ainsi que leur risque relatif. Tiré de [121].

1.2.2.3.5 Autres régions associées au risque de développer le diabète de type 1

La découverte de nouvelles régions et gènes associés à la prédisposition au diabète auto-immun est ardue, compte tenu du faible risque que représente chacun d'eux. De plus, le rôle joué par le polymorphisme au niveau des molécules de HLA est si important qu'il masque parfois l'impact de certains gènes. Le nombre d'individus participant aux études génétiques est un facteur majeur permettant de valider le rôle de régions modifiant légèrement le risque de développer la maladie. En effet, les résultats d'une méta-analyse ont permis l'identification de 40 régions qui seraient associées au risque de développer la maladie [74]. La liste ainsi qu'une cartographie récente des différents loci génétiques associées à la prédisposition au diabète de type 1 sont représentées aux figures 4 et 5. Ainsi,

un nombre grandissant de volontaires ainsi que des techniques d'analyses génétiques raffinées seront sans doute nécessaires afin de permettre l'identification de tous les gènes impliqués dans la susceptibilité au diabète de type 1.

Human Type 1 diabetes susceptibility regions

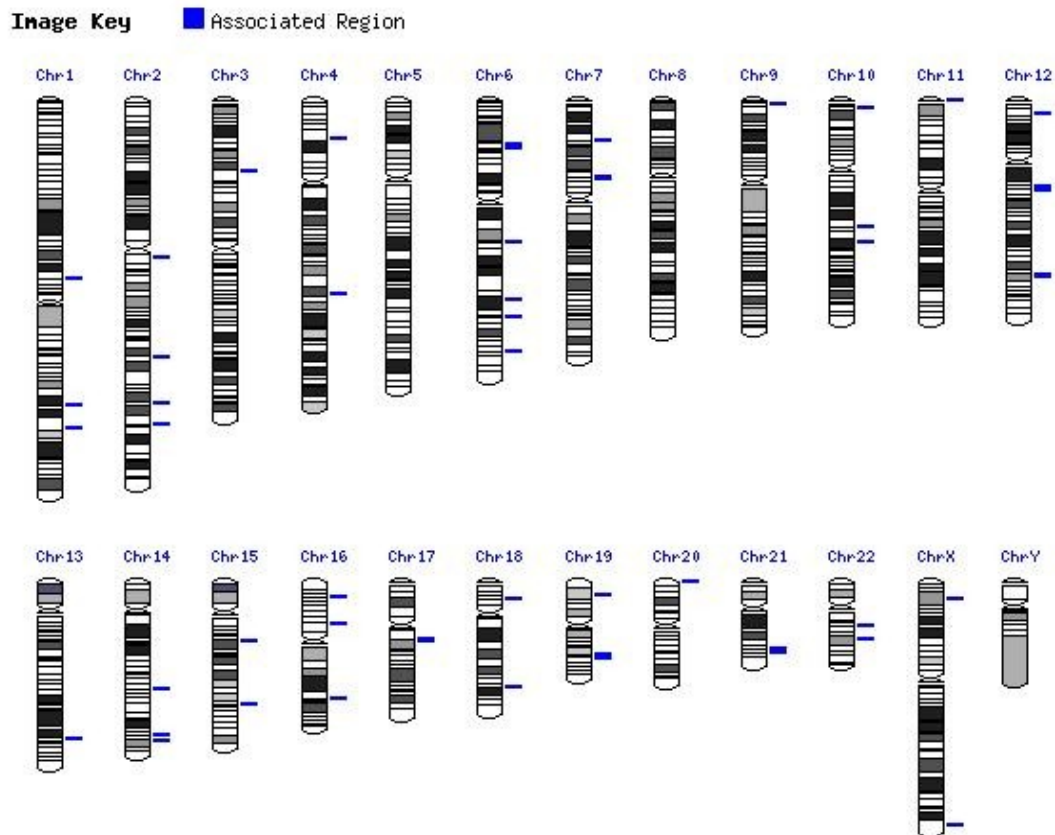


Figure 5 : Représentation des régions génétiques associées à la prédisposition au diabète de type 1 chez l'homme. Tiré de [122].

Par ailleurs, il devient primordial de s'intéresser à d'autres types d'altérations génétiques distinguant les individus. Par exemple, les variations du nombre de copies de gènes (CNV, *Copy Number Variations*), qui ont été associées à la prédisposition à diverses maladies complexes telles que la maladie de Crohn et le lupus érythémateux [123], ont

récemment été étudiées pour leur rôle dans la susceptibilité au diabète de type 1. Malheureusement, la quantité limitée de régions actuellement connues pour leur aptitude à se dupliquer n'a permis l'identification que d'une seule région génétique, soit HLA [124]. Un autre d'altération suscitant l'intérêt sont les modifications épigénétiques, qui incluent la méthylation de l'ADN et la modification post-translationnelle des histones [125]. Il a d'ailleurs récemment été démontré que la méthylation en plusieurs sites précis étaient associée à la prédisposition à la néphropathie liée au diabète de type 1 [126]. Toutefois, de nombreuses études seront nécessaires afin de mieux cerner l'impact de ce type d'altérations génétiques sur le risque de développer le diabète auto-immun.

1.3 Les modèles animaux d'étude du diabète auto-immun

Les étapes impliquées dans le développement du diabète de type 1 nécessitent une étude approfondie afin d'en arriver à la prévention et à la guérison des patients qui en sont atteints. Toutefois, de nombreux obstacles limitent l'investigation de la maladie chez l'homme. Tout d'abord, lorsque les patients reçoivent le diagnostic de la pathologie, les îlots de Langerhans sont déjà infiltrés et en grande partie détruits par les cellules du système immunitaire. Il est ainsi ardu de comprendre ce qui peut initier le recrutement lymphocytaire au niveau du pancréas puisque ces événements surviennent bien avant l'apparition des symptômes. De plus, chez la majorité des patients souffrant du diabète de type 1, la maladie apparaît au cours de l'enfance, ce qui limite le recours à des prélèvements et études invasives. Finalement, il est difficile de découvrir les facteurs environnementaux et génétiques sous-jacents à l'apparition du diabète de type 1 puisque les patients présentent des modes de vie ainsi que des profils génétiques excessivement différents les uns des autres.

Afin de pallier aux limitations imposées chez l'homme, de nombreux chercheurs ont recours aux modèles animaux afin d'étudier le diabète de type 1. Loin d'être parfait, ces modèles ont toutefois permis la découverte de nombreux facteurs impliqués dans le développement de la maladie, en plus d'agir à titre de volontaires désignés lorsque de nouveaux traitements sont envisagés. Les lignées d'animaux dites « *inbreds* » présentent de plus l'avantage de générer des individus génétiquement identiques entre eux, ce qui facilite grandement l'étude du rôle de facteurs héréditaires en limitant la variabilité [127]. Les prochains paragraphes décriront les modèles les plus souvent utilisés afin d'étudier la pathologie du diabète auto-immun.

1.3.1 Le rat *BioBreeding* (BB)

La découverte du rat *BioBreeding* (BB) remonte à 1974, alors que dans un laboratoire d'Ottawa, plusieurs rats d'une même portée provenant d'une colonie Wistar « *outbred* » ont développé les signes cliniques du diabète [128]. La lignée a ensuite été rendue *inbred* par reproductions successives des frères et sœurs entre eux, pour finalement être décrite pour la première fois en 1977 [129]. Il s'agit ainsi du premier modèle animal développant le diabète de façon spontanée. Les conditions dans lesquelles sont maintenus ces animaux ainsi que la dérive génétique font varier l'incidence de diabète auto-immun observée chez le rat BB selon les laboratoires, mais celle-ci avoisine généralement 60% pour les lignées demeurées prédisposées à la maladie [130]. Tout comme chez l'homme, l'incidence est similaire chez les mâles et les femelles. De plus, il a été démontré que le CMH, nommé RT-1 chez le rat, est déterminant du risque de développer le diabète auto-immun chez ces animaux [131]. Alors que la maladie observée chez le rat BB est aussi caractérisée par une insulite consécutive à l'infiltration du pancréas par des cellules mononucléées, ce modèle présente toutefois une différence flagrante face aux observations faites chez l'homme. En effet, le rat BB souffre d'une sévère lymphopénie périphérique affectant particulièrement les lymphocytes T, phénomène qui n'est pas typique de la maladie humaine [132, 133]. Ainsi, le rôle joué par les lymphocytes dans la pathologie observée chez le rat s'avère peu représentatif des altérations du système immunitaire présentes chez l'homme.

1.3.2 La souris *Non-Obese Diabetic* (NOD)

La souris NOD, le modèle murin le plus étudié pour sa prédisposition à l'auto-immunité, a été découverte par inadvertance par des chercheurs japonais tentant de générer des animaux susceptibles au développement de cataractes [134, 135]. Ce faisant, ils ont sélectionnés des souris chez lesquelles un diabète spontané apparaît dès 12 semaines d'âge. De façon générale, l'incidence de diabète auto-immun observée chez la souris NOD atteint 60% chez les femelles et environ 20% chez les mâles, un élément qui différencie ce modèle de l'homme et du rat BB. Par ailleurs, le CMH (H-2 chez la souris) constitue le facteur

prédisposant prépondérant chez ce modèle [136-138], en accord avec les analyses génétiques menées chez l'homme. Plus particulièrement, l'allèle de classe II I-A^{g7} du CMH murin a été identifié comme responsable majeur du développement de la maladie [139-141]. Tout comme chez l'homme, la susceptibilité associée à cet allèle a été liée à l'absence d'un résidu d'acide aspartique en position 57 de la chaîne bêta de la molécule de CMH-II [135, 140].

À ce jour, plus de 25 régions génétiques (régions *Idd*, pour *Insulin-dependant diabetes*) ont été associées à la prédisposition au diabète auto-immun chez la souris NOD [122]. Parmi celles-ci, certains gènes candidats communs à l'homme et la souris ont pu être validés. En effet, *CTLA4* [142, 143], ainsi qu'un orthologue du gène *PTPN22* [144], sont tous deux déterminants dans le risque de développer le diabète auto-immun chez les deux espèces. De plus, même si le récepteur de l'IL-2 ne semble pas être affecté chez la souris NOD, il a été démontré que l'expression de la cytokine elle-même est réduite chez ce modèle, ce qui a été associé à une perte d'efficacité d'une population de lymphocytes T aux fonctions régulatrices [145-147]. Puisque la quantité de gènes validés pour leur association à la prédisposition au diabète auto-immun parmi les régions QTL identifiées chez l'homme et la souris demeure limitée, il est possible que la ressemblance génétique de la pathologie entre l'homme et la souris s'accroisse dans les années à venir. De plus, l'incidence de la maladie observée chez ce modèle est aussi sensible aux infections virales [148-150], à l'alimentation [151-153], et à l'apport en vitamine D [154, 155], des facteurs environnementaux impliqués chez l'homme. Ainsi, la souris NOD développe spontanément une maladie auto-immune pour laquelle les facteurs associés au risque sont similaires à ceux impliqués dans le développement du diabète de type 1 humain. Toutefois, il convient de demeurer prudent dans l'interprétation des résultats de ce modèle, puisqu'il ne représente qu'un seul génotype menant à la maladie, alors que chez l'homme une diversité d'haplotypes peuvent mener à des variantes du diabète de type 1 [156]. Enfin, depuis sa création, ce modèle a été intensivement manipulé génétiquement afin de répondre à de

nombreuses questions relatives à la tolérance immunitaire ainsi qu'aux rôles des différents sous-types de leucocytes dans la pathogénèse du diabète auto-immun.

1.3.3 Les modèles induits

Outre les modèles développant de façon spontanée le diabète auto-immun, il est aussi possible d'étudier des animaux sains chez lesquels on induit la maladie chimiquement, chirurgicalement ou via infection. En effet, deux produits sont couramment utilisés afin d'induire une nécrose spécifique des cellules bêta du pancréas : l'alloxane et la streptozotocine [157]. Ces analogues du glucose s'accumulent préférentiellement dans les cellules bêta et exercent une activité cytotoxique selon deux mécanismes bien différents; l'alloxane génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) [158], alors que la streptozotocine est responsable de l'alkylation de l'ADN [159]. Ces composés sont utilisés afin d'induire le diabète dans divers modèles animaux tels que la souris, le rat, le chien et le lapin [157]. Bien que mimant les symptômes du diabète de type 1 observés chez l'homme, ces modèles sont toutefois peu utiles afin d'étudier les facteurs prédisposant à la maladie, ou la pathologie auto-immune. Dans le même ordre d'idées, l'ablation chirurgicale du pancréas mène aussi à une forme insuline-dépendante de diabète et est parfois utilisée comme modèle chez l'animal. Ce type de chirurgie a entre autres permis d'étudier l'impact de nouvelles techniques de transplantations de fragments de pancréas chez le porc [160].

Alors que les techniques de destruction des cellules bêta présentées ci-haut agissent de manière indépendante du système immunitaire, il est aussi possible de recréer le diabète auto-immun en activant spécifiquement les globules blancs. En effet, l'infection de rats par le virus du rat de Kilham provoque une insulite menant à la cytolysse des cellules bêta et au développement du diabète [161]. De plus, il a été démontré que ce modèle est dépendant des lymphocytes T, ce qui a contribué à l'hypothèse de l'infection virale comme déclencheur de l'auto-immunité chez l'homme [162]. Chez la souris, le virus de

l'encéphalomyocardite démontre aussi le potentiel d'induire le diabète [163, 164]. Toutefois, il semble que, dans ce cas, le virus lui-même soit responsable de la lyse des cellules bêta, limitant ainsi le rôle joué par le système immunitaire de l'hôte dans la pathogénèse.

1.3.4 Les modèles génétiquement modifiés

Les modèles spontanés d'étude du diabète de type 1 génétiquement similaires à l'homme constituent un tremplin pour l'étude de gènes, régions QTL, cytokines et populations cellulaires potentiellement impliqués dans le développement de la maladie. En effet, il est possible d'altérer génétiquement un seul de ces facteurs chez l'animal afin d'en étudier l'impact de façon indépendante. La section qui suit résume les principales modifications génétiques utilisées pour l'étude de pathologies du système immunitaire, et met l'accent sur certains modèles d'intérêt utilisés au laboratoire.

1.3.4.1 Les animaux congéniques

Par définition, deux lignées animales sont congéniques lorsqu'elles sont génétiquement identiques, à l'exception d'un seul locus [78]. Il est possible d'arriver à ce résultat en croisant deux souches étudiées entre elles, puis en sélectionnant les petits selon la présence d'un allèle recherché au niveau d'un locus précis. Ceux-ci sont alors mis en reproduction en utilisant des animaux de la lignée à laquelle on veut comparer la souche congénique. La création d'animaux congéniques nécessite des reproductions successives pendant de multiples générations afin d'éliminer le matériel génétique de la souche ayant fourni le locus d'intérêt (Figure 6). L'exemple le plus fréquemment étudié dans le contexte du diabète auto-immun est sans doute la souris NOD congénique pour l'haplotype du CMH-II. Alors que la souris NOD conventionnelle $H-2^{g7}$ présente un fort risque de développer la pathologie, la lignée congénique NOD. $H-2^b$ dont le CMH est dérivé de la souche murine B10 ne souffre pas de diabète auto-immun [165]. Ces résultats permettent de

confirmer que chez la souris NOD, l'haplotype $H-2^{g7}$ est nécessaire à la progression vers le diabète. La souris congénique réciproque, c'est-à-dire la B10. $H-2^{g7}$, demeure toutefois résistante au développement de la maladie, ce qui met l'emphase sur le caractère polygénique du diabète de type 1 [166]. Ainsi, la création de souris congéniques peut permettre de valider le rôle d'une région génétique selon deux stratégies différentes, c'est-à-dire soit par l'insertion d'allèles de résistance chez un modèle prédisposé, ou encore par l'insertion d'allèles de prédisposition chez un modèle naturellement résistant à la maladie.

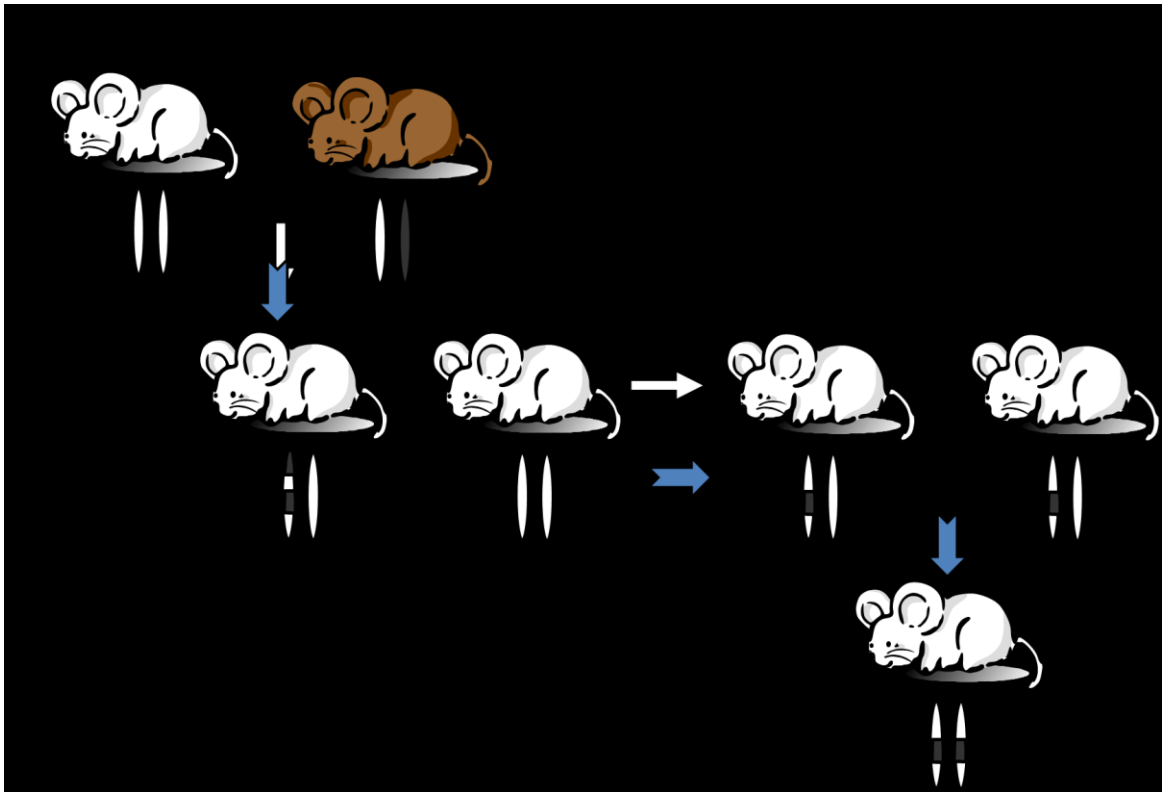


Figure 6 : Méthode de création de souris congéniques homozygotes pour une région (locus X) associée à la résistance à une maladie donnée.

La génération de souris congéniques NOD a grandement facilité l'étude du rôle des régions de prédisposition au diabète auto-immun *Idd*. Tel que mentionné précédemment, ce type d'étude a permis d'évaluer l'influence de l'haplotype de l'*Idd1*, c'est-à-dire du CMH-II, sur l'incidence de diabète auto-immun murin [165]. Chez la souris NOD, l'absence de la molécule de CMH-II I-E, en présence d'une forme particulière de la molécule I-A (g7), sont reconnus comme les principaux déterminants du risque encodés par l'*Idd1* [136]. Toutefois, la création de souris NOD sous-congéniques pour le locus du CMH a permis de constater qu'une région contigüe à l'*Idd1* sur le chromosome 17 était aussi responsable de la prédisposition au diabète auto-immun chez l'animal [167]. Ce locus, nommé *Idd16*, contient entre autres le gène codant pour la cytokine TNF- α et démontre que, chez la souris

comme chez l'homme, plusieurs gènes situés dans l'intervalle du CMH jouent un rôle dans la prédisposition à la maladie [168-170].

Outre le rôle du CMH, les souris congéniques dérivées de la lignée NOD ont permis de mieux comprendre la pathogénèse du diabète de type 1. Par exemple, le locus *Idd7* a été montré comme responsable d'un défaut de sélection thymique permettant à des lymphocytes T auto-réactifs d'émigrer vers la périphérie [171]. De même, des études concernant l'implication des lymphocytes B et utilisant des lignées congéniques pour diverses régions de susceptibilité à la maladie ont permis d'associer les régions *Idd5* et *Idd9/11* à l'activité pathogénique de cette population cellulaire [172]. Par ailleurs, alors que les souris NOD.*Idd9* présentent de l'insulite sans toutefois progresser vers le diabète [173], il a été démontré que des animaux congéniques à la fois pour l'*Idd3* et l'*Idd5* (NOD.*Idd3-Idd5*) sont exempts d'infiltration lymphocytaire dans les îlots du pancréas [174]. De telles observations sont primordiales dans l'identification de gènes candidats contribuant aux différentes phases de développement du diabète auto-immun.

1.3.4.1.1 Contribution de l'*Idd13*

L'*Idd13* a été identifié en 1994 par le groupe de Leiter [175], alors que ceux-ci comparaient le génotype de la souris NOD à celui de la NOR, une lignée résistante au diabète, 88% identique à la NOD et issue de recombinaisons avec les souches murines DBA et B6 [176]. C'est l'analyse de QTLs liés à l'incidence de diabète chez des animaux générés par des croisements de 2^e génération entre les souris NOD et NOR qui a permis d'identifier une région située en position distale sur le chromosome 2. L'importance de ce locus a été confirmée par la création de la lignée congénique NOD.*Idd13*, chez laquelle plus de 60% des souris sont exemptes de progression vers le diabète auto-immun [175]. Il a par la suite été démontré que l'allèle NOD de l'*Idd13* influence l'infiltration lymphocytaire

puisque sa présence est associée de façon dominante à une insulite invasive plutôt que périphérique des îlots pancréatiques [177].

De nombreux gènes candidats situés dans l'intervalle de l'*Idd13* ont été étudiés au cours des dernières années. Tout d'abord, l'association génétique la plus forte entre l'*Idd13* et la résistance au diabète a été initialement décrite grâce à un marqueur situé tout près des gènes codant pour les chaînes alpha et bêta de la cytokine inflammatoire IL-1 [175]. Des études ultérieures ont démontré qu'une déficience dans l'expression du récepteur de cette cytokine était associée à un ralentissement de la progression du diabète auto-immun chez la souris NOD, mettant ainsi en évidence le rôle de l'IL-1 dans la pathogénèse de la maladie [178]. De plus, l'expression de la chaîne bêta de la cytokine a aussi été identifiée pour son rôle dans le développement d'une autre maladie auto-immune, l'arthrite [179]. Outre l'IL-1, les gènes *Bim* et *$\beta 2m$* , codant respectivement pour une molécule pro-apoptotique et la chaîne non-polymorphique associée au CMH-I, tous deux situés dans l'intervalle de l'*Idd13*, ont été associés à la génération de lymphocytes T auto-réactifs [180, 181]. Leurs rôles seront discutés plus extensivement dans la section portant sur la sélection des lymphocytes T. Ainsi, il semble que de nombreux gènes puissent être impliqués dans le phénotype de résistance au diabète observé chez les souris NOD.*Idd13*. Toutefois, la contribution relative de chacun d'eux à la pathogénèse de la maladie reste à déterminer.

1.3.4.2 Les modèles « knock-out » et « knock-in »

Les animaux « knock-out » et « knock-in » représentent une approche relativement simple permettant d'étudier les effets de la délétion ou de la mutation d'un gène précis. Brièvement, le principe de la création d'une souris « knock-out » repose sur l'insertion d'une cassette d'ADN, souvent un gène de résistance à un antibiotique, dans une cellule souche embryonnaire pluripotente. Par recombinaison homologue, cette cassette s'intègre alors à l'ADN cellulaire au niveau d'un exon du gène visé [182, 183]. La cellule ayant

intégré correctement la cassette présente alors une copie supprimée du gène d'intérêt, et peut être sélectionnée grâce à sa résistance aux antibiotiques afin d'être injectée dans un blastocyste murin. La souris ainsi formée se développe à partir de la cellule souche modifiée, et est hétérozygote pour une déficience touchant le gène d'intérêt. Si l'absence complète de celui-ci n'est pas létale à l'état embryonnaire, il est alors possible de croiser les souris hétérozygotes entre elles afin d'obtenir des individus déficients pour une protéine donnée. La souris « *knock-in* » constitue une variante chez laquelle l'ADN intégré au génome est souvent une version altérée du gène original, permettant l'étude de mutations spécifiques sur l'expression ou la fonction protéique. Cette méthode alloue aussi la possibilité de limiter la délétion ou la mutation à certains types cellulaires précis, ainsi que de permettre l'expression transitoire et contrôlée de l'altération génétique [182, 184].

Dans le contexte du diabète auto-immun, la création de souris « *knock-out* » s'est souvent avérée utile, particulièrement en regard de l'étude du rôle de certaines cytokines dans le développement de la maladie. Par exemple, l'arrivée de la souris NOD déficiente pour l'interleukine 4 (IL-4) a mis en doute la perception générale selon laquelle cette cytokine immuno-régulatrice protégeait du diabète de type 1, puisqu'il a été démontré que son absence n'accélérait pas le développement de la maladie [185]. Par ailleurs, la souris NOD déficiente pour le récepteur de l'IL-21 a permis de confirmer le rôle de la signalisation par cette interleukine dans la pathogénèse auto-immune, puisque cet animal est résistant à l'insulite et à la production d'auto-anticorps [186]. Finalement, l'étude d'une souris NOD « *knock-in* » pour la séquence codante B6 de l'exon 1 du gène de l'IL-2 a démontré que la glycosylation de la protéine n'était pas impliquée dans la protection envers le diabète de type 1, appuyant plutôt l'hypothèse selon laquelle le niveau d'expression de la cytokine est associé au risque de développer la maladie [187].

1.3.4.2.1 La souris déficiente pour *CD47*

La protéine CD47, aussi nommée la protéine associée aux intégrines, est une molécule exprimée de façon ubiquitaire à la surface des cellules nucléées, des plaquettes et

des érythrocytes [188]. Cette molécule de surface est en fait constituée d'un récepteur à 5 domaines transmembranaires qui s'associe à une intégrine afin de former un complexe de signalisation couplé à une protéine G [189]. Des études nécessitant la génération de fragments protéolytiques de la thrombospondine-1 ont montré une forte affinité de liaison entre une portion du domaine C-terminal de cette glycoprotéine de matrice et CD47 [190-192]. Parmi les rôles proposés de l'association CD47-thrombospondine-1, il a entre autres été observé que cette interaction était impliquée dans la régulation de la vascularisation dépendante de l'oxyde nitrique [193]. La liaison des thrombospondines à CD47 à la surface des plaquettes est aussi connue pour mener à l'activation d'une intégrine importante pour la liaison au fibrinogène, agissant ainsi sur l'agrégation plaquettaire [194]. Outre la thrombospondine-1, CD47 est connu pour s'associer à une molécule de surface dont l'expression est principalement restreinte aux cellules de lignée hématopoïétique myéloïde, soit Sirp α . Sirp α , tout comme Sirp β et Sirp γ , est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immuno-globulines [195]. Il a été démontré que l'interaction CD47-Sirp α induit un signal bidirectionnel dont les effets influencent la migration cellulaire ainsi que l'activation des cellules du système immunitaire [196, 197]. En résumé, suite à la reconnaissance de ses ligands, CD47 peut à la fois induire l'activation de ses intégrines associées, la signalisation via une protéine G ainsi que la modulation de la réponse immunitaire des cellules exprimant la molécule Sirp α .

Très conservée, la protéine CD47 s'est vue attribuer le rôle de « marqueur du soi » lorsqu'il a été démontré par transfert adoptif que son absence à la surface des globules rouges mène à une phagocytose rapide par les macrophages [198]. La souris B6 déficiente pour l'expression de *CD47* est viable et en bonne santé, par contre il a été démontré que le transfert de la délétion sur le fonds génétique NOD prédisposé à l'auto-immunité induit le développement d'une forme fatale d'anémie hémolytique [199]. Ainsi, la perte d'expression de *CD47* participe au bris de tolérance nécessaire au développement de pathologies auto-immunes chez les animaux génétiquement prédisposés. Par ailleurs, des

études récentes ont démontré un rôle pour l'axe impliquant CD47 et son ligand cellulaire Sirp α dans le déclenchement d'une forme de colite expérimentale [200]. De plus, il a été démontré que les animaux déficients pour le domaine intracellulaire de Sirp α deviennent résistants au développement de pathologies auto-immunes dans le contexte de modèles induits de sclérose en plaques et d'arthrite [201, 202]. Ainsi, chez l'animal, la rupture de l'axe CD47-Sirp α influence de façon variable et divergente la susceptibilité à l'auto-immunité, selon le modèle d'étude. Chez l'homme, un polymorphisme observé au niveau d'un bloc de gènes comprenant l'homologue de Sirp α , c'est-à-dire Sirp γ , a récemment été associé au risque de développer le diabète de type 1 [74]. Finalement, des résultats obtenus au laboratoire avant mon arrivée et présentés à l'article 1 de la thèse démontrent que, dans un contexte transgénique où les cellules T sont spécifiques à un antigène exprimé par les îlots pancréatiques (souris BALB.K TCR3A9:insHEL), la perte d'expression de CD47 est responsable d'une forte augmentation de l'incidence de diabète auto-immun [203]. Ces résultats contradictoires, qui varient selon la pathologie et le modèle murin étudiés, mettent toutefois en évidence un rôle pour l'axe CD47-Sirp α dans la régulation de la tolérance immunitaire.

1.3.4.3 Les animaux transgéniques

Outre la génération d'animaux congéniques ou déficients pour l'expression de gènes donnés, l'une des manipulations génomiques les plus courantes consiste en la création d'individus porteurs de transgènes. Par définition, un transgène est un gène supplémentaire et étranger introduit dans un organisme qui s'en trouve transformé [2]. Par opposition aux souris « *knock-out* » ou « *knock-in* », les transgènes ne requièrent pas nécessairement d'intégration en un site chromosomique précis, et sont généralement introduits au hasard dans le génome. Dans le domaine de l'immunologie, l'une des premières applications de cette technologie chez la souris a permis l'étude du contrôle génétique des immunoglobulines *in vivo* [204, 205]. Depuis la fin des années 1980, de nombreux modèles murins transgéniques ont été générés afin d'étudier la tolérance immunitaire ainsi que le

développement de maladies auto-immunes [206]. L'introduction de transgènes codant pour certaines chaînes spécifiques de molécules de CMH [207-209] ou du récepteur des lymphocytes T [210, 211] a grandement facilité la compréhension des étapes de sélection thymique de ces cellules. Ainsi, les mécanismes sous-jacents à la sélection clonale des lymphocytes T et B potentiellement auto-réactifs ont ainsi pu être mis en lumière, et seront détaillés plus loin.

Dans le contexte de l'étude du diabète auto-immun, plusieurs modèles transgéniques ont permis l'identification de gènes et médiateurs impliqués dans la pathologie. Alors que de nombreux types cellulaires jouent un rôle dans la pathogénèse, les lymphocytes T représentent les acteurs principaux de la destruction du pancréas, ce qui justifie le recours à des animaux exprimant un TCR transgénique. Brièvement, l'insertion d'un TCR transgénique inhibe la recombinaison de la chaîne bêta du récepteur, alors que celle de la chaîne alpha demeure possible, générant ainsi une proportion variable de cellules T exprimant le récepteur monoclonal [212]. L'un des premiers modèles TCR-transgénique étudié dans le contexte du diabète auto-immun a été la souris NOD BDC2.5. Généré à partir d'un clone de lymphocyte T CD4+, ce TCR est composé des chaînes variables V β 4 et V α 1 et est sélectionné préférentiellement sur une molécule de CMH-II I-A^{g7} [213]. Il a d'abord été proposé que le TCR BDC2.5 reconnaisse un antigène cryptique de la protéine GAD-65, dont l'antigénicité est associée au développement de la maladie chez la souris NOD et chez l'homme [214-217]. Toutefois, une étude récente a permis d'identifier un peptide dérivé de la vasostatine-1 comme étant l'auto-antigène reconnu par le TCR BDC2.5 [218]. Modèles fréquemment étudiés, les souris NOD transgéniques 4.1 et 8.3, pour lesquelles le TCR provient des clones de lymphocytes T CD4+ NY4.1 et CD8+ NY8.3, génèrent aussi des lymphocytes T reconnaissant des antigènes naturellement exprimés par les cellules bêta et présentés par des molécules de CMH-II et -I, respectivement [219, 220]. En absence d'expression naturelle de l'antigène reconnu par les lymphocytes T exprimant un TCR transgénique, la création d'animaux exprimant simultanément un deuxième

transgène allouant l'expression de la protéine d'intérêt de façon restreinte aux îlots pancréatiques peut s'avérer très utile. De nombreux systèmes double-transgéniques pour lesquels le TCR est sélectionné sur différentes molécules de CMH de classe I ou II ont été générés. Parmi ceux-ci, notons la souris TCR-GP, chez laquelle les lymphocytes T CD8+ reconnaissent la glycoprotéine du virus de la chorioméningite lymphocytaire (VCML) [221], ainsi que les modèles OT-I (lymphocytes T CD8+) et OT-II (lymphocytes T CD4+), qui sont spécifiques de peptides générés par la digestion de l'ovalbumine (OVA) [222, 223].

1.3.4.3.1 Le système TCR3A9:insHEL

Le TCR 3A9 a initialement été décrit en 1984, alors que le groupe du Dr Unanue cherchait à identifier des clones de lymphocytes T réactifs envers la protéine de lysozyme de poule HEL (*Hen Egg Lysozyme*) présentée par des macrophages exprimant la molécule de CMH-II I-A^k [224]. Il a par la suite été déterminé que le peptide reconnu par les lymphocytes T 3A9 était constitué des acides aminés en position 46-61 de la protéine [225]. Le croisement de souris exprimant le transgène TCR3A9 à de multiples lignées murines transgéniques pour l'expression de HEL dans différents organes par le groupe du Dr Goodnow a permis de démontrer que la sélection des lymphocytes était dépendante du profil d'expression de la protéine reconnue par les lymphocytes T [226]. De plus, le croisement de la souris transgénique 3A9 à celle exprimant la protéine HEL sous le contrôle du promoteur de l'insuline du rat (insHEL, ou ILK3) a grandement facilité l'étude des facteurs prédisposant au développement du diabète auto-immun. En effet, il s'agit d'un modèle double-transgénique à la limite du bris de tolérance immunitaire, puisque les animaux B10.Br génétiquement résistants à la maladie ne développent pas le diabète dans ce contexte, alors que la souris NOD.*H2k* présente une forte incidence de la pathologie, et ce, malgré l'absence du CMH-II prédisposant I-A^{g7} [227]. De plus, ce modèle présente l'avantage d'exclure le rôle du CMH dans la prédisposition, mettant ainsi en évidence les autres facteurs génétiques associés à la maladie.

La comparaison de souris TCR3A9 :insHEL de lignées B10.Br et NOD.H2k a permis la mise en évidence de nombreux phénotypes au niveau du système immunitaire. Chez l'animal, des outils génétiques permettent d'associer des phénotypes à des régions génétiques, entre autres grâce à l'analyse de type « *genome wide scan* ». Pour ce faire, on croise entre elles les lignées murines présentant un phénotype divergent, afin de générer des animaux F1. Ceux-ci sont ensuite croisés entre eux pour obtenir des animaux de génération F2, qui présentent chacun une mosaïque d'allèles provenant des deux souches parentales. Typiquement, un minimum d'une centaine de souris F2 sont étudiées phénotypiquement, puis leur ADN est analysé à l'aide de nombreux marqueurs dans le but d'identifier des régions QTLs [228-230]. Alternativement, chez des souris présentant un phénotype différent au niveau d'un organe ou d'une population donnés, il est possible d'isoler l'ARN messager cellulaire afin de l'hybrider à des micro-puces d'ADN, ce qui permet de mettre en évidence de variations dans les niveaux d'expression de milliers de gènes [231, 232]. Par ailleurs, il est aussi possible de déterminer les facteurs génétiques liés à un phénotype particulier en utilisant des techniques de mutagenèse aléatoire telle que l'administration d'ENU (N-ethyl N-nitrosourea), qui permet l'induction d'une trentaine de mutations réparties dans le génome chez des petits dont la mère a été traitée [233]. Ainsi, lorsque les mutations ne sont pas létales, les souris générées peuvent être étudiés en quête du phénotype recherché et mises en reproduction. Leur progéniture est par la suite génotypée afin d'identifier l'altération génétique en cause. Toutefois, le recours à ce type d'analyses est restreint puisqu'il nécessite de larges colonies animales, ainsi que beaucoup de temps et de ressources.

1.4 Le rôle du système immunitaire dans la pathogénèse

1.4.1 Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des cellules mononucléées appartenant au système immunitaire adaptatif. Ils sont nécessaires au combat d'infections parasitaires, bactériennes, fongiques et virales ainsi qu'à la création de la mémoire immunitaire [2, 78]. Ces lymphocytes peuvent généralement être divisés en deux grandes catégories selon l'expression de co-récepteurs à la surface, soit les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Les lymphocytes T CD4⁺, ou cellules T auxiliaires, reconnaissent des peptides présentés par une molécule de CMH-II exprimée à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ils sont spécialisés dans l'élimination de pathogènes extracellulaires ou intravésiculaires, et sont généralement nécessaires à l'activation des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8⁺. Les lymphocytes T CD8⁺, aussi appelés lymphocytes T cytotoxiques, reconnaissent quant à eux des peptides présentés par une molécule de CMH-I à la surface de n'importe quelle cellule nucléée, par exemple lors d'infection virale ou de transformation cellulaire. Ainsi, les lymphocytes T naïfs circulent en quête d'un peptide étranger pour lequel leur récepteur (TCR) est spécifique, afin d'enclencher une réponse immunitaire adaptative. La capacité d'un lymphocyte T de ne pas s'activer suite à la rencontre d'un antigène du soi est cruciale, puisqu'une telle réponse peut mener au développement de maladies auto-immunes comme le diabète de type 1.

1.4.1.1 Rôles des lymphocytes T dans la pathogénèse de la maladie

De nombreuses évidences impliquent les lymphocytes T dans la pathogénèse du diabète de type 1. Tout d'abord, il a été démontré en 1986 que le transfert de 5 000 000 de splénocytes provenant d'une souris NOD diabétique était suffisant afin d'induire un diabète auto-immun rapide chez plus de 95% des hôtes NOD irradiés [234]. Plus particulièrement, ce groupe et d'autres ont observé que lors du transfert adoptif à de jeunes souris NOD, la

présence de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ était nécessaire au développement de la maladie [235-237]. Toutefois, l'utilisation d'hybridomes de lymphocytes T a mis en évidence la capacité d'un seul clone, CD4⁺ ou CD8⁺, à accélérer la maladie chez un hôte sain [135, 238-241]. Chez la souris NOD, les lymphocytes T CD8⁺ sont généralement considérés comme d'importants médiateurs de l'initiation de la pathologie, alors que les lymphocytes T CD4⁺ ont été démontrés comme importants durant tout le processus de destruction des îlots [135, 242, 243]. Chez le rat BB, l'importance des lymphocytes T dans la pathologie a aussi été mise en évidence par la résistance au diabète auto-immun observée chez les individus à la suite de thymectomies en jeune âge [244]. De plus, l'injection de sérum contenant des anticorps dirigés contre les lymphocytes de rat a permis de prévenir le développement de la maladie dans une colonie d'animaux BB prédisposés au diabète auto-immun [245]. De façon similaire, une seule administration d'anticorps anti-CD3, molécule nécessaire à la transmission du signal du TCR, a suffi afin de ralentir la progression de la maladie chez des patients nouvellement diagnostiqués pendant une période d'au moins un an [246]. Finalement, il a été démontré que les lymphocytes T de patients atteints de diabète de type 1 s'activent vigoureusement en présence d'auto-antigènes pancréatiques, tels que GAD65, et ce, de façon indépendante des signaux de co-stimulation [247, 248]. Ainsi, chez l'animal comme chez l'homme, les lymphocytes T s'activent de façon aberrante envers les cellules bêta pancréatiques responsables de la production d'insuline. Il importe alors de comprendre quelles sont les failles du système immunitaire menant au bris de tolérance à l'égard du soi.

1.4.1.2 Mécanismes de tolérance centrale des lymphocytes T $\alpha\beta$

Alors que les précurseurs hématopoïétiques des lymphocytes T sont générés dans la moelle osseuse, c'est plutôt dans le thymus que ceux-ci se différencient et acquièrent l'expression d'un récepteur de cellule T. Brièvement, les thymocytes passent par plusieurs stades caractérisés par l'expression de marqueurs de surface spécifiques. Tout d'abord déficients quant à l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8 (DN, double négatifs), les

thymocytes porteurs d'un TCR $\alpha\beta$ se mettent ensuite à exprimer les deux co-récepteurs (DP, double positifs), pour finalement réprimer l'un d'eux afin de devenir un lymphocyte T naïf auxiliaire (SP, simple positif CD4+) ou cytotoxique (SP, simple positif CD8+) et être exporté vers la périphérie [2, 249]. Les mécanismes de tolérance centrale des lymphocytes T réfèrent aux étapes de sélection des lymphocytes T se déroulant à l'intérieur du thymus, lors de la maturation des thymocytes (Figure 7) [250].

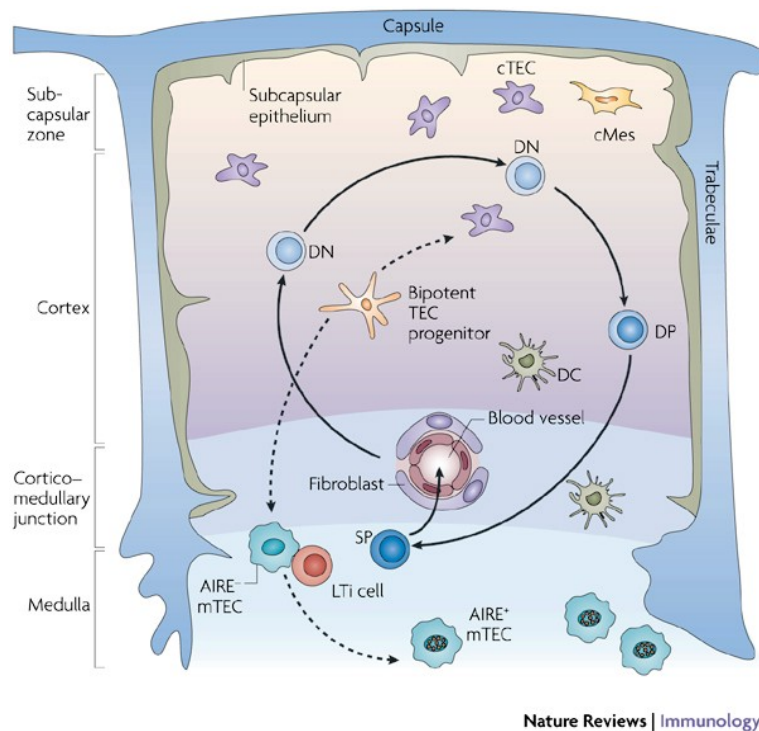


Figure 7 : Migration et éducation des thymocytes de stade DN, DP et SP à travers les différentes zones du thymus. Les flèches pleines représentent la différenciation des thymocytes. Les flèches pointillées représentent la différenciation des cellules épithéliales thymiques. Tiré de [251].

Le thymus est un organe lymphoïde primaire permettant la génération de lymphocytes T aptes à reconnaître les pathogènes et à combattre les infections, sans toutefois s'activer à l'égard de composantes normales du soi. Afin de s'assurer que les lymphocytes T puissent reconnaître efficacement un peptide présenté dans le contexte d'une molécule de CMH, une étape de sélection positive des thymocytes a lieu au stade DP, dans le cortex thymique. À cet endroit, les cellules épithéliales thymiques du cortex (cTEC) digèrent et apprêtent des antigènes du soi d'une manière propre au thymus afin de présenter les peptides ainsi générés aux thymocytes DP, dans le contexte de molécules de CMH-I ou II [252-255]. Seuls les quelques thymocytes reconnaissant le complexe peptide-CMH avec un seuil d'affinité minimal assurant leur survie en périphérie évitent l'apoptose et répriment subséquemment l'expression de l'un des deux co-récepteurs (Figure 8) [256, 257]. Chez la souris NOD, il a été démontré que les thymocytes DP immatures présentent un défaut intrinsèque abaissant le seuil minimal d'activation nécessaire à la sélection positive [258]. Cette particularité favorise la survie d'une plus grande quantité de thymocytes SP reconnaissant modérément des antigènes du soi, et potentiellement impliqués dans le développement de lésions auto-immunes.

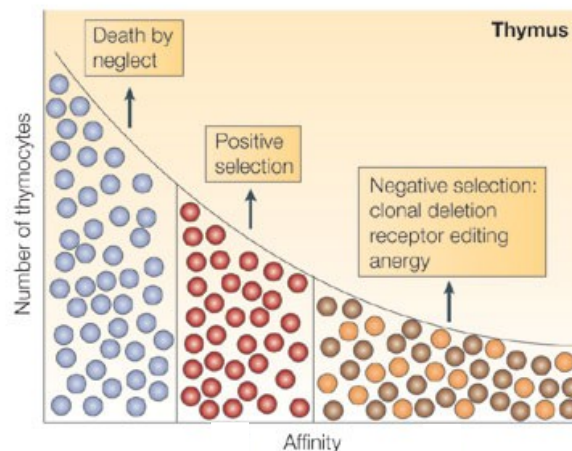


Figure 8 : Sélection positive et négative des thymocytes selon l'affinité avec laquelle ils reconnaissent un complexe CMH-peptide. Adapté de [259].

Les thymocytes SP CD4⁺ ou CD8⁺ ayant été sélectionnés positivement dans le cortex thymique sont par la suite dirigés vers la médulla, siège principal de la sélection négative. Les cellules épithéliales thymiques de la médulla (mTEC), ainsi que les cellules dendritiques, ont pour fonction d'y présenter des peptides dérivés du soi pouvant être rencontrés par les lymphocytes T en périphérie. Les thymocytes SP recevant un signal de haute intensité via le TCR suite à l'interaction avec un complexe CMH-peptide sont éliminés par apoptose, afin de limiter l'export de lymphocytes T auto-réactifs. Cependant, alors que certaines protéines sont généralement restreintes à un organe donné (TRA, *Tissue-Restricted Antigen*), il est primordial de permettre l'expression de ces antigènes dans le thymus afin d'assurer l'instruction adéquate des thymocytes. À cet égard, les mTECs expriment le gène *AIRE*, nécessaire à la présentation thymique de plusieurs centaines d'antigènes non-circulants [68, 260]. Les peptides générés sont alors présentés aux thymocytes directement par les mTECs, ou encore transférés aux cellules dendritiques thymiques. L'expression d'antigènes du soi grâce à *AIRE* est primordiale à la tolérance immunitaire, puisque les animaux présentant une mutation au niveau de ce gène développent une pathologie auto-immune sévère et atteignant de multiples organes. Les modèles animaux possédant un TCR transgénique ont permis d'identifier des défauts de sélection négative des thymocytes associés à la prédisposition au diabète auto-immun. Par exemple, il a été démontré que le gène *Bim*, un important médiateur de l'apoptose, n'est pas induit adéquatement par les thymocytes de la souris NOD suite à la reconnaissance d'antigènes du soi dans le thymus [180, 261]. Ces résultats corroborent ceux du groupe du Dr Sprent, qui a démontré que la souris NOD présentait un défaut de sélection négative lié à l'expression accrue de la protéine inhibitrice de l'apoptose FLICE [262]. Par ailleurs, il a été proposé qu'un variant structurel du gène $\beta 2m$ impliqué dans la formation du CMH-I pourrait aussi favoriser la sélection thymique de lymphocytes T CD8⁺ chez la souris NOD [181]. Ainsi, la force du signal reçu via le TCR lors de la maturation des thymocytes doit se trouver à l'intérieur d'une fenêtre restreinte afin de permettre leur survie sans favoriser l'auto-immunité. Toutefois, les thymocytes de la souris NOD échappent à ce contrôle

rigoureux, ce qui contribue à l'export de lymphocytes T potentiellement auto-réactifs vers la périphérie.

Lors de la sélection négative, les thymocytes potentiellement auto-réactifs ne sont pas automatiquement astreints à l'apoptose. En effet, une forte interaction entre le TCR et un complexe CMH-peptide peut mener à l'expression de la chaîne alpha (CD25) du récepteur à l'IL-2, par lequel l'IL-2 environnant induit un signal permettant la transcription du facteur Foxp3 responsable de la différenciation d'une population naturelle de lymphocytes T régulateurs (nTreg CD4+ Foxp3+) [263, 264]. La fonction des lymphocytes T régulateurs est de limiter l'activation exacerbée du système immunitaire. Leurs mécanismes d'action seront décrits ci-dessous.

1.4.1.3 Mécanismes de tolérance périphérique des lymphocytes T $\alpha\beta$

Malgré les rigoureuses étapes de sélection mises en place dans le thymus, certains lymphocytes T auto-réactifs réussissent à atteindre la périphérie. En fait, la majorité des individus sains présentent des lymphocytes T auto-réactifs circulants [265]. Des mécanismes extra-thymiques assurent donc le maintien de la tolérance immunitaire envers les antigènes du soi. Tout d'abord, les lymphocytes T naïfs émigrent en périphérie et circulent parmi les organes lymphoïdes à la recherche d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) exprimant à sa surface un complexe CMH-peptide pour lequel leur TCR est spécifique. Toutefois, afin de s'activer, les cellules naïves doivent recevoir simultanément un signal par le TCR ainsi que par une molécule de co-stimulation, la plus étudiée étant CD28. En effet, les CPAs apprêtent et présentent constamment des peptides insérés dans des molécules de CMH-I et -II, et ce, même à l'état de base. L'activation des CPAs suite à des signaux de danger permet l'expression à sa surface de ligands de la molécule CD28 : CD80 et CD86. En absence de signal de co-stimulation, la rencontre entre un lymphocyte T et une CPA présentant l'antigène auquel le lymphocyte est spécifique mène à l'anergie de ce dernier [266]. De plus, suite à l'activation, le lymphocyte T exprime à surface la

molécule inhibitrice CTLA-4, qui entre en compétition avec CD28 pour la liaison de CD80 et CD86 afin d'initier la rétraction de la réponse immunitaire. Chez l'homme, il a été démontré que les allèles de *CTLA-4* prédisposant à l'auto-immunité étaient responsables de la génération d'un variant de la protéine au potentiel moins inhibiteur [267]. La signalisation via CD28/CTLA-4 a aussi été associée à l'activation, la fonction et à la survie des Tregs chez la souris [268-270]. De plus, des résultats obtenus chez la souris NOD ont associé une perturbation dans la signalisation via une seconde molécule inhibitrice, PD-1, à la prédisposition au diabète auto-immun [271]. Les différentes molécules impliquées dans la co-stimulation des lymphocytes T s'avèrent donc d'importants régulateurs de la tolérance périphérique.

1.4.1.3.1 Différentes populations de lymphocytes T régulateurs (Tregs)

Alors que les molécules de co-stimulation dictent à la cellule T l'attitude à adopter selon le contexte physiologique, il est possible que la rencontre entre un lymphocyte T auto-réactif et une CPA présentant l'antigène spécifique se déroule dans un environnement inflammatoire, menant ainsi à l'activation du lymphocyte. Le rôle des lymphocytes Tregs est alors d'inhiber l'activation lymphocytaire excessive et l'auto-immunité. Tel que mentionné précédemment, les nTregs CD4⁺ Foxp3⁺ se différencient dans le thymus, en réponse à un fort signal par le TCR. Des cellules Tregs au phénotype similaire peuvent aussi être induites en périphérie (iTregs), lorsqu'un lymphocyte T naïf rencontre son antigène spécifique en présence de la cytokine TGF- β [272]. Les Tregs CD4⁺ Foxp3⁺, lorsqu'activés via un signal antigène-spécifique par le TCR, inhibent l'activation des lymphocytes environnants en séquestrant l'IL-2 disponible, en libérant des granules cytolytiques, en modifiant la fonction des cellules dendritiques et en produisant des cytokines immuno-régulatrices telles que l'IL-10, le TGF- β et l'IL-35 [273]. De nombreuses évidences impliquent ces Tregs dans la pathogénèse du diabète de type 1. Tout d'abord, plusieurs études ont associé le polymorphisme de l'*IL-2* situé dans la région *Idd3* à une fonction altérée des Tregs chez la souris NOD [145, 147, 274]. Par ailleurs, des altérations

au niveau du nombre, de la fonction et de la survie des Tregs ont été observées chez les patients atteints de diabète auto-immun [275, 276].

Alors que les Tregs CD4⁺ Foxp3⁺ constituent la population de cellules régulatrices la plus étudiée, des lymphocytes présentant des phénotypes variés ont été caractérisés pour leur capacité à inhiber la réponse immunitaire (Figure 9) [277]. Chez l'homme, une population de lymphocytes T CD8⁺ Foxp3⁺ provenant du thymus et exerçant des fonctions régulatrices a été identifiée [278]. Il a récemment été démontré que ces cellules pouvaient aussi être induites suite à un traitement d'anti-CD3 chez des patients atteints du diabète de type 1 [279]. Dans le même ordre d'idées, il a été observé chez des patients en rémission d'arthrite rhumatoïde qu'un sous-groupe spécialisé de cellules dendritiques, nommées plasmacytoïdes, ont la capacité d'induire la différenciation de lymphocytes T régulateurs Tr1 sécrétant d'IL-10 [280]. Finalement, un rôle pour des cellules T régulatrices n'exprimant aucun des co-récepteurs (DN, double négatives) a récemment été mis en évidence chez l'homme et la souris. Les paragraphes qui suivent résument les connaissances actuelles quant au mécanisme d'action de ces cellules.

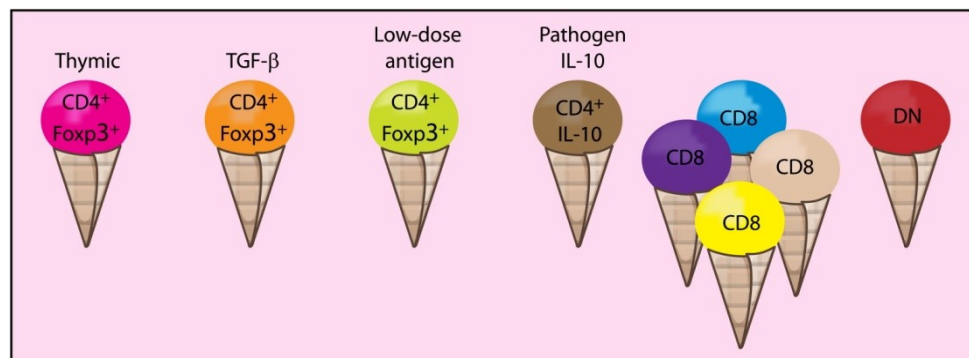


Figure 9 : Différentes populations de lymphocytes T régulateurs. Tiré de [277].

1.4.1.3.2 Les lymphocytes T CD4-CD8- (DN)

Les lymphocytes T DN ont longtemps été associés au développement de l'auto-immunité puisqu'ils sont phénotypiquement similaires à une population proliférant excessivement chez les patients souffrant du syndrome lymphoprolifératif auto-immun [281]. Cette pathologie est typiquement caractérisée par une **splénomégalie**, une lymphadénopathie, une hypergammaglobulinémie, ainsi que des manifestations auto-immunes telles que la cytopénie [282, 283]. Les patients atteints présentent de plus un risque accru de développer un lymphome à cellules B. La souris *lpr/lpr* constitue un modèle d'étude de la maladie puisque celle-ci souffre aussi de lymphadénopathie caractérisée par une augmentation du nombre de cellules T DN [284]. Chez l'homme comme chez l'animal, des mutations altérant la voie de signalisation apoptotique Fas/Fas-L sont responsables de la pathologie. Les lymphocytes T DN retrouvés chez les patients atteints du syndrome lymphoprolifératif auto-immun seraient issus de cellules T CD8 périphériques résistantes à l'apoptose induite par la voie de FAS et proliférant de façon aberrante [285, 286]. Le facteur de transcription EOMES a récemment été identifié pour son rôle dans l'accumulation de cellules T DN chez les patients souffrant de la maladie ainsi que la souris *lpr/lpr* [287]. Outre sa qualité de biomarqueur, le rôle exact de cette population cellulaire dans la pathogénèse du syndrome lymphoprolifératif auto-immun demeure nébuleux puisque les atteintes auto-immunes observées semblent plutôt causées par les niveaux exacerbés d'auto-anticorps [288].

Une population de lymphocytes T n'exprimant aucun des co-récepteurs CD4 et CD8 a aussi été identifiée chez les individus sains. Ces cellules T DN constituent de 1 à 5% des cellules T périphériques chez l'homme, et jusqu'à 3% chez la souris [289, 290]. Contrairement aux lymphocytes T DN retrouvés en grand nombre chez les souris *lpr/lpr*, ces cellules n'expriment pas le marqueur de surface B220, distinction appuyant l'existence de deux populations cellulaires différentes [203, 291]. Il a été démontré que les lymphocytes T DN présents chez les individus sains ont la capacité d'inhiber la

prolifération de lymphocytes T naïfs et mémoires *in vitro*, proposant ainsi un rôle régulateur pour cette population [292]. Chez la souris, de nombreuses études corroborent cette hypothèse. En effet, la fonction régulatrice des lymphocytes T DN murins a initialement été décrite en 2000 par le groupe du Dr Zhang [290]. Plus spécifiquement, cette étude a permis de démontrer dans un modèle TCR transgénique que des cellules TCR β^+ , CD4 $^-$, CD8 $^-$, NK1.1 $^-$ et nécessitant l'ajout d'IL-2 afin de proliférer en culture ont la capacité d'inhiber le rejet d'allogreffe de peau. Le mécanisme proposé pour expliquer l'induction de tolérance est l'acquisition d'allo-antigènes par les cellules T DN via les CPA, suivi de la lyse spécifique des lymphocytes T cytotoxiques reconnaissant l'allo-antigène présenté à la surface des lymphocytes T DN (Figure 10).

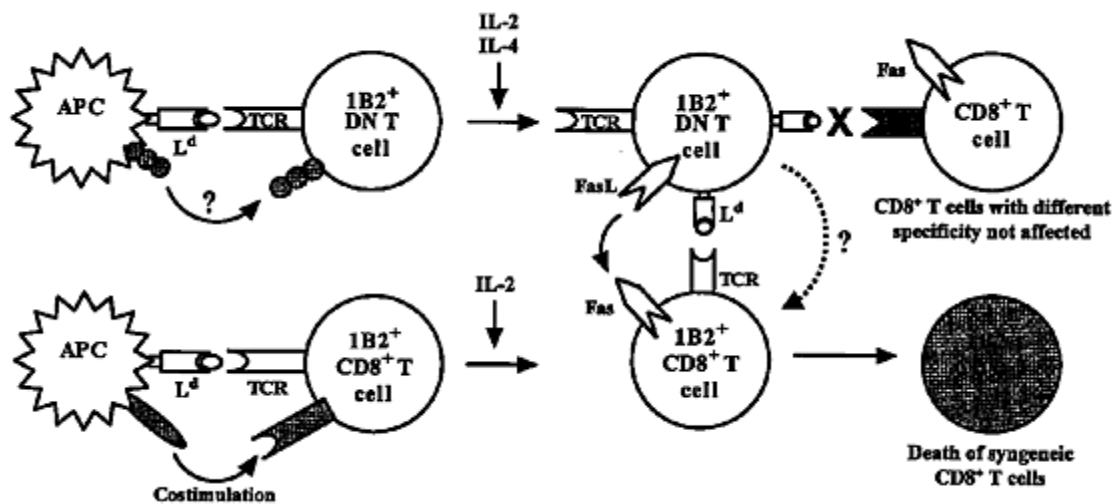


Figure 10 : Modèle décrivant le mécanisme d'action des lymphocytes T DN par le groupe de L. Zhang. Les flèches pleines représentent l'interaction de molécules de surface situées sur différentes cellules. La flèche pointillée représente l'activité cytotoxique des cellules T DN à l'égard d'une cible cellulaire suite à la reconnaissance d'un peptide. Tiré de [290].

Depuis, plusieurs études ont démontré un rôle préventif des cellules T DN dans le rejet d'allogreffes de peau et de cœur [290, 293], de xéno-greffes cardiaques ainsi que dans la maladie du greffon contre l'hôte [294-296]. Plus près de notre champ d'intérêt, deux groupes ont récemment décrit l'importance des lymphocytes T DN dans des modèles murins d'auto-immunité. Tout d'abord, le groupe de L. Zhang a observé que le transfert de lymphocytes T DN activés permet d'inhiber le développement d'une forme de diabète auto-immun induit dans un système antigène-spécifique TCR transgénique [297]. Dans ce contexte, les cellules T DN démontrent la capacité de supprimer la prolifération ainsi que d'éliminer les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'auto-antigène. Plus récemment, le groupe du Dr Brumeau a aussi observé une activité tolérogène pour les lymphocytes T DN dans le cadre d'un modèle de diabète auto-immun [291]. Cette fois, il a été démontré que les cellules T DN non-transgéniques, lorsque transférées à des souris NOD.SCID immuno-supprimées ayant reçu des splénocytes diabétogéniques, peuvent ralentir l'apparition de la maladie. Le mécanisme exact par lequel les lymphocytes T DN exercent leur activité régulatrice dans ce contexte n'est pas investigué, par contre des résultats *in vitro* montrent que ces cellules ont l'habileté de sécréter d'importantes quantités d'IL-10.

Les processus par lesquels les cellules T DN régulent la réponse immunitaire chez la souris ont été souvent étudiés et diffèrent selon les modèles. Selon les articles, les lymphocytes T DN exercent une activité cytotoxique à l'égard des lymphocytes T et/ou B, via des mécanismes cellulaires dépendant ou non de FAS et pouvant inclure la libération de granules cytotoxiques [298]. Il a aussi été observé que les cellules T DN inhibent la production de cytokines telles que l'IL-2 et l'IFN γ par les lymphocytes T effecteurs environnant [299]. Par ailleurs, il a été démontré que ces cellules ont la capacité d'effectuer de la trogocytose, c'est-à-dire d'acquérir des molécules de CMH exprimées à la surface des CPAs avec lesquelles les lymphocytes T DN entrent en contact [300]. Mises en commun, ces études démontrent clairement que chez l'animal, les lymphocytes T DN exercent une activité régulatrice par des mécanismes variés.

La description de l'activité fonctionnelle des lymphocytes T DN chez l'homme en est à ses balbutiements. Il a toutefois été observé qu'*in vitro*, les cellules T DN reconnaissant l'antigène gp-100 du mélanome exercent une activité cytotoxique à l'égard des cellules présentant cet antigène en co-culture [301]. En effet, les lymphocytes T DN activés en présence du peptide qui leur est spécifique produisent de l'IFN- γ ainsi que du TNF, et éliminent les cellules cibles via la sécrétion de granzyme et perforine [289, 301]. Une étude récente a aussi démontré que ces cellules régulatrices peuvent inhiber la réponse des lymphocytes T CD4 et CD8, via des mécanismes requérant des contacts cellulaires [292]. Ainsi, il semble que chez l'homme comme chez la souris, de multiples processus soient impliqués dans le maintien de tolérance exercé par les lymphocytes T DN. Finalement, il est intéressant d'ajouter que des études menées au laboratoire ont associé le nombre de cellules T DN à la résistance au diabète auto-immun chez un modèle murin prédisposé au bris de tolérance immunitaire, ce qui a fortement influencé le choix de mon sujet de recherche.

1.4.2 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont générés dans la moelle osseuse et constituent les effecteurs de la voie humorale de la réponse adaptative. Leur activation en présence de pathogènes est le plus souvent dépendante des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires et mène à la différenciation de plasmocytes sécréteurs d'anticorps et de cellules B mémoires [2]. En tant que CPA, les lymphocytes B sont de plus responsables de la présentation antigénique via l'expression de molécules de CMH-I et -II.

Le rôle des lymphocytes B dans l'initiation et le développement du diabète de type 1 a été longtemps débattu. Alors que la présence d'auto-anticorps dirigés contre les cellules bêta représente un marqueur prédictif de la maladie, leur fonction dans la pathogénèse demeure très mitigée [302-304]. Toutefois, il a récemment été démontré que l'injection

d'anti-CD20, un anticorps éliminant les lymphocytes B, permet de préserver partiellement la fonction des cellules bêta chez des patients diagnostiqués [305]. La littérature concernant la souris NOD propose que le mécanisme par lequel les cellules B participent à la pathogène du diabète auto-immun serait indépendant de la production d'auto-anticorps. En effet, il a été observé que l'absence d'expression de la molécule de CMH-II I-A^{g7} à la surface des lymphocytes B uniquement prévient le développement de la maladie [306]. De plus, le transfert d'auto-anticorps provenant d'une souris NOD diabétique n'est pas suffisant afin d'induire la maladie chez un hôte déficient en cellules B et résistant au diabète auto-immun [307]. Finalement, la création d'une souris NOD transgénique chez laquelle les lymphocytes B sont incapables de sécréter des anticorps a permis de démontrer que cet animal développe de l'insulite et présente une incidence de diabète plus élevée que chez la souris déficiente en lymphocytes B NOD. μ MT^{-/-} [308].

Il semble donc que la fonction principale des lymphocytes B dans la pathogénèse du diabète auto-immun ne soit pas la production d'auto-anticorps mais plutôt leur implication dans l'activation des lymphocytes T naïfs, la maintenance des cellules T mémoires ou encore dans la production de cytokines liées à l'inflammation [309-312]. Par ailleurs, il a été démontré que la fonction pathogénique des cellules B liée à la présentation antigénique nécessitait la présence de lymphocytes B auto-réactifs, puisque ceux-ci peuvent capter les auto-antigènes solubles via leurs immunoglobulines membranaires afin de les présenter plus efficacement aux lymphocytes T CD4+ [313]. Au niveau de la moelle osseuse, l'édition réussie du récepteur des cellules B immatures permet d'empêcher la mort par apoptose des lymphocytes ayant rencontré un antigène du soi qui leur est spécifique [314]. Un deuxième mécanisme de sélection négative consiste en l'anergie des cellules B étant constamment en contact avec des auto-antigènes de faible avidité [315]. Puisque de nombreuses régions *Idd*, incluant les *Idd5*, *Idd9/11* et *Idd22*, ont été associées à un rôle des lymphocytes B dans le développement du diabète auto-immun, il est probable que certaines

de ces régions de prédisposition à la maladie soient responsables d'une sélection déficiente des cellules B auto-réactives [172, 316].

1.4.3 Implication des autres cellules du système immunitaire

Outre les lymphocytes T et B, de nombreuses populations cellulaires sont impliquées dans l'initiation du bris de tolérance menant au développement du diabète de type 1. Les cellules dendritiques, dont la fonction principale est la capture, l'apprêtement et la présentation antigénique, sont réputées pour capter les auto-antigènes libérés suite à la mort de cellules bêta pancréatiques afin de les présenter aux lymphocytes T naïfs situés dans les ganglions drainants [317]. De plus, il a été démontré que les cellules dendritiques conventionnelles retrouvées chez la souris NOD présentent une capacité accrue à activer les lymphocytes T [318, 319]. Toutefois, une étude *in vivo* éliminant plusieurs sous-populations de cellules dendritiques sur une longue période de temps a permis de constater que celles-ci sont nécessaires au maintien de la tolérance, puisque les souris traitées ont développé une pathologie auto-immune fatale [320]. Par ailleurs, les cellules dendritiques sont aussi responsables de l'induction périphérique de lymphocytes Tregs CD4⁺ Foxp3⁺ ainsi que du maintien de leurs fonctions effectrices via la sécrétion d'IL-2 [147].

Autre cellule du système immunitaire inné, le macrophage est aussi impliqué dans la pathogénèse du diabète de type 1. En effet, il a été observé chez la souris que les macrophages infiltrent les îlots de Langerhans avant même les lymphocytes T, et qu'ils exercent une action cytotoxique à l'égard des cellules bêta pancréatiques via la production de TNF- α et d'IL-1 β [321, 322]. De plus, le transfert de splénocytes diabétogéniques chez lesquels un récepteur d'adhésion du macrophage a été bloqué permet d'empêcher l'infiltration pancréatique par les macrophages et les lymphocytes T, inhibant ainsi le développement du diabète auto-immun [323]. Par ailleurs, chez des patients atteints de la maladie et récemment diagnostiqués, des macrophages produisant de l'IL-1 β et du TNF- α

ont été retrouvés dans les infiltrations pancréatiques [324]. En contrepartie, il semble que les cellules NK ainsi qu'à tout le moins certaines populations de lymphocytes NKT, malgré leur habileté à promouvoir l'inflammation, puissent être impliquées dans la prévention de la maladie. En effet, une fonction altérée des cellules NK a été associée à la prédisposition au diabète auto-immun, chez la souris comme chez l'homme [325-327]. Toutefois, il a aussi été récemment démontré que les cellules NK étaient impliquées dans la pathogénèse de la maladie, modérant ainsi le rôle protecteur de cette population [328, 329]. En ce qui concerne les cellules NKT, il a été prouvé par différents modèles que l'augmentation du nombre de ces cellules est liée à la résistance au diabète de type 1 chez la souris [330-332]. Ainsi, de nombreuses populations cellulaires participent à la pathogénèse du diabète de type 1. Par ailleurs, le rôle de chacune d'elle peut varier selon le contexte, c'est-à-dire à l'état de base, en présence d'inflammation ou encore lorsque les mécanismes assurant la tolérance immunitaire sont rompus (Figure 11).

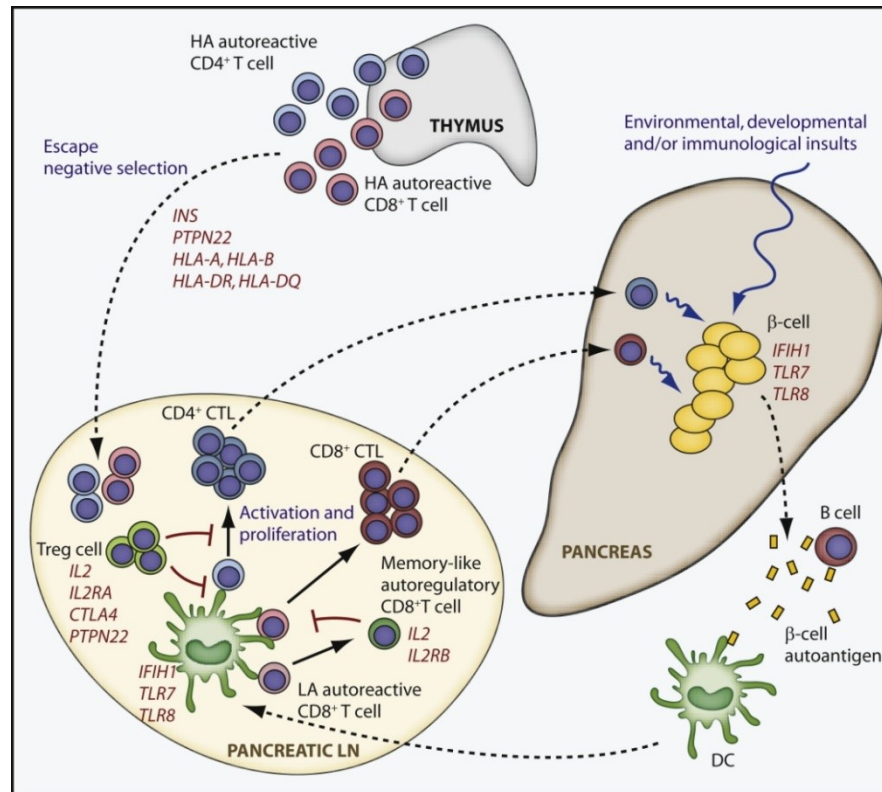


Figure 11 : Modèle général de la réponse immunitaire altérée par des facteurs génétiques et environnementaux menant au développement du diabète de type 1. Les flèches pleines représentent la différenciation, l'activation et la prolifération des lymphocytes T suite à la présentation d'auto-antigènes. Les flèches pointillées représentent la migration des différents sous-types cellulaires impliqués dans la pathogénèse du diabète auto-immun. Les flèches arrondies représentent l'action des différents facteurs et effecteurs cellulaires sur la destruction des cellules bêta-pancréatiques. Tiré de [333].

Raisonnement, Hypothèse et Objectifs

L'étude des facteurs prédisposant au diabète de type 1 de façon indépendante du complexe majeur d'histocompatibilité est un défi. À cet égard, l'utilisation du modèle murin double transgénique TCR3A9:insHEL constitue une approche ingénieuse puisqu'elle permet d'évaluer les facteurs génétiques responsables du maintien de la tolérance immunitaire dans un système antigène-spécifique, en absence de l'haplotype I-A^{g7} prédisposant au développement de l'auto-immunité. L'étude de diverses lignées de souris transgéniques génétiquement résistantes ou prédisposée à l'auto-immunité a révélé une association entre la proportion d'une population peu connue de lymphocytes T DN et la susceptibilité au diabète auto-immun. Puisque différentes populations de lymphocytes T aux fonctions régulatrices ont été identifiées pour leur rôle crucial dans le maintien de la tolérance nécessaire à la prévention du diabète de type 1 chez l'homme et la souris, nous émettons l'hypothèse suivante :

« Les lymphocytes T DN exercent une activité immuno-régulatrice et sont nécessaires au maintien de la tolérance périphérique chez un modèle murin transgénique prédisposé au développement du diabète auto-immun. »

Les objectifs principaux de la thèse sont:

- ❖ Définir le phénotype des lymphocytes T DN et confirmer leur présence chez l'animal non-transgénique.
- ❖ Démontrer la fonction régulatrice des lymphocytes T DN ainsi qu'étudier les mécanismes par lesquels ces cellules participent à la tolérance immunitaire périphérique.
- ❖ Identifier les facteurs génétiques responsables de la régulation des lymphocytes T DN.

CHAPITRE 2 : ARTICLE 1

2.1 Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes.

Véronique Dugas, Claudine Beauchamp, Geneviève Chabot-Roy, Erin E. Hillhouse, Sylvie Lesage.

Cet article a été publié dans le *Journal of Autoimmunity* **35**, 23-32 (2010)

Ma contribution à cet article est majeure. J'ai participé activement au design expérimental, à l'aide de C. Beauchamp, G. Chabot-Roy et S. Lesage. C. Beauchamp et E.E. Hillhouse ont participé au phénotypage des lymphocytes T DN. J'ai effectué les manipulations de lymphocytes T régulateurs CD4⁺ Foxp3⁺. J'ai mis au point les expérimentations liées à l'analyse de la prolifération des cellules T DN, ainsi qu'au transfert adoptif de ces cellules. J'ai participé activement à l'interprétation des résultats, à la mise en forme des figures, à l'écriture du texte ainsi qu'à la réponse à l'éditeur. J'évalue ma participation à 75%.

Les résultats présentés dans cet article sont centraux à la thèse puisqu'ils décrivent le phénotype ainsi que l'activité fonctionnelle des lymphocytes T DN retrouvés chez la souris transgénique. De plus, il y est démontré que la proportion de ces cellules est inversement corrélée à la prédisposition à l'auto-immunité. Finalement, cet article met en évidence le rôle régulateur exercé par les lymphocytes T DN, puisqu'un unique transfert adoptif de ces cellules à des animaux fortement prédisposés au diabète auto-immun et présentant initialement une faible proportion de lymphocytes T DN est suffisant afin de restaurer l'état de tolérance et inhiber le développement de la maladie.

Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes.

Véronique Dugas^{a,b}, Claudine Beauchamp^{a,b}, Geneviève Chabot-Roy^a, Erin E. Hillhouse^{a,b}, Sylvie Lesage^{a,b}

a Immunology-oncology Section, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada

b Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

2.2 Abstract

CD47 and signal regulatory protein (SIRP) interactions have been proposed to take part in autoimmune disease susceptibility. Importantly, a recent genome wide association study for type 1 diabetes susceptibility highlighted the association of the 20p13 region comprising the *SIRP* cluster, where some of the SIRP proteins encode functional ligands to CD47. Using a TCR transgenic mouse model at the brink of autoimmune disease, we demonstrate that CD47-deficiency is sufficient to break the immune tolerance and provoke the onset of autoimmune diabetes. Interestingly, CD47-deficient mice show a severe reduction in the number of mature CD4-CD8- T cells, and passive transfer of these CD4-CD8- T cells is sufficient to restore immune tolerance and prevent diabetes progression. Together, these findings constitute an *in vivo* demonstration that CD47 is involved in diabetes susceptibility and controls the homeostatic regulation of CD4-CD8- T cells.

Keywords: T cells, tolerance, autoimmune diabetes, transgenic mice, CD47, signal regulatory protein

2.3 Introduction

CD47 is a ubiquitously expressed atypical protein which encodes for five transmembrane domains that interact in *cis* with integrins to form a complete seven transmembrane complex, which signals through G-proteins [1]. CD47 is involved in various immunological processes, including apoptosis, phagocytosis, cell migration as well as T cell responses [1-12]. Particularly, CD47 ligation with either antibodies or its physiological ligand potentiates T cell activation [5-7]. The cellular ligands for CD47 include members of the signal-regulatory protein (SIRP) family, SIRP α and SIRP γ [13, 14]. CD47 also interacts with thrombospondin, although this latter interaction is currently the subject of debate [14, 15].

SIRP compose a family of genes, including SIRP α , SIRP β and SIRP γ proteins, which have most probably arisen as a consequence of gene duplication [16]. Their extracellular domains are highly homologous and are characteristic of the immunoglobulin superfamily, while their intracellular domains, and consequently their signaling, are very divergent [17]. Indeed, the SIRP family is defined as “paired receptors”, having both activating and inhibitory receptors [13, 18]. Of interest, the cellular expression and function of these CD47 ligands also differs. The biological function of the highly polymorphic SIRP α protein has been most extensively studied in myeloid cells, where it is expressed [2, 7, 17]. Alternatively, SIRP γ expressed on T cells and NK cells, has been revealed as an important modulator of T cell responses [3, 19-21]. Thus, both CD47 and SIRP are known to influence T cell responses.

More recently, CD47-SIRP interactions have been proposed to take part in T cell-mediated autoimmune disease susceptibility. For instance, animals lacking the intracellular domain of SIRP α become resistant to the development of a myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced EAE and collagen-induced arthritis [22, 23], whereas CD47-deficiency

facilitates the progression of autoimmune hemolytic anemia in mice [24, 25]. In addition, autoimmune diabetes linkage studies in rat and mice have revealed respective associations with *Iddm27* and *Idd13*, two genetic loci encompassing the highly polymorphic *Sirpa* gene [17, 26-28]. Moreover, a recent genome-wide association study for type 1 diabetes susceptibility in humans highlighted the association of the 20p13 region comprising the *SIRP* cluster [29]. Importantly, based on linkage disequilibrium (LD), the *SIRP* cluster contains three genes, namely *SIRPD*, *SIRPB1*, *SIRPG* some of which are known to encode functional ligands to CD47 [16, 29]. Therefore, we aimed to define the contribution of the CD47 pathway in autoimmune diabetes.

For our studies, we use a TCR transgenic mouse model at the brink of autoimmune disease, allowing us to reveal the impact of subtle genetic differences in the regulation of T cell tolerance. In this transgenic model, deletion of CD47 is sufficient to break the immune tolerance, provoking the onset of autoimmune diabetes. We previously demonstrated that T cell central tolerance mechanisms were not altered in TCR transgenic CD47-deficient mice [30], therefore suggesting that defects in peripheral tolerance were at play. Accordingly, we observe a reduction in the number of mature CD4-CD8- T cells in association with disease susceptibility in different genetic backgrounds. Interestingly, these CD4-CD8- T cells are phenotypically similar to immunoregulatory T cells identified by others [31-34]. Moreover, we show that increasing the number of CD4-CD8- T cells is sufficient to confer immune tolerance and impede autoimmune diabetes development. Together, these findings lend support to the view that the CD47-*SIRP* pathway is implicated in susceptibility to autoimmune diabetes.

2.4 Materials and Methods:

2.4.1 Mice

3A9 TCR [35] and insHEL (Hen egg lysozyme (HEL) under the rat-insulin promoter a.k.a ILK-3) [36] transgenic mice on B10.Br, NOD.*H2^k* and BALB.K backgrounds have been previously described [30, 37]. CD47-deficient BALB/c mice [38] were bred to TCR:insHEL B10.Br mice as previously described [30]. Non-transgenic B10.Br (#000465) and NOD (#001976) mice were purchased from The Jackson Laboratory. The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee overseen by the Canadian Council for Animal Protection approved all experimental procedures.

2.4.2 Flow cytometry

6–12-wk old nondiabetic mice (Diascreen negative) were analyzed. All lymphoid organs were passed through a sterile cell strainer. Cell counts were performed by trypan blue exclusion using a hemacytometer. The FITC Anti-Mouse/Rat Foxp3 Staining Set was used for Foxp3 staining according to the manufacturer's instructions (eBiosciences). Anti-clonotypic 1G12 antibody recognizing the expression of the 3A9 TCR [39] was used as a culture supernatant and detected using APC-labelled X56 from BD. Anti-CD25 antibody was purchased from Caltag. All other antibodies were purchased from Biolegend. CD1d tetramer is a generous gift from Dr. David Serreze. Data was collected on a FACSCalibur (BD Biosciences), cells were sorted on a FACSVantage (BD Biosciences) and all data was analyzed with FlowJo software (Treestar).

2.4.3 Proliferation and suppression assays

To measure the extent of T cell proliferation, sorted CD4 and DN T cells were labeled with 2 μ M CFSE (Invitrogen, [40]) and washed twice in cold RPMI containing 10% FCS prior to culture. They were stimulated *in vitro* (250 000 cells/ml) for three days in the presence of irradiated T-depleted splenocytes (2.5 Gy, 250 000 cells/ml) and anti-CD3 (1 μ g/ml), with

or without IL-2 (30 U/ml). To quantify the potential of Tregs at suppressing CD4 T cell proliferation, CD4⁺CD25⁻ effector cells were sorted and labeled with CFSE as above, and cultured for 3 days in presence of the indicated ratio of CD4⁺CD25^{hi} Tregs or CD4⁺CD25⁻ control effector cells.

2.4.4 Diabetes monitoring

The diabetes incidence was monitored every two weeks using Diascreen, where diabetic mice were positive for two consecutive tests and showed blood glucose levels above 17mM. To evaluate the role of CD4⁻CD8⁻ (double negative, DN) T cells, spleen and peripheral lymph nodes cells were obtained from BALB.K TCR mice. Where mentioned, DN T cells were enriched using EasySep[™] biotin selection kit, efficiently removing >95% of CD4⁺ (RM4-5), CD8⁺ (53-6.7) and B cells (CD45R, RA3-6B2). More than 50% of the remaining cells were positive for 1G12 expression. 10 million enriched DN T cells or 10 million selected CD4⁺ T cells (purity 95%) were then injected i.v. in non-diabetic (diastix negative) 9 week-old CD47^{-/-} BALB.K TCR:insHEL mice. Alternatively, 6 week-old non-diabetic CD47^{-/-} BALB.K TCR:insHEL mice were injected with 2 million sorted DN T cells. Sorted 1G12⁺ DN T cells purity was above 90%. Serum was collected from diabetic mice (showing two consecutive Diascreen positive tests and blood glucose levels above 17mM) or when mice reached 24 weeks of age. Anti-HEL IgM and IgG serum levels were measured by ELISA using HEL-coated plates and polyclonal goat anti-mouse IgM and IgG peroxidase conjugate antibodies (Calbiochem).

2.4.5 Phenotyping and quantifying DN T cells in non-transgenic mice

Phenotyping of non-transgenic DN T cells from the spleen and lymph nodes of B10.Br and NOD mice was performed by depleting CD4, CD8, B220, CD49b and TCR δ positive cells using EasySep[™] biotin selection kit. For determining the number of DN T cells, cell separation was not performed to avoid cell loss. The proportion of DN T cells was obtained

by electronic gating on $\text{TCR}\beta^+\text{CD5}^{\text{low}}\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{B220}^-\text{CD1d tetramer}^-$ cells and multiplied by the absolute cell number in each organ.

2.4.6 Statistics

Mann-Whitney U test was performed where appropriate unless otherwise specified.

2.5 Results:

2.5.1 CD47-deficient mice are prone to autoimmune diabetes.

CD47-SIRP interactions regulate T cell responses [1-3, 5-7, 17] and the *SIRP* cluster has been recently associated with autoimmune diabetes progression [29]. We therefore elected to evaluate the impact of the CD47-SIRP pathway on diabetes onset in a T cell dependent model. As such, we took advantage of the TCR:insHEL transgenic mouse model, where the 3A9 TCR transgene recognizes a HEL peptide in the context of I-A^k and the insHEL transgene is expressed under the rat-insulin promoter [36, 37]. Accordingly, TCR:insHEL transgenic mice carry a significant number of autoreactive T cells [36, 37]. This model should thus help reveal the impact of subtle genetic differences in the regulation of T cell tolerance.

In humans, both SIRP α and SIRP γ bind to CD47, while the ligand for SIRP β has not been defined [13, 17]. Murine SIRP α also binds to CD47; however mice do not express SIRP γ [3]. To effectively disrupt the CD47-SIRP pathway and determine its impact on autoimmune disease progression, we monitored the diabetes incidence in TCR:insHEL CD47-deficient, which had been previously generated on the BALB.K background [30]. In this antigen-specific context, less than 20% of the TCR:insHEL CD47-sufficient mice developed autoimmune diabetes within 24 weeks (Figure 1). In contrast, within this same time frame, the incidence of diabetes reached 90% in TCR:insHEL CD47-deficient mice. Moreover, the onset of disease occurred much earlier in CD47-deficient mice, where the first diabetic mice appeared at 6 weeks as opposed to 15 weeks of age in CD47-sufficient mice (Figure 1). Together, these data highlight an important role for the CD47 pathway in the regulation of immune tolerance in a T-cell model of autoimmune diabetes.

2.5.2 Tregs, CD4 and CD8 T cells are not influenced by the absence of CD47

Both central and peripheral T cell tolerance defects may contribute to the pathogenesis of autoimmune diabetes. Although we have previously shown a defect in central tolerance using this TCR transgenic model on a different genetic background [37], we have recently reported that CD47-deficiency does not affect thymic selection events in the TCR:insHEL BALB.K model [30]. Therefore, it is unlikely that defects in central tolerance describe the increased susceptibility to autoimmune diabetes in CD47-deficient mice.

Subsequently, to evaluate the peripheral regulation of T cells independently of the previously ascribed effects of thymic negative selection processes [37], we examined the T cell populations in the spleen and lymph nodes of single TCR transgenic mice, i.e. in the absence of the insHEL transgene which causes negative selection of potentially autoreactive TCR transgenic T cells. As for the B10.Br and NOD.*H2^k* genetic backgrounds [37], single TCR transgenic mice do not develop diabetes on the BALB.K genetic background (data not shown); consequently, any cellular differences observed by comparing CD47-deficient and –sufficient mice will reveal phenotypes associated with disease predisposition in the complete absence of islet inflammation. Moreover, the insertion of both TCR and insHEL transgenes is needed to allow diabetes progression, demonstrating that a sufficient number of HEL-specific T cells, in the presence of HEL expression in the pancreas, must be present to initiate the pathology.

Peripheral T cell regulation is mediated at least in part by Foxp3-expressing CD4 regulatory T cells (Tregs) known to limit auto-reactive T cell activation [41]. As a result, we first evaluated whether the absence of CD47 modulated the number or function of Tregs. By comparing 3A9 TCR clonotype (1G12)⁺ cells in the spleen and lymph nodes of TCR single transgenic CD47-deficient and –sufficient mice, we observed no significant difference in the proportion of Tregs or in their potential to inhibit *in vitro* CD4 T cell proliferation (Figure 2a and 2b). Indeed, CD47-deficient Tregs from 3A9 TCR transgenic mice were at least as efficient as those from CD47-sufficient mice at inhibiting CD4 T cell

proliferation, monitored by the extent of CFSE dilution. These results support previous findings demonstrating that neither the quantity nor the function of Tregs is reduced in CD47-deficient non-transgenic mice [42]. Rather, Tregs appear to slowly accumulate with age in CD47-deficient mice [42]. Together, these data suggest that the increased susceptibility to autoimmune diabetes in CD47-deficient mice cannot be attributed to a defect in Treg homeostasis or function.

Secondly, we showed that the proportion, the absolute number and activation markers of either CD4 or CD8 T cells were not altered in peripheral lymphoid organs of TCR transgenic CD47-deficient mice when compared with CD47-sufficient mice (Figure 2c, Table I and data not shown). Together, these data suggest that the T cell pool is not affected by the absence of the CD47 molecule.

2.5.3 Decreased proportion of CD4-CD8- T cells in CD47 deficient mice.

Yet, while analyzing the CD4 and CD8 T cell subsets, we observed a high number of TCR clonotype 1G12⁺ cells lacking both CD4 and CD8 expression (Figure 3a). Indeed, approximately 50% of TCR clonotype 1G12⁺ cells were CD4⁻CD8⁻, revealing the presence of non-conventional T cells (Figure 3a). Almost 5% of total spleen cells and an astounding 15% of total lymph nodes cells were CD4⁻CD8⁻1G12⁺ (Figure 3b). We hereafter refer to these cells as double negative T (DN T) cells. More importantly, DN T cells were severely reduced in TCR CD47-deficient mice when compared with CD47-sufficient mice (Figure 3b). Finally, similar results were obtained in TCR:insHEL mice, where the number of DN T cells was also significantly lower in the absence of CD47 (data not shown). These results suggest that CD47 is associated with the homeostatic regulation of DN T cells.

2.5.3 Elevated DN T cell numbers are associated with diabetes resistance.

Hitherto, our results show that CD47-deficiency accelerates autoimmune diabetes progression and is associated with a reduced number of DN T cells in pre-diabetic mice. To determine whether elevated DN T cell number is associated with diabetes resistance, we

investigated the proportion of DN T cells in two other genetic backgrounds. The proportion and number of DN T cells was comparable for both diabetes-resistant TCR B10.Br and BALB.K mice in the spleen and lymph nodes (Figure 4a, Table II). Moreover, both the diabetes-prone TCR NOD.*H2^k* and CD47-deficient BALB.K mice show a severe reduction in DN T cell proportion and number (Figure 4a, Table II). Interestingly, similar to CD47-deficient and -sufficient mice, the TCR transgene on B10.Br and NOD.*H2^k* backgrounds did not impact the proportion of CD4 and CD8 T cell subsets (Figure 4b). Finally, the discrepancy in DN T cell number between the B10.Br and NOD.*H2^k* strains was also apparent in TCR:insHEL transgenic mice (Figure 4c). Thus, we find elevated DN T cell numbers in both diabetes-resistant TCR B10.Br and BALB.K CD47-sufficient mouse models and low DN T cell numbers in both diabetes susceptible TCR NOD.*H2^k* and BALB.K CD47-deficient mouse models. Taken together, these results suggest that elevated DN T cell number is associated with autoimmune diabetes resistance.

2.5.4 Phenotypic characterization of DN T cells.

Immunoregulatory DN T cells have been previously described by others [31, 32]. These cells are rare in non-transgenic mice [43, 44] and humans [34]. Interestingly, the insertion of TCR transgenes has been shown to increase the proportion of DN T cells in many different models, including the HY-TCR, the 4E3-TCR, the 1H3.1 and the 2C-TCR transgenic mice [31, 32, 45-48]. Similarly, we have found that the proportion of DN T cells is considerably increased in the context of the 3A9 TCR transgene (Figure 3). As a sizeable proportion of DN T cells can be found in TCR transgenic mice, it is not surprising to find that the most extensive characterization of this cell type has been performed using the TCR transgenic settings [31, 32, 46]. We compared the phenotype of the 3A9 TCR transgenic T cells to these immunoregulatory DN T cells.

Similar to the immunoregulatory 2C TCR transgenic DN T cells as well as the 1H3.1 DN T cells, those obtained in the 3A9 TCR transgenic mice are anergic and the anergy can be reversed upon addition of IL-2 [32, 46, 49] (Figure 5). Moreover, DN T cells from 2C,

IH3.1 and 3A9 TCR transgenic mice exhibit a comparable phenotype, in that they express low levels of CD44, are negative for CD25, CD69, CD122 and Foxp3 expression and show high levels of Ly6A [31, 32, 46, 50, 51] (Figure 6a). We performed additional phenotypic characterization and demonstrate that 3A9 TCR transgenic DN T cells express many naïve T cell markers such as CD3, CD62L and CD45RB at levels comparable to CD4 T cells from TCR transgenic mice and low levels of CD5 [46, 52] (Figure 6b). Therefore, the CD4-CD8-1G12+ subset found in the 3A9 TCR transgenic mice defines a naïve T cell type and carries a similar phenotype to the previously defined immunoregulatory DN T cell subset.

2.5.5 DN T cells are reduced in number in non-transgenic autoimmune prone NOD mice. Insertion of TCR transgenes are known to alter the homeostatic regulation of various T cell subsets [53]. We thus aimed to verify whether the increased number of DN T cells is associated with autoimmune diabetes resistance in a non-transgenic setting. We took advantage of the phenotypic characterization performed on TCR transgenic DN T cells to identify the rare DN T cells in non-transgenic mice. Spleen and lymph node cells from B10.Br and NOD mice were selected for lack of CD4, CD8, DX5, B220, and TCR δ expression (purity >95%). Up to 25% of this enriched cellular population are shown to express high levels of TCR β , the majority of which do not stain for the CD1d-tetramer, thereby excluding potential contaminating CD4⁻CD8⁻ NKT cells from the analysis (Figure 7a and data not shown). Finally, similar to the observations made for TCR transgenic DN T cells, these non-transgenic DNT cells showed a low level of CD5 expression (Figure 7a). Therefore, DN T cells can clearly be identified in a non-transgenic setting.

As autoimmune-prone TCR transgenic mice show a severe reduction in the proportion of DN T cells, we quantified the proportion of DN T cells in H-2^{g7} non-transgenic NOD mice. Our data demonstrate at least a three-fold reduction in DN T cell number in non-transgenic NOD mice when compared to diabetes-resistant B10.Br (Figure 7b). This result further supports the view that low DN T cell proportion is associated with diabetes susceptibility.

2.5.6 DN T cells are sufficient to restore diabetes resistance.

We next aimed to determine whether DN T cells were directly implicated in resistance to diabetes progression. We selected a group of 23 TCR:insHEL transgenic CD47-deficient BALB.K mice, which tested negative for urine glucose (Diascreen) at 9 weeks of age. Nine of these mice received 10 million DN T cells and the cohort of 23 mice was monitored for diabetes incidence. At 24 weeks of age, only 1/9 mice which had received DN T cells was hyperglycemic, as compared to 11/14 in non-injected animals (Figure 8a). As a control, 2 mice were injected with 10 million CD4⁺ T cells from TCR transgenic BALB.K mice and 1 of these became diabetic before 24 weeks (Table III). Moreover, to exclude the possibility that contaminating cells found in the DN T cell preparation were responsible for conferring protection from diabetes progression, we generated an additional cohort of mice, which were instead injected with 2 million DN T cells sorted to high purity. All of the four mice, injected at 6 weeks of age, have maintained low urine and blood glucose levels (Table III).

Furthermore, we have previously shown that, in the TCR:insHEL model, anti-HEL IgG antibody levels correlate with diabetes susceptibility in other genetic backgrounds [37]. We thus quantified the HEL specific auto-antibodies in TCR:insHEL CD47-deficient mice, which had, or had not, received DN T cells. Levels of serum anti-HEL IgM auto-antibodies were similar between both groups (Figure 8b). Interestingly, DN T cell transfer in TCR:insHEL CD47-deficient mice not only protected the mice from diabetes progression but these recipients also showed a lower level of serum anti-HEL IgG auto-antibodies (Figure 8c). Taken together, these results suggest that restoring DN T cell number in diabetes-prone mice prevents diabetes progression.

2.6 Discussion:

T cell-mediated autoimmune diabetes progresses similarly in humans and in NOD mice [54]. In support of this view, genetic susceptibility to autoimmune diabetes is quite concordant between the two species, where the *MHC*, *PTPN22* and *CTLA-4* genetic polymorphisms associate with disease [55]. Moreover, insulin has been suggested as the initiating autoantigen in both humans and mice [56-59]. Finally, the mouse *Il2* and human *CD25* genes are also both associated with increased risk, suggesting that the IL-2 pathway is involved in disease susceptibility [55]. Herein, we lend support for the implication of yet another pathway which is involved in autoimmune diabetes progression in both species: the CD47-SIRP pathway.

CD47-SIRP interactions modulate T cell responses and have been suggested to contribute to T cell-mediated autoimmune pathogenesis [17, 22, 23, 29]. Using a TCR transgenic mouse model, we demonstrated that CD47-deficiency is sufficient to break the immune tolerance and promote autoimmune diabetes progression. Transgenic mouse models have been commonly used to validate the implication of other biological pathways in the progression of autoimmune diabetes. A TCR transgenic approach was used to verify the association of the IL-2 candidate gene, located within the *Idd3* locus, with autoimmune diabetes susceptibility [60]. In addition, the role of CTLA-4 in autoimmune diabetes was evaluated using a transgenic mouse model for a specific CTLA-4 isoform [61]. These studies highlight the importance of murine transgenic systems to reveal the *in vivo* role of candidate genes and/or pathways implicated in immune tolerance and associated with human autoimmune diseases.

The introduction of the CD47-deficiency on non-transgenic C57BL/6 or BALB/c background, genetically resistant to autoimmune diseases, is not sufficient to cause autoimmune diabetes. This is not surprising, considering the multigenic character of autoimmune diseases, and certainly does not preclude a role for the CD47 pathway in

autoimmunity. Autoimmune disease predisposition is a complex genetic trait, where multiple genes are associated with disease progression [62]. By definition, one gene is thus not sufficient to confer disease progression. For example, the MHC I-A^{g7}, the most important factor contributing to autoimmune diabetes susceptibility in NOD mice, is not sufficient to confer diabetes susceptibility in autoimmune resistant C57BL/6 mice when these mice are made congenic for the H2^{g7} allele (a.k.a. B6.g7) [63]. Furthermore, in support of a role for the CD47 pathway in autoimmunity, CD47-deficient autoimmune-prone NOD mice were shown to develop hemolytic anemia [25]. CD47 expression on erythrocytes is of critical importance [24, 64], and CD47-deletion may embrittle the red blood cells, increasing the predisposition to autoimmune hemolytic anemia in a strain already highly susceptible to autoimmune diseases. Thus, we propose that, as for other factors associated with autoimmune diabetes predisposition, the CD47 pathway is one of many parameters contributing to autoimmune disease susceptibility.

Within the CD47 pathway, it is tempting to propose *SIRP α* as the candidate gene. First, CD47 is only known to bind *SIRP α* and *SIRP γ* [14]. Second, *SIRP γ* is not expressed in mice [16]. Third, *SIRP α* is located within the *Idd13* and *Iddm27* diabetes susceptibility locus in mice and rats, respectively [26, 27]. Finally, *SIRP α* is highly polymorphic [28]. However, it must be noted that the polymorphisms in the human *SIRP α* gene are unlikely to affect binding with CD47 [13, 14]. Moreover, the human genetic association to type 1 diabetes was more strongly linked to *SIRP γ* and appeared to exclude *SIRP α* as a candidate gene [29]. Thus, although we have demonstrated that ablating CD47 is sufficient to contribute to autoimmune disease progression, more studies are required to resolve the exact polymorphism and protein interactions increasing autoimmune diabetes susceptibility.

In this study, we demonstrate that the CD47 pathway influences the homeostatic regulation of an unconventional T cell subset (the DN T cells), where DN T cell transfer is sufficient to prevent diabetes progression. Immunoregulatory DN T cells have been previously

characterized by others [31, 32], where they must be activated by antigen to efficiently eliminate CD8 T cells carrying the same antigenic specificity [33]. Indeed, these cells can prevent skin and heart allograft as well as heart xenograft rejection [31, 65, 66]. Using a different TCR transgenic model, where diabetes is induced upon peptide and anti-CD40 challenge, DN T cells were also shown to confer protection from autoimmune diabetes progression [67]. Our data thus support and add to the findings that DN T cells protect from diabetes progression. For one, we demonstrate that DN T cells can prevent diabetes onset in a spontaneous model of diabetes. Secondly, we perform a more extensive phenotypic characterization of this T cell subset and show that they exhibit a similar profile to naïve CD4 T cells. Thirdly, we associate low DN T cell number with diabetes susceptibility in TCR transgenic CD47-deficient BALB.K mice and NOD.*H2^k* mice, as well as in non-transgenic NOD mice. Finally, we demonstrate that DN T cell transfer associates with lower autoantibody levels.

In summary, our observations have permitted the association of a defect in the CD47 pathway with autoimmune diabetes progression and identify at least part of the mechanism by which the disruption of the CD47 pathway accelerates disease onset; through the regulation of DN T cell number. As TCR:insHEL NOD.*H2^k* mice carry a low number of DN T cells and are highly susceptible to autoimmune diabetes, it would be expected that introgression of the *Idd13* resistance allele, which contains *SIRP α* , in this transgenic model would restore DN T cell number and confer protection from diabetes progression. Alternatively, DN T cell proportion could be monitored in humans carrying either the resistance or susceptibility allele for the *SIRP* locus genetic marker rs2281808 [29], to determine the association between the genotype and phenotype. Such an association would identify a novel therapeutic target and lead the way for a potential cellular therapy approach, where expansion of DN T cell numbers may protect from autoimmune disease progression.

2.7 Acknowledgments

We thank Dr C. C. Goodnow and P. A. Oldenborg for generously providing the mice, Dr. D. Serreze for providing the CD1d-tetramer staining reagent, Drs N. Labrecque, M. Guimond, C. Perrault and A. Liston for critical review of the manuscript, A.N. Pelletier for statistical analyses, M. Asselin, J. Cousineau, M. J. Guyon and the staff of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center for curating the mouse colony. This work was supported by grants from the Juvenile Diabetes Research Foundation International, the Canadian Institutes of Health Research and La Fondation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. S.L., V.D., C.B and E.E.H. hold a FRSQ Junior Scholarship, a FRSQ PhD Scholarship, a Diabète Québec scholarship and a CIHR PhD Scholarship, respectively.

2.8 References

1. Brown, E.J., Frazier, W.A. 2001. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol*, 11: 130-5.
2. Latour, S., Tanaka, H., Demeure, C., Mateo, V., Rubio, M., Brown, E.J., Maliszewski, C., Lindberg, F.P., Oldenborg, A., Ullrich, A. *et al.* 2001. Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein- α : down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J Immunol*, 167: 2547-54.
3. Brooke, G., Holbrook, J.D., Brown, M.H., Barclay, A.N. 2004. Human lymphocytes interact directly with CD47 through a novel member of the signal regulatory protein (SIRP) family. *J Immunol*, 173: 2562-70.
4. Pettersen, R.D. 2000. CD47 and death signaling in the immune system. *Apoptosis*, 5: 299-306.
5. Tichioni, M., Deckert, M., Mary, F., Bernard, G., Brown, E.J., Bernard, A. 1997. Integrin-associated protein (CD47) is a comitogenic molecule on CD3-activated human T cells. *J Immunol*, 158: 677-84.
6. Waclavicek, M., Majdic, O., Stulnig, T., Berger, M., Baumruker, T., Knapp, W., Pickl, W.F. 1997. T cell stimulation via CD47: agonistic and antagonistic effects of CD47 monoclonal antibody 1/1A4. *J Immunol*, 159: 5345-54.
7. Seiffert, M., Brossart, P., Cant, C., Cella, M., Colonna, M., Brugger, W., Kanz, L., Ullrich, A., Buhning, H.J. 2001. Signal-regulatory protein α (SIRP α) but not SIRP β is involved in T-cell activation, binds to CD47 with high affinity, and is expressed on immature CD34(+)CD38(-) hematopoietic cells. *Blood*, 97: 2741-9.
8. de Vries, H.E., Hendriks, J.J., Honing, H., De Lavalette, C.R., van der Pol, S.M., Hooijberg, E., Dijkstra, C.D., van den Berg, T.K. 2002. Signal-regulatory protein α -CD47 interactions are required for the transmigration of monocytes across cerebral endothelium. *J Immunol*, 168: 5832-9.
9. Liu, Y., Buhning, H.J., Zen, K., Burst, S.L., Schnell, F.J., Williams, I.R., Parkos, C.A. 2002. Signal regulatory protein (SIRP α), a cellular ligand for CD47, regulates neutrophil transmigration. *J Biol Chem*, 277: 10028-36.
10. Van, V.Q., Lesage, S., Bouguermouh, S., Gautier, P., Rubio, M., Levesque, M., Nguyen, S., Galibert, L., Sarfati, M. 2006. Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *Embo J*, 25: 5560-8.
11. Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasn, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.A., Michalak, M., Henson, P.M. 2005. Cell-

surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*, 123: 321-34.

12. Beattie, L., Svensson, M., Bune, A., Brown, N., Maroof, A., Zubairi, S., Smith, K.R., Kaye, P.M. 2009. Leishmania donovani-induced expression of SIRPalpha on kupffer cells enhances hepatic invariant NKT cell activation. *Eur J Immunol*.

13. Hatherley, D., Graham, S.C., Turner, J., Harlos, K., Stuart, D.I., Barclay, A.N. 2008. Paired receptor specificity explained by structures of signal regulatory proteins alone and complexed with CD47. *Mol Cell*, 31: 266-77.

14. Barclay, A.N. 2009. Signal regulatory protein alpha (SIRPalpha)/CD47 interaction and function. *Curr Opin Immunol*, 21: 47-52.

15. Kvensakul, M., Adams, J.C., Hohenester, E. 2004. Structure of a thrombospondin C-terminal fragment reveals a novel calcium core in the type 3 repeats. *The EMBO journal*, 23: 1223-33.

16. van Beek, E.M., Cochrane, F., Barclay, A.N., van den Berg, T.K. 2005. Signal regulatory proteins in the immune system. *J Immunol*, 175: 7781-7.

17. Barclay, A.N., Brown, M.H. 2006. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol*, 6: 457-64.

18. Barclay, A.N., Hatherley, D. 2008. The counterbalance theory for evolution and function of paired receptors. *Immunity*, 29: 675-8.

19. Piccio, L., Vermi, W., Boles, K.S., Fuchs, A., Strader, C.A., Facchetti, F., Cella, M., Colonna, M. 2005. Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRPbeta2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation. *Blood*, 105: 2421-7.

20. Ichigotani, Y., Matsuda, S., Machida, K., Oshima, K., Iwamoto, T., Yamaki, K., Hayakawa, T., Hamaguchi, M. 2000. Molecular cloning of a novel human gene (SIRP-B2) which encodes a new member of the SIRP/SHPS-1 protein family. *J Hum Genet*, 45: 378-82.

21. Stefanidakis, M., Newton, G., Lee, W.Y., Parkos, C.A., Luscinskas, F.W. 2008. Endothelial CD47 interaction with SIRPgamma is required for human T-cell transendothelial migration under shear flow conditions in vitro. *Blood*, 112: 1280-9.

22. Tomizawa, T., Kaneko, Y., Saito, Y., Ohnishi, H., Okajo, J., Okuzawa, C., Ishikawa-Sekigami, T., Murata, Y., Okazawa, H., Okamoto, K. *et al.* 2007. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis and impaired T cell priming by dendritic cells in Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 mutant mice. *J Immunol*, 179: 869-77.

23. Okuzawa, C., Kaneko, Y., Murata, Y., Miyake, A., Saito, Y., Okajo, J., Tomizawa, T., Okazawa, H., Ohnishi, H., Matozaki, T. *et al.* 2008. Resistance to collagen-induced arthritis in SHPS-1 mutant mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 371: 561-6.

24. Oldenborg, P.A., Zheleznyak, A., Fang, Y.F., Lagenaur, C.F., Gresham, H.D., Lindberg, F.P. 2000. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*, 288: 2051-4.
25. Oldenborg, P.A., Gresham, H.D., Chen, Y., Izui, S., Lindberg, F.P. 2002. Lethal autoimmune hemolytic anemia in CD47-deficient nonobese diabetic (NOD) mice. *Blood*, 99: 3500-4.
26. Wallis, R.H., Wang, K., Marandi, L., Hsieh, E., Ning, T., Chao, G.Y., Sarmiento, J., Paterson, A.D., Poussier, P. 2009. Type 1 diabetes in the BB rat: a polygenic disease. *Diabetes*, 58: 1007-17.
27. Serreze, D.V., Prochazka, M., Reifsnyder, P.C., Bridgett, M.M., Leiter, E.H. 1994. Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene. *J Exp Med*, 180: 1553-8.
28. Takenaka, K., Prasolava, T.K., Wang, J.C., Mortin-Toth, S.M., Khalouei, S., Gan, O.I., Dick, J.E., Danska, J.S. 2007. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*, 8: 1313-23.
29. Barrett, J.C., Clayton, D.G., Concannon, P., Akolkar, B., Cooper, J.D., Erlich, H.A., Julier, C., Morahan, G., Nerup, J., Nierras, C. *et al.* 2009. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nature genetics*.
30. Guimont-Desrochers, F., Beauchamp, C., Chabot-Roy, G., Dugas, V., Hillhouse, E.E., Dusseault, J., Langlois, G., Gautier-Ethier, P., Darwiche, J., Sarfati, M. *et al.* 2009. Absence of CD47 in vivo influences thymic dendritic cell subset proportions but not negative selection of thymocytes. *Int Immunol*, 21: 167-77.
31. Zhang, Z.X., Yang, L., Young, K.J., DuTemple, B., Zhang, L. 2000. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med*, 6: 782-9.
32. Priatel, J.J., Utting, O., Teh, H.S. 2001. TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J Immunol*, 167: 6188-94.
33. Chen, W., Ford, M.S., Young, K.J., Zhang, L. 2004. The role and mechanisms of double negative regulatory T cells in the suppression of immune responses. *Cell Mol Immunol*, 1: 328-35.
34. Fischer, K., Voelkl, S., Heymann, J., Przybylski, G.K., Mondal, K., Laumer, M., Kunz-Schughart, L., Schmidt, C.A., Andreesen, R., Mackensen, A. 2005. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood*, 105: 2828-35.
35. Ho, W.Y., Cooke, M.P., Goodnow, C.C., Davis, M.M. 1994. Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med*, 179: 1539-49.

36. Akkaraju, S., Ho, W.Y., Leong, D., Canaan, K., Davis, M.M., Goodnow, C.C. 1997. A range of CD4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis. *Immunity*, 7: 255-71.
37. Lesage, S., Hartley, S.B., Akkaraju, S., Wilson, J., Townsend, M., Goodnow, C.C. 2002. Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes. *J Exp Med*, 196: 1175-88.
38. Lindberg, F.P., Bullard, D.C., Caver, T.E., Gresham, H.D., Beaudet, A.L., Brown, E.J. 1996. Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. *Science*, 274: 795-8.
39. Van Parijs, L., Peterson, D.A., Abbas, A.K. 1998. The Fas/Fas ligand pathway and Bcl-2 regulate T cell responses to model self and foreign antigens. *Immunity*, 8: 265-74.
40. Weston, S.A., Parish, C.R. 1990. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods*, 133: 87-97.
41. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133: 775-87.
42. Van, V.Q., Darwiche, J., Raymond, M., Lesage, S., Bouguermouh, S., Rubio, M., Sarfati, M. 2008. Cutting edge: CD47 controls the in vivo proliferation and homeostasis of peripheral CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells that express CD103. *J Immunol*, 181: 5204-8.
43. Abraham, V.S., Sachs, D.H., Sykes, M. 1992. Mechanism of protection from graft-versus-host disease mortality by IL-2. III. Early reductions in donor T cell subsets and expansion of a CD3⁺CD4⁻CD8⁻ cell population. *J Immunol*, 148: 3746-52.
44. Strober, S., Dejbachsh-Jones, S., Van Vlasselaer, P., Duwe, G., Salimi, S., Allison, J.P. 1989. Cloned natural suppressor cell lines express the CD3⁺CD4⁻CD8⁻ surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor. *J Immunol*, 143: 1118-22.
45. Egawa, T., Kreslavsky, T., Littman, D.R., von Boehmer, H. 2008. Lineage diversion of T cell receptor transgenic thymocytes revealed by lineage fate mapping. *PLoS ONE*, 3: e1512.
46. Viret, C., Janeway, C.A., Jr. 2003. Self-specific MHC class II-restricted CD4-CD8- T cells that escape deletion and lack regulatory activity. *J Immunol*, 170: 201-9.
47. Illes, Z., Waldner, H., Reddy, J., Anderson, A.C., Sobel, R.A., Kuchroo, V.K. 2007. Modulation of CD4 co-receptor limits spontaneous autoimmunity when high-affinity transgenic TCR specific for self-antigen is expressed on a genetically resistant background. *Int Immunol*.

48. Fritsch, M., Andersson, A., Petersson, K., Ivars, F. 1998. A TCR alpha chain transgene induces maturation of CD4- CD8- alpha beta+ T cells from gamma delta T cell precursors. *Eur J Immunol*, 28: 828-37.
49. Zhang, Z.X., Ma, Y., Wang, H., Arp, J., Jiang, J., Huang, X., He, K.M., Garcia, B., Madrenas, J., Zhong, R. 2006. Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, fas-fas ligand-independent pathway. *J Immunol*, 177: 6920-9.
50. Zhang, Z.X., Stanford, W.L., Zhang, L. 2002. Ly-6A is critical for the function of double negative regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 32: 1584-92.
51. Lee, B.P., Mansfield, E., Hsieh, S.C., Hernandez-Boussard, T., Chen, W., Thomson, C.W., Ford, M.S., Bosinger, S.E., Der, S., Zhang, Z.X. *et al.* 2005. Expression profiling of murine double-negative regulatory T cells suggest mechanisms for prolonged cardiac allograft survival. *J Immunol*, 174: 4535-44.
52. Leng, Q., Ge, Q., Nguyen, T., Eisen, H.N., Chen, J. 2007. Stage-dependent reactivity of thymocytes to self-peptide-MHC complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 5038-43.
53. Baldwin, T.A., Hogquist, K.A., Jameson, S.C. 2004. The fourth way? Harnessing aggressive tendencies in the thymus. *J Immunol*, 173: 6515-20.
54. Anderson, M.S., Bluestone, J.A. 2005. THE NOD MOUSE: A Model of Immune Dysregulation. *Annu Rev Immunol*, 23: 447-85.
55. Maier, L.M., Wicker, L.S. 2005. Genetic susceptibility to type 1 diabetes. *Curr Opin Immunol*, 17: 601-8.
56. Kent, S.C., Chen, Y., Bregoli, L., Clemmings, S.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Hering, B.J., Hafler, D.A. 2005. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature*, 435: 224-8.
57. Nakayama, M., Abiru, N., Moriyama, H., Babaya, N., Liu, E., Miao, D., Yu, L., Wegmann, D.R., Hutton, J.C., Elliott, J.F. *et al.* 2005. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature*, 435: 220-3.
58. von Herrath, M. 2005. Immunology: insulin trigger for diabetes. *Nature*, 435: 151-2.
59. Krishnamurthy, B., Dudek, N.L., McKenzie, M.D., Purcell, A.W., Brooks, A.G., Gellert, S., Colman, P.G., Harrison, L.C., Lew, A.M., Thomas, H.E. *et al.* 2006. Responses against islet antigens in NOD mice are prevented by tolerance to proinsulin but not IGRP. *J Clin Invest*, 116: 3258-3265.
60. Yamanouchi, J., Rainbow, D., Serra, P., Howlett, S., Hunter, K., Garner, V.E., Gonzalez-Munoz, A., Clark, J., Veijola, R., Cubbon, R. *et al.* 2007. Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nature genetics*, 39: 329-37.

61. Fife, B.T., Griffin, M.D., Abbas, A.K., Locksley, R.M., Bluestone, J.A. 2006. Inhibition of T cell activation and autoimmune diabetes using a B cell surface-linked CTLA-4 agonist. *The Journal of clinical investigation*, 116: 2252-61.
62. Wicker, L.S., Todd, J.A., Peterson, L.B. 1995. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol*, 13: 179-200.
63. Yui, M.A., Muralidharan, K., Moreno-Altamirano, B., Perrin, G., Chestnut, K., Wakeland, E.K. 1996. Production of congenic mouse strains carrying NOD-derived diabetogenic genetic intervals: an approach for the genetic dissection of complex traits. *Mamm Genome*, 7: 331-4.
64. Wang, H., Madariaga, M.L., Wang, S., Van Rooijen, N., Oldenburg, P.A., Yang, Y.G. 2007. Lack of CD47 on nonhematopoietic cells induces split macrophage tolerance to CD47null cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 13744-9.
65. Chen, W., Ford, M.S., Young, K.J., Cybulsky, M.I., Zhang, L. 2003. Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival. *J Immunol*, 170: 1846-53.
66. Chen, W., Ford, M.S., Young, K.J., Zhang, L. 2003. Infusion of in vitro-generated DN T regulatory cells induces permanent cardiac allograft survival in mice. *Transplant Proc*, 35: 2479-80.
67. Ford, M.S., Chen, W., Wong, S., Li, C., Vanama, R., Elford, A.R., Asa, S.L., Ohashi, P.S., Zhang, L. 2007. Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development. *Eur J Immunol*.

2.9 Figures and Tables

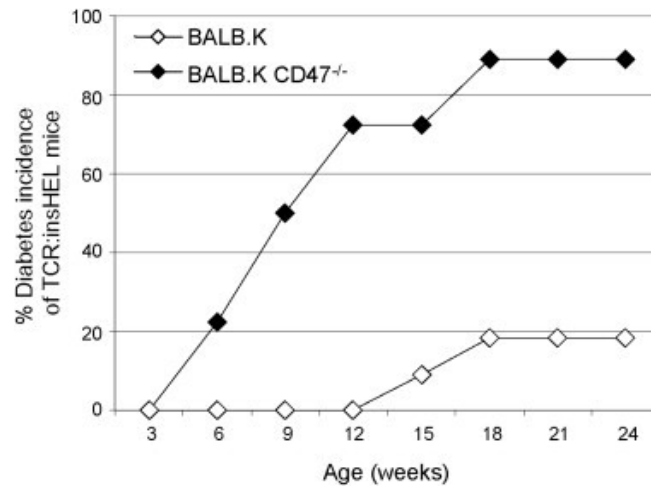


Figure 1: Diabetes incidence is increased in TCR:insHEL BALB.K CD47-deficient mice. Diabetes incidence was monitored in CD47-sufficient (n = 11) and CD47-deficient (n = 18) TCR:insHEL BALB.K mice.

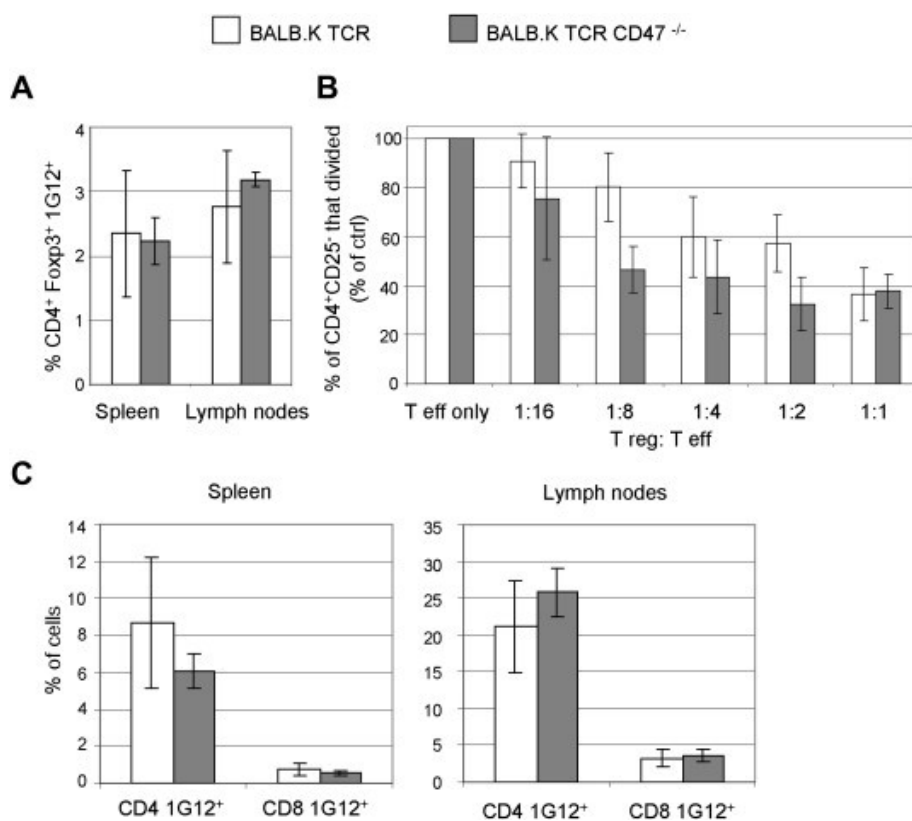


Figure 2: Tregs, CD4 and CD8 T cells are not influenced by the absence of CD47

The proportion of T cells from the spleen and lymph nodes of TCR transgenic CD47-sufficient and -deficient BALB.K mice was determined by staining for CD4, CD8, 1G12 and Foxp3. A) The proportion of TCR transgenic CD4⁺ Foxp3⁺ T cells ($n \geq 5$) and B) the ability of sorted CD4⁺CD25^{hi} Tregs to suppress the proliferation of CFSE-labeled CD4⁺CD25⁻ effector T cells *in vitro* is shown for CD47-sufficient (white) and -deficient (grey) TCR transgenic BALB.K mice ($n = 3$). C) The proportion of TCR transgenic CD4 and CD8 T cells in the spleen and lymph nodes are shown for CD47-sufficient (white) and -deficient (grey) BALB.K mice ($n \geq 5$). * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$

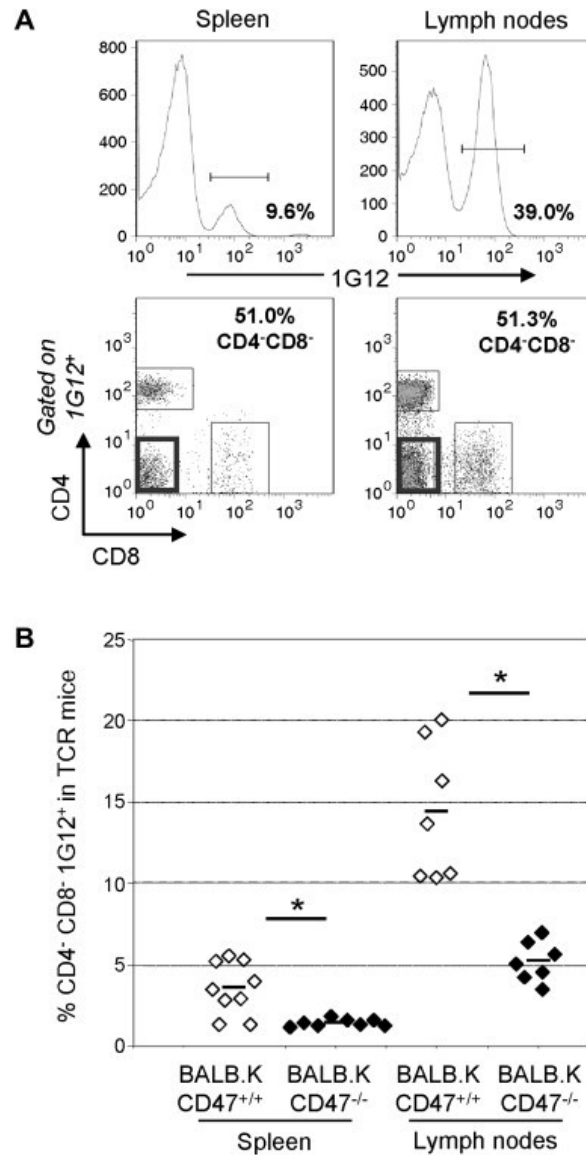


Figure 3: Decreased proportion of an unconventional cell-type in CD47-deficient mice.

Cells were prepared as in Figure 2. A) The gating strategy used to detect CD4-CD8-1G12⁺ T cells is shown for spleen (left) and lymph nodes (right). $n \geq 5$. B). The proportion of CD4-CD8-1G12⁺ is presented for the spleen and lymph nodes of each mouse from the indicated strains. DN T cell proportion is significantly decreased in CD47-deficient TCR transgenic BALB.K mice ($n \geq 5$). Student's T test * $p < 0.05$.

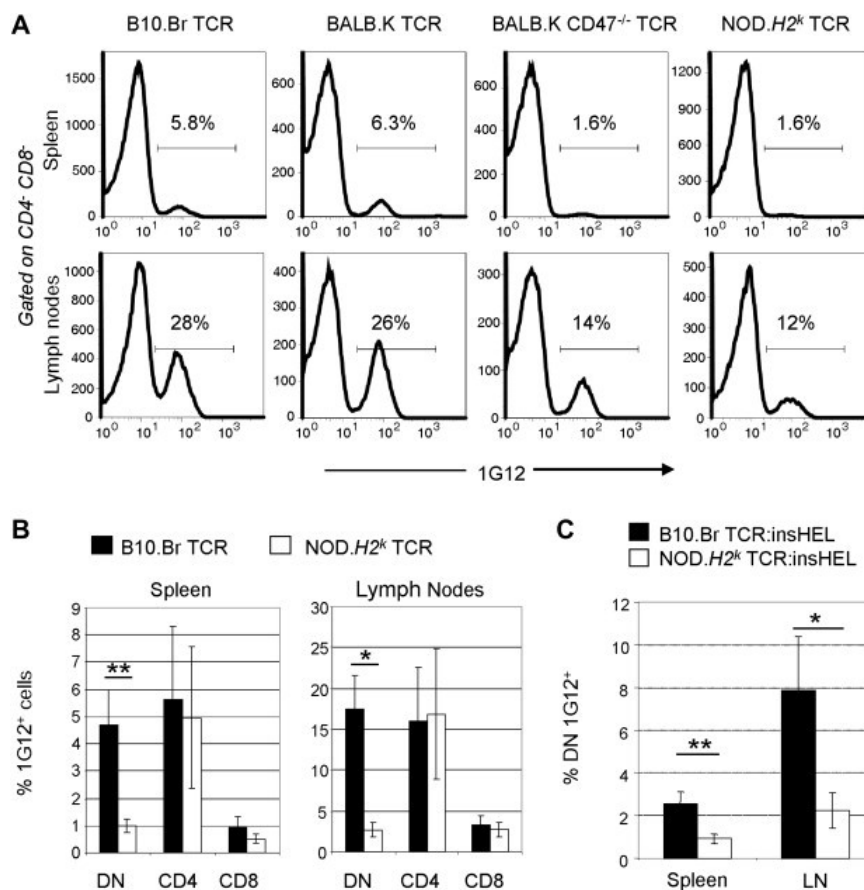


Figure 4: Elevated DN T cell numbers are associated with diabetes resistance. Cells from lymphoid organs of transgenic BALB.K, B10.Br and NOD.H2^k mice were harvested and stained for CD4, CD8 and 1G12 expression. A) DN T cell proportion in TCR transgenic CD47-deficient and -sufficient BALB.K compared to TCR transgenic diabetes-resistant B10.Br and -susceptible NOD.H2^k mice. The data is representative of at least three independent experiments. The bar charts demonstrate B) the proportion of CD4+1G12⁺, CD8+1G12⁺ and CD4-CD8-1G12⁺ (DN) T cells in the spleen and lymph nodes of TCR transgenic B10.Br and NOD.H2^k mice and C) the proportion of CD4-CD8-1G12⁺ (DN) T cells in the spleen and skin-draining lymph nodes (LN) of TCR:insHEL transgenic B10.Br and NOD.H2^k mice. The mean and SD of more than five mice per group is shown. * p < 0.01, ** p < 0.001

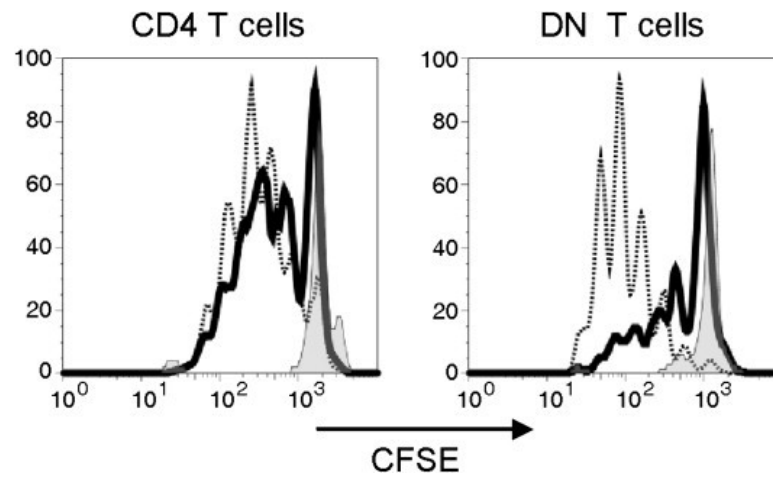


Figure 5: DN T cells are anergic. CFSE-labeled CD4 and DN T cells were cultured for 3 days with APCs (shaded); APCs and anti-CD3 (thick); or APCs, anti-CD3 and IL-2 (dotted). The histograms indicate the level of CFSE dilution corresponding to cellular proliferation. Representative of 3 independent experiments.

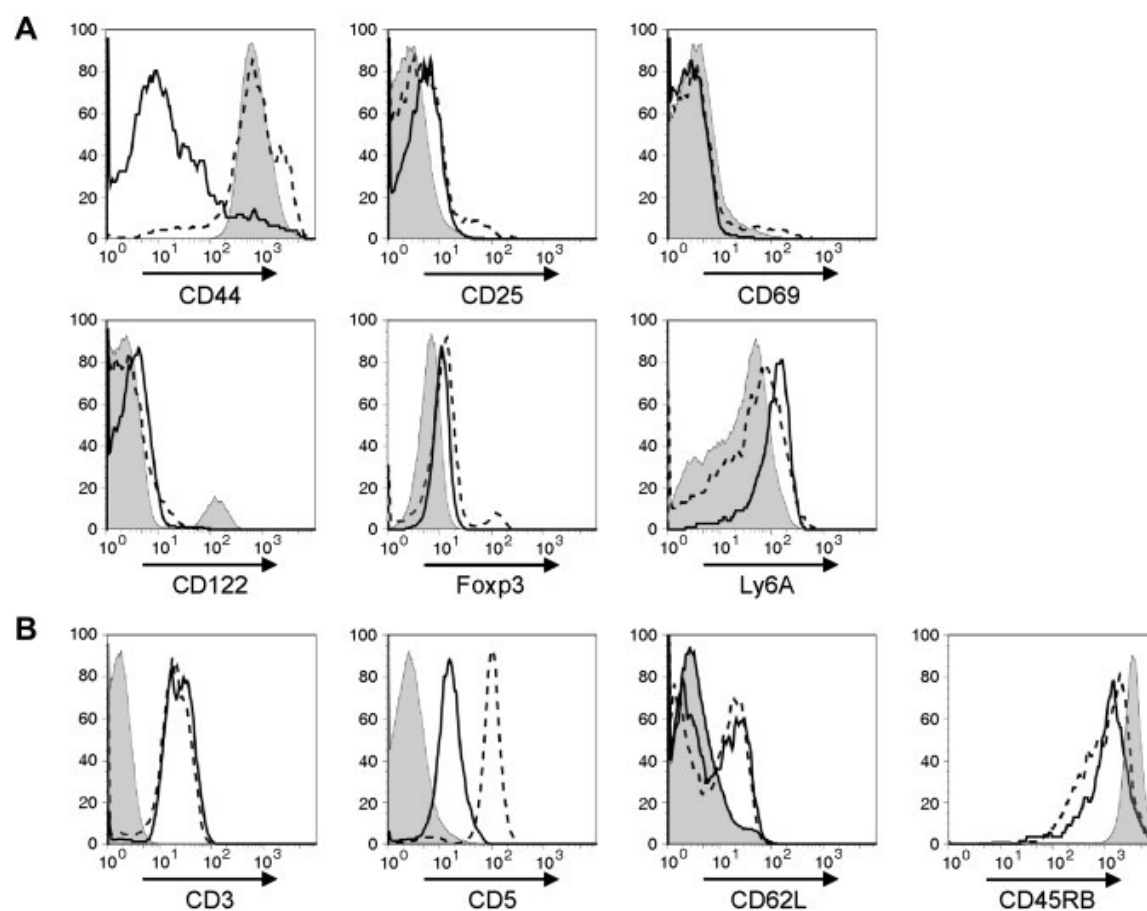


Figure 6: Phenotypic characterization of DN T cells. Spleen cells of TCR transgenic B10.Br mice were stained with CD4, CD8, 1G12 and various other phenotypic markers, as indicated. The expression of cell surface markers is indicated for DN T cells (CD4-CD8-1G12+, thick), CD4 T cells (CD4+CD8-, dashed) and non T cells (CD4-CD8-1G12-), comprising mostly B cells, shaded) were analysed for various cell surface markers. Histograms show expression level of A) surface markers characterizing immunoregulatory DN T cells and B) naïve T cell markers. Representative of at least three independent experiments.

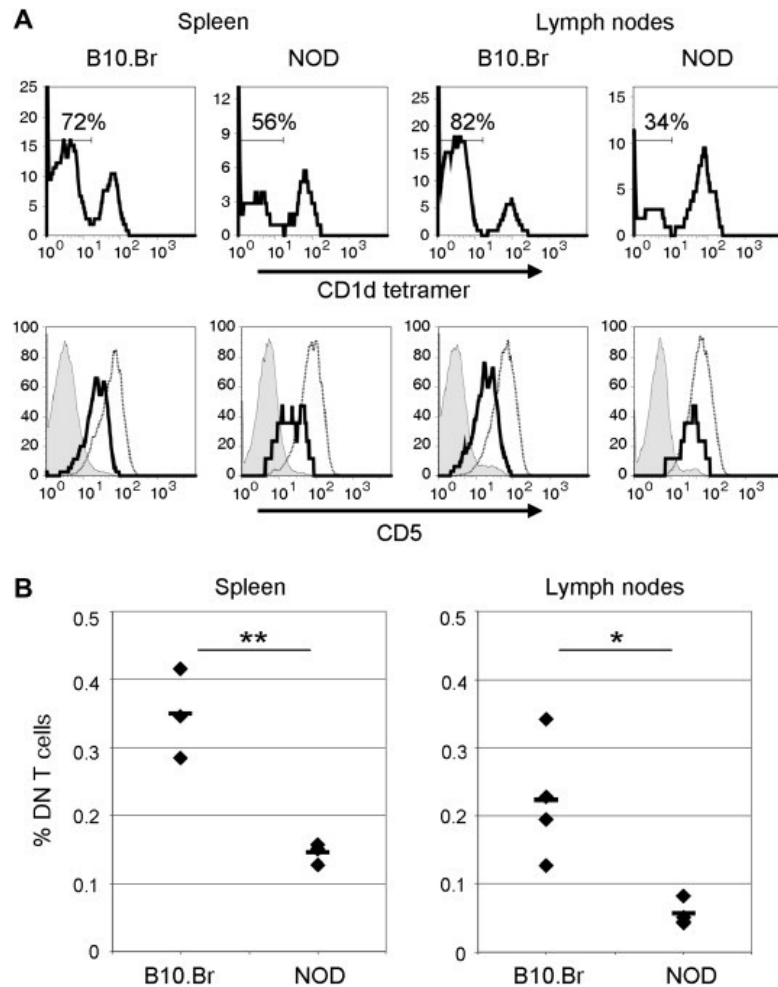


Figure 7: Non-transgenic autoimmune-prone NOD mice show a reduction in the number of DN T cells. A) Cells from spleen and lymph nodes of non-transgenic B10.Br and NOD (I-Ag7) mice were negatively selected for CD4, CD8, CD49b, B220 and TCR δ expression using magnetic separation. *Top panels:* Cells are gated for TCR β ⁺ expression. The percentage of CD1d tetramer negative cells is shown. *Bottom panels:* The histograms show the level of CD5 expression on B220⁺ (shaded), CD4⁺ (dotted) and DN (solid) T cells. Representative of at least three experiments. B) Proportion of DN T cells (B220⁻ CD4⁻ CD8⁻ CD1d-tetramer⁻ TCR β ⁺ CD5^{low}) in the spleen and lymph nodes of non-transgenic B10.Br and NOD mice. Student's T test. * p < 0.05, ** p < 0.01

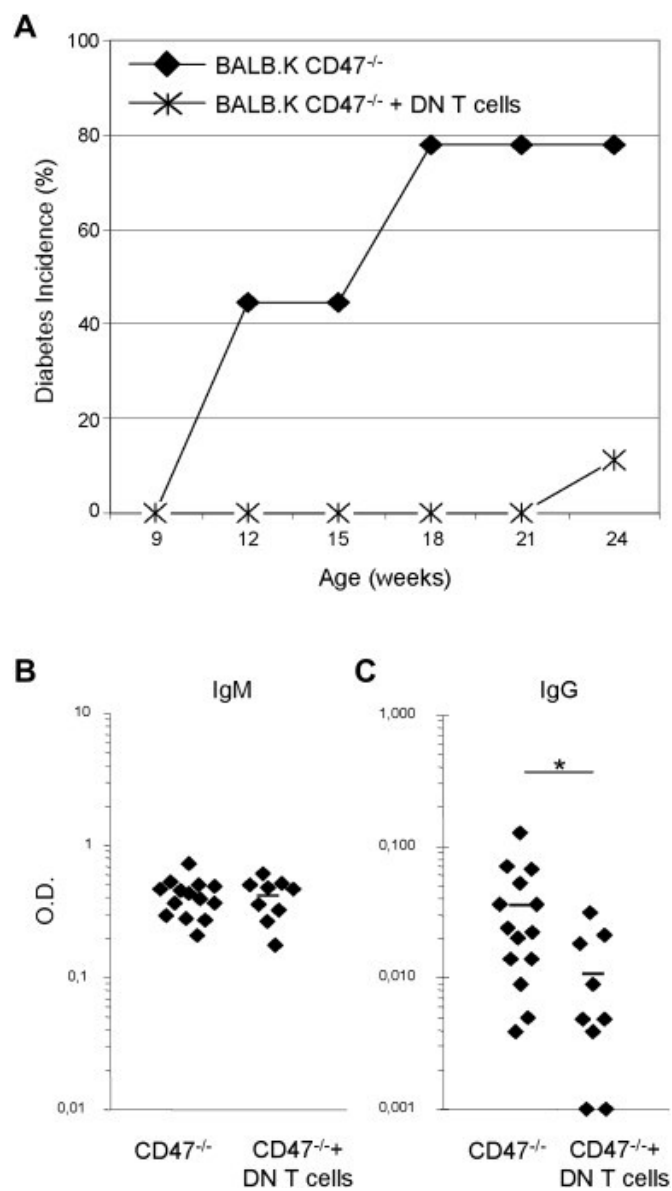


Figure 8: DN T cells are sufficient to restore diabetes resistance. A) Diabetes incidence and B) HEL-specific antibody serum levels of IgM and C) IgG are shown for TCR:insHEL BALB.K CD47^{-/-} mice injected (n = 9) or not (n = 14) with DN T cells. * p < 0.05.

Table 1: Absolute numbers of CD4 1G12⁺ and CD8 1G12⁺ cells found in TCR transgenic CD47-sufficient and -deficient BALB.K mice. Data represents mean \pm SD n \geq 5

T cell subset	Mice	Spleen ($\times 10^6$ cells)	Lymph nodes ($\times 10^6$ cells)
CD4 1G12 ⁺	BALB.K	9.15 \pm 4.46	3.46 \pm 2.05
	BALB.K CD47 ^{-/-}	7.30 \pm 4.76	3.52 \pm 1.52
CD8 1G12 ⁺	BALB.K	0.82 \pm 0.47	0.55 \pm 0.39
	BALB.K CD47 ^{-/-}	0.70 \pm 0.54	0.51 \pm 0.25

Table 2: Total cellularity and absolute numbers of DN T cells found in TCR transgenic B10.Br, NOD.*H2^k* and CD47-sufficient and -deficient BALB.K mice. Data represents mean \pm SD n \geq 4

Mice	Spleen		Skin-draining Lymph nodes [6]	
	Total cellularity ($\times 10^7$ cells)	Nb DN T cells ($\times 10^6$ cells)	Total cellularity ($\times 10^7$ cells)	Nb DN T cells ($\times 10^6$ cells)
B10.Br	7.52 \pm 3.12	3.73 \pm 1.57	1.30 \pm 0.56	2.17 \pm 1.18
BALB.K	9.72 \pm 2.89	3.71 \pm 1.99	1.56 \pm 0.48	2.37 \pm 0.38
BALB.K CD47 ^{-/-}	8.75 \pm 3.05	1.82 \pm 1.27	1.20 \pm 0.46	0.71 \pm 0.29
NOD. <i>H2^k</i>	7.48 \pm 0.40	0.78 \pm 0.19	1.10 \pm 0.33	0.21 \pm 0.11

Table 3: Description of diabetes incidence cohorts injected either with sorted DN T cells or with CD4 T cells.

Mouse Nb	Age at transfer (weeks)	Age at final assessment (weeks)	Type of cell transferred	Purification	Nb of cells (millions)	Blood glucose	Age diabetic (weeks)
1	5	17	1G12 ⁺ DN T cells	Sorted	2	10.9	—
2	5	17	1G12 ⁺ DN T cells	Sorted	2	11.7	—
3	6	15	1G12 ⁺ DN T cells	Sorted	2	8.6	—
4	5	9	1G12 ⁺ DN T cells	Sorted	2	8.9	—
5	9	24	CD4 ⁺ T cells	Enrichment (91%)	10	8.5	—
6	9	13	CD4 ⁺ T cells	Enrichment (91%)	10	30.1	11

CHAPITRE 3: ARTICLE 2

3.1 *Idd13* is involved in defining immunoregulatory DN T cell number.

Véronique Dugas, Adrian Liston, Claudine Beauchamp, Geneviève Chabot-Roy, Adam-Nicolas Pelletier, Sylvie Lesage.

Cet article est prêt pour soumission dans le journal *Genes and Immunity*.

Ma contribution à cet article est majeure. J'ai participé à l'élaboration du design expérimental avec S. Lesage. C. Beauchamp et S. Lesage ont évalué la proportion de cellules T DN retrouvées dans le thymus des animaux transgéniques. A. Liston a effectué l'analyse du phénotype des souris maintenues en Australie. J'ai effectué les analyses liées à la proportion périphérique de lymphocytes T DN chez toutes les lignées de souris transgéniques maintenues à l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. J'ai mis au point et participé au phénotypage des souris non-transgéniques à l'aide de G. Chabot-Roy. J'ai effectué les expérimentations nécessitant la création d'animaux chimériques. A.-N. Pelletier a participé au génotypage des souris et a effectué les analyses statistiques. J'ai participé à la préparation des figures à l'aide de S. Lesage. J'ai rédigé la première version du manuscrit et incorporé les suggestions suggérées par S. Lesage. J'évalue ma participation à 65%.

Cet article s'inscrit bien dans le contexte de mon projet de doctorat puisqu'il démontre la contribution du locus de prédisposition au diabète auto-immun *Idd13* dans la régulation des lymphocytes T DN. De plus, les résultats présentés permettent d'exclure un rôle majeur dans le contrôle de cette population de cellules pour 2 gènes candidats liés au développement de l'auto-immunité. Finalement, cet article propose la contribution de polymorphismes au niveau du gène *Sirp α* dans la régulation des lymphocytes T DN.

***Idd13* is involved in defining immunoregulatory DN T cell number.**

Véronique Dugas^{a,b}, Adrian Liston^{c,d}, Claudine Beauchamp^{a,b}, Geneviève Chabot-Roy^a, Adam-Nicolas Pelletier^{a,b}, Sylvie Lesage^{a,b}.

a Immunology-oncology Section, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada

b Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

c The Department of Experimental Medicine, University of Leuven, Leuven, 3000, Belgium

d Autoimmune Genetics Laboratory, The Flanders Institute of Biotechnology, Gent, 9052, Belgium

The authors declare no conflict of interest.

3.2 Abstract

Immunoregulatory T cells have been identified as key modulators of peripheral tolerance, playing a crucial role in autoimmune diabetes protection. In addition, genetic loci contributing towards defining the effectiveness and proportion of regulatory cells coincide with autoimmune disease predisposition factors. We have recently shown that a rare T cell subset, namely DN T cells, is able to confer protection from Type 1 Diabetes (T1D) progression. Moreover, we demonstrated that autoimmune-prone NOD mice exhibit a low proportion and absolute number of DN T cells. The objective of this study is to investigate the immunogenetic regulation of DN T cell proportion in relation with their association to T1D. We demonstrate that major *Idd* loci known to affect Treg function, including *Idd3*, *Idd5* and *Idd9*, do not regulate DN T cells. However, NOD mice congenic for the *Idd13* locus show a partial restoration of DN T cell proportion. Moreover, we provide evidence to suggest that two prime candidate genes encoded within the *Idd13* interval, *bim* and *$\beta 2m$* , are not involved in the control of DN T cell numbers. Together with our previous results demonstrating the contribution of the CD47-Sirp α pathway in DN T cell number regulation, our current findings suggest the contribution of *Sirp α* as a non-autonomous candidate gene within the *Idd13* predisposition locus that controls DN T cell number.

Keywords: *Idd13*, transgenic mice, Double Negative T cells

3.3 Introduction

Type 1 diabetes is an autoimmune disease underlying a complex genetic trait, both in humans and in mice. The NOD mouse has revealed itself a helpful model for the study of genetic factors underlying autoimmune diabetes predisposition [1]. To date, more than 20 *Idd* (Insulin dependent diabetes) loci have been identified in NOD mice (www.T1Dbase.org), and some of them have been confirmed to directly impact on human's diabetes susceptibility [2].

Specific *Idd* loci have been found to impact on regulatory T cells activity. Indeed, the *Idd3*-related IL-2 deficiency observed in NOD mice alters the recruitment and function of regulatory CD4⁺ Foxp3⁺ T cells [3]. Also, the diabetes-resistant NOD mice congenic for the protective allele of *Idd9.1* show an improved suppressive function of this immunoregulatory cell subset [4]. Moreover, the NOD *CTLA-4* variant situated within the *Idd5.1* susceptibility region has been associated to an altered ability to downregulate the T lymphocyte response, perhaps via inhibitory effects on regulatory T cell maintenance and activity [5-7]. Clearly, the genetic control of regulatory T cells is associated with autoimmune diabetes predisposition.

Recently, several different regulatory T cell subsets have been identified and associated with autoimmune diseases susceptibility, including NKT cells [8], IL-10 producing Tr1 and CD8⁺ suppressor T cells [9, 10]. We and others have demonstrated that a rare CD4-CD8⁻ (DN) T cell population was implicated in autoimmune diabetes resistance [11-13]. Indeed, L. Zhang's group has demonstrated that the transfer of an activated DN T cell clone is sufficient to delay diabetes incidence in a MHC-I restricted TCR transgenic model [11]. We have also recently shown that transgenic DN T cells can abrogate disease development in *CD47*^{-/-} BALB.K transgenic mice that are predisposed to diabetes [13]. Moreover, we demonstrated in different genetic strains that DN T cell proportion is inversely correlated with disease incidence. Finally, DN T cells from non-transgenic mice have also been

described for their ability to confer autoimmune diabetes resistance when transferred into a SCID recipient [12]. The regulatory activity of DN T cells has been proposed to occur through granzyme B/perforin degranulation [14-16], FAS-FAS ligand interactions [17] or trogocytosis [18], depending on the model system. Nevertheless, our previous results suggest that DN T cell function remains unaltered in diabetes-susceptible NOD mice when compared to diabetes resistant B10.Br animals, pinpointing a drastic biological relevance for the number of these DN T cells [13, 15].

NOD *Idd* congenic mice have allowed the validation of several defects in T cell processes [4, 19-21]. Since number of DN T cell is associated with autoimmune diabetes predisposition, analysis of mice congenic for *Idd* loci could help reveal genetic factors contributing to the control of this rare T cell population. To assess this possibility, we took advantage of a TCR transgenic model which amplifies strain-related differences in T cell number [13], and evaluated the proportion of this T cell subset in different transgenic NOD *Idd* congenic animals. These mice, which express the 3A9 TCR transgene and bear the non-predisposing MHC allele $H2^k$, also present insertion of B6 origin for loci known to regulate T cell selection and CD4⁺ Foxp3⁺ Tregs population. We demonstrate that NOD.NOR-*Idd13*, but not NOD-*Idd3*, -3/5, -5 and -9 transgenic mice, show a partially rescued DN T cell number. Moreover, we find that the proportion of this T regulatory cell subset is also increased in non-transgenic NOD.NOR-*Idd13* mice. Finally, we show that two of the *Idd13* candidate genes, $\beta2m$ and *bim*, are not associated with the control of this regulatory T cell population, arguing in favor of a role for *Sirp α* as an important mediator of DN T cell proportion in that interval.

3.4 Results

DN T cell proportion is not increased in various congenic mice resistant to diabetes.

We have previously demonstrated that genes outside the MHC locus are responsible for autoimmune diabetes susceptibility in the TCR:insHEL model since female transgenic B10.Br mice are highly resistant to the disease while the diabetes incidence reaches more than 80% in NOD.*H2^k* transgenic animals [22]. This antigen-specific mouse model has also allowed the study of a double negative (CD4-CD8-, DN) regulatory T cell population, for which we demonstrated that the proportion is associated with prevention of autoimmunity [13]. However, the immunogenetic regulation of this lymphocyte subset remains unclear.

Up to now, more than 20 insulin-dependent diabetes (*Idd*) loci have been shown to confer resistance to autoimmune diabetes in NOD mice [23]. More specifically, the preventive effect of the *Idd3*, *Idd5* and *Idd9* regions on insulinitis and/or diabetes has been associated with the control of regulatory T cell function or number [24, 25]. To examine the contribution of these loci on the proportion of DN T cells, NOD-*Idd3/5* and NOD-*Idd9* congenic mice were bred to 3A9 TCR NOD.*H2^k* mice. Our breeding approach allowed us to segregate the *Idd3* and *Idd5* congenic loci to create 4 congenic strains: TCR transgenic NOD.*H2^k*-*Idd3*, -*Idd5*, -*Idd3/5* and -*Idd9*. The spleens from these mice were analyzed for the proportion of DN T cells. Surprisingly, none of these *Idd*-resistance loci influenced the proportion of DN T cells (Figure 1a).

Yet another locus sufficient in itself to decrease the incidence of diabetes in NOD mice is the *Idd13* locus from C57BL/6 mice [20]. Interestingly, the NOD *Idd13* region provides diabetes-susceptibility through a T-cell mediated manner, by enhancing the severity of the beta cell destruction within the islets, thus making it a good candidate for the regulation of DN T cell numbers [26]. In order to evaluate the contribution of *Idd13* towards defining DN T cell number, we bred NOD.NOR-*Idd13* mice, wherein the *Idd13* interval is of B6 origin, to TCR transgenic NOD.*H2^k* animals [27]. TCR transgenic NOD.*H2^k*-*Idd13*

congenic mice showed a moderate increase in the proportion of DN T cells in the spleen (Figure 1b). In addition, the proportion and absolute number of DN T cells was also increased in NOD.NOR-*Idd13* non-transgenic animals in comparison to NOD mice (Figure 1c,d) [13]. Indeed, we found that TCR β ⁺ CD4⁻ CD8⁻ CD19⁻ cells, which do not stain for CD1d tetramer, can be distinguished from other T cell populations in non-transgenic animals (Supp. Figure 1). Taken together, these results demonstrate that genetic polymorphisms encoded within the *Idd13* interval impact on the proportion of DN T cells.

Thymic selection of DN T cells is unaltered in NOD mice

The *Idd13* region has been identified as a contributing locus in NOD susceptibility to autoimmune diabetes [27]. The locus is constituted with multiple potentially causative polymorphisms, clustered in at least two subloci, *Idd13.1* and *Idd13.2* [20]. Even though *Idd13* contains a cluster of multiple apoptosis-associated genes with differential gene regulation in NOD mice, two candidate genes located in this region have been strongly associated with pathogenic T cell selection, *bim* and $\beta 2m$ [28]. Indeed, previous work on thymic differentiation processes has highlighted *bim* as a potential candidate gene within this interval [29, 30]. This Bcl-2 family member has been identified as a key pro-apoptotic mediator of thymic deletion [31], and has been shown to be inefficiently up-regulated in NOD mice, when compared to diabetes-resistant B10.Br or B6 animals [29, 30]. Thus, we evaluated the possibility that the NOD defect in the regulation of apoptosis-related genes such as could alter the thymic selection of DN T cells. Although autoreactive transgenic CD4 T cells are differentially selected in NOD vs B10.Br TCR:insHEL animals [29], we found a similar proportion of mature DN T cells, which have downregulated the activation molecule CD24, in the thymus of both TCR transgenic strains suggesting that the proportion of DN T cells is under the control of peripheral elements (Figure 2a). In both genetic backgrounds, the proportion of thymic DN T cells is independent of ongoing negative selection processes as it was not influenced by the presence of HEL in TCR:insHEL double transgenic mice (Figure 2b). Moreover, since we evaluate DN T cell

proportion in TCR transgenic animals in absence of the agonistic peptide HEL, *bim* regulation should be similar for B10.Br and NOD.*H2^k* mice [29], and thus should not account for the difference observed between these strains.

Another candidate gene found within the *Idd13* locus is *$\beta 2m$* , with a suggested association to diabetes-resistance and control for the proportion of NKT cells [20, 32, 33]. *$\beta 2m$* is comprised within the *Idd13* locus and is the prized candidate gene [32]. We thus evaluated the impact of *$\beta 2m$* deletion on the proportion of DN T cells, by breeding TCR 3A9 transgenic NOD.*H2^k* with NOD *$\beta 2m^{-/-}$* mice. DN T cells are not reduced in TCR transgenic NOD.*H2^k* *$\beta 2m^{-/-}$* mice. Rather, we observe a slight increase in the proportion of DN T cells in the thymus, spleen, peripheral as well as pancreatic lymph nodes which is accounted for by the reduction in CD8 T cells (Figure 3a). Alternatively, we suspected that as the *$\beta 2m$* deficiency was generated in CBA x C57 mice, genes closely linked to *$\beta 2m$* remain of CBA x C57 origin even upon extensive backcrossing to the NOD background (N10). These genes of CBA x C57 origin may influence DN T cell number. To circumvent this issue, we evaluated DN T cell proportion in B10.Br TCR transgenic mice lacking *$\beta 2m$* expression. Similarly to the observations made in NOD.*H2^k* mice, the results depicted in Figure 3b demonstrate that the loss of function of *$\beta 2m$* does not impair DN T cell proportion in B10.Br TCR transgenic animals. Therefore, our results conclusively demonstrate that neither *bim* nor *$\beta 2m$* regulate the proportion of DN T cells.

DN T cell number is regulated by cell-extrinsic factors

As mentioned above, the reduction in DN T cell number on the NOD background is not associated with the defect in negative selection. Rather it appears to originate from peripheral regulation mechanisms. Bone marrow chimeras were generated to investigate whether the proportion of DN T cells was regulated by cell-intrinsic or cell-extrinsic factors. TCR transgenic B10.Br and NOD.*H2^k* bone marrow were mixed at a 1:1 ratio into

non-transgenic F1 hosts (Figure 4a). Eight weeks following reconstitution, the contribution of B10.Br or NOD.*H2^k* bone marrow to the TCR transgenic DN T cell proportion was evaluated in spleen and lymph nodes. Figure 4b demonstrates that both B10.Br and NOD.*H2^k* contribute equally to the DN T cell subset. Therefore, the lower proportion of DN T cells observed in NOD mice is not attributable to a cell-intrinsic defect. Similar results are obtained when insHEL transgenic F1 hosts were used as recipients showing that the presence of self-antigen does not influence the proportion of DN T cells from either genetic background.

Cell-extrinsic factors which influence the proportion of DN T cells may be of either hematopoietic or non-hematopoietic origin. Thus, we performed additional bone marrow chimeras to address which component modulates the proportion of DN T cells. Non-transgenic or insHEL transgenic F1 recipients were lethally irradiated and reconstituted with TCR transgenic bone marrow of either B10.Br or NOD.*H2^k* background. The proportion of DN T cells is highest in F1 recipients reconstituted with TCR transgenic B10.Br bone marrow irrespective of the presence of HEL antigen (Figure 4c). Thus, the origin or composition of the bone marrow influences the proportion of DN T cells such that the presence of B10.Br hematopoietic cells correlates with a higher proportion of DN T cells. Interestingly, the B10.Br to NOD.*H2^k* 1:1 bone marrow chimeras showed an intermediate level of DN T cell proportion, demonstrating that the extrinsic-factor is present in limited quantities. Together, these data suggest that DN T cell-extrinsic factors of hematopoietic origin contribute to the size of this regulatory T cell compartment.

CD47-Sirp α interactions control the proportion of DN T cells

We recently demonstrated the contribution of CD47 to the regulation of DN T cell proportion, using *CD47^{-/-}* BALB.K TCR transgenic mice [13]. Ligation of CD47 to Sirp α found at the cell surface of myeloid mononuclear phagocytes provides “don’t eat me” signals. Moreover, CD47 is involved in cell migration. Interestingly, *Sirp α* is located at 73.1 cM on chromosome 2, within the *Idd13* locus, and shows extensive polymorphisms

between strains [34]. More importantly, NOD *Sirpα* polymorphisms have been associated to defects in xenografts rejection [34]. Furthermore, *Sirpα* is an interesting cell-extrinsic candidate gene as it is expressed on hematopoietic cells of myeloid origin and not on T cells [35]. Figure 5a demonstrates the *Sirpα* is highly polymorphic between B6 (genetically related to B10) and NOD strains. To confirm the role of the CD47-Sirpα pathway on DN T cell regulation in B10.Br mice, we generated 3A9 TCR *CD47*-deficient mice on B10.Br background. Again, a markedly reduced proportion of DN T cells was observed in the spleen and lymph nodes of transgenic *CD47*-deficient B10.Br mice (Figure 5b). Moreover, the proportion of DN T cells was significantly reduced in non-transgenic *CD47*-deficient B10.Br mice when compared to *CD47* proficient controls (Figure 5c). Taken together, these results suggest *Sirpα* as a prime candidate within the *Idd13* that mediates differential regulation of DN T cell numbers between respectively diabetes-resistant and –prone strains B10.Br and NOD.*H2^k*.

3.5 Discussion

We demonstrate that the *Idd13* resistance allele partially restores the proportion of regulatory DN T cells in NOD TCR transgenic as well as non-transgenic congenic mice, thus providing a mechanism for the role of *Idd13* in diabetes susceptibility. We previously demonstrated a role for DN T cells towards preventing diabetes progression [13]. Our results now suggest that the protection conferred by DN T cells is regulated at least in part by the *Idd13* locus. The role of *Idd13* has been associated with the severity of the inflammation within the islets, as well as their infiltration and destruction by autoreactive T cells. Accordingly, we have previously demonstrated that TCR:insHEL NOD.*H2^k* infiltrated islets form large germinal centers, while no tertiary lymphoid organ structures formation were found in TCR:insHEL mice on the B10.Br genetic background [22]. Since we also demonstrated that DN T cells exert an antigen-specific cytotoxic activity towards activated B lymphocytes [13, 15], it is tempting to suggest that a role for the *Idd13* locus is to maintain a high number of regulatory DN T, which consequently eliminate activated B cells, limiting self-antigen presentation within the pancreatic islets.

The *Idd13* interval is constituted of at least two distinct regions, *Idd13.1* and *Idd13.2*, and encodes for several candidate genes implicated in the negative selection of autoreactive T cells. Pro-apoptotic mediators such as *bim* have been proven to represent key effectors in the deletion of potentially harmful T cells [29]. Moreover, the Mer tyrosine kinase (*MerTK*) encoding gene, also situated within the *Idd13* interval, has recently been proposed to participate in autoimmune pathogenesis through the negative regulation of antigen-presenting in the thymus [36]. However, the lower DN T cell number in NOD.*H2^k* relative to B10.Br is observed in single TCR transgenic mice, i.e. in absence of cognate antigen, where negative selection is unlikely to contribute to the difference in phenotype between the two strains. Moreover, our results show that thymic selection of DN T cells is not defective in the NOD TCR:insHEL mice when compared to B10.Br, since the proportion of

mature CD4-CD8- TCR+ DN T cells is similar in the presence or the absence of the antigen in both strains. These results suggest that peripheral factors are responsible for the reduced proportion of DN T cells in secondary lymphoid organs in the NOD background. Another prized candidate for diabetes susceptibility within the *Idd13* interval is $\beta 2m$ [32]. We thus evaluated the impact of $\beta 2m$ deletion on the proportion of DN T cells, expecting that $\beta 2m$ deletion would reduce the proportion of DN T cells. However, DN T cells are not reduced in TCR transgenic NOD.*H2^k* $\beta 2m^{-/-}$ mice. Rather, we observe a slight increase in the proportion of DN T cells (Figure 3a). Moreover, a similar augmentation in DN T cell proportion is observed in B10.Br mice deficient for $\beta 2m$ expression. This is most likely due to the disappearance of CD8+ T lymphocytes in absence of class I MHC molecules and rules out the possibility that DN T cells could be selected following TCR-MHC class I interactions.

As demonstrated in figure 4, bone marrow chimera experiments reveal that hematopoietic factors are responsible for defining the size of the DN T cell niche. To that effect *Sirp α* is an interesting candidate gene within the *Idd13* interval as it is not expressed on T cells. Indeed, the genetic cluster containing the human ortholog of *Sirp α* has recently been associated to autoimmune diabetes [37]. Moreover, in mice, *Sirp α* -CD47 interactions have been shown to participate to immune tolerance regulation. For instance, animals lacking the intracytoplasmic domain of *Sirp α* become resistant to EAE induction following injection with the MOG peptide. However, we and others have demonstrated a protective role for *Sirp α* -CD47 interactions, where NOD *CD47^{-/-}* mice develop fatal autoimmune hemolytic anemia with age [38], and BALB.K *CD47^{-/-}* as well as B10.Br *CD47^{-/-}* mice show a reduced regulatory DN T cell proportion [13]. *CD47^{-/-}* BALB.K TCR:insHEL transgenic mice present an increased susceptibility to autoimmune diabetes. It is important to mention that *CD47*, which is located on chromosome 16 in mice, is highly conserved between strains and species, and could thus not account for genetic variation impacting on the quality of its interaction with *Sirp α* .

Introduction of *Idd13* of B10 origin in TCR NOD.*H2^k* mice and non-transgenic NOD animals only partially restores DN T cell numbers relative to B10.Br TCR and non-transgenic, respectively. We recently demonstrated that DN T cells from TCR NOD.*H2^k* mice produce more IL-10 than their TCR B10.Br counterpart [15]. In *in vitro* culture, IL-10 secreted by DN T cells increased their apoptosis. It is possible that polymorphisms affecting the production of IL-10 or the expression of the IL-10R could affect the survival and maintenance of the DN T cell population, and such avenue are currently under investigation. Clearly, the regulation of regulatory DN T cells is most likely to be multigenic. The identification of other loci is under current investigation, however we demonstrated that *Idd3*, *Idd5* and *Idd9* diabetes susceptibility loci are not involved in DN T cell number regulation.

3.6 Material and methods

Mice

3A9 TCR and insHEL (ILK-3) transgenic mice on B10.Br and NOD. $H2^k$ background have been previously described. TCR NOD mice congenic for *Idd3/5*, *Idd9* (Taconic line 6109 and 905, gift from L.S. Wicker) and *Idd13* (gift from A. Baxter), were mated to TCR NOD. $H2^k$ mice. All *Idd* congenic mice were maintained at the Mouse Genome Center, Australia and genotyped for D3nds36 (*Idd3*), D1Mit74 and D1Mit132 (*Idd5*), D4Mit76 and D4Mit180 (*Idd9*) and D2Mit164 and D2Mit490 (*Idd13*). The genetic boundaries can be found on the Taconic website (<http://www.taconic.com/wmspage.cfm?parm1=1437>). Experiments involving TCR *Idd* congenic mice and their appropriate controls were performed at the Mouse Genome Center, Australia. B10.Br, NOD (purchased from Jackson Labs) and NOD.NOR.*Idd13* (gift from D.V. Serreze) non-transgenic mice were maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital. NOD $\beta2m^{-/-}$ (gift from D.C. Roy, originally from Jackson Labs) and B6 $\beta2m^{-/-}$ mice (purchased from Jackson Labs) were mated to TCR NOD. $H2^k$ and B10.Br animals, respectively. BALB/c $CD47^{-/-}$ (gift from P.A. Oldenborg) mice were backcrossed for 10 generations to B10.Br and intercrossed to TCR B10.Br mice to generate TCR B10.Br $CD47^{-/-}$ mice. For chimeras, recipient mice were irradiated with 11Gy and reconstituted with 2×10^6 bone marrow cells. Mice were analysed 8 weeks post-reconstitution. The HMR ethics committee overseen by the Canadian Council for Animal Protection approved all experimental procedures.

Flow cytometry

6–12-wk old nondiabetic mice (Diastix negative) were analyzed. All lymphoid organs were passed through a sterile cell strainer. Anti-clonotypic 1G12 antibody [39] was used as a culture supernatant and detected using APC-labelled X56 from BD. All other antibodies were purchased from Biolegend. CD1d-tetramer is a generous gift from Dr. David Serreze. Data was collected on a FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed with CellQuest Pro (BD) or FlowJo software (Treestar).

Statistics

P values are obtained by a Mann-Whitney U test.

3.7 Acknowledgements

We thank Dr C. C. Goodnow for generously providing the mice, Dr. D. Serreze for providing the CD1d-tetramer staining reagent, M. Asselin, N. Tessier, M.-J. Guyon and the staff of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center for curating the mouse colony. This work was supported by grants from the Juvenile Diabetes Research Foundation International, the Canadian Institutes of Health Research and La Fondation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. S.L., V.D., C.B and A.-N.P. hold a CIHR New Investigator scholarship, an FRSQ PhD scholarship, a Diabète Québec scholarship and a University of Montreal-Microbiology and Immunology departmental scholarship, respectively.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

3.8 References

1. Anderson, M.S. and J.A. Bluestone, *The NOD mouse: a model of immune dysregulation*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 447-85.
2. Wicker, L.S., et al., *Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice*. *J Autoimmun*, 2005. **25 Suppl**: p. 29-33.
3. Yamanouchi, J., et al., *Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity*. *Nat Genet*, 2007. **39**(3): p. 329-37.
4. Yamanouchi, J., et al., *Idd9.1 locus controls the suppressive activity of FoxP3+CD4+CD25+ regulatory T-cells*. *Diabetes*. **59**(1): p. 272-81.
5. Araki, M., et al., *Genetic evidence that the differential expression of the ligand-independent isoform of CTLA-4 is the molecular basis of the Idd5.1 type 1 diabetes region in nonobese diabetic mice*. *J Immunol*, 2009. **183**(8): p. 5146-57.
6. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. *J Exp Med*, 2000. **192**(2): p. 295-302.
7. Grohmann, U., et al., *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 1097-101.
8. Hammond, K.J., et al., *alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10*. *J Exp Med*, 1998. **187**(7): p. 1047-56.
9. Battaglia, M. and M.G. Roncarolo, *Induction of transplantation tolerance via regulatory T cells*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2006. **5**(3): p. 157-65.
10. Mikulkova, Z., et al., *Numerical defects in CD8(+)CD28(-) T-suppressor lymphocyte population in patients with type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis*. *Cell Immunol*.
11. Ford, M.S., et al., *Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development*. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(8): p. 2234-41.
12. Duncan, B., et al., *Double negative (CD3+ 4- 8-) TCR alphabeta splenic cells from young NOD mice provide long-lasting protection against type 1 diabetes*. *PLoS One*. **5**(7): p. e11427.
13. Dugas, V., et al., *Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes*. *J Autoimmun*, 2010. **35**(1): p. 23-32.
14. Zhang, Z.X., et al., *Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway*. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 6920-9.

15. Hillhouse, E.E., et al., *Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice*. Immunol Cell Biol. **88**(8): p. 771-80.
16. Ford McIntyre, M.S., et al., *Consequences of double negative regulatory T cell and antigen presenting cell interaction on immune response suppression*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(5): p. 597-603.
17. Zhang, Z.X., et al., *Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression*. Nat Med, 2000. **6**(7): p. 782-9.
18. Ford McIntyre, M.S., et al., *Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2271-5.
19. Serreze, D.V., et al., *Through regulation of TCR expression levels, an Idd7 region gene(s) interactively contributes to the impaired thymic deletion of autoreactive diabetogenic CD8+ T cells in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3250-9.
20. Serreze, D.V., et al., *Subcongenic analysis of the Idd13 locus in NOD/Lt mice: evidence for several susceptibility genes including a possible diabetogenic role for beta 2-microglobulin*. J Immunol, 1998. **160**(3): p. 1472-8.
21. Silveira, P.A., et al., *Genes within the Idd5 and Idd9/11 diabetes susceptibility loci affect the pathogenic activity of B cells in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7033-41.
22. Lesage, S., et al., *Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes*. J Exp Med, 2002. **196**(9): p. 1175-88.
23. Maier, L.M. and L.S. Wicker, *Genetic susceptibility to type 1 diabetes*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(6): p. 601-8.
24. Hill, N.J., et al., *NOD Idd5 locus controls insulinitis and diabetes and overlaps the orthologous CTLA4/IDDM12 and NRAMP1 loci in humans*. Diabetes, 2000. **49**(10): p. 1744-7.
25. Lyons, P.A., et al., *The NOD Idd9 genetic interval influences the pathogenicity of insulinitis and contains molecular variants of Cd30, Tnfr2, and Cd137*. Immunity, 2000. **13**(1): p. 107-15.
26. Fox, C.J., et al., *Two genetic loci regulate T cell-dependent islet inflammation and drive autoimmune diabetes pathogenesis*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(1): p. 67-81.
27. Serreze, D.V., et al., *Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1553-8.

28. Liston, A., et al., *Impairment of organ-specific T cell negative selection by diabetes susceptibility genes: genomic analysis by mRNA profiling*. *Genome Biol*, 2007. **8**(1): p. R12.
29. Liston, A., et al., *Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim*. *Immunity*, 2004. **21**(6): p. 817-30.
30. Zucchelli, S., et al., *Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics*. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 385-96.
31. Bouillet, P., et al., *BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes*. *Nature*, 2002. **415**(6874): p. 922-6.
32. Hamilton-Williams, E.E., et al., *Transgenic rescue implicates beta2-microglobulin as a diabetes susceptibility gene in nonobese diabetic (NOD) mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(20): p. 11533-8.
33. Esteban, L.M., et al., *Genetic control of NKT cell numbers maps to major diabetes and lupus loci*. *J Immunol*, 2003. **171**(6): p. 2873-8.
34. Takenaka, K., et al., *Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(12): p. 1313-23.
35. van Beek, E.M., et al., *Signal regulatory proteins in the immune system*. *J Immunol*, 2005. **175**(12): p. 7781-7.
36. Wallet, M.A., et al., *MerTK regulates thymic selection of autoreactive T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(12): p. 4810-5.
37. Barrett, J.C., et al., *Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes*. *Nat Genet*, 2009. **41**(6): p. 703-7.
38. Oldenborg, P.A., et al., *Lethal autoimmune hemolytic anemia in CD47-deficient nonobese diabetic (NOD) mice*. *Blood*, 2002. **99**(10): p. 3500-4.
39. Van Parijs, L., D.A. Peterson, and A.K. Abbas, *The Fas/Fas ligand pathway and Bcl-2 regulate T cell responses to model self and foreign antigens*. *Immunity*, 1998. **8**(2): p. 265-74.

3.9 Figures

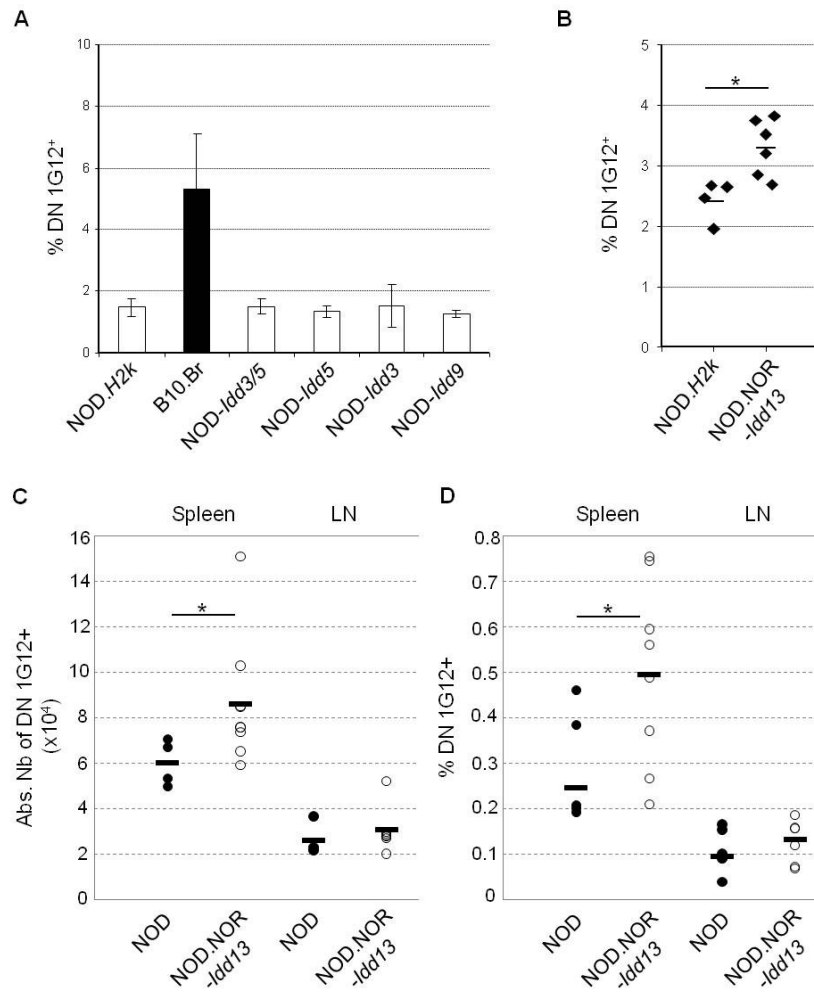


Figure 1: The *Idd13* locus influences DN T cell number. The proportion of splenic CD4-CD8- 1G12+ (TCR 3A9 clonotype) DN T cells from various strains of mice is compared to that of TCR B10.Br and TCR NOD.H2^k mice: A) TCR NOD.H2^k mice made congenic for various *Idd* loci (the mean and SD of at least four mice per group is shown), B) TCR NOD.H2^k mice congenic for the B10 *Idd13* locus (each dot represents one mouse). C) Absolute numbers and D) proportion of non-transgenic DN T cells in NOD and NOD.NOR-*Idd13* mice. $N \geq 4$ * $p < 0.05$

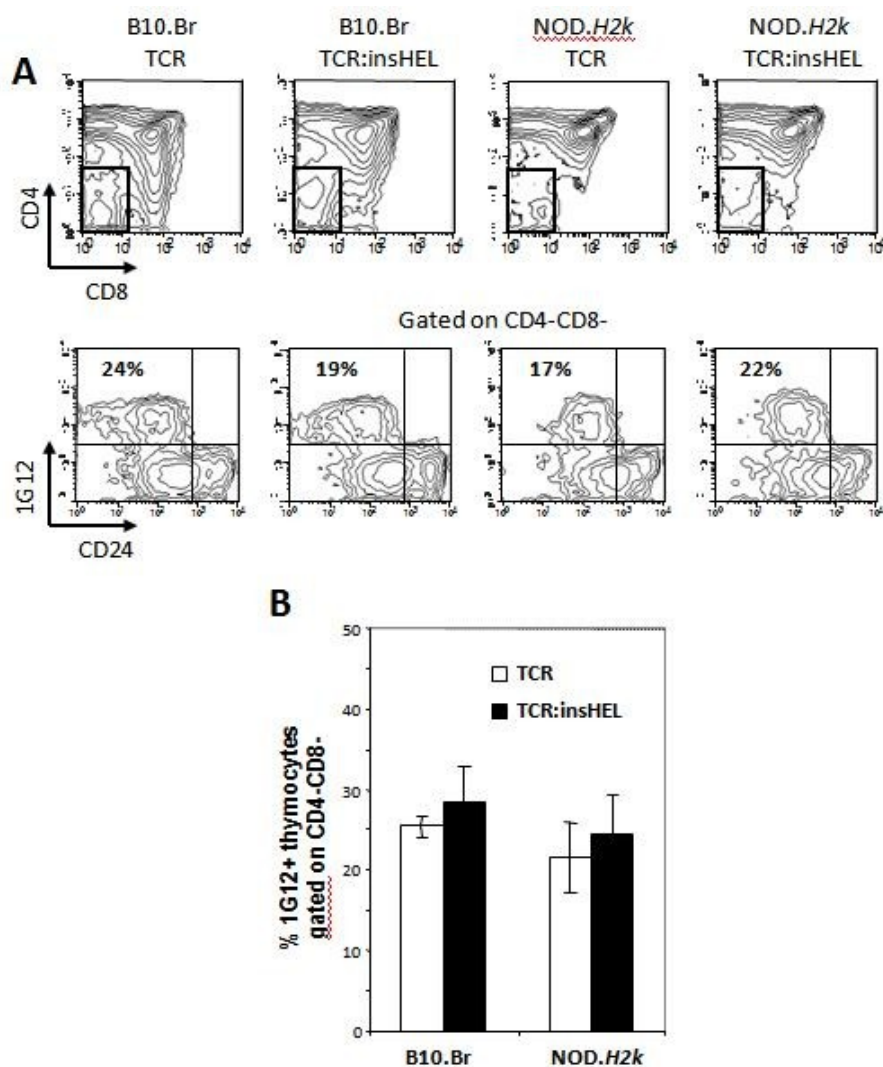


Figure 2: DN T cells are not subject to negative selection. Thymocytes were stained for CD4, CD8, CD24 and 1G12 expression. A) The top contour plots show CD4 and CD8 thymic profiles. The lower contour plots show the percentage of 1G12⁺ gated on CD4⁻CD8⁻ and demonstrate that all the 1G12⁺ cells express low levels of CD24 (mature phenotype). The data is representative of three independent experiments. B) Histogram shows mean \pm SD for the percentage of 1G12⁺ thymocytes gated on CD4⁻CD8⁻ subset. The mean and SD of at least three mice per group is shown.

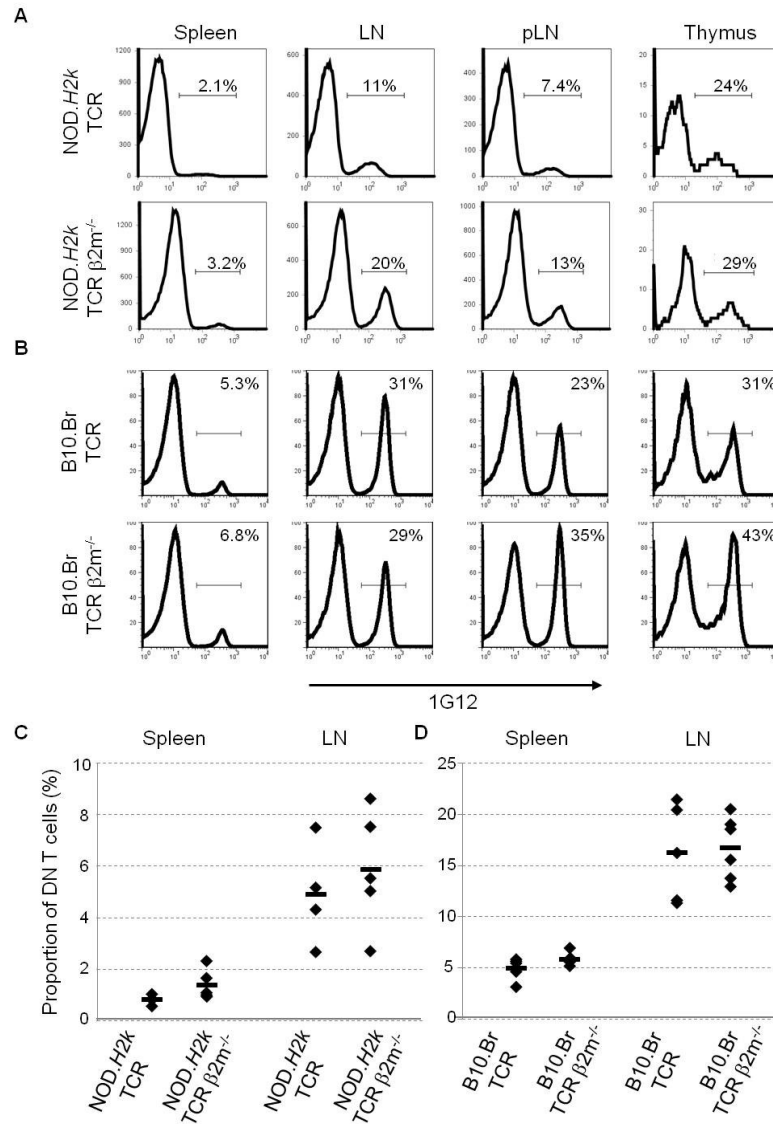


Figure 3: $\beta 2m$ is not involved in defining DN T cell number. The 1G12 histograms shown are gated on CD4- and CD8- cells. The total proportion of DN T cells is examined in all lymphoid organs of TCR $\beta 2m^{-/-}$ A) NOD.H2^k and B) B10.Br mice. The data is representative of three independent experiments. Proportion of DN T cells found in TCR C) NOD.H2^k and D) B10.Br mice deficient or not for $\beta 2m$ expression (each dot represents one mouse) $N \geq 4$.

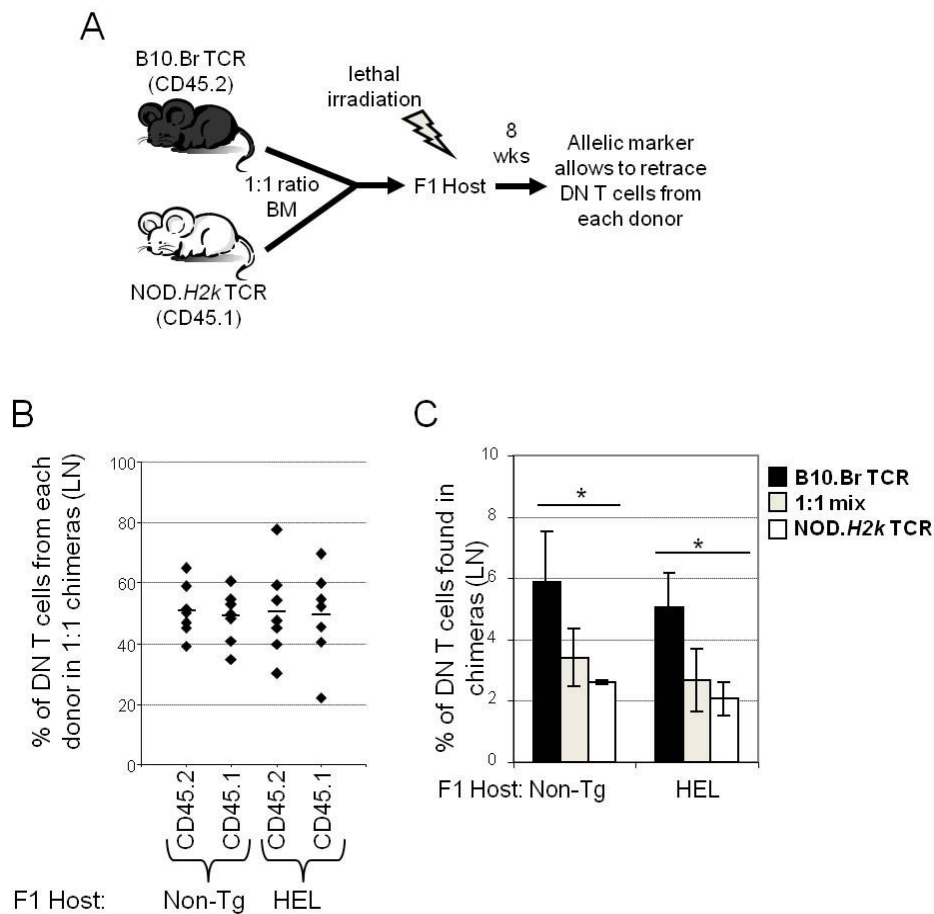


Figure 4: Hematopoietic but DN T cell-extrinsic regulation of DN T cell number. A) Bone marrow cells from B10.Br TCR (CD45.2) and NOD.H2^k TCR (CD45.1) mice were injected at 1:1 ratio into lethally irradiated non-transgenic or insHEL F1 recipients (CD45.1 and CD45.2). B) 8 weeks post reconstitution lymph nodes from the recipients were analyzed for the contribution of B10.Br and NOD.H2^k bone marrow to the DN T cell subset. Each dot represents data from one mouse. N ≥ 6. C) Bone marrow from TCR B10.Br, TCR NOD.H2^k or a 1:1 mixture of both was used to reconstitute non-transgenic or insHEL. The percentage of DN T cells was evaluated in the lymph nodes of recipient mice 8 weeks post-reconstitution. The mean and SD of at least three mice per group is shown.

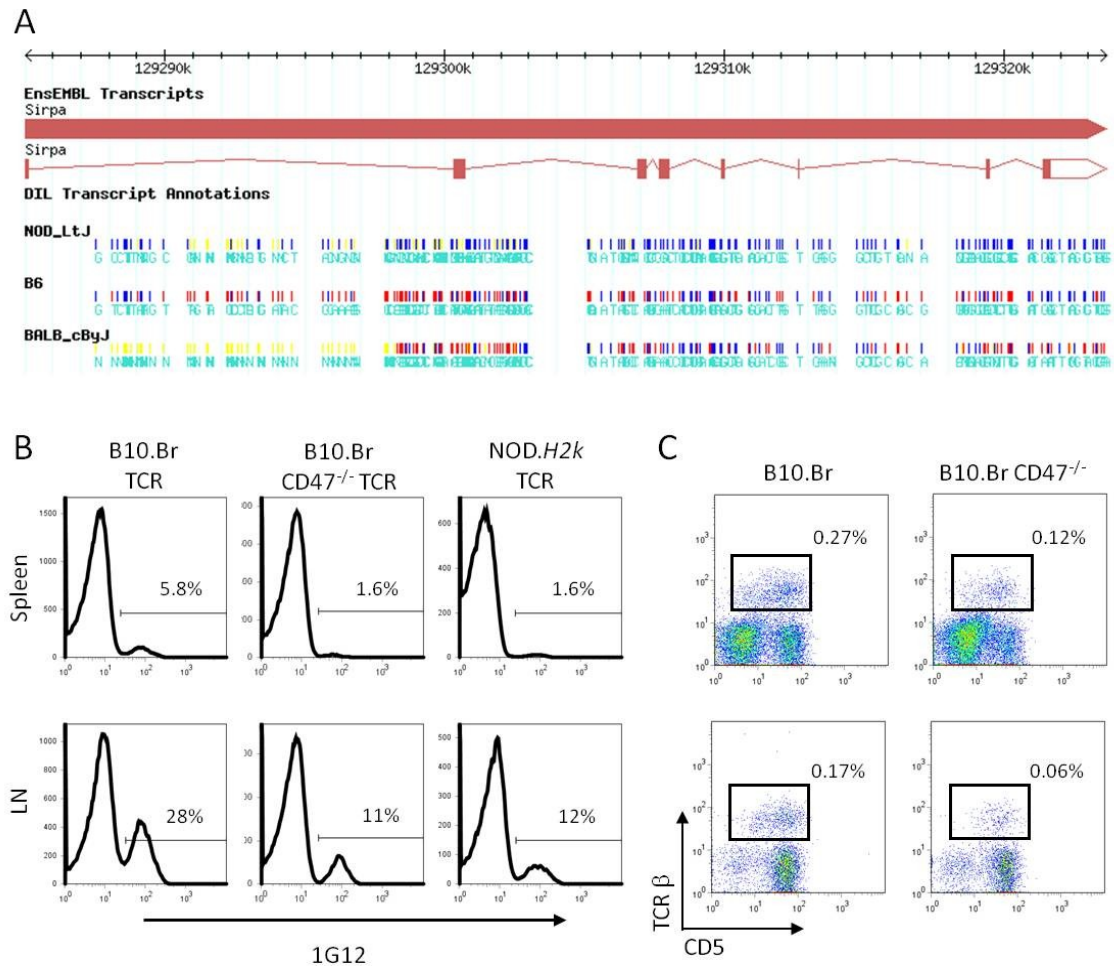
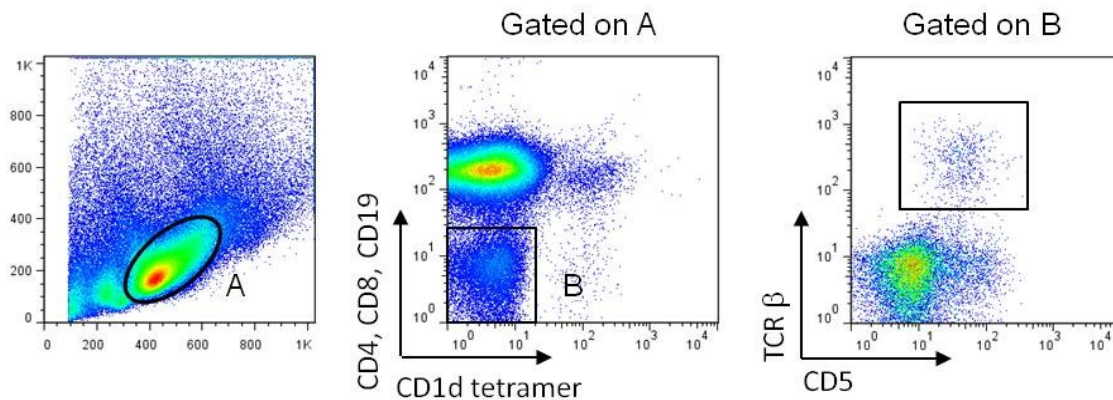


Figure 5: *Sirpα*-CD47 interactions influence DN T cell number. A) Representation of the polymorphisms in *Sirpα* for three different genetic strains of mice; NOD, B6 and BALB/c. B) The proportion of DN T cells from the spleen and lymph nodes of TCR B10.Br mice sufficient or deficient for *CD47* is compared to TCR NOD.*H2^k* animals. C) The proportion of DN T cells is determined by gating on CD4⁻ CD8⁻ B220⁻ CD1d tetramer⁻, followed by gating on TCRβ⁺ cells. Total proportion is represented in B10.Br *CD47*-deficient or sufficient non-transgenic mice. Representative of at least three mice.



Supplementary figure 1: Gating strategy for non-transgenic DN T cell identification. The identification of DN T cells in the spleen or lymph nodes is made possible by gating on the live population (A), then on cells that do not stain for CD1d-tetramer and that lack expression of CD4, CD8, and CD19 (B). Expression of TCR β on these non-B and non-conventional T lymphocytes allows for the discrimination of the peripheral DN T cell population.

CHAPITRE 4: ARTICLE 3

4.1 Genetic association of regulatory DN T cell niche.

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

Cet article est prêt pour soumission dans le *Journal of Autoimmunity*.

Ma contribution à cet article est majeure. J'ai participé au design des expérimentations avec S. Lesage. J'ai effectué l'analyse phénotypique des souris F2, puis j'ai généré et génotypé les différentes lignées de souris congéniques. J'ai participé à l'analyse du phénotype des souris congéniques, à l'aide de G. Chabot-Roy. A.-N. Pelletier a effectué les analyses statistiques. J'ai effectué la mise en forme des figures, rédigé la première version du manuscrit et incorporé les suggestions suggérées par S. Lesage. J'évalue ma participation à 90%.

Cet article est pertinent dans le contexte de ma thèse de doctorat puisqu'il met en évidence la contribution d'un locus génétique associé à la régulation de la proportion des lymphocytes T DN. Puisque la restauration du nombre de ces cellules constitue une avenue envisagée afin de prévenir l'auto-immunité, la découverte des facteurs génétiques associés au contrôle des lymphocytes T DN est primordiale.

Genetic association of regulatory DN T cell niche.

Véronique Dugas^{a,b}, Geneviève Chabot-Roy^a, Adam-Nicolas Pelletier^{a,b}, Sylvie Lesage^{a,b}.

a Immunology-oncology Section, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada

b Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

The authors declare no conflict of interest.

4.2 Abstract

Several regulatory T lymphocytes subsets limit auto-destructive immune responses. Among these populations, double negative (DN) T cells have been highlighted as crucial mediators implicated in the prevention of autoimmunity and allograft rejection. We have already identified the CD47-Sirp α pathway as an important actor implicated in the maintenance of the regulatory DN T lymphocytes, however other genetic factors involved in the control of this cell population remain to be defined. In this study, we perform a genome wide linkage analysis and determine that the regulation of DN T cell proportion is defined, at least in part, by a genetic locus on proximal chromosome 12. Moreover, we show that epistatic interactions between genes within the *Idd13* locus and the region on chromosome 12 greatly modulate DN T cell numbers. Taken together, these results identify genetic determinants implicated in the regulation of DN T cell proportion and we present a mechanism to explain how these loci may impact on autoimmune pathogenicity.

Keywords :

T cells, transgenic mice, *Idd13*, chromosome 12, autoimmunity

4.3 Introduction

Autoimmunity results from a break in immune tolerance that leads to the destruction of healthy organs, glands, joints or the central nervous system. The triggers that cause T or B lymphocytes to aberrantly recognize and mount an immune response against self-antigens remain to be fully elucidated. However, a prominent role in the prevention of autoimmunity has been attributed to the number and function of regulatory cell subsets. Indeed, several populations belonging to the T cell or B cell compartment carry the ability to inhibit inadequate immune response and promote peripheral tolerance, namely Tr1, CD8⁺ and Foxp3⁺ regulatory T cells [1-7], as well as B10 regulatory B cells [8-10]. The mechanisms through which these lymphocytes suppress the activation of the immune response generally rely on anti-inflammatory cytokine production, cell-contact interactions or stimulation factor deprivation [11-13], and can be mediated in an antigen-specific fashion and/or lead to bystander response suppression.

Recently, we and others have characterized a subset of regulatory T cells that lack the expression of CD4 and CD8 co-receptors (double negative, DN) [14-18]. This rare population comprises approximately 1% of total lymphocytes in humans and mice [16, 18]. However a more sizeable proportion of DN T cells is found in multiple TCR transgenic mouse models that promote the differentiation of DN T cells [14, 19-21]. These regulatory T cells have been shown to promote allo- and xeno-graft tolerance [16, 22], limit incidence of GVHD [23], exert cytotoxic activity towards tumor cells [24] as well as to provide resistance to autoimmune diabetes development in different animal models [14, 25, 26]. More specifically, we demonstrated that a single transfer of DN T cells is sufficient to lower the level of circulating autoreactive IgG antibody and to abrogate evolution towards diabetes in transgenic mice genetically susceptible to the disease. Furthermore, using *in vitro* experiments, we have shown that transgenic DN T cells can be expanded and efficiently eliminate activated B cells in an antigen-specific fashion [27]. Therefore, this

immunoregulatory T cell population that is also found in humans is of great and may yield the development of novel antigen-specific therapeutic approaches.

Taking advantage of BALB.K mice bearing the 3A9 TCR transgene that recognizes the 46-61 portion of HEL peptide [28], we demonstrated that the CD47 pathway contributed towards defining the size of the DN T cell niche. In addition, we have shown that autoimmune susceptible 3A9 TCR NOD.*H2^k* mice exhibit a low proportion of DN T cells relative to both 3A9 TCR B10.Br and 3A9 TCR BALB.K mice. More recently, we have shown that the proportion of DN T cells was only partially restored in 3A9 TCR NOD.*H2k-Idd13* congenic mice, as well as in non-transgenic NOD-*Idd13* mice. These findings prompted us to further investigate the genetic regulation of DN T cells.

As mentioned above, autoimmune-prone 3A9 TCR NOD.*H2^k* mice exhibit a low proportion of DN T cells relative to that of 3A9 TCR transgenic B10.Br mice [14]. We confirmed that this difference was not an artifact of TCR transgene insertion, as the difference in DN T cell proportion was also observed in non-transgenic NOD and B10.Br mice [14]. Here, we investigate the genetic determinants responsible for defining the DN T cell proportion. We performed a linkage analysis of the proportion of DN T cells in the F2 generation of the (B10.Br x NOD.*H2^k*) TCR transgenic cross. A significant LOD score was obtained on chromosome 12 (Ch12). Interestingly, this genetic interval coincides with a locus identified for its contribution to auto-antibody levels in lupus-prone animals [29]. Moreover, we generated NOD.*H2^k* mice congenic for the Ch12 interval. Using this congenic mouse, we validated the role of the Ch12 interval in the regulation of DN T cell number. Furthermore, we generated two congenic sublines which significantly reduce the list of potential candidate genes involved in defining the proportion of DN T cells. Finally, our data lends support to the hypothesis that both the *Idd13* and the Ch12 locus interact positively in defining the proportion of DN T cells. Taken together, these results demonstrate that at least two genetic factors are responsible for the proportion of regulatory DN T cells.

4.4 Material and methods

4.4.1 Mice

3A9 TCR transgenic mice on B10.Br and NOD.*H2^k* backgrounds have been previously described [30, 31]. TCR transgenic B10.Br, NOD.*H2^k*, F1 (B10.Br x NOD.*H2^k*), F2 (F1 X F1) and chromosome 12 NOD congenic mice were maintained at Maisonneuve-Rosemont Hospital housing facility. Congenic mice were genotyped for chromosome 12 alleles using the following MIT markers: D12Mit170 and D12Mit184, where Ch12L mice possess the B10.Br alleles for both markers, Ch12P mice possess the B10.Br allele only for D12Mit170 marker and Ch12D animals possess only the B10.Br allele for D12Mit184 marker. All congenic mice showed homozygosity for NOD parental allele at the distal marker D12Mit185. No marker proximal to D12Mit170 has been used to discriminate between both parental strains. 8 to 12 week-old mice were used for phenotypic analyses. The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee overseen by the Canadian Council for Animal Protection approved all experimental procedures.

4.4.2 Flow cytometry

Spleen and lymph nodes were passed through a cell strainer. Anti-clonotypic 1G12 antibody recognizing the expression of the 3A9 TCR [32] was used as a culture supernatant and detected using APC-labelled X56 from BD. All other antibodies were purchased from Biolegend. Data was collected on a FACSCalibur (BD Biosciences) and all data was analyzed with FlowJo software (Treestar).

4.4.3 Linkage analysis

Genomic DNA was isolated from the tails of F2 male and female mice by using the DNeasy Blood & Tissue Kit from Qiagen and single nucleotide polymorphisms were determined using the Illumina Mouse Low Density Linkage panel serviced through The Centre for Applied Genomics at The Hospital for Sick Children, Ontario, Canada. The

LOD score was obtained through a single QTL model using the library R/qtl of R software (ver 2.6.2). No impact of gender was observed.

4.4.4 Statistics

Mann-Whitney U test was performed where appropriate unless otherwise specified.

4.5 Results

4.5.1 Proportion of DN T cell is attributable to genetic background

We have demonstrated that the proportion and absolute number of CD4 and CD8 T cells is comparable in both 3A9 TCR B10.Br and 3A9 TCR NOD.*H2^k* transgenic mice, and thus are not influenced by the genetic background [14]. However, we noticed a sizeable proportion of regulatory 1G12+ (anti-TCR 3A9 clonotypic antibody) TCRb+ CD4- CD8- (Double Negative, DN) T cells in the secondary lymphoid organs of TCR B10.Br animals, which is significantly reduced in the NOD.*H2^k* strain (Figure 1A) [14]. Clearly, the regulation of this cell subset is due to genetic components that are different between these two strains of mice. Moreover, F1 progeny from a TCR (B10.Br x NOD.*H2^k*) cross present an intermediate proportion of DN T cells, arguing that the gene(s) responsible(s) for defining the size of the DN T cell niche exert a co-dominant effect overall (Figure 1A).

To examine the genetic regulation of DN T cell proportion, we generated a TCR (B10.Br x NOD.*H2^k*) F2 cohort. The analysis of the proportion of DN T cells (CD4-, CD8-, 1G12+) in the lymphoid organs of the 96 F2 mice revealed a normal distribution of the proportion, as tested by the Kolmogorov-Smirnov non-parametric hypothesis (Figure 1B). The broad distribution suggests that the trait is multigenic.

4.5.2 Regulation of DN T cell proportion by proximal region on chromosome 12

The results observed in the F2 cohort demonstrate that most mice present an intermediate proportion of DN T cells relative to the parental strains, and that several genetic regions are implicated in the regulation of this T cell population. In order to assess which loci are associated with the phenotype, we performed a genome wide scan on the DNA of the F2 mice. The Illumina low density platform presents 173 informative single nucleotide polymorphisms (SNPs) that differ between TCR B10.Br and NOD.*H2^k* mice, and therefore that could be used to characterize the genome of the F2 progeny. A linkage analysis of the DN T cell proportion in the spleen revealed a significant LOD score on Ch12 (Figure 2A).

In addition, analysis of the same genetic markers in the lymph nodes shows a suggestive linkage (Figure 2A). The genetic marker that shows the strongest association to the DN T cell phenotype is rs3718992, which is located at 12 Mbp on the proximal region of chromosome 12. We then segregated the F2 mice according to their genotype for the rs3718992 genetic marker. Mice that are heterozygous or homozygous NOD for the rs3718992 SNP show a similar proportion of DN T cells, suggesting that the NOD allele has a dominant effect on the phenotype (Figure 2B).

4.5.3 NOD congenic mice show a partially restored proportion of DN T cells

To confirm the impact of chromosome 12 on the proportion of DN T cells we generated TCR congenic mice carrying B10.Br derived interval for the region of interest on a NOD.*H2^k* background, using the following Mit markers to select the animals (referred to as Ch12L (long)): D12Mit170 and D12Mit184. Through extensive backcrossing, we generated two congenic sublines (Ch12P (proximal) and Ch12D (distal)). These three congenic strains were bred for at least 7 generations on the NOD.*H2^k* parental background (Figure 3). The purity of the genome was assessed after 6 generations using the Illumina medium density platform and we confirmed that more than 99% of the genome was of NOD.*H2^k* origin. To compensate for any residual genetic material from the B10.Br parental strain, the congenic mice were always compared to control littermates homozygous for NOD.*H2^k* allele in the chromosome 12 region.

We assessed the proportion of DN T cells in the spleen and lymph nodes of the congenic Ch12L, Ch12D and Ch12P NOD strains, as well as NOD.*H2^k* littermate controls. As depicted in figure 4, the proportion of DN T cells is significantly increased in the lymph nodes of Ch12L and Ch12D congenic strains when compared to NOD.*H2^k* mice. A similar tendency is also observed in the spleen of these animals. It should be noted that as the proportion of DN T cells is higher in the lymph node relative to the spleen, the sensitivity in detecting variations in proportions is highest in the former. Nevertheless, the proportion of DN T cells observed in TCR Ch12P animals was not increased when compared to

control NOD.*H2^k* littermates, in both the spleen and lymph nodes. Taken together, these results confirm that the Ch12 interval contributes towards increasing the DN T cell proportion. Moreover, as both Ch12L and Ch12D TCR NOD.*H2^k* congenic mice exhibit a higher proportion of DN T cells the genetic polymorphisms defining the size of the DN T cell niche are included between 15 and 31 Mbp.

4.5.4 Regions on chromosomes 2 and 12 interact to modulate DN T cell proportion

Our previous results have demonstrated that, on a BALB.K background, CD47-Sirp α interactions are essential to maintain a high proportion of DN T cells in TCR transgenic mice [14]. We propose Sirp α as a candidate for regulating DN T cells, as its expression has been associated to autoimmunity susceptibility [33-35], it is located within the *Idd13* locus, an autoimmune diabetes predisposition region [36]. Interestingly, a moderate hit on chromosome 2 within the *Idd13* locus stands for a possible association of this region with the proportion of DN T cells in the lymph nodes (Figure 2A). The proportion of DN T cells in F2 mice according to their genotype on chromosome 2 is depicted in Figure 5B. Even though a statistical difference between groups could not be achieved because of the results variability, a tendency for a high DN T cell proportion in mice harboring at least one B10.Br allele is clearly observed. Moreover, a two-dimension plot of the genome wide linkage suggest several epistatic interactions, including those between the regions found on distal chromosome 2 (*Idd13*) and proximal chromosome 12 (Figure 5A). We thus examined the relative contribution of both of these regions on DN T cell proportion in F2 mice (Figure 5C). Interestingly, mice that are homozygous for B10 alleles at both loci exhibit a proportion similar to what is found in TCR B10.Br animals. These results confirm that genetic elements included in both the Ch12 and the *Idd13* loci synergize to define the proportion of DN T cells.

4.6 Discussion

Regulatory DN T lymphocytes have been associated with the prevention of aberrant immune responses in several mouse models of allograft [16, 22], xenograft [37], graft versus host disease (GVHD) [23] and autoimmune diabetes [14, 25, 26]. Their presence in human has also been related to immune tolerance [38]. However, little is known about the genetic regulation of these lymphocytes. Using a transgenic gene-deficient model of autoimmunity, we previously demonstrated that CD47-Sirp α interactions are essential to maintain i) immune tolerance, and ii) the population of DN T cells [14]. However, the proportion of DN T cells was only partially restored in 3A9 TCR NOD.*H2^k-Idd13* congenic mice (to be submitted). suggesting that additional genetic loci contribute towards defining the size of the DN T cell niche. Indeed, the results of our linkage analysis highlight the contribution of a locus situated on proximal chromosome 12.

Interestingly, others have shown an impact of a proximal locus on chromosome 12 that controls autoimmunity. Indeed, this Ch12 locus has previously been associated with autoantibodies in a (NZB x BALB/c) F2 cohort created to identify lupus susceptibility determinants and was named *Nbwa1* [29, 39]. More specifically, the NZB alleles have been shown to impact the levels of anti-chromatin, anti-ssDNA, anti-dsDNA and anti-erythrocytes antibodies, as well as total serum IgG levels and glomerulonephritis intensity. In agreement with these findings, we have previously demonstrated that transgenic DN T cells specifically eliminate B cells that present the cognate antigen HEL, and that a single transfer of these regulatory T lymphocytes is sufficient to significantly reduced the level of serum anti-HEL IgG auto-antibodies [14, 15]. The mechanism through which auto-antibody levels are affected in the mouse model of lupus is yet unclear. However, it would be tempting to suggest that DN T cell proportion could be low in the mice that present a high level of anti-self antibodies along with clinical signs of autoimmunity.

TCR Ch12L and Ch12D congenic mice show partial restoration of DN T cell proportion. The Ch12D congenic subline is derived from a recombination which occurred during the backcross of Ch12L on a NOD.*H2^k* background. Therefore, the gene(s) involved in the regulation of DN T cells is/are encoded between 15 and 31 Mbp on proximal chromosome 12. Still, several genes are encoded within this genetic locus. Expression arrays may help reveal variations in gene expression which participate towards defining DN T cell numbers.

Although we had previously shown that the CD47 pathway contributed to the regulation of DN T cell number, the linkage analysis did not reveal a statistically significant linkage near CD172a. This may be attributable to the fact that only 96 mice were analyzed in the F2 cohort, thus providing a low statistical power. Notwithstanding the 2D representation of the epistatic interactions clearly highlights a role for the *Idd13* locus and the proximal region of chromosome 12. Importantly, mice harboring the B10.Br homozygous alleles for both of these loci present a complete restoration of DN T cell number. We are currently intercrossing NOD.NOR-*Idd13* and Ch12D congenic mice to confirm the interaction between these two genetic loci in defining DN T cell number.

4.7 Acknowledgements

We thank N. Tessier, M. J. Guyon and the staff of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center for curating the mouse colony. This work was supported by grants from the Juvenile Diabetes Research Foundation International, the Canadian Institutes of Health Research and La Fondation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. S.L., V.D. and A.N.P. hold a CIHR New Investigator, a FRSQ PhD Scholarship and a Département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal scholarship, respectively.

4.8 References

1. Astier, A.L. and D.A. Hafler, *Abnormal Tr1 differentiation in multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2007. **191**(1-2): p. 70-8.
2. Hall, A.M., et al., *Interleukin-10-mediated regulatory T-cell responses to epitopes on a human red blood cell autoantigen*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4529-36.
3. Battaglia, M., et al., *Induction of tolerance in type 1 diabetes via both CD4+CD25+ T regulatory cells and T regulatory type 1 cells*. Diabetes, 2006. **55**(6): p. 1571-80.
4. Singh, R.P., et al., *CD8+ T cell-mediated suppression of autoimmunity in a murine lupus model of peptide-induced immune tolerance depends on Foxp3 expression*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7649-57.
5. Filaci, G., et al., *Impairment of CD8+ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2001. **166**(10): p. 6452-7.
6. Zhang, B., et al., *Reduction of forkhead box P3 levels in CD4+CD25high T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus*. Clin Exp Immunol, 2008. **153**(2): p. 182-7.
7. Long, S.A., et al., *Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects*. Diabetes. **59**(2): p. 407-15.
8. Wolf, S.D., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice*. J Exp Med, 1996. **184**(6): p. 2271-8.
9. Mizoguchi, A. and A.K. Bhan, *A case for regulatory B cells*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 705-10.
10. Fillatreau, S., et al., *B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 944-50.
11. Piccirillo, C.A., *Regulatory T cells in health and disease*. Cytokine, 2008. **43**(3): p. 395-401.
12. Sakaguchi, S., *Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 531-62.
13. Scheffold, A., J. Huhn, and T. Hofer, *Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango*. Eur J Immunol, 2005. **35**(5): p. 1336-41.
14. Dugas, V., et al., *Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes*. J Autoimmun. **35**(1): p. 23-32.

15. Hillhouse, E.E., et al., *Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice*. Immunol Cell Biol. **88**(8): p. 771-80.
16. Zhang, Z.X., et al., *Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression*. Nat Med, 2000. **6**(7): p. 782-9.
17. Priatel, J.J., O. Utting, and H.S. Teh, *TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells*. J Immunol, 2001. **167**(11): p. 6188-94.
18. Fischer, K., et al., *Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2828-35.
19. von Boehmer, H., J. Kirberg, and B. Rocha, *An unusual lineage of alpha/beta T cells that contains autoreactive cells*. J Exp Med, 1991. **174**(5): p. 1001-8.
20. Viret, C. and C.A. Janeway, Jr., *Self-specific MHC class II-restricted CD4-CD8- T cells that escape deletion and lack regulatory activity*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 201-9.
21. Khan, Q., et al., *Regulation of apoptosis in mature alphabeta+CD4-CD8- antigen-specific suppressor T cell clones*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5860-7.
22. Chen, W., et al., *Infusion of in vitro-generated DN T regulatory cells induces permanent cardiac allograft survival in mice*. Transplant Proc, 2003. **35**(7): p. 2479-80.
23. Young, K.J., et al., *Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 134-41.
24. Young, K.J., et al., *Antitumor activity mediated by double-negative T cells*. Cancer Res, 2003. **63**(22): p. 8014-21.
25. Ford, M.S., et al., *Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development*. Eur J Immunol, 2007. **37**(8): p. 2234-41.
26. Duncan, B., et al., *Double negative (CD3+ 4- 8-) TCR alphabeta splenic cells from young NOD mice provide long-lasting protection against type 1 diabetes*. PLoS One. **5**(7): p. e11427.
27. Hillhouse, E.E., et al., *Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice*. Immunol Cell Biol, 2010. **88**(8): p. 771-80.

28. Nelson, C.A., et al., *Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-Ak*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7380-3.
29. Rigby, R.J., et al., *New loci from New Zealand Black and New Zealand White mice on chromosomes 4 and 12 contribute to lupus-like disease in the context of BALB/c*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4609-17.
30. Ho, W.Y., et al., *Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells*. J Exp Med, 1994. **179**(5): p. 1539-49.
31. Lesage, S., et al., *Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes*. J Exp Med, 2002. **196**(9): p. 1175-88.
32. Van Parijs, L., D.A. Peterson, and A.K. Abbas, *The Fas/Fas ligand pathway and Bcl-2 regulate T cell responses to model self and foreign antigens*. Immunity, 1998. **8**(2): p. 265-74.
33. Barclay, A.N. and M.H. Brown, *The SIRP family of receptors and immune regulation*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 457-64.
34. Tomizawa, T., et al., *Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis and impaired T cell priming by dendritic cells in Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 mutant mice*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 869-77.
35. Okuzawa, C., et al., *Resistance to collagen-induced arthritis in SHPS-1 mutant mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **371**(3): p. 561-6.
36. Takenaka, K., et al., *Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1313-23.
37. Chen, W., et al., *Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 1846-53.
38. Voelkl, S., R. Gary, and A. Mackensen, *Characterization of the immunoregulatory function of human TCR-alpha-beta+ CD4- CD8- double-negative T cells*. Eur J Immunol. **41**(3): p. 739-48.
39. Rigby, R.J., et al., *A novel locus regulates both retroviral glycoprotein 70 and anti-glycoprotein 70 antibody production in New Zealand mice when crossed with BALB/c*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 5078-85.

4.9 Figures

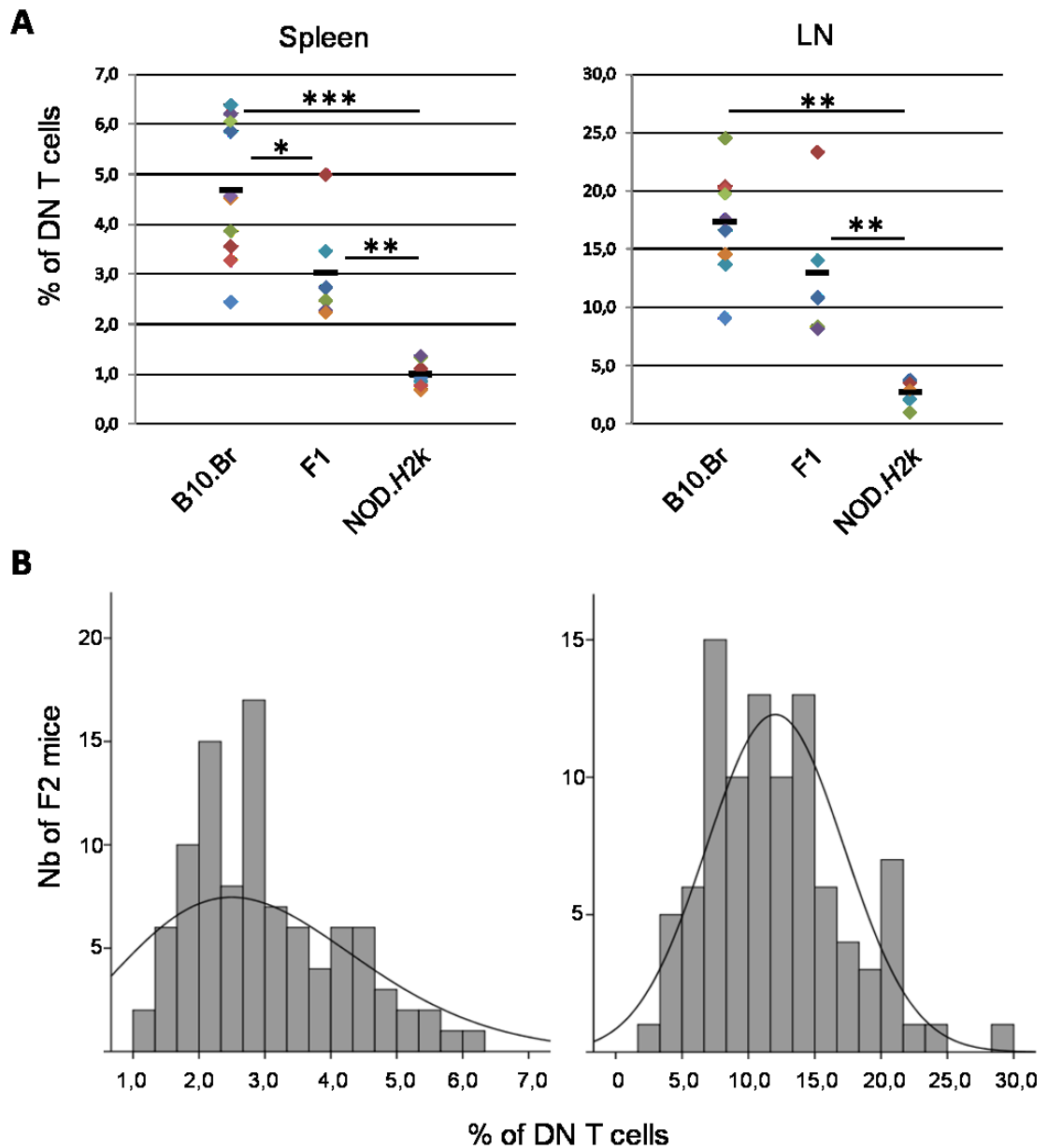


Figure 1: Proportion of DN T cell is attributable to genetic background. Cells from spleen and lymph nodes of TCR transgenic A) B10.Br, NOD.H2^k, F1 and B) F2 mice were harvested and stained for CD4, CD8 and 1G12 expression. The proportion of DN T cells is represented. N ≥ 4. * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001

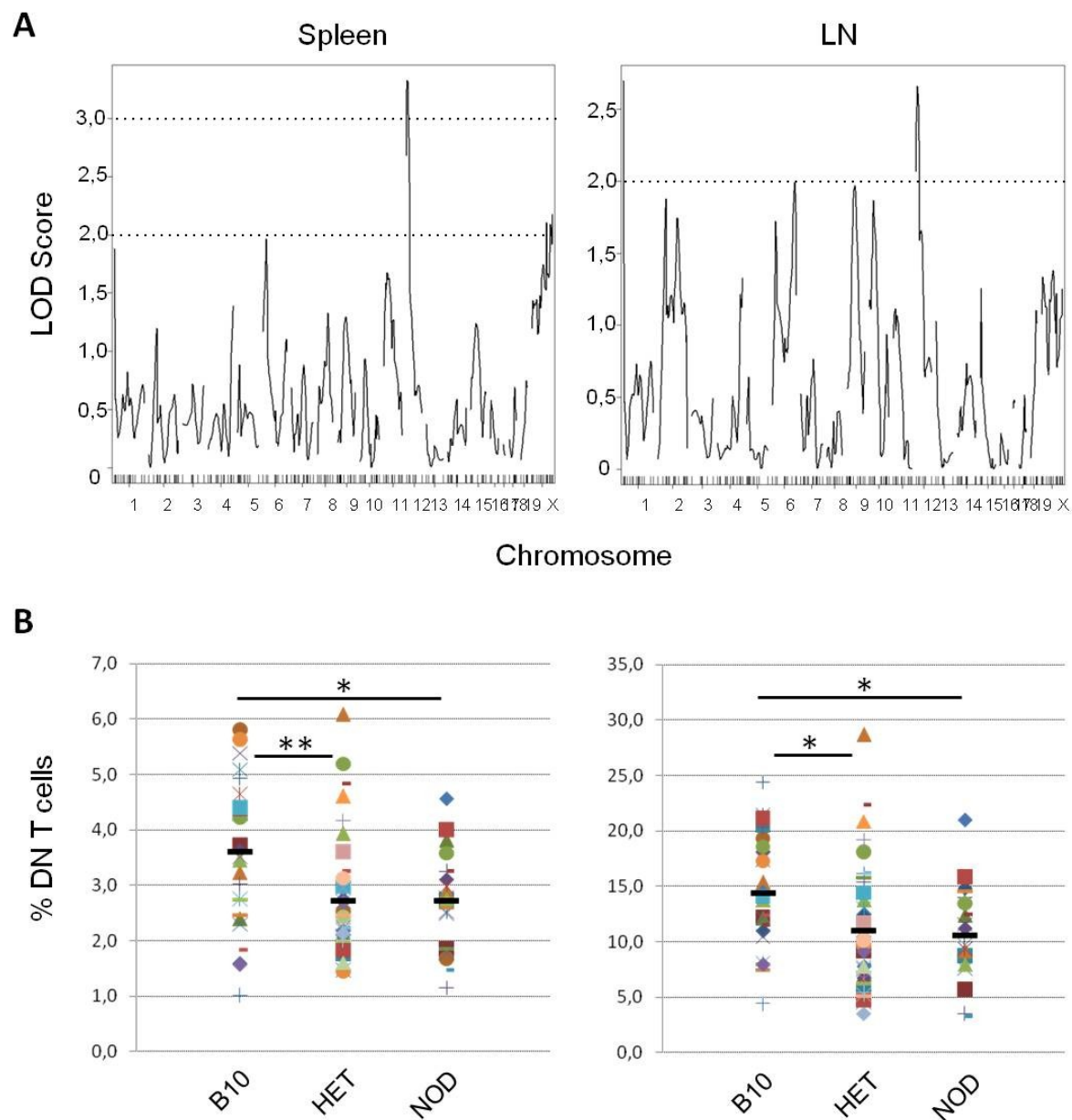


Figure 2: Regulation of DN T cell proportion by proximal region on chromosome 12.

A) Logarithm of odds plot for the % of DN T cells in F2 cohorts is shown for the spleen and lymph nodes. B) Proportion of DN T cells in the spleen and lymph nodes of F2 mice according for their genotype on chromosome 12. N = 96. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

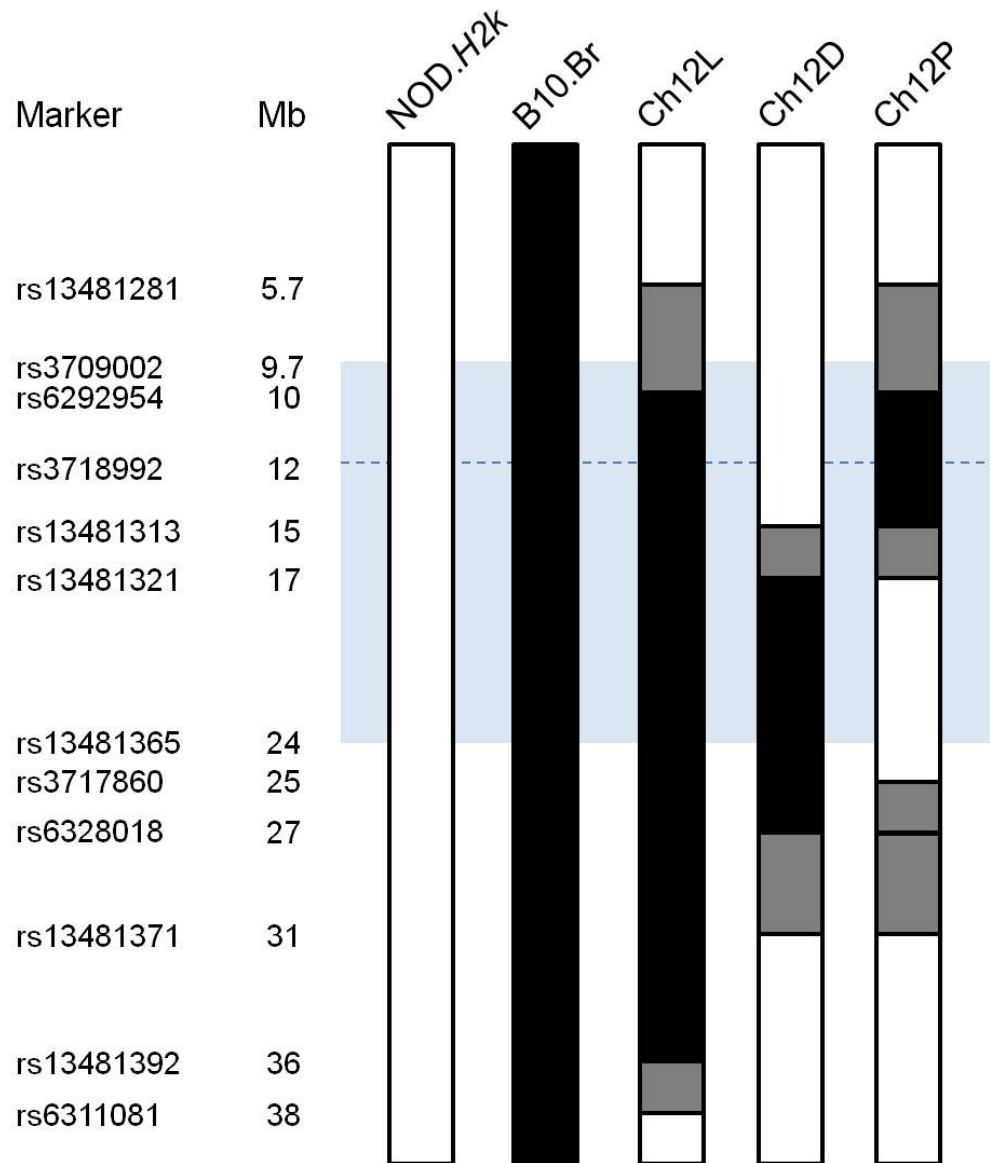


Figure 3: Mapping of the different chromosome 12 NOD congenic constructions.

Schematic representation of the shared intervals between B10.Br, NOD.H2^k, Ch12L, Ch12D and Ch12P mice. The genetic region is delimited by D12Mit172 and D12Mit184. Marker placement is determined according to the Mouse Genome Informatics database.

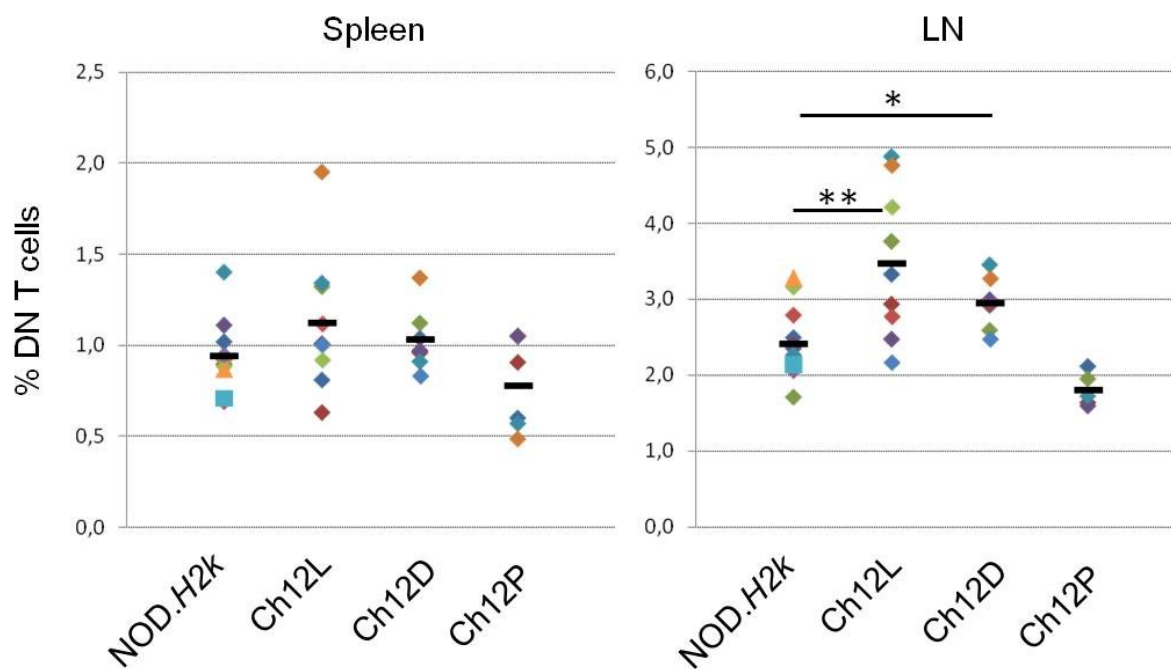


Figure 4: NOD congenic mice show a partially restored proportion of DN T cells. Cells from spleen and lymph nodes of TCR transgenic NOD.H2^k, Ch12L, Ch12D and Ch12P mice were harvested and stained for CD4, CD8 and 1G12 expression. The proportion of DN T cells is represented. N ≥ 5. * p<0.05, ** p<0.01

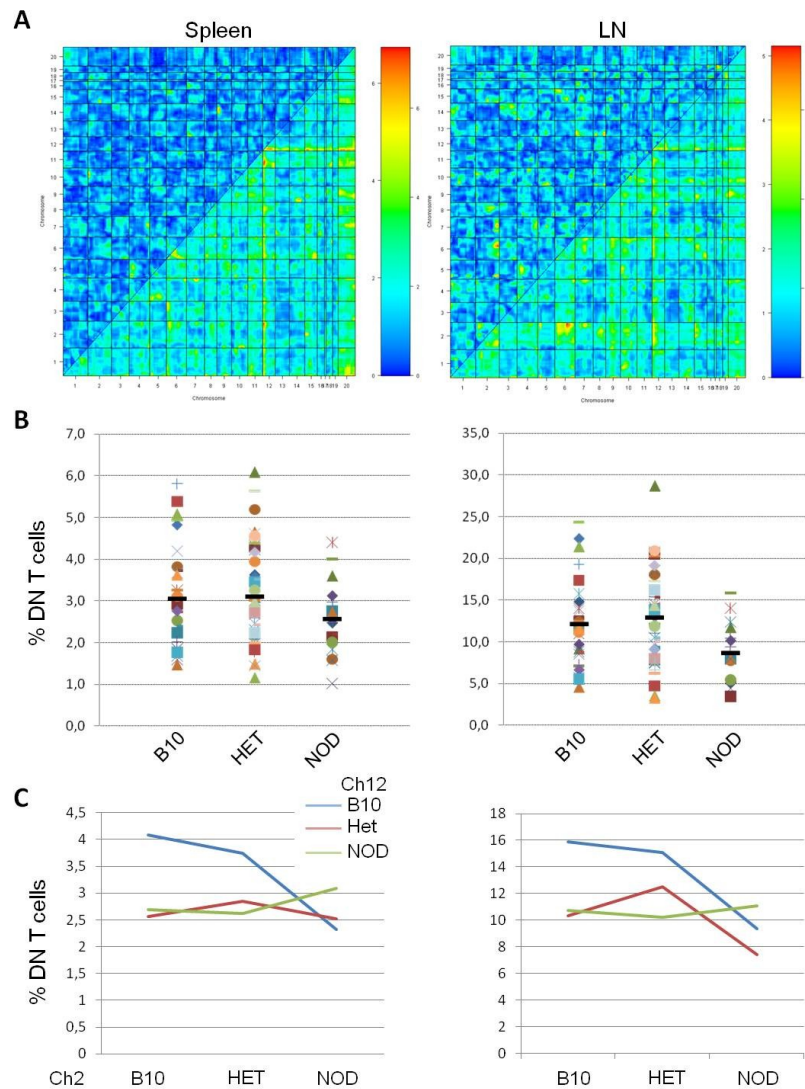


Figure 5: Regions on chromosomes 2 and 12 interact to modulate DN T cell proportion. Epistatic interactions influencing DN T cell number A) 2D genome wide linkage in F₂ genotypes. Joint LOD scores were plotted as a heat map. B) Proportion of DN T cells in F₂ mice according to their genotypes for chromosome 2. N = 96. C) Representation of the average DN T cell proportion in 96 F₂ mice segregated according to the combined chromosome 2 and 12 genotypes.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

5.1 Lymphocytes T DN : Que sont-ils?

Par analogie, un système immunitaire adaptatif sain peut être comparé à une balance qui risque de basculer à tout moment. D'un côté, une déficience au niveau de la reconnaissance antigénique par les lymphocytes T et B peut favoriser l'évolution d'infections et de tumeurs potentiellement fatales. De l'autre, l'hyperactivité de ces cellules ainsi que la reconnaissance aberrante d'antigènes du soi peut mener au développement de pathologies auto-immunes tout aussi destructrices (Figure 12). Il est ainsi nécessaire d'établir des mécanismes rigoureux permettant le maintien de ce fragile équilibre que représente la tolérance immunitaire. C'est sur l'étude de ces mécanismes qu'a porté mon projet de recherche au doctorat, dans le contexte d'un modèle murin prédisposé au diabète auto-immun. Plus précisément, les résultats présentés dans cette thèse visent à décrire le phénotype, la fonction ainsi que la régulation d'une population peu connue de lymphocytes T régulateurs n'exprimant aucun des corécepteurs CD4 et CD8 (lymphocytes T DN).

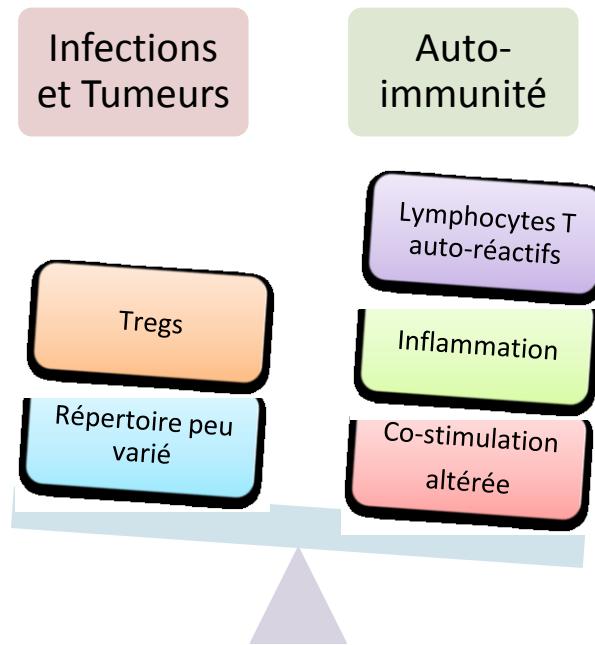


Figure 12 : Schéma représentant comment l'accumulation de facteurs peut mener au développement de pathologies immunitaires.

Plusieurs populations de lymphocytes T sont caractérisées par l'absence des corécepteurs CD4 et CD8 à la surface membranaire. Tout d'abord, les lymphocytes NKT (*Natural Killer T cells*) portent à la fois un TCR ainsi que des marqueurs spécifiques des cellules NK. De plus, les lymphocytes NKT peuvent exprimer ou non le corécepteur CD4, alors que la molécule CD8 n'est pas retrouvée à la surface de ces cellules. Ces cellules se divisent en deux grandes catégories, soit les NKT invariants (type 1) et non-classiques (type II) [334]. Les cellules NKT invariante se distinguent chez la souris par un répertoire biaisé envers les chaînes du TCR $V\beta 8$, $V\beta 7$, $V\beta 2$ et $V\alpha 14$, par l'expression de molécules telles que CD49b et NK1.1 et par la restriction à la molécule de CMH de classe I non-classique CD1d [335]. Par opposition, nous avons montré que les lymphocytes T DN retrouvés chez la souris TCR3A9 B10.Br n'expriment pas les marqueurs de cellules NK CD49b et NK1.1, et ne lient pas les molécules CD1d apprêtées avec le glycolipide α GalCer. De plus, tous les lymphocytes T DN sont reconnus par l'anticorps clonotypique 1G12 et possèdent donc un

TCR V β 8.2/V α 3 [227]. De façon similaire, nous avons démontré que les lymphocytes T DN retrouvés chez la souris B10.Br non-transgénique ne portent pas les marqueurs de surface spécifiques des cellules NK, ne lient pas le tétramère CD1d- α GalCer et présentent un répertoire V β polyclonal (Article 1, figure 7 et résultats générés par E.E. Hillhouse). Les cellules NKT non-classiques, quant à elles, demeurent restreintes à la molécule de CMH CD1d sans toutefois reconnaître l'antigène α GalCer, ce qui rend plus ardue l'identification de ces cellules. L'utilisation de souris déficientes pour les molécules β 2m et CD1d a cependant permis de confirmer hors de tout doute que les lymphocytes T DN constituent une population différente des cellules NKT. En effet, on retrouve les cellules T DN chez ces animaux, malgré l'absence des molécules permettant la sélection des lymphocytes NKT (Article 2, figure 3 et résultats générés par E.E. Hillhouse).

Chez les souris transgéniques pour l'expression du TCR, il est possible d'observer une population de lymphocytes T $\gamma\delta$ DN chez laquelle l'expression du TCR $\alpha\beta$ est induite de façon aberrante à la surface [336]. Une faible proportion de ces cellules co-exprime donc les deux types de TCR. Nous avons démontré que les lymphocytes T DN retrouvés chez la souris TCR3A9 B10.Br ne présentent pas de récepteur $\gamma\delta$ à la surface, éliminant ainsi la possibilité que ces cellules soient en fait des lymphocytes T $\gamma\delta$ (résultats générés par C. Beauchamp). De plus, chez les animaux non-transgéniques, les lymphocytes T expriment le TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ de façon mutuellement exclusive. Comme nous retrouvons les lymphocytes T DN chez les souris B10.Br et NOD n'exprimant pas le TCR 3A9, ces cellules ne constituent pas des lymphocytes T $\gamma\delta$ mal programmés et générés uniquement grâce à l'insertion transgénique (Article 1, figure 7).

Par ailleurs, l'absence d'expression de la molécule associée aux lymphocytes B B220 ainsi que l'association de son nombre à la résistance à l'auto-immunité rend la population de lymphocytes T DN différente des cellules proliférant massivement chez la

souris lpr. Finalement, les lymphocytes T DN n'expriment pas le facteur de transcription Foxp3 ainsi que la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 (CD25) *ex vivo* (Article 1, figure 6), ce qui différencie cette population des lymphocytes T régulateurs préalablement décrits.

De façon générale, les lymphocytes T se développent dans le thymus et passent par divers stades au cours desquels ils n'expriment pas de corécepteurs, puis expriment à la fois les molécules CD4 et CD8 et finalement répriment l'expression de l'un des corécepteurs avant d'être exportés vers la circulation. En ce qui concerne les lymphocytes T DN, il est possible que ceux-ci soient générés, ou du moins acquièrent leur phénotype, en périphérie. Il a en effet été démontré que certains lymphocytes T CD4 périphériques ont la capacité de moduler l'expression de leur corécepteur ainsi que de leur seuil minimal d'activation suite à l'exposition à un ligand [337, 338]. De plus, il est possible d'observer la conversion de lymphocytes T conventionnels en cellules à la fonction régulatrice, qui sont généralement induites suite à la rencontre d'un agoniste fortement reconnu par le TCR [272, 339]. Bien que nous ne puissions actuellement exclure la possibilité que les lymphocytes T DN se différencient en périphérie suite à un stimulus fort via leur TCR, cette avenue s'avère cependant invraisemblable. En effet, les souris B10.Br transgéniques exprimant le TCR 3A9 présentent une forte proportion de cellules T DN même en absence de l'antigène spécifique HEL. De plus, le niveau intermédiaire de la molécule CD5 exprimée à la surface tend à démontrer que ces lymphocytes ne reçoivent pas une stimulation antigénique particulièrement intense. Finalement, les souris B10.Br TCR 3A9:insHEL exprimant à la fois le TCR transgénique ainsi que l'antigène qui lui est spécifique montrent une réduction de la proportion périphérique de lymphocytes T DN, ce qui propose un mécanisme de sélection négative de ces cellules plutôt qu'une conversion favorisée en présence de stimulus antigénique (Article 1, figure 4).

Si les lymphocytes T DN ne sont pas induits en périphérie, cela signifie que des thymocytes sont exportés alors qu'ils n'expriment pas les corécepteurs CD4 et CD8. Nous

avons effectivement démontré que des cellules TCR β +, CD4-, CD8- et ayant abaissé le niveau d'expression de la molécule CD24, ce qui caractérise les thymocytes matures [340], sont retrouvées dans le thymus de souris TCR transgéniques B10.Br et NOD.*H2^k*, en présence ou non de l'antigène HEL (Article 2, figure 2). Récemment, des études menées au laboratoire ont aussi permis d'identifier des thymocytes DN matures dans le thymus de souris B10.Br CD1d^{-/-} non transgéniques (résultats obtenus par E.E. Hillhouse). Par ailleurs, plusieurs groupes ont démontré que les lymphocytes T périphériques peuvent retourner vers le thymus suite à l'activation [341-343]. Il est toutefois peu probable que les cellules T DN matures retrouvées dans le thymus proviennent de la périphérie, puisque leur proportion thymique est similaire chez les lignées murines B10.Br et NOD.*H2^k* TCR transgéniques, alors qu'en périphérie les souris NOD présentent une forte diminution de la proportion de ces lymphocytes (Article 2, figure 2). Ces résultats proposent donc que les cellules T DN se différencient en lymphocytes matures au niveau du thymus, puis sont exportés en périphérie où différents facteurs régulent leur proportion.

Dans le thymus, le stade auquel les lymphocytes T régulateurs DN deviennent matures puis quittent vers la périphérie est actuellement inconnu. Nous retenons actuellement deux hypothèses principales. Premièrement, il a été démontré que chez les modèles murins TCR transgéniques, l'expression du récepteur peut survenir à une étape aussi précoce que le stade DN2 [344]. Il est donc possible qu'une certaine proportion des thymocytes DN exprimant le TCR subisse une maturation prématurée menant à la différenciation en cellules T DN régulatrices puis à l'export périphérique. Selon cette théorie, les lymphocytes T DN ne passeraient pas par un stade DP au niveau du thymus, et éviteraient ainsi les étapes de sélection positive et négative centrales. Différentes évidences appuient cette hypothèse. Il est tout d'abord important de noter que l'anticorps clonotypique 1G12, utilisé afin de marquer les lymphocytes T spécifiques de l'antigène HEL, ne permet d'identifier que les cellules T n'ayant pas subi de réarrangement au niveau de la chaîne alpha de leur TCR. Ainsi, parmi les lymphocytes T CD4+ retrouvés chez la

souris B10.Br TCR transgénique, seules les cellules exprimant à la fois les chaînes bêta et alpha transgéniques sont identifiables grâce à l'anticorps clonotypique 1G12. Par ailleurs, chez cette même souris, tous les lymphocytes T DN sont spécifiquement reconnus par l'anticorps et n'expriment donc pas de chaîne alpha endogène du TCR (résultats obtenus par C. Beauchamp). Ces résultats tendent ainsi vers un export précoce du thymus limitant la possibilité de réarrangement au niveau du locus de la chaîne alpha du TCR. Par ailleurs, les lymphocytes T DN sont retrouvés en proportion considérable chez les souris B10.Br TCR transgéniques en absence de leur antigène spécifique HEL, phénomène tout à fait compatible avec une absence de sélection positive à l'étape DP.

Une seconde hypothèse expliquant la génération des lymphocytes T régulateurs DN serait que ces cellules puissent atteindre le stade de thymocytes DP, pour ensuite inhiber l'expression des deux corécepteurs avant d'être exportés en périphérie. En effet, il a été démontré *in vitro* que des thymocytes DP confrontés à une forte concentration d'un antigène spécifiquement reconnu peuvent se convertir en lymphocytes T DN [345]. Il est d'ailleurs intéressant de constater que ces cellules T acquièrent des propriétés immunorégulatrices, incluant la sécrétion d'IL-10 ainsi que la suppression de la prolifération de lymphocytes T naïfs en réponse à l'antigène. Cette théorie est cependant mise à l'épreuve par le fait que les cellules T DN retrouvées chez les lignées B10.Br, NOD.*H2^k* et BALB.K TCR transgéniques sont sélectionnées en l'absence de l'agoniste HEL. Par ailleurs, puisque des lymphocytes T CD4 et CD8 sont retrouvés chez les souris TCR transgéniques alors que la protéine HEL est absente, il est probable que les lymphocytes T DN aient aussi la capacité de reconnaître des ligands endogènes permettant leur sélection positive. Des résultats préliminaires générés par A. Liston lors de son doctorat dans le laboratoire du Dr C. Goodnow et récemment analysés par E.E. Hillhouse tendent à démontrer que chez la souris B10.Br TCR transgénique, une déficience au niveau de la protéine AIRE est associée à une réduction du nombre de lymphocytes T DN. De façon générale, AIRE est responsable de la sélection négative des thymocytes pour lesquels le TCR reconnaît spécifiquement des

TRAs. Toutefois, l'implication de ce facteur de transcription dans le développement de lymphocytes T régulateurs vient tout juste d'être décrite [346]. En effet, AIRE a été montrée comme nécessaire à la production de la chimiokine XCL1 par les mTECs, ce qui permet le recrutement de DC thymiques au niveau de la médulla ainsi que la génération de lymphocytes T régulateurs CD4⁺ Foxp3⁺. Il est donc possible d'envisager que le facteur de transcription AIRE puisse de même être impliqué dans la sélection ou la différenciation thymique de lymphocytes T régulateurs DN. De plus, nous avons démontré que chez les souris déficientes pour la molécule de surface CD47, les DC thymiques exprimant Sirp α sont réduites en proportion (Annexe 1, figure 8) [347]. Puisque ces mêmes souris présentent une proportion réduite de lymphocytes T DN, ces données suggèrent un rôle des DC thymiques dans la sélection des cellules T DN.

Considérant que les cellules T DN se différencient dans le thymus, il devient intéressant de tenter de déterminer par quelle molécule de CMH est restreinte la génération de ces lymphocytes. Nos travaux démontrent que la proportion de cellules T DN n'est pas réduite chez les souris B10.Br et NOD.*H2^k* TCR transgéniques déficientes pour la molécule β 2m nécessaire à la formation du CMH-I (Article 2, figure 3). Ainsi, il semblerait selon toute vraisemblance que les lymphocytes T DN puissent reconnaître un peptide dans le contexte d'une molécule de CMH-II. Par ailleurs, les lymphocytes T régulateurs DN ont aussi été identifiés chez des modèles transgéniques pour lesquels le TCR reconnaît des peptides présentés dans le contexte de molécules de CMH-I [290]. Il est envisageable que l'insertion d'un TCR transgénique restreigne l'affinité du récepteur pour une classe de molécules de CMH donnée, limitant du même coup le répertoire de ces cellules. Ainsi, chez les animaux non-transgéniques et chez l'homme, il est possible que les lymphocytes T DN puissent être sélectionnés à la fois grâce à des molécules de CMH-I et II, tout comme des cellules T conventionnelles. Il est toutefois intéressant de noter que chez des animaux déficients pour les corécepteurs CD4 et CD8 ainsi que pour les molécules de CMH-I et -II, des lymphocytes T DN arborant une affinité pour divers ligands indépendants du CMH

sont sélectionnés et retrouvés en périphérie [348]. Ces résultats permettent d'envisager qu'une large gamme de molécules puissent être responsables de la sélection thymique des lymphocytes T DN, qui conservent cependant la capacité de reconnaître spécifiquement des auto-antigènes.

5.2 Lymphocytes T DN : Que font-ils?

Le mécanismes d'action attribués aux lymphocytes T DN varie grandement d'un modèle à l'autre, *in vitro* [298, 299, 301]. Nous avons démontré que chez la souris B10.Br TCR 3A9, ces cellules ont la capacité de sécréter de l'IL-10 lorsque mises en culture (Annexe 2, figure 3) [349]. Une grande proportion des lymphocytes T DN activés produit aussi des granules cytotoxiques contenant du granzyme B et de la perforine, qui sont adéquatement exportées à la surface tel que suggéré par la présence du marqueur de dégranulation CD107a (Annexe 2, figure 1 et données non présentées). Finalement, nos résultats montrent qu'*in vitro*, ces cellules éliminent spécifiquement les lymphocytes B activés présentant l'antigène HEL, alors qu'elles n'exercent pas d'activité cytotoxique à l'égard des lymphocytes T (Annexe 2, figures 1 et 2). Mis en commun, ces résultats suggèrent pour les lymphocytes T DN un rôle suppressif exercé de manière antigène-spécifique. De plus, nous avons démontré que chez différentes lignées de souris transgéniques, la proportion de cellules T DN est directement associée à la protection au diabète auto-immun, appuyant ainsi une fonction biologique liée au maintien de la tolérance immunitaire (Article 1, figures 3 et 4).

Afin de valider *in vivo* la fonction régulatrice des lymphocytes T DN, nous avons souhaité vérifier l'impact d'un transfert de ces cellules chez un hôte présentant une faible proportion de ces cellules et génétiquement prédisposé à l'auto-immunité. La souris NOD s'avère toutefois de piètre utilité pour ce type d'expérimentations puisqu'il est très ardu d'isoler un nombre suffisant de lymphocytes T DN chez cet animal qui en génère très peu. De plus, l'utilisation de souris B10.Br ou BALB.K TCR transgéniques en tant que donneuses n'est pas envisageable puisque dû à des discordances au niveau d'antigènes mineurs d'histocompatibilité, les lymphocytes T DN provenant de ces lignées murines seraient rapidement éliminées lorsque transférées chez la souris NOD.*H2^k*. Nous avons donc pris avantage de la différence de proportion de cellules T DN observée entre les souris

BALB.K déficientes ou non pour la molécule CD47 afin d'isoler un nombre suffisant de lymphocytes pouvant être transférées adoptivement à un hôte compatible. Ainsi, alors qu'environ 80% des souris BALB.K TCR :insHEL développent le diabète auto-immun avant 24 semaines d'âge, seulement 1/9 des souris ayant reçu un transfert de lymphocytes T DN sont devenues diabétiques au même âge (Article 1, figure 8). Ce résultat démontre que les cellules T DN exercent effectivement une activité régulatrice *in vivo* permettant de réduire la prédisposition à l'auto-immunité.

L'habileté des lymphocytes T DN à inhiber l'apparition du diabète auto-immun chez des animaux prédisposés soulève de nombreuses questions quant aux mécanismes utilisés par ces cellules afin de restaurer la tolérance immunitaire. Nous avons évalué le taux sérique d'auto-anticorps IgG anti-HEL retrouvé chez les souris BALB.K TCR :insHEL ayant reçu ou non des lymphocytes T DN, et démontré que l'augmentation du nombre de ces cellules entraîne une chute du niveau des auto-anticorps dirigés contre la protéine HEL (Article 1, figure 8). Ces résultats appuient les observations *in vitro* selon lesquelles les cellules T DN éliminent les lymphocytes B présentant l'antigène reconnu. Afin de vérifier si les lymphocytes T DN exercent une activité cytotoxique à l'égard des cellules B présentant spécifiquement des peptides dérivés de la protéine HEL *in vivo*, nous avons utilisé des souris immunodéficientes *Rag^{-/-}* chez lesquelles nous avons transféré 1- des lymphocytes B activés ayant apprêté les protéines HEL ou OVA, puis 2- des cellules T DN. Les résultats présentés à l'annexe 4 démontrent que lorsque les souris hôtes reçoivent des lymphocytes B présentant HEL et OVA dans un ratio 1 :1, il est possible de retrouver ces cellules dans la rate de l'animal injecté dans les mêmes proportions suite au transfert. Par contre, lorsque des lymphocytes T DN sont aussi transférés aux souris receveuses, la population de cellules B présentant HEL diminue drastiquement comparativement à celle composée de cellules B ayant apprêté OVA, une protéine qui n'est pas reconnue par le TCR 3A9. Ainsi, *in vivo*, les lymphocytes T DN provenant de la souris B10.Br TCR

transgénique agissent en éliminant de façon spécifique les lymphocytes B activés qui présentent l'antigène HEL.

La pathogénèse du diabète auto-immun a été étudiée chez les animaux transgéniques TCR :insHEL en comparant les lignées B10.Br et NOD.*H2^k*, respectivement résistantes et prédisposées à la maladie [227]. Il a été observé que les souris NOD.*H2^k* TCR :insHEL présentent de larges centres germinatifs au niveau des îlots pancréatiques, ainsi que des niveaux sériques d'IgG anti-HEL environ 1 000 fois plus élevés que les animaux B10.Br transgéniques. Ainsi, alors que le rôle des lymphocytes B varie selon le modèle d'étude du diabète auto-immun, il semble que dans un système spécifique à l'antigène tel que la souris transgénique TCR :insHEL, ces cellules participent activement au développement de la maladie.

Afin de s'activer et éventuellement former un centre germinatif, le lymphocyte B doit recevoir 2 signaux distincts. Le premier survient lors de la rencontre d'un antigène spécifiquement reconnu par le récepteur de cellules B (BCR). La reconnaissance d'un antigène par le lymphocyte B en absence du second signal mène par ailleurs à l'anergie ou la mort du lymphocyte par apoptose. Ce deuxième signal peut quant à lui être délivré soit par des lymphocytes T auxiliaires ayant aussi reconnu l'antigène, ou encore par des alertes de danger provenant du système immunitaire inné [350]. Suite à l'activation adéquate de la cellule B s'ensuit une prolifération rapide et une maturation pouvant mener à la génération de trois types cellulaires différents, c'est-à-dire un plasmocyte extrafolliculaire, un lymphocyte B de centre germinatif ou encore une cellule B mémoire. L'affinité du BCR pour l'antigène, la qualité de l'interaction entre les lymphocytes T et B ainsi que les cytokines environnantes ne sont que quelques-uns des facteurs identifiés responsables de la génération d'un centre germinatif [350]. Sa formation permet une maturation de l'affinité du BCR envers l'antigène reconnu, et mène subséquemment à la différenciation de plasmocytes et de cellules B mémoires encore plus spécifique de l'antigène (Figure 13).

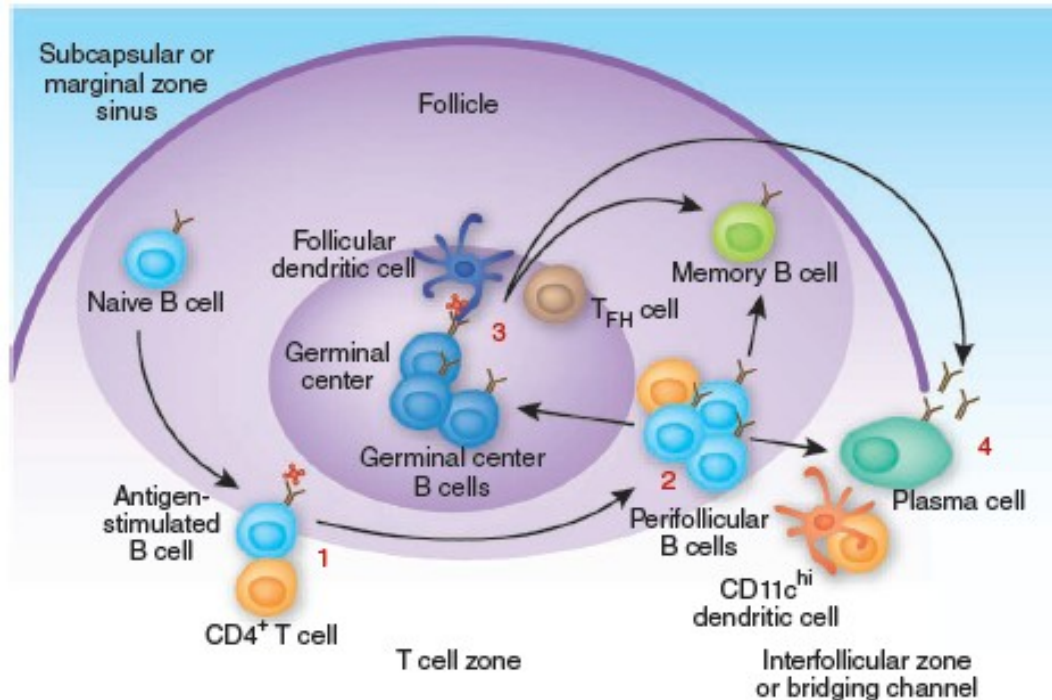


Figure 13 : Représentation des étapes menant à la génération d'un centre germinatif, ainsi qu'à la différenciation de plasmocytes et de cellules B mémoires. Les flèches pleines ainsi que les numéros représentent, dans l'ordre, les différentes étapes de différenciation et de migration des lymphocytes B suite à la rencontre antigénique en présence de lymphocytes T auxiliaires. Tiré de [350].

Chez les souris transgéniques TCR :insHEL, un nombre élevé de lymphocytes T CD4 auto-réactifs peuvent fournir l'aide nécessaire à l'activation de lymphocytes B reconnaissant l'antigène HEL. Ainsi, la génération de centres germinatifs chez ces souris repose principalement sur deux facteurs principaux, soit la présence accrue de lymphocytes B auto-réactifs et/ou une atteinte au niveau des mécanismes périphériques responsables de maintenir l'état de tolérance. Il est difficile de quantifier et comparer le nombre de lymphocytes B exportés de la moelle osseuse qui ont la capacité de reconnaître l'antigène HEL chez les souris B10.Br et NOD.H2^k TCR :insHEL sans que les résultats ne soient

biaisés par la présence des cellules T DN chez ces animaux. Si l'on considère que les deux lignées murines ont la capacité de générer des lymphocytes B potentiellement auto-réactifs, cela signifie qu'un ou plusieurs mécanisme(s) de tolérance périphérique limitant l'activation des cellules B est(sont) rompu(s) chez la souris NOD développant des centres germinatifs. La proportion de lymphocytes T DN pourrait constituer l'un des éléments limitant le développement de ces structures. Cette proposition est d'ailleurs renforcée par la faible proportion de lymphocytes T DN retrouvés chez les souris NOD.*H2^k* TCR :insHEL et NOD non-transgéniques (Article 1, figures 4 et 7).

Alors que les résultats obtenus suggèrent qu'une forte proportion de cellules T régulatrices DN limite la formation de centres germinatifs ainsi que la progression vers le diabète auto-immun chez la souris transgénique, le mécanisme exact demeure peu compris. Par exemple, nous ne savons pas à quelle étape de la pathogénèse ces cellules ont la capacité d'intervenir. Lors du transfert adoptif de lymphocytes T DN aux souris BALB.K *CD47^{-/-}*, nous avons choisi d'injecter les hôtes à l'âge de 9 semaines, c'est-à-dire à un moment où 50% des animaux de la lignée ont déjà progressé vers la maladie. Même si les souris sélectionnées n'étaient pas diabétiques au moment du transfert, il est probable qu'une certaine proportion d'entre elles souffrait d'insulite et avait déjà développé des centres germinatifs au niveau des îlots pancréatiques. Ces observations proposent que non seulement les lymphocytes T DN puissent inhiber la formation de nouveaux centres germinatifs, mais aussi détruire ou réduire ceux déjà existants afin d'éviter l'évolution vers la maladie. Ce résultat est d'une importance capitale pour l'utilisation des cellules T DN dans le contexte d'un traitement immunothérapeutique chez l'homme. En effet, lorsque les patients sont diagnostiqués avec le diabète de type 1, une certaine fonction des cellules bêta pancréatiques demeure.

Nous avons démontré, *in vivo* et *in vitro*, que les cellules T DN éliminent les lymphocytes B mis en culture en présence de l'antigène et de LPS. Toutefois, nous ne savons toujours pas si un récepteur présent à la surface de ces cellules B est nécessaire à la

reconnaissance par les lymphocytes T DN afin de permettre la lyse cellulaire. Si oui, il est possible que les lymphocytes B matures, les plasmocytes, les cellules B de centres germinatifs et mémoire ne soient pas tous sujets à l'action cytotoxique des lymphocytes T DN. Par ailleurs, si seule la reconnaissance du peptide agoniste des cellules T DN est nécessaire à leur activation, d'autres CPA impliquées dans la présentation d'antigènes pancréatiques peuvent être la cible de l'activité cytotoxique des lymphocytes T régulateurs DN. Nous avons tenté d'évaluer le potentiel de cytotoxicité de ces cellules à l'égard de DC et de macrophages mis en culture, *in vitro* et *in vivo*. Nous avons remarqué que la fragilité de ces cellules suite à l'activation rendait les expérimentations de libération de chrome radioactif très difficiles à interpréter puisque le seuil minimal de relâche était très élevé et variable d'une expérience à l'autre. De même, puisque les tests *in vivo* nécessitent des marquages de différentes intensités de CFSE afin de distinguer les populations cellulaires endogènes de celles présentant les antigènes HEL et OVA, la variation de taille et de forme des DC et macrophages ne permettait pas d'obtenir des colorations uniformes et facilement différenciables par cytométrie en flux. Il est donc difficile de déterminer exactement quelles sont les cibles des lymphocytes T DN, même chez la souris transgénique. Il est important de noter que, selon les modèles transgéniques utilisés, l'activité cytotoxique des lymphocytes T DN n'est pas dirigée à l'endroit des mêmes populations cellulaires. Il est plausible que le choix de la cible soit influencé par le modèle étudié, et par conséquent que chez les souris non-transgéniques ainsi que chez l'homme, les lymphocytes T DN aient la capacité de lyser différents types de cellules.

5.3 Lymphocytes T DN : Comment restaurer leur nombre?

Comme la souris NOD non-transgénique représente sans doute le modèle animal présentant la pathologie la plus semblable au diabète auto-immun, l'un des objectifs à court terme du laboratoire est de démontrer que l'augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs DN chez cet animal est suffisant afin de prévenir et/ou guérir le diabète auto-immun. Il convient donc avant tout de s'assurer que la fonction cytotoxique des cellules T DN provenant de la souris NOD ne soit pas déficiente. Tel que présenté à la figure 2 de l'annexe 2, l'activité cytotoxique des cellules T provenant des souris B10.Br et NOD.H2^k TCR transgénique envers des cibles F1 est similaire, ce qui suggère que seul le nombre de ces cellules est altéré chez la souris NOD. Afin de restaurer la proportion de lymphocytes T DN, deux grandes avenues sont envisagées soit 1- l'expansion suivie du transfert adoptif de ces cellules et 2- l'identification de cibles moléculaires permettant la thérapie génique.

5.3.1 Expansion et transfert

Au cours des expérimentations visant la caractérisation phénotypique des lymphocytes T régulateurs DN, nous avons remarqué que ces cellules étaient anergiques *in vitro*. En effet, malgré l'absence d'expression de la molécule CD25 chez ces cellules à l'état naïf, celles-ci nécessitent l'IL-2 afin de proliférer suite à un signal via le TCR (Article 1, figure5). La chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (CD25) apparaît à la surface cellulaire suite à l'activation. Ainsi, nous avons observé qu'en présence d'IL-2, d'anti-CD3 et d'anti-CD28, il est possible d'obtenir une expansion des lymphocytes T DN atteignant jusqu'à 45X et 10X en 7 jours chez les souris TCR transgéniques B10.Br et NOD.H2^k, respectivement. Cette différence dans le potentiel d'expansion entre les lymphocytes T DN provenant des lignées B10.Br et NOD.H2^k est expliquée par la production accrue d'IL-10 par les cellules de la souris NOD.H2^k, ce qui augmente l'apoptose et limite ainsi l'augmentation du nombre (Annexe 2, figures 3 et 6). Des résultats préliminaires obtenus

par E.E. Hillhouse démontrent de plus une expression accrue du récepteur de l'IL-10 à la surface des lymphocytes T DN provenant de la souris NOD.H2^k TCR transgénique, suggérant une sensibilité supérieure de ces cellules à la cytokine. Finalement, l'ajout d'anticorps antagoniste du récepteur de l'IL-10 permet de restaurer l'expansion cellulaire chez ces souris (Annexe 2, figure 7). Il est donc possible d'obtenir de grandes quantités de lymphocytes T DN activés dans le but de les utiliser à des fins thérapeutiques chez la souris transgénique. Par ailleurs, comme nous souhaitons mettre à profit ces connaissances chez les animaux non-transgéniques, il est important de garder à l'esprit que le répertoire des cellules T DN est polyclonal chez les souris n'exprimant pas un TCR transgénique, et donc que seule une mince fraction de ces lymphocytes est potentiellement spécifique d'antigènes dérivés de cellules β pancréatiques. Ainsi, la stratégie optimale n'est peut-être pas l'expansion *in vitro* des lymphocytes T DN de toutes spécificités grâce à l'anti-CD3, mais plutôt une co-culture de ces cellules en présence de lysats d'îlots pancréatiques et de CPA. De cette façon, seuls les lymphocytes dont le TCR reconnaît spécifiquement des auto-antigènes pancréatiques seraient activés et proliféreraient. Cette approche permettrait sans doute d'obtenir une population de cellules régulatrices plus efficace puisque spécifique à l'antigène, tout en limitant les risques associés à une potentielle immunosuppression causée par le transfert d'une grande quantité de lymphocytes T suppresseurs. Finalement, l'élaboration d'un protocole d'expansion assurant le maintien des propriétés régulatrices tout en favorisant la survie des cellules suite au transfert deviendra nécessaire lorsque sera entreprise la transition vers l'homme. En effet, les études cliniques récentes ont démontré que l'expansion de lymphocytes T régulateurs viables et efficaces est plus ardue chez l'homme que chez l'animal, ce qui engendre de nouveaux défis thérapeutiques [351, 352].

5.3.2 Régulation et thérapie génique

Alors que le prélèvement de sang, l'isolement, l'expansion puis la réinjection de lymphocytes T constitue une approche permettant d'augmenter le nombre de ces cellules de façon temporaire, il est aussi envisageable d'agir directement au niveau des gènes responsables de la régulation de cette population cellulaire. En effet, des études de thérapie génique ont démontré que, grâce à des techniques ayant recours ou non à des transfections virales, il est possible de modifier le profil d'expression de gènes de multiples populations ciblées de cellules impliquées dans le développement du diabète [353]. Par exemple, certains groupes sont arrivés à moduler le système immunitaire en injectant des adénovirus permettant l'expression de certains TRA dans le thymus de souris [354], ou encore à réduire l'incidence de diabète chez la souris NOD via l'induction de sécrétion d'IL-4 par les DC [355]. Afin d'arriver à modifier la proportion de lymphocytes T DN, il importe tout d'abord de comprendre de quelle façon des facteurs génétiques sont responsables de sa régulation. Par ailleurs, la découverte des gènes impliqués dans le contrôle de cette population cellulaire et des polymorphismes associés à une prédisposition accrue représente une opportunité exceptionnelle afin d'identifier les individus à risque de développer une pathologie auto-immune.

Lors de l'étude du défaut de tolérance menant au diabète observé chez les souris BALB.K transgéniques *CD47^{-/-}*, nous avons remarqué que la population de lymphocytes T DN étaient altérée chez ces animaux lorsque comparée aux souris BALB.K transgéniques exprimant normalement la protéine de surface CD47 (Article 1, figure3). De toute évidence, l'interruption du signal bidirectionnel entre les molécules CD47 et son ligand Sirp α est suffisante afin de perturber l'homéostasie des cellules T DN chez les animaux BALB.K transgéniques TCR et TCR :insHEL. La façon dont l'interaction CD47-Sirp α influence la proportion de lymphocytes T DN demeure incertaine. Par ailleurs, certaines

évidences suggèrent que ces lymphocytes, qui expriment la molécule CD47 mais non Sirp α , doivent interagir avec d'autres cellules exprimant Sirp α , soit principalement certaines DC ainsi que les macrophages. En tant que CPA professionnelles, il n'est pas surprenant que ces cellules entrent régulièrement en contact avec les lymphocytes T DN. Tout d'abord, nous avons démontré que l'inhibition de CD47 perturbe l'homéostasie des DC thymiques en induisant une réduction significative de la proportion de DC Sirp α ⁺ par rapport au nombre de DC thymiques total, qui demeure inchangé (Annexe 1, figure 8). Puisque nous posons l'hypothèse que la sélection thymique des lymphocytes T DN est dépendante d'interactions avec certaines DC du thymus et que la perte d'expression de CD47 affecte à la fois la proportion des cellules T DN et de DC thymiques Sirp α ⁺, il apparaît probable que ces dernières constituent le sous-type de DC responsables de la génération des lymphocytes T DN. D'autres groupes ont de plus démontré des perturbations au niveau de la distribution des sous-populations de DC périphériques chez les animaux déficients pour la molécule CD47, ce qui pourrait aussi contribuer à la diminution de la proportion de lymphocytes T DN chez les souris BALB.K *CD47*^{-/-} TCR transgéniques [356, 357].

Un deuxième argument vient appuyer le rôle d'interactions entre les lymphocytes T DN et les cellules Sirp α ⁺ en périphérie. En effet, la souris NOD présente un défaut de maturation des macrophages causé par une insensibilité des précurseurs hématopoïétiques au facteur de croissance M-CSF nécessaire à leur différenciation [358]. Ce défaut se traduit par une réduction importante du nombre de macrophages Sirp α ⁺ dans la rate des souris NOD.*H2*^k TCR transgéniques lorsque comparées aux animaux de lignées B10.BR TCR transgéniques (Annexe 5). Ainsi, dans deux modèles différents présentant des affections distinctes, l'altération des populations myéloïdes exprimant la molécule Sirp α est associée à la réduction de la proportion de lymphocytes T DN. Certaines questions subsistent toutefois et méritent des investigations plus poussées. Tout d'abord, est-ce que l'interaction CD47-Sirp α est réellement nécessaire au maintien des lymphocytes T DN, ou bien la

molécule $Sirp\alpha$ agit-elle simplement à titre de marqueur afin d'identifier les cellules responsables de la régulation des lymphocytes T DN? De plus, il serait intéressant de déterminer plus clairement de quelle façon les cellules $Sirp\alpha^+$ sont impliquées dans l'homéostasie des lymphocytes T DN, c'est-à-dire si elles sont nécessaires uniquement à leur sélection, différenciation, survie ou activation? Le fait que des cellules $Sirp\alpha^+$ thymiques et périphériques aient été associées à la proportion de lymphocytes T DN suggère qu'elles puissent être impliquées dans plusieurs de ces processus.

Tel que mentionné, les lymphocytes T DN sont régulés différemment chez les souris B10.Br et NOD. $H2^k$. Nous avons démontré un impact de la région de prédisposition au diabète auto-immun *Idd13* dans le contrôle de la proportion de ces cellules entre les deux lignées murines, transgéniques et non-transgéniques (Article 2, figure 1). Ces résultats sont en accord avec le rôle présumé de *Sirp\alpha* dans le maintien de la population de lymphocytes T DN, puisque le gène encodant cette protéine est situé à l'intérieur de l'intervalle de susceptibilité et présente de nombreux polymorphismes entre les lignées murines étudiées (Article 2, figure 5). Par ailleurs, les autres gènes candidats responsables de la susceptibilité accrue du diabète localisés dans cette région ne semblent pas être impliqués dans la régulation des cellules T DN (Article 2, figures 2 et 3). L'utilisation de souris NOD congéniques pour le locus *Idd13* provenant de la lignée B6 a permis d'observer une restauration partielle mais significative de la proportion de lymphocytes T DN. Deux facteurs principaux contribuent à expliquer l'absence de restauration complète du nombre de ces cellules. Premièrement, bien que ses causes génétiques soient méconnues, il est peu probable que le défaut au niveau de la maturation des macrophages soit éliminé chez la souris NOD.NOR-*Idd13*, ce qui implique qu'une proportion réduite de cellules $Sirp\alpha^+$ puisse interagir avec les lymphocytes T DN chez cette souris. Deuxièmement, l'étude de la proportion de cellules T DN chez des souris issues d'un croisement (B10.Br x NOD. $H2^k$) TCR transgéniques de 2^e génération (F2) a permis de démontrer que ce trait est régulé de façon multigénique (Article 3, figure 1).

Afin d'identifier les locus génétiques jouant un rôle prépondérant dans la régulation des lymphocytes T DN, nous avons procédé à un *genome wide scan* sur les souris F2 générées à partir du croisement (B10.Br x NOD. $H2^k$) TCR. Cette étude nous a permis de déterminer qu'une région située dans la portion proximale du chromosome 12 est directement associée à la proportion de lymphocytes T DN retrouvés dans la rate ainsi que les ganglions périphériques des animaux transgéniques pour le TCR 3A9 (Article 3, figure 2). La création de différentes lignées de souris NOD.B10 congéniques pour la région d'intérêt du chromosome 12 confirme l'impact de gène(s) situé(s) dans un intervalle contenu entre les 15e et 31e méga paires de bases (Article 3, figure 4). Évidemment, de nombreux gènes sont retrouvés au niveau de ce locus, ce qui complique grandement l'identification de candidats. Deux approches pourraient être à envisager afin de rétrécir le nombre de gènes potentiellement impliqués dans la régulation des lymphocytes T DN. Tout d'abord, une analyse de l'expression génique de ces cellules provenant de souris B10.Br et NOD. $H2^k$ pourrait permettre de déceler des différences au niveau du transcriptome pour certains gènes localisés au niveau du chromosome 12. Alternativement ou en combinaison avec cette stratégie, il est aussi possible de continuer les croisements des souris C12D avec des souris NOD. $H2^k$ en espérant observer de nouvelles recombinaisons permettant de rétrécir l'intervalle associé au phénotype.

Malgré l'absence d'identification de gènes candidats liés au chromosome 12, la mise en évidence de cette région s'avère très intéressante puisqu'une revue de la littérature a permis de démontrer que ce même locus a déjà été associé à la susceptibilité à l'auto-immunité chez un modèle murin différent [359, 360]. En effet, le groupe du Dr Vyse a observé une corrélation entre cette région génétique et la susceptibilité au lupus érythémateux. Plus encore, l'allèle de prédisposition provenant de la souris NZB est associé à l'augmentation des niveaux d'auto-anticorps IgG circulants dirigés contre de multiples composantes du soi telles que l'ADN, la chromatine et les érythrocytes. Ce phénotype concorde parfaitement à la pathologie observée chez les souris TCR :insHEL chez

lesquelles la proportion de lymphocytes T DN est réduite, c'est-à-dire les animaux de lignée NOD.*H2^k* et BALB.K *CD47^{-/-}*. Ainsi, l'identification de cette région vient appuyer le modèle selon lequel les cellules T DN participent au maintien de la tolérance via l'élimination de lymphocytes B réactifs envers les antigènes du soi. La proportion de lymphocytes T DN retrouvées chez les souris NZB prédisposées à l'auto-immunité est actuellement inconnue. Il serait évidemment intéressant d'étudier le nombre de cellules T DN ainsi leur implication dans le contrôle du niveau d'auto-anticorps sérique et dans la susceptibilité à la maladie chez cet autre modèle murin. Ce type d'études pourrait de plus nous renseigner sur les mécanismes grâce auxquels certains gènes situés sur le chromosome 12 de la souris influence la proportion de lymphocytes T DN.

L'analyse génétique menée sur les souris F2 n'a pas permis de valider le rôle de l'*Idd13* de façon statistiquement significative (Article 3, figure 2). Compte tenu de la variabilité observée d'un animal et d'un organe à l'autre, il est probable que le nombre de souris utilisées pour l'étude ait été insuffisant afin de mettre en lumière les loci influençant de façon modérée la proportion de lymphocytes T DN. Par ailleurs, lorsque l'on examine l'effet combiné des intervalles d'intérêt situés sur les chromosomes 12 et 2 (*Idd13*), on remarque que la proportion de lymphocytes T DN retrouvée chez les souris arborant un haplotype homozygote B10 pour les 2 régions est similaire à celle de la lignée parentale B10.Br TCR transgénique (Article 3, figure 5). Cette observation montre bien que l'allèle NOD au niveau de l'*Idd13* affecte la proportion de lymphocytes T DN de façon récessive, et suggère que d'autres loci puissent contribuer à la régulation de ces cellules malgré l'obtention de LOD scores insuffisants pour confirmer un rôle biologique. Par exemple, des travaux non-publiés de E.E Hillhouse ont démontré que l'expression du récepteur de l'IL-10 était particulièrement élevée suite à la mise en culture des lymphocytes T DN provenant de la souris NOD.*H2^k* TCR transgénique, ce qui est possiblement responsable de leur plus grande susceptibilité à l'apoptose. Dans le même sens, un SNP situé à proximité du gène de l'IL-10R sur le chromosome 9 présente un LOD score tout près de la limite de signification

dans les ganglions périphériques (Article 3, figure 2). Des analyses plus exhaustives seront donc nécessaires afin d'identifier tous les gènes impliqués dans la régulation des lymphocytes T DN.

5.4 Modèle

L'étude phénotypique, fonctionnelle et génétique menée sur les lymphocytes T DN a permis de mieux comprendre leur biologie et leur rôle dans le maintien de la tolérance périphérique. La figure qui suit tente de résumer les connaissances acquises, tout en soulignant les aspects liés à la régulation de ces cellules qui demeurent à éclaircir.

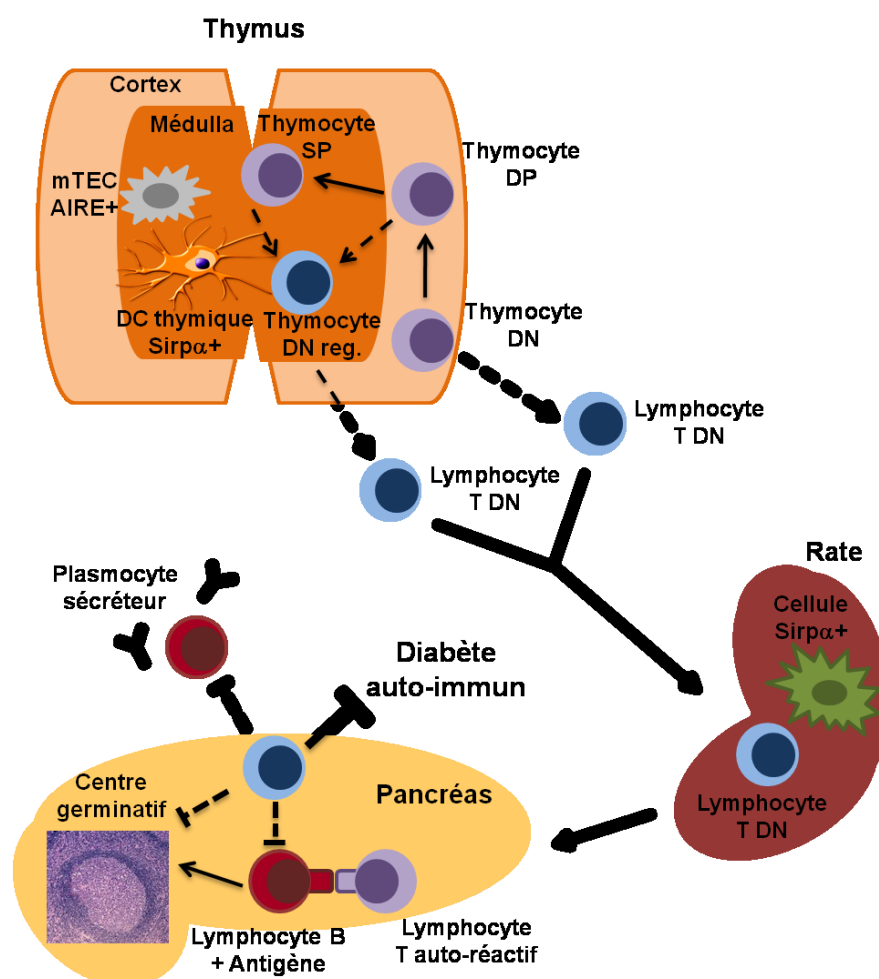


Figure 14 : Modèle représentant le développement ainsi que le rôle des lymphocytes T DN dans la prévention du diabète auto-immun. (Lignes hachurées : à confirmer) Inspiré de [227].

5.5 Conclusion

L'objectif global de ce projet de recherche consistait à améliorer notre compréhension des mécanismes limitant le développement de maladies auto-immunes, tout en cherchant à identifier de nouveaux facteurs génétiques responsables de la susceptibilité à ce type de pathologie. Ce faisant, nous avons participé à la caractérisation d'une population peu décrite de lymphocytes T n'exprimant pas les corécepteurs CD4 et CD8 (DN), et démontré que le nombre de ces cellules est associé à la prédisposition à l'auto-immunité. Tirant avantage d'un modèle murin transgénique chez lequel une grande quantité de lymphocytes T auto-réactifs reconnaissent spécifiquement un antigène du soi, nous avons observé que l'interaction CD47-Sirp α était cruciale au maintien de la tolérance immunitaire via la régulation du nombre de lymphocytes T régulateurs DN. Nous avons de plus démontré que ces cellules exercent leur activité tolérogène en éliminant de façon spécifique les lymphocytes B présentant l'auto-antigène reconnu. Finalement, une étude génétique a permis d'associer le contrôle de la proportion de lymphocytes T DN à un locus situé en région proximale du chromosome 12 et présentant des polymorphismes entre les lignées de souris B10.Br et NOD.H2^k, respectivement résistantes et prédisposées au diabète auto-immun.

Les résultats présentés dans cette thèse permettent, outre l'avancement des connaissances fondamentales liées à l'immunologie, d'envisager une identification et un traitement plus précoce des individus prédisposés au diabète de type 1. En effet, si les résultats obtenus chez la souris sont confirmés chez l'homme, il serait possible d'utiliser la proportion de lymphocytes T DN retrouvés dans le sang en tant que biomarqueur afin de faciliter la détection des personnes à risque. Mieux encore, l'augmentation du nombre de cellules T DN via l'expansion *ex vivo* ou encore par le ciblage de gènes régulant leur proportion pourrait être effectuée en prophylaxie chez les individus prédisposés au diabète de type 1. De plus, il est important de spécifier que contrairement à la majorité des

approches actuelles visant l'immunothérapie du diabète auto-immun, l'utilisation de lymphocytes T DN constitue une avenue antigène-spécifique, qui permet donc de réduire les effets secondaires éventuels. Par ailleurs, il est important de considérer l'utilisation de ces cellules dans la prévention et le traitement de différentes pathologies du système immunitaire, incluant le rejet de greffe ainsi que l'élimination de cellules tumorales. Évidemment, de nombreuses études menées chez différents modèles animaux seront nécessaires afin de mieux comprendre le fonctionnement des lymphocytes T DN. L'identification de ces cellules constitue toutefois un premier pas vers la création de nouveaux tests pré-diagnostiques ainsi que de traitements novateurs visant l'amélioration de la santé des patients souffrant de maladies auto-immunes telles que le diabète de type 1.

BIBLIOGRAPHIE

1. Paul, W.E., *Fundamental immunology*. 5th ed2003, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. xxi, 1701 p.
2. Janeway, C., *Immunobiology : the immune system in health and disease*. 6th ed2005, New York: Garland Science. xxiii, 823 p.
3. Davidson, A. and B. Diamond, *Autoimmune diseases*. N Engl J Med, 2001. **345**(5): p. 340-50.
4. Beeson, P.B., *Age and sex associations of 40 autoimmune diseases*. Am J Med, 1994. **96**(5): p. 457-62.
5. Gale, E.A. and K.M. Gillespie, *Diabetes and gender*. Diabetologia, 2001. **44**(1): p. 3-15.
6. Karvonen, M., et al., *Sex difference in the incidence of insulin-dependent diabetes mellitus: an analysis of the recent epidemiological data. World Health Organization DIAMOND Project Group*. Diabetes Metab Rev, 1997. **13**(4): p. 275-91.
7. Karvonen, M., et al., *Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group*. Diabetes Care, 2000. **23**(10): p. 1516-26.
8. Legault, L. and C. Polychronakos, *Annual incidence of type 1 diabetes in Quebec between 1989-2000 in children*. Clin Invest Med, 2006. **29**(1): p. 10-3.
9. Patterson, C.C., et al., *Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study*. Lancet, 2009. **373**(9680): p. 2027-33.
10. Tortora, G.J. and S.R. Grabowski, *Principles of anatomy and physiology*. 9th ed2000, New York: J. Wiley & Sons. 1 v. (various pagings).
11. NIH, *Stem cells and diabetes: Stem cells and diabetes*; <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter7>.
12. Sherry, N.A., E.B. Tsai, and K.C. Herold, *Natural history of beta-cell function in type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54 Suppl 2**: p. S32-9.
13. Hahr, A.J. and M.E. Molitch, *Optimizing insulin therapy in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus: optimal dosing and timing in the outpatient setting*. Dis Mon. **56**(3): p. 148-62.
14. Hood, K.K., et al., *Association between adherence and glycemic control in pediatric type 1 diabetes: a meta-analysis*. Pediatrics, 2009. **124**(6): p. e1171-9.
15. *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes*

- Control and Complications Trial Research Group*. N Engl J Med, 1993. **329**(14): p. 977-86.
16. Klein, B.E., *Overview of epidemiologic studies of diabetic retinopathy*. Ophthalmic Epidemiol, 2007. **14**(4): p. 179-83.
 17. Rodrigues, T.C., et al., *Hypertension is the Metabolic Syndrome Component Most Strongly Associated with Microvascular Complications and Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes*. J Endocrinol Invest.
 18. Marshall, S.M., *Recent advances in diabetic nephropathy*. Clin Med, 2004. **4**(3): p. 277-82.
 19. Perkins, B.A., et al., *Short-term metabolic change is associated with improvement in measures of diabetic neuropathy: a 1-year placebo cohort analysis*. Diabet Med. **27**(11): p. 1271-9.
 20. Hering, B.J., et al., *Clinical islet transplantation--registry report, accomplishments in the past and future research needs*. Cell Transplant, 1993. **2**(4): p. 269-82; discussion 283-305.
 21. Shapiro, A.M., et al., *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen*. N Engl J Med, 2000. **343**(4): p. 230-8.
 22. Ryan, E.A., et al., *Five-year follow-up after clinical islet transplantation*. Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2060-9.
 23. Kaprio, J., et al., *Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland*. Diabetologia, 1992. **35**(11): p. 1060-7.
 24. Redondo, M.J., et al., *Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins*. N Engl J Med, 2008. **359**(26): p. 2849-50.
 25. Ronningen, K.S., N. Keiding, and A. Green, *Correlations between the incidence of childhood-onset type 1 diabetes in Europe and HLA genotypes*. Diabetologia, 2001. **44 Suppl 3**: p. B51-9.
 26. Green, A., *What can the epidemiological approach to type 1 diabetes contribute to the unravelling of autoimmune pathological mechanisms?* Springer Semin Immunopathol, 2002. **24**(3): p. 323-30.
 27. Rioux, J.D. and A.K. Abbas, *Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 584-9.
 28. Shapira, Y., N. Agmon-Levin, and Y. Shoenfeld, *Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity*. J Autoimmun. **34**(3): p. J168-77.

29. Raymond, N.T., et al., *Comparative incidence of Type I diabetes in children aged under 15 years from South Asian and White or Other ethnic backgrounds in Leicestershire, UK, 1989 to 1998*. Diabetologia, 2001. **44 Suppl 3**: p. B32-6.
30. Feltbower, R.G., et al., *Trends in the incidence of childhood diabetes in south Asians and other children in Bradford, UK*. Diabet Med, 2002. **19**(2): p. 162-6.
31. Holmqvist, B.M., O. Lofman, and U. Samuelsson, *A low incidence of Type I diabetes between 1977 and 2001 in south-eastern Sweden in areas with high population density and which are more deprived*. Diabet Med, 2008. **25**(3): p. 255-60.
32. Miller, L.J., et al., *Urban-rural variation in childhood type I diabetes incidence in Canterbury, New Zealand, 1980-2004*. Health Place.
33. Patterson, C.C., D.J. Carson, and D.R. Hadden, *Epidemiology of childhood IDDM in Northern Ireland 1989-1994: low incidence in areas with highest population density and most household crowding*. Northern Ireland Diabetes Study Group. Diabetologia, 1996. **39**(9): p. 1063-9.
34. Staines, A., et al., *Small area variation in the incidence of childhood insulin-dependent diabetes mellitus in Yorkshire, UK: links with overcrowding and population density*. Int J Epidemiol, 1997. **26**(6): p. 1307-13.
35. Thomas, W., R. Birgit, and S. Edith, *Changing geographical distribution of diabetes mellitus type I incidence in Austrian children 1989--2005*. Eur J Epidemiol, 2008. **23**(3): p. 213-8.
36. Cherubini, V., et al., *Large incidence variation of Type I diabetes in central-southern Italy 1990-1995: lower risk in rural areas*. Diabetologia, 1999. **42**(7): p. 789-92.
37. Pundziute-Lycka, A., et al., *Incidence of type I diabetes in Lithuanians aged 0-39 years varies by the urban-rural setting, and the time change differs for men and women during 1991-2000*. Diabetes Care, 2003. **26**(3): p. 671-6.
38. Borch-Johnsen, K., et al., *Relation between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus. A hypothesis*. Lancet, 1984. **2**(8411): p. 1083-6.
39. Gerstein, H.C., *Cow's milk exposure and type I diabetes mellitus. A critical overview of the clinical literature*. Diabetes Care, 1994. **17**(1): p. 13-9.
40. Pietropaolo, M., et al., *Islet cell autoantigen 69 kD (ICA69). Molecular cloning and characterization of a novel diabetes-associated autoantigen*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 359-71.
41. Cavallo, M.G., et al., *Cell-mediated immune response to beta casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implications for disease pathogenesis*. Lancet, 1996. **348**(9032): p. 926-8.

42. Saruger, E., et al., *Cellular and humoral immunity against cow's milk proteins in type 1 diabetes*. J Autoimmun, 1999. **13**(3): p. 365-73.
43. Lempainen, J., et al., *Interplay between PTPN22 C1858T polymorphism and cow's milk formula exposure in type 1 diabetes*. J Autoimmun, 2009. **33**(2): p. 155-64.
44. Fuchtenbusch, M., A.G. Ziegler, and M. Hummel, *Elimination of dietary gluten and development of type 1 diabetes in high risk subjects*. Rev Diabet Stud, 2004. **1**(1): p. 39-41.
45. Ventura, A., G. Magazzu, and L. Greco, *Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease*. Gastroenterology, 1999. **117**(2): p. 297-303.
46. Hummel, M., et al., *Elimination of dietary gluten does not reduce titers of type 1 diabetes-associated autoantibodies in high-risk subjects*. Diabetes Care, 2002. **25**(7): p. 1111-6.
47. Muntoni, S., et al., *Nitrate in community water supplies and risk of childhood type 1 diabetes in Sardinia, Italy*. Eur J Epidemiol, 2006. **21**(3): p. 245-7.
48. Helgason, T. and M.R. Jonasson, *Evidence for a food additive as a cause of ketosis-prone diabetes*. Lancet, 1981. **2**(8249): p. 716-20.
49. Casu, A., et al., *Type 1 diabetes in sardinia is not linked to nitrate levels in drinking water*. Diabetes Care, 2000. **23**(7): p. 1043-4.
50. Ercolini, A.M. and S.D. Miller, *The role of infections in autoimmune disease*. Clin Exp Immunol, 2009. **155**(1): p. 1-15.
51. Fairweather, D., et al., *From infection to autoimmunity*. J Autoimmun, 2001. **16**(3): p. 175-86.
52. Bowles, N.E., et al., *Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy*. Lancet, 1986. **1**(8490): p. 1120-3.
53. Gauntt, C.J., et al., *Molecular mimicry, anti-coxsackievirus B3 neutralizing monoclonal antibodies, and myocarditis*. J Immunol, 1995. **154**(6): p. 2983-95.
54. Cunningham, M.W., et al., *Human monoclonal antibodies reactive with antigens of the group A Streptococcus and human heart*. J Immunol, 1988. **141**(8): p. 2760-6.
55. Ellis, N.M., et al., *T cell mimicry and epitope specificity of cross-reactive T cell clones from rheumatic heart disease*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 5448-56.
56. Nocton, J.J., et al., *Detection of Borrelia burgdorferi DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis*. N Engl J Med, 1994. **330**(4): p. 229-34.

57. Jun, H.S. and J.W. Yoon, *A new look at viruses in type 1 diabetes*. Diabetes Metab Res Rev, 2003. **19**(1): p. 8-31.
58. Richardson, S.J., et al., *The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes*. Diabetologia, 2009. **52**(6): p. 1143-51.
59. Lonrot, M., et al., *Enterovirus RNA in serum is a risk factor for beta-cell autoimmunity and clinical type 1 diabetes: a prospective study. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group*. J Med Virol, 2000. **61**(2): p. 214-20.
60. Pak, C.Y., et al., *Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes*. Lancet, 1988. **2**(8601): p. 1-4.
61. Burgess, M.A. and J.M. Forrest, *Congenital rubella and diabetes mellitus*. Diabetologia, 2009. **52**(2): p. 369-70; author reply 373.
62. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size*. Bmj, 1989. **299**(6710): p. 1259-60.
63. Calcinaro, F., et al., *Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse*. Diabetologia, 2005. **48**(8): p. 1565-75.
64. Raine, T., et al., *Salmonella typhimurium infection in nonobese diabetic mice generates immunomodulatory dendritic cells able to prevent type 1 diabetes*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2224-33.
65. Hypponen, E., et al., *Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study*. Lancet, 2001. **358**(9292): p. 1500-3.
66. Israni, N., et al., *Interaction of vitamin D receptor with HLA DRB1 0301 in type 1 diabetes patients from North India*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8023.
67. Bjorses, P., et al., *Gene defect behind APECED: a new clue to autoimmunity*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(10): p. 1547-53.
68. Liston, A., et al., *Aire regulates negative selection of organ-specific T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 350-4.
69. Waterfield, M. and M.S. Anderson, *Clues to immune tolerance: the monogenic autoimmune syndromes*. Ann N Y Acad Sci. **1214**: p. 138-55.
70. Riordan, J.R., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1066-73.
71. Encinas, J.A. and V.K. Kuchroo, *Mapping and identification of autoimmunity genes*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(6): p. 691-7.
72. Kruglyak, L. and D.A. Nickerson, *Variation is the spice of life*. Nat Genet, 2001. **27**(3): p. 234-6.

73. *The International HapMap Project*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 789-96.
74. Barrett, J.C., et al., *Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes*. Nat Genet, 2009. **41**(6): p. 703-7.
75. Manolio, T.A., *Genomewide association studies and assessment of the risk of disease*. N Engl J Med. **363**(2): p. 166-76.
76. Brorsson, C., et al., *Identification of T1D susceptibility genes within the MHC region by combining protein interaction networks and SNP genotyping data*. Diabetes Obes Metab, 2009. **11 Suppl 1**: p. 60-6.
77. Davies, J.L., et al., *A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes*. Nature, 1994. **371**(6493): p. 130-6.
78. Goldsby, R.A., et al., *Kuby immunology*. 4th ed2000, New York: W.H. Freeman. xxv, 670 p.
79. She, J.X., *Susceptibility to type 1 diabetes: HLA-DQ and DR revisited*. Immunol Today, 1996. **17**(7): p. 323-9.
80. Ettinger, R.A., et al., *Allelic variation in key peptide-binding pockets discriminates between closely related diabetes-protective and diabetes-susceptible HLA-DQB1*06 alleles*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1988-98.
81. Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth, *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. Nature. **464**(7293): p. 1293-300.
82. Aly, T.A., et al., *Extreme genetic risk for type 1A diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(38): p. 14074-9.
83. Steck, A.K. and M.J. Rewers, *Genetics of type 1 diabetes*. Clin Chem. **57**(2): p. 176-85.
84. Barker, J.M., et al., *Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY)*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(8): p. 3896-902.
85. Todd, J.A., J.I. Bell, and H.O. McDavitt, *HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus*. Nature, 1987. **329**(6140): p. 599-604.
86. Ettinger, R.A., et al., *Beta 57-Asp plays an essential role in the unique SDS stability of HLA-DQA1*0102/DQB1*0602 alpha beta protein dimer, the class II MHC allele associated with protection from insulin-dependent diabetes mellitus*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3232-8.
87. Ettinger, R.A., et al., *Exceptional stability of the HLA-DQA1*0102/DQB1*0602 alpha beta protein dimer, the class II MHC molecule associated with protection from insulin-dependent diabetes mellitus*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6439-45.

88. Lee, K.H., K.W. Wucherpfennig, and D.C. Wiley, *Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(6): p. 501-7.
89. Easteal, S., et al., *HLA-DP variation as additional risk factor in IDDM*. *Diabetes*, 1990. **39**(7): p. 855-7.
90. Noble, J.A., et al., *The HLA class II locus DPB1 can influence susceptibility to type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2000. **49**(1): p. 121-5.
91. Noble, J.A., A.S. Cavalli, and H.A. Erlich, *DPB1*5901a: a novel HLA-DPB1 allele from a Caucasian family with insulin-dependent diabetes mellitus*. *Tissue Antigens*, 1996. **47**(2): p. 159-62.
92. Bugawan, T.L., et al., *The association of specific HLA class I and II alleles with type 1 diabetes among Filipinos*. *Tissue Antigens*, 2002. **59**(6): p. 452-69.
93. Howson, J.M., et al., *Confirmation of HLA class II independent type 1 diabetes associations in the major histocompatibility complex including HLA-B and HLA-A*. *Diabetes Obes Metab*, 2009. **11 Suppl 1**: p. 31-45.
94. Nejentsev, S., et al., *Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A*. *Nature*, 2007. **450**(7171): p. 887-92.
95. Noble, J.A., et al., *The HLA class I A locus affects susceptibility to type 1 diabetes*. *Hum Immunol*, 2002. **63**(8): p. 657-64.
96. Ouyang, Q., et al., *Recognition of HLA class I-restricted beta-cell epitopes in type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2006. **55**(11): p. 3068-74.
97. Lhotta, K., et al., *Polymorphism of complement C4 and susceptibility to IDDM and microvascular complications*. *Diabetes Care*, 1996. **19**(1): p. 53-5.
98. Valdes, A.M. and G. Thomson, *Several loci in the HLA class III region are associated with T1D risk after adjusting for DRB1-DQB1*. *Diabetes Obes Metab*, 2009. **11 Suppl 1**: p. 46-52.
99. Valdes, A.M., et al., *Extended DR3-D6S273-HLA-B haplotypes are associated with increased susceptibility to type 1 diabetes in US Caucasians*. *Tissue Antigens*, 2005. **65**(1): p. 115-9.
100. el-Nawawy, A., et al., *Interleukin-1-beta, tumor necrosis factor-alpha, insulin secretion and oral glucose tolerance in non-diabetic siblings of children with IDDM*. *Indian J Pediatr*, 1998. **65**(3): p. 455-60.
101. van der Linden, M.W., et al., *Six microsatellite markers on the short arm of chromosome 6 in relation to HLA-DR3 and TNF-308A in systemic lupus erythematosus*. *Genes Immun*, 2001. **2**(7): p. 373-80.

102. Bell, G.I., S. Horita, and J.H. Karam, *A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus*. *Diabetes*, 1984. **33**(2): p. 176-83.
103. Bennett, S.T., et al., *Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus*. *Nat Genet*, 1995. **9**(3): p. 284-92.
104. Sabater, L., et al., *Insulin alleles and autoimmune regulator (AIRE) gene expression both influence insulin expression in the thymus*. *J Autoimmun*, 2005. **25**(4): p. 312-8.
105. Pugliese, A., et al., *The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes*. *Nat Genet*, 1997. **15**(3): p. 293-7.
106. Vafiadis, P., et al., *Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus*. *Nat Genet*, 1997. **15**(3): p. 289-92.
107. Walter, M., et al., *IDDM2/insulin VNTR modifies risk conferred by IDDM1/HLA for development of Type 1 diabetes and associated autoimmunity*. *Diabetologia*, 2003. **46**(5): p. 712-20.
108. Bottini, N., et al., *A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes*. *Nat Genet*, 2004. **36**(4): p. 337-8.
109. Vang, T., et al., *Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant*. *Nat Genet*, 2005. **37**(12): p. 1317-9.
110. Mustelin, T., T. Vang, and N. Bottini, *Protein tyrosine phosphatases and the immune response*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(1): p. 43-57.
111. Kordonouri, O., et al., *PTPN22 1858T allele is associated with younger age at onset of type 1 diabetes and is not related to subsequent thyroid autoimmunity*. *Hum Immunol*. **71**(7): p. 731-2.
112. Todd, J.A. and M. Farrall, *Panning for gold: genome-wide scanning for linkage in type 1 diabetes*. *Hum Mol Genet*, 1996. **5 Spec No**: p. 1443-8.
113. Ihara, K., et al., *Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with type 1 diabetes in the Japanese population*. *Immunogenetics*, 2001. **53**(6): p. 447-54.
114. Douroudis, K., et al., *Association of CTLA4 but not ICOS polymorphisms with type 1 diabetes in two populations with different disease rates*. *Hum Immunol*, 2009. **70**(7): p. 536-9.
115. Wood, J.P., et al., *A recently described polymorphism in the CD28 gene on chromosome 2q33 is not associated with susceptibility to type 1 diabetes*. *Eur J Immunogenet*, 2002. **29**(4): p. 347-9.

116. Ueda, H., et al., *Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease*. Nature, 2003. **423**(6939): p. 506-11.
117. Vella, A., et al., *Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms*. Am J Hum Genet, 2005. **76**(5): p. 773-9.
118. Lowe, C.E., et al., *Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes*. Nat Genet, 2007. **39**(9): p. 1074-82.
119. Qu, H.Q., et al., *The type 1 diabetes association of the IL2RA locus*. Genes Immun, 2009. **10 Suppl 1**: p. S42-8.
120. Long, S.A., et al., *Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects*. Diabetes. **59**(2): p. 407-15.
121. Todd, J.A., *Etiology of type 1 diabetes*. Immunity. **32**(4): p. 457-67.
122. T1Dbase, *T1Dbase*.
123. Zhang, F., et al., *Copy number variation in human health, disease, and evolution*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2009. **10**: p. 451-81.
124. Craddock, N., et al., *Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls*. Nature. **464**(7289): p. 713-20.
125. MacFarlane, A.J., A. Strom, and F.W. Scott, *Epigenetics: deciphering how environmental factors may modify autoimmune type 1 diabetes*. Mamm Genome, 2009. **20**(9-10): p. 624-32.
126. Bell, C.G., et al., *Genome-wide DNA methylation analysis for diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus*. BMC Med Genomics. **3**: p. 33.
127. Rees, D.A. and J.C. Alcolado, *Animal models of diabetes mellitus*. Diabet Med, 2005. **22**(4): p. 359-70.
128. Chappel, C.I. and W.R. Chappel, *The discovery and development of the BB rat colony: an animal model of spontaneous diabetes mellitus*. Metabolism, 1983. **32**(7 Suppl 1): p. 8-10.
129. Nakhoda, A.F., et al., *The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies*. Diabetes, 1977. **26**(2): p. 100-12.
130. Castano, L. and G.S. Eisenbarth, *Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat*. Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 647-79.
131. Colle, E., et al., *Spontaneous diabetes mellitus syndrome in the rat. IV. Immunogenetic interactions of MHC and non-MHC components of the syndrome*. Metabolism, 1983. **32**(7 Suppl 1): p. 54-61.

132. Naji, A., et al., *Spontaneous diabetes in rats: destruction of islets is prevented by immunological tolerance*. Science, 1981. **213**(4514): p. 1390-2.
133. Yale, J.F. and E.B. Marliss, *Altered immunity and diabetes in the BB rat*. Clin Exp Immunol, 1984. **57**(1): p. 1-11.
134. Makino, S., et al., *Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice*. Jikken Dobutsu, 1980. **29**(1): p. 1-13.
135. Anderson, M.S. and J.A. Bluestone, *The NOD mouse: a model of immune dysregulation*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 447-85.
136. Hattori, M., et al., *The NOD mouse: recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex*. Science, 1986. **231**(4739): p. 733-5.
137. Prochazka, M., et al., *Three recessive loci required for insulin-dependent diabetes in nonobese diabetic mice*. Science, 1987. **237**(4812): p. 286-9.
138. Wicker, L.S., J.A. Todd, and L.B. Peterson, *Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 179-200.
139. Singh, B., et al., *Role of the first external domain of I-A beta chain in immune responses and diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice*. J Autoimmun, 1990. **3**(5): p. 507-21.
140. Acha-Orbea, H. and H.O. McDevitt, *The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(8): p. 2435-9.
141. Kanagawa, O., et al., *Autoreactivity of T cells from nonobese diabetic mice: an I-Ag7-dependent reaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1721-4.
142. Vijaykrishnan, L., et al., *An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells*. Immunity, 2004. **20**(5): p. 563-75.
143. Wicker, L.S., et al., *Fine mapping, gene content, comparative sequencing, and expression analyses support Ctla4 and Nramp1 as candidates for Idd5.1 and Idd5.2 in the nonobese diabetic mouse*. J Immunol, 2004. **173**(1): p. 164-73.
144. Wicker, L.S., et al., *Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice*. J Autoimmun, 2005. **25 Suppl**: p. 29-33.
145. Yamanouchi, J., et al., *Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity*. Nat Genet, 2007. **39**(3): p. 329-37.
146. Dendrou, C.A. and L.S. Wicker, *The IL-2/CD25 pathway determines susceptibility to T1D in humans and NOD mice*. J Clin Immunol, 2008. **28**(6): p. 685-96.
147. Sgouroudis, E., M. Kornete, and C.A. Piccirillo, *IL-2 production by dendritic cells promotes Foxp3(+) regulatory T-cell expansion in autoimmune-resistant NOD congenic mice*. Autoimmunity.

148. Tracy, S., et al., *Enteroviruses, type 1 diabetes and hygiene: a complex relationship*. Rev Med Virol. **20**(2): p. 106-16.
149. Drescher, K.M., et al., *Coxsackievirus B3 infection and type 1 diabetes development in NOD mice: insulinitis determines susceptibility of pancreatic islets to virus infection*. Virology, 2004. **329**(2): p. 381-94.
150. Filippi, C.M., et al., *Immunoregulatory mechanisms triggered by viral infections protect from type 1 diabetes in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1515-23.
151. Hoorfar, J., K. Buschard, and F. Dagnaes-Hansen, *Prophylactic nutritional modification of the incidence of diabetes in autoimmune non-obese diabetic (NOD) mice*. Br J Nutr, 1993. **69**(2): p. 597-607.
152. Mueller, D.B., et al., *Influence of early nutritional components on the development of murine autoimmune diabetes*. Ann Nutr Metab, 2009. **54**(3): p. 208-17.
153. Schmid, S., et al., *Delayed exposure to wheat and barley proteins reduces diabetes incidence in non-obese diabetic mice*. Clin Immunol, 2004. **111**(1): p. 108-18.
154. Giulietti, A., et al., *Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice*. Diabetologia, 2004. **47**(3): p. 451-62.
155. Driver, J.P., et al., *Comparative therapeutic effects of orally administered 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and 1alpha-hydroxyvitamin D(3) on type-1 diabetes in non-obese diabetic mice fed a normal-calcaemic diet*. Clin Exp Immunol, 2008. **151**(1): p. 76-85.
156. Roep, B.O., *Are insights gained from NOD mice sufficient to guide clinical translation? Another inconvenient truth*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1103**: p. 1-10.
157. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*. Diabetologia, 2008. **51**(2): p. 216-26.
158. Elsner, M., E. Gurgul-Convey, and S. Lenzen, *Relation between triketone structure, generation of reactive oxygen species, and selective toxicity of the diabetogenic agent alloxan*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(4): p. 691-9.
159. Bennett, R.A. and A.E. Pegg, *Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin*. Cancer Res, 1981. **41**(7): p. 2786-90.
160. Hawthorne, W.J., et al., *Subcapsular fetal pig pancreas fragment transplantation provides normal blood glucose control in a preclinical model of diabetes*. Transplantation. **91**(5): p. 515-21.
161. Guberski, D.L., et al., *Induction of type I diabetes by Kilham's rat virus in diabetes-resistant BB/Wor rats*. Science, 1991. **254**(5034): p. 1010-3.
162. Ellerman, K.E., et al., *Kilham rat triggers T-cell-dependent autoimmune diabetes in multiple strains of rat*. Diabetes, 1996. **45**(5): p. 557-62.

163. Craighead, J.E. and M.F. McLane, *Diabetes mellitus: induction in mice by encephalomyocarditis virus*. Science, 1968. **162**(856): p. 913-4.
164. Craighead, J.E., R.E. Kanich, and J.B. Kessler, *Lesions of the islets of Langerhans in encephalomyocarditis virus-infected mice with diabetes mellitus-like disease. I. Acute lesions*. Am J Pathol, 1974. **74**(2): p. 287-300.
165. Wicker, L.S., et al., *Autoimmune syndromes in major histocompatibility complex (MHC) congenic strains of nonobese diabetic (NOD) mice. The NOD MHC is dominant for insulinitis and cyclophosphamide-induced diabetes*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 67-77.
166. Todd, J.A., et al., *Genetic analysis of autoimmune type 1 diabetes mellitus in mice*. Nature, 1991. **351**(6327): p. 542-7.
167. Ikegami, H., et al., *Identification of a new susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus by ancestral haplotype congenic mapping*. J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 1936-42.
168. Babaya, N., et al., *Sequence analysis of Tnf as a candidate for Idd16*. Autoimmunity, 2002. **35**(1): p. 63-6.
169. Fujisawa, T., et al., *MHC-linked susceptibility to type 1 diabetes in the NOD mouse: further localization of Idd16 by subcongenic analysis*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1079**: p. 118-21.
170. Hiromine, Y., et al., *Congenic mapping of the MHC-linked susceptibility to type 1 diabetes in the NOD mouse: at least two genes contribute to the Idd16 effect*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1150**: p. 90-2.
171. Serreze, D.V., et al., *Through regulation of TCR expression levels, an Idd7 region gene(s) interactively contributes to the impaired thymic deletion of autoreactive diabetogenic CD8+ T cells in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3250-9.
172. Silveira, P.A., et al., *Genes within the Idd5 and Idd9/11 diabetes susceptibility loci affect the pathogenic activity of B cells in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7033-41.
173. Lyons, P.A., et al., *The NOD Idd9 genetic interval influences the pathogenicity of insulinitis and contains molecular variants of Cd30, Tnfr2, and Cd137*. Immunity, 2000. **13**(1): p. 107-15.
174. Robles, D.T., et al., *Insulin autoantibodies are associated with islet inflammation but not always related to diabetes progression in NOD congenic mice*. Diabetes, 2003. **52**(3): p. 882-6.
175. Serreze, D.V., et al., *Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1553-8.

176. Prochazka, M., et al., *NOR/Lt mice: MHC-matched diabetes-resistant control strain for NOD mice*. Diabetes, 1992. **41**(1): p. 98-106.
177. Fox, C.J., et al., *Two genetic loci regulate T cell-dependent islet inflammation and drive autoimmune diabetes pathogenesis*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(1): p. 67-81.
178. Thomas, H.E., et al., *IL-1 receptor deficiency slows progression to diabetes in the NOD mouse*. Diabetes, 2004. **53**(1): p. 113-21.
179. Ohmura, K., et al., *Variation in IL-1beta gene expression is a major determinant of genetic differences in arthritis aggressivity in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(35): p. 12489-94.
180. Liston, A., et al., *Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim*. Immunity, 2004. **21**(6): p. 817-30.
181. Serreze, D.V., et al., *Subcongenic analysis of the Idd13 locus in NOD/Lt mice: evidence for several susceptibility genes including a possible diabetogenic role for beta 2-microglobulin*. J Immunol, 1998. **160**(3): p. 1472-8.
182. Manis, J.P., *Knock out, knock in, knock down--genetically manipulated mice and the Nobel Prize*. N Engl J Med, 2007. **357**(24): p. 2426-9.
183. Shastry, B.S., *Gene disruption in mice: models of development and disease*. Mol Cell Biochem, 1998. **181**(1-2): p. 163-79.
184. Choi, Y.J., M.Y. Son, and P. Hastay, *One-step knockin for inducible expression in mouse embryonic stem cells*. Genesis.
185. Wang, B., et al., *Interleukin-4 deficiency does not exacerbate disease in NOD mice*. Diabetes, 1998. **47**(8): p. 1207-11.
186. Sutherland, A.P., et al., *Interleukin-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice*. Diabetes, 2009. **58**(5): p. 1144-55.
187. Kamanaka, M., et al., *Amino acid polymorphisms altering the glycosylation of IL-2 do not protect from type 1 diabetes in the NOD mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(27): p. 11236-40.
188. Lindberg, F.P., et al., *Rh-related antigen CD47 is the signal-transducer integrin-associated protein*. J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 1567-70.
189. Brown, E.J. and W.A. Frazier, *Integrin-associated protein (CD47) and its ligands*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(3): p. 130-5.
190. Kosfeld, M.D. and W.A. Frazier, *Identification of a new cell adhesion motif in two homologous peptides from the COOH-terminal cell binding domain of human thrombospondin*. J Biol Chem, 1993. **268**(12): p. 8808-14.

191. Gao, A.G. and W.A. Frazier, *Identification of a receptor candidate for the carboxyl-terminal cell binding domain of thrombospondins*. J Biol Chem, 1994. **269**(47): p. 29650-7.
192. Gao, A.G., et al., *Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 21-4.
193. Isenberg, J.S., et al., *CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26069-80.
194. Chung, J., A.G. Gao, and W.A. Frazier, *Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin alphaIIb beta3*. J Biol Chem, 1997. **272**(23): p. 14740-6.
195. Barclay, A.N. and M.H. Brown, *The SIRP family of receptors and immune regulation*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 457-64.
196. Matozaki, T., et al., *Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(2): p. 72-80.
197. Latour, S., et al., *Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2547-54.
198. Oldenburg, P.A., et al., *Role of CD47 as a marker of self on red blood cells*. Science, 2000. **288**(5473): p. 2051-4.
199. Oldenburg, P.A., et al., *Lethal autoimmune hemolytic anemia in CD47-deficient nonobese diabetic (NOD) mice*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3500-4.
200. Fortin, G., et al., *A role for CD47 in the development of experimental colitis mediated by SIRPalpha+CD103- dendritic cells*. J Exp Med, 2009. **206**(9): p. 1995-2011.
201. Tomizawa, T., et al., *Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis and impaired T cell priming by dendritic cells in Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 mutant mice*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 869-77.
202. Okuzawa, C., et al., *Resistance to collagen-induced arthritis in SHPS-1 mutant mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **371**(3): p. 561-6.
203. Dugas, V., et al., *Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes*. J Autoimmun. **35**(1): p. 23-32.
204. O'Brien, R.L., R.L. Brinster, and U. Storb, *Somatic hypermutation of an immunoglobulin transgene in kappa transgenic mice*. Nature, 1987. **326**(6111): p. 405-9.

205. Storb, U., *Transgenic mice with immunoglobulin genes*. *Annu Rev Immunol*, 1987. **5**: p. 151-74.
206. Hanahan, D., *Transgenic mouse models of self-tolerance and autoreactivity by the immune system*. *Annu Rev Cell Biol*, 1990. **6**: p. 493-537.
207. Le Meur, M., et al., *Correcting an immune-response deficiency by creating E alpha gene transgenic mice*. *Nature*, 1985. **316**(6023): p. 38-42.
208. Bieberich, C., et al., *Regulated expression of a murine class I gene in transgenic mice*. *Mol Cell Biol*, 1986. **6**(4): p. 1339-42.
209. van Ewijk, W., et al., *Compartmentalization of MHC class II gene expression in transgenic mice*. *Cell*, 1988. **53**(3): p. 357-70.
210. Teh, H.S., et al., *Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells*. *Nature*, 1988. **335**(6187): p. 229-33.
211. Kisielow, P., et al., *Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules*. *Nature*, 1988. **335**(6192): p. 730-3.
212. Ohashi, P.S., et al., *Ontogeny and selection of the T cell repertoire in transgenic mice*. *Semin Immunol*, 1989. **1**(2): p. 95-104.
213. Katz, J.D., et al., *Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis*. *Cell*, 1993. **74**(6): p. 1089-100.
214. Judkowski, V., et al., *Identification of MHC class II-restricted peptide ligands, including a glutamic acid decarboxylase 65 sequence, that stimulate diabetogenic T cells from transgenic BDC2.5 nonobese diabetic mice*. *J Immunol*, 2001. **166**(2): p. 908-17.
215. Dai, Y.D., et al., *A peptide of glutamic acid decarboxylase 65 can recruit and expand a diabetogenic T cell clone, BDC2.5, in the pancreas*. *J Immunol*, 2005. **175**(6): p. 3621-7.
216. Tisch, R., et al., *Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice*. *Nature*, 1993. **366**(6450): p. 72-5.
217. Baekkeskov, S., et al., *Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase*. *Nature*, 1990. **347**(6289): p. 151-6.
218. Nikoopour, E., et al., *Cutting edge: vasostatin-1-derived peptide ChgA29-42 is an antigenic epitope of diabetogenic BDC2.5 T cells in nonobese diabetic mice*. *J Immunol*, 2011. **186**(7): p. 3831-5.
219. Yang, Y. and P. Santamaria, *T-cell receptor-transgenic NOD mice: a reductionist approach to understand autoimmune diabetes*. *J Autoimmun*, 2004. **22**(2): p. 121-9.

220. Verdaguer, J., et al., *Spontaneous autoimmune diabetes in monoclonal T cell nonobese diabetic mice*. J Exp Med, 1997. **186**(10): p. 1663-76.
221. Ohashi, P.S., et al., *Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice*. Cell, 1991. **65**(2): p. 305-17.
222. Kurts, C., et al., *Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 923-30.
223. Ahmed, K.A., et al., *Acquired pMHC I complexes greatly enhance CD4(+) Th cell's stimulatory effect on CD8(+) T cell-mediated diabetes in transgenic RIP-mOVA mice*. Cell Mol Immunol, 2008. **5**(6): p. 407-15.
224. Allen, P.M. and E.R. Unanue, *Differential requirements for antigen processing by macrophages for lysozyme-specific T cell hybridomas*. J Immunol, 1984. **132**(3): p. 1077-9.
225. Nelson, C.A., et al., *Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-Ak*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7380-3.
226. Akkaraju, S., et al., *A range of CD4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis*. Immunity, 1997. **7**(2): p. 255-71.
227. Lesage, S., et al., *Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes*. J Exp Med, 2002. **196**(9): p. 1175-88.
228. Lundholm, M., et al., *Defective induction of CTLA-4 in the NOD mouse is controlled by the NOD allele of Idd3/IL-2 and a novel locus (Ctex) telomeric on chromosome 1*. Diabetes, 2006. **55**(2): p. 538-44.
229. Rolf, J., et al., *The enlarged population of marginal zone/CD1d(high) B lymphocytes in nonobese diabetic mice maps to diabetes susceptibility region Idd11*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4821-7.
230. Jiang, W., et al., *Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency*. J Exp Med, 2005. **202**(6): p. 805-15.
231. Irie, J., et al., *Genome-wide microarray expression analysis of CD4+ T Cells from nonobese diabetic congenic mice identifies Cd55 (Daf1) and Acadl as candidate genes for type 1 diabetes*. J Immunol, 2008. **180**(2): p. 1071-9.
232. Eaves, I.A., et al., *Combining mouse congenic strains and microarray gene expression analyses to study a complex trait: the NOD model of type 1 diabetes*. Genome Res, 2002. **12**(2): p. 232-43.
233. Cook, M.C., C.G. Vinuesa, and C.C. Goodnow, *ENU-mutagenesis: insight into immune function and pathology*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(5): p. 627-33.

234. Wicker, L.S., B.J. Miller, and Y. Mullen, *Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice*. Diabetes, 1986. **35**(8): p. 855-60.
235. Miller, B.J., et al., *Both the Lyt-2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 1988. **140**(1): p. 52-8.
236. Bendelac, A., et al., *Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells*. J Exp Med, 1987. **166**(4): p. 823-32.
237. Matsumoto, M., et al., *Transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to NOD athymic nude mice: the roles of T cell subsets in the pathogenesis*. Cell Immunol, 1993. **148**(1): p. 189-97.
238. Haskins, K., et al., *Pancreatic islet-specific T-cell clones from nonobese diabetic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(20): p. 8000-4.
239. Haskins, K. and M. McDuffie, *Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1433-6.
240. Graser, R.T., et al., *Identification of a CD8 T cell that can independently mediate autoimmune diabetes development in the complete absence of CD4 T cell helper functions*. J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3913-8.
241. Wong, F.S., et al., *CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells*. J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 67-76.
242. Wang, B., et al., *The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus*. Eur J Immunol, 1996. **26**(8): p. 1762-9.
243. Serreze, D.V., et al., *Initiation of autoimmune diabetes in NOD/Lt mice is MHC class I-dependent*. J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3978-86.
244. Groen, H., et al., *Temporary, but essential requirement of CD8+ T cells early in the pathogenesis of diabetes in BB rats as revealed by thymectomy and CD8 depletion*. Clin Dev Immunol, 2003. **10**(2-4): p. 141-51.
245. Like, A.A., et al., *Spontaneous diabetes mellitus: reversal and prevention in the BB/W rat with antiserum to rat lymphocytes*. Science, 1979. **206**(4425): p. 1421-3.
246. Herold, K.C., et al., *Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus*. N Engl J Med, 2002. **346**(22): p. 1692-8.
247. Giuliani, L., et al., *Detection of GAD65 autoreactive T-cells by HLA class I tetramers in type 1 diabetic patients*. J Biomed Biotechnol, 2009. **2009**: p. 576219.
248. Viglietta, V., et al., *GAD65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1a diabetes*. J Clin Invest, 2002. **109**(7): p. 895-903.

249. Forster, R., A.C. Davalos-Missslitz, and A. Rot, *CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 362-71.
250. Klein, L., et al., *Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(12): p. 833-44.
251. Anderson, G., P.J. Lane, and E.J. Jenkinson, *Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(12): p. 954-63.
252. Nakagawa, T., et al., *Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus*. Science, 1998. **280**(5362): p. 450-3.
253. Gommeaux, J., et al., *Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4+ thymocytes*. Eur J Immunol, 2009. **39**(4): p. 956-64.
254. Nedjic, J., et al., *Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance*. Nature, 2008. **455**(7211): p. 396-400.
255. Murata, S., et al., *Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes*. Science, 2007. **316**(5829): p. 1349-53.
256. Ladi, E., et al., *Thymocyte-dendritic cell interactions near sources of CCR7 ligands in the thymic cortex*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 7014-23.
257. Alam, S.M., et al., *T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection*. Nature, 1996. **381**(6583): p. 616-20.
258. Kwon, H., et al., *Development of autoreactive diabetogenic T cells in the thymus of NOD mice*. J Autoimmun, 2005. **24**(1): p. 11-23.
259. Hogquist, K.A., T.A. Baldwin, and S.C. Jameson, *Central tolerance: learning self-control in the thymus*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(10): p. 772-82.
260. Mathis, D. and C. Benoist, *Aire*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 287-312.
261. Zucchelli, S., et al., *Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 385-96.
262. Kishimoto, H. and J. Sprent, *A defect in central tolerance in NOD mice*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1025-31.
263. Bautista, J.L., et al., *Intraclonal competition limits the fate determination of regulatory T cells in the thymus*. Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 610-7.
264. Hogquist, K.A. and A.E. Moran, *Treg cells meet their limit*. Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 565-6.
265. Danke, N.A., et al., *Autoreactive T cells in healthy individuals*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 5967-72.
266. Collins, M., V. Ling, and B.M. Carreno, *The B7 family of immune-regulatory ligands*. Genome Biol, 2005. **6**(6): p. 223.

267. Kouki, T., et al., *CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6606-11.
268. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 295-302.
269. Grohmann, U., et al., *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1097-101.
270. Tang, Q., et al., *Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3348-52.
271. Yadav, D., et al., *Altered availability of PD-1/PD ligands is associated with the failure to control autoimmunity in NOD mice*. Cell Immunol, 2009. **258**(2): p. 161-71.
272. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
273. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
274. Sgouroudis, E., A. Albanese, and C.A. Piccirillo, *Impact of protective IL-2 allelic variants on CD4+ Foxp3+ regulatory T cell function in situ and resistance to autoimmune diabetes in NOD mice*. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 6283-92.
275. Brusko, T.M., et al., *Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1407-14.
276. Lindley, S., et al., *Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 92-9.
277. Shevach, E.M., *From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 195-201.
278. Cosmi, L., et al., *Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes*. Blood, 2003. **102**(12): p. 4107-14.
279. Ablamunits, V., B. Bisikirska, and K.C. Herold, *Acquisition of regulatory function by human CD8(+) T cells treated with anti-CD3 antibody requires TNF*. Eur J Immunol. **40**(10): p. 2891-901.
280. Kavousanaki, M., et al., *Novel role of plasmacytoid dendritic cells in humans: induction of interleukin-10-producing Treg cells by plasmacytoid dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis responding to therapy*. Arthritis Rheum. **62**(1): p. 53-63.

281. Magerus-Chatinet, A., et al., *FAS-L, IL-10, and double-negative CD4- CD8- TCR alpha/beta+ T cells are reliable markers of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) associated with FAS loss of function.* Blood, 2009. **113**(13): p. 3027-30.
282. Holzelova, E., et al., *Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations.* N Engl J Med, 2004. **351**(14): p. 1409-18.
283. Oliveira, J.B., et al., *Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop.* Blood. **116**(14): p. e35-40.
284. Lubinski, J.M., et al., *Double-negative (L3T4-, Lyl2-) thymocytes of autoimmune lpr/lpr mice are resistant to down-regulation of DNA synthesis by a thymic stromal cell product.* Cell Immunol, 1993. **150**(2): p. 425-38.
285. Bristeau-Leprince, A., et al., *Human TCR alpha/beta+ CD4-CD8- double-negative T cells in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome express restricted Vbeta TCR diversity and are clonally related to CD8+ T cells.* J Immunol, 2008. **181**(1): p. 440-8.
286. Trimble, L.A., et al., *Fas-dependent elimination of nonselected CD8 cells and lpr disease.* J Immunol, 2002. **168**(10): p. 4960-7.
287. Kinjyo, I., et al., *Cutting edge: Lymphoproliferation caused by Fas deficiency is dependent on the transcription factor eomesodermin.* J Immunol. **185**(12): p. 7151-5.
288. Stranges, P.B., et al., *Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity.* Immunity, 2007. **26**(5): p. 629-41.
289. Fischer, K., et al., *Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells.* Blood, 2005. **105**(7): p. 2828-35.
290. Zhang, Z.X., et al., *Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression.* Nat Med, 2000. **6**(7): p. 782-9.
291. Duncan, B., et al., *Double negative (CD3+ 4- 8-) TCR alphabeta splenic cells from young NOD mice provide long-lasting protection against type 1 diabetes.* PLoS One. **5**(7): p. e11427.
292. Voelkl, S., R. Gary, and A. Mackensen, *Characterization of the immunoregulatory function of human TCR-alpha/beta(+) CD4(-) CD8(-) double-negative T cells.* Eur J Immunol. **41**(3): p. 739-48.
293. Chen, W., et al., *Infusion of in vitro-generated DN T regulatory cells induces permanent cardiac allograft survival in mice.* Transplant Proc, 2003. **35**(7): p. 2479-80.

294. Chen, W., et al., *Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 1846-53.
295. Young, K.J., et al., *Antitumor activity mediated by double-negative T cells*. Cancer Res, 2003. **63**(22): p. 8014-21.
296. Young, K.J., et al., *Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 134-41.
297. Ford, M.S., et al., *Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development*. Eur J Immunol, 2007. **37**(8): p. 2234-41.
298. Zhang, Z.X., et al., *Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6920-9.
299. Chen, W., et al., *Donor lymphocyte infusion induces long-term donor-specific cardiac xenograft survival through activation of recipient double-negative regulatory T cells*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 3409-16.
300. Ford McIntyre, M.S., et al., *Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2271-5.
301. Voelkl, S., et al., *Characterization of MHC class-I restricted TCRalpha+ CD4-CD8- double negative T cells recognizing the gp100 antigen from a melanoma patient after gp100 vaccination*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(5): p. 709-18.
302. Komulainen, J., et al., *Poor beta-cell function after the clinical manifestation of type 1 diabetes in children initially positive for islet cell specific autoantibodies. The Childhood Diabetes in Finland Study Group*. Diabet Med, 1997. **14**(7): p. 532-7.
303. Ortqvist, E., et al., *Changes in GAD65Ab-specific antiidiotypic antibody levels correlate with changes in C-peptide levels and progression to islet cell autoimmunity*. J Clin Endocrinol Metab. **95**(11): p. E310-8.
304. Corte-Real, J., et al., *Autoimmunity triggers in the NOD mouse: a role for natural auto-antibody reactivities in type 1 diabetes*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1173**: p. 442-8.
305. Pescovitz, M.D., et al., *Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function*. N Engl J Med, 2009. **361**(22): p. 2143-52.
306. Noorchashm, H., et al., *I-Ag7-mediated antigen presentation by B lymphocytes is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet beta cells of nonobese diabetic mice*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 743-50.

307. Serreze, D.V., et al., *B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice.* J Immunol, 1998. **161**(8): p. 3912-8.
308. Wong, F.S., et al., *Investigation of the role of B-cells in type 1 diabetes in the NOD mouse.* Diabetes, 2004. **53**(10): p. 2581-7.
309. O'Neill, S.K., E. Liu, and J.C. Cambier, *Change you can B(cell)eive in: recent progress confirms a critical role for B cells in type 1 diabetes.* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2009. **16**(4): p. 293-8.
310. Falcone, M., et al., *B lymphocytes are crucial antigen-presenting cells in the pathogenic autoimmune response to GAD65 antigen in nonobese diabetic mice.* J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1163-8.
311. Linton, P.J., J. Harbertson, and L.M. Bradley, *A critical role for B cells in the development of memory CD4 cells.* J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5558-65.
312. Harris, D.P., et al., *Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells.* Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 475-82.
313. Silveira, P.A., et al., *The preferential ability of B lymphocytes to act as diabetogenic APC in NOD mice depends on expression of self-antigen-specific immunoglobulin receptors.* Eur J Immunol, 2002. **32**(12): p. 3657-66.
314. Halverson, R., R.M. Torres, and R. Pelanda, *Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens.* Nat Immunol, 2004. **5**(6): p. 645-50.
315. Goodnow, C.C., et al., *Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice.* Nature, 1988. **334**(6184): p. 676-82.
316. Sundstrom, M. and K. Lejon, *Idd-linked genetic regulation of TACI^{high} expressing B cells in NOD mice.* J Autoimmun, 2007. **29**(2-3): p. 116-24.
317. Turley, S., et al., *Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model.* J Exp Med, 2003. **198**(10): p. 1527-37.
318. Poligone, B., et al., *Elevated NF-kappaB activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function.* J Immunol, 2002. **168**(1): p. 188-96.
319. Steptoe, R.J., J.M. Ritchie, and L.C. Harrison, *Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice.* J Immunol, 2002. **168**(10): p. 5032-41.

320. Ohnmacht, C., et al., *Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity*. J Exp Med, 2009. **206**(3): p. 549-59.
321. Dahlen, E., et al., *Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3585-93.
322. Arnush, M., et al., *Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes*. J Immunol, 1998. **160**(6): p. 2684-91.
323. Hutchings, P., et al., *Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages*. Nature, 1990. **348**(6302): p. 639-42.
324. Uno, S., et al., *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, 2007. **50**(3): p. 596-601.
325. Lehuen, A., et al., *Immune cell crosstalk in type 1 diabetes*. Nat Rev Immunol. **10**(7): p. 501-13.
326. Ogasawara, K., et al., *Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice*. Immunity, 2003. **18**(1): p. 41-51.
327. Rodacki, M., et al., *Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients*. Diabetes, 2007. **56**(1): p. 177-85.
328. Ogasawara, K., et al., *NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice*. Immunity, 2004. **20**(6): p. 757-67.
329. Gur, C., et al., *The activating receptor Nkp46 is essential for the development of type 1 diabetes*. Nat Immunol. **11**(2): p. 121-8.
330. Hammond, K.J., et al., *alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10*. J Exp Med, 1998. **187**(7): p. 1047-56.
331. Lehuen, A., et al., *Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14-Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes*. J Exp Med, 1998. **188**(10): p. 1831-9.
332. Hegde, S., et al., *Autoreactive natural killer T cells: promoting immune protection and immune tolerance through varied interactions with myeloid antigen-presenting cells*. Immunology. **130**(4): p. 471-83.
333. Santamaria, P., *The long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes*. Immunity. **32**(4): p. 437-45.

334. Arrenberg, P., R. Halder, and V. Kumar, *Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens*. J Cell Physiol, 2009. **218**(2): p. 246-50.
335. Bendelac, A., P.B. Savage, and L. Teyton, *The biology of NKT cells*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 297-336.
336. Bruno, L., H.J. Fehling, and H. von Boehmer, *The alpha beta T cell receptor can replace the gamma delta receptor in the development of gamma delta lineage cells*. Immunity, 1996. **5**(4): p. 343-52.
337. Nicholson, L.B., A.C. Anderson, and V.K. Kuchroo, *Tuning T cell activation threshold and effector function with cross-reactive peptide ligands*. Int Immunol, 2000. **12**(2): p. 205-13.
338. Illes, Z., et al., *Modulation of CD4 co-receptor limits spontaneous autoimmunity when high-affinity transgenic TCR specific for self-antigen is expressed on a genetically resistant background*. Int Immunol, 2007. **19**(10): p. 1235-48.
339. Gottschalk, R.A., E. Corse, and J.P. Allison, *TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo*. J Exp Med, 2010. **207**(8): p. 1701-11.
340. Wilson, A., et al., *Subpopulations of mature murine thymocytes: properties of CD4-CD8+ and CD4+CD8- thymocytes lacking the heat-stable antigen*. Cell Immunol, 1988. **117**(2): p. 312-26.
341. Agus, D.B., C.D. Surh, and J. Sprent, *Reentry of T cells to the adult thymus is restricted to activated T cells*. J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1039-46.
342. Hale, J.S. and P.J. Fink, *Back to the thymus: peripheral T cells come home*. Immunol Cell Biol, 2009. **87**(1): p. 58-64.
343. Edelmann, S.L., P. Marconi, and T. Brocker, *Peripheral T cells re-enter the thymus and interfere with central tolerance induction*. J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5612-9.
344. Baldwin, T.A., et al., *The timing of TCR alpha expression critically influences T cell development and selection*. J Exp Med, 2005. **202**(1): p. 111-21.
345. Wang, R., Y. Wang-Zhu, and H. Grey, *Interactions between double positive thymocytes and high affinity ligands presented by cortical epithelial cells generate double negative thymocytes with T cell regulatory activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 2181-6.
346. Lei, Y., et al., *Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development*. J Exp Med, 2011. **208**(2): p. 383-94.

347. Guimont-Desrochers, F., et al., *Absence of CD47 in vivo influences thymic dendritic cell subset proportions but not negative selection of thymocytes*. *Int Immunol*, 2009. **21**(2): p. 167-77.
348. Van Laethem, F., et al., *Deletion of CD4 and CD8 coreceptors permits generation of alphabetaT cells that recognize antigens independently of the MHC*. *Immunity*, 2007. **27**(5): p. 735-50.
349. Hillhouse, E.E., et al., *Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice*. *Immunol Cell Biol*, 2010. **88**(8): p. 771-80.
350. Goodnow, C.C., et al., *Control systems and decision making for antibody production*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(8): p. 681-8.
351. Riley, J.L., C.H. June, and B.R. Blazar, *Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning*. *Immunity*, 2009. **30**(5): p. 656-65.
352. Safinia, N., et al., *Adoptive regulatory T cell therapy: challenges in clinical transplantation*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2010. **15**(4): p. 427-34.
353. Wong, M.S., W.J. Hawthorne, and N. Manolios, *Gene therapy in diabetes*. *Self Nonsel*, 2010. **1**(3): p. 165-175.
354. DeMatteo, R.P., et al., *Gene transfer to the thymus. A means of abrogating the immune response to recombinant adenovirus*. *Ann Surg*, 1995. **222**(3): p. 229-39; discussion 239-42.
355. Creusot, R.J., et al., *Tissue-targeted therapy of autoimmune diabetes using dendritic cells transduced to express IL-4 in NOD mice*. *Clin Immunol*, 2008. **127**(2): p. 176-87.
356. Hagnerud, S., et al., *Deficit of CD47 results in a defect of marginal zone dendritic cells, blunted immune response to particulate antigen and impairment of skin dendritic cell migration*. *J Immunol*, 2006. **176**(10): p. 5772-8.
357. Van, V.Q., et al., *Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs*. *EMBO J*, 2006. **25**(23): p. 5560-8.
358. Serreze, D.V., J.W. Gaedeke, and E.H. Leiter, *Hematopoietic stem-cell defects underlying abnormal macrophage development and maturation in NOD/Lt mice: defective regulation of cytokine receptors and protein kinase C*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(20): p. 9625-9.
359. Rigby, R.J., et al., *New loci from New Zealand Black and New Zealand White mice on chromosomes 4 and 12 contribute to lupus-like disease in the context of BALB/c*. *J Immunol*, 2004. **172**(7): p. 4609-17.

360. Rigby, R.J., et al., *A novel locus regulates both retroviral glycoprotein 70 and anti-glycoprotein 70 antibody production in New Zealand mice when crossed with BALB/c*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 5078-85.

ANNEXE 1

Transmitting Editor: Dr. Alfred Singer

Title: Absence of CD47 *in vivo* influences thymic dendritic cell subset proportions but not negative selection of thymocytes.

Fanny Guimont-Desrochers^{1,2}, Claudine Beauchamp^{1,2}, Geneviève Chabot-Roy¹,
Véronique Dugas^{1,2}, Erin E. Hillhouse^{1,2}, Julie Dusseault^{1,3}, Geneviève Langlois^{1,3}, Patrick
Gautier-Ethier^{3,4}, Jinane Darwiche^{2,4}, Marika Sarfati^{3,4}, Sylvie Lesage^{1,2}

1 Maisonneuve-Rosemont Hospital, Research Center

2. Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal

3. Department of Medicine, University of Montreal

4. CHUM Research Center

Running Head: Thymic DC alterations in CD47-deficient mice

Pages: 33

Figures (8), Tables (1)

F.G.D. and C.B. contributed equally

KEYWORDS: T cells, DC subsets, CD172a

Abbreviations: DC, dendritic cell; RIP, rat-insulin promoter; HEL, hen egg lysozyme; idd, insulin-dependent diabetes; OVA, ovalbumin.

Abstract

CD47 is a ubiquitously expressed molecule which has been attributed a role in many cellular processes. Its role in preventing cellular phagocytosis has defined CD47 as an obligatory self-molecule providing a “don’t-eat-me-signal”. Additionally, CD47-CD172a interactions are important for cellular trafficking. Yet, the contribution of CD47 to T cell stimulation remains controversial, acting sometimes as a co-stimulator, sometimes as an inhibitor of TCR signalling or peripheral T cell responses. Most of the experiments leading to this controversy have been carried in *in vitro* systems. Moreover, the role of CD47 on thymocyte differentiation, which precisely relies on TCR signal strength, has not been evaluated. Here, we examine the *in vivo* role of CD47 in T cell differentiation using CD47-deficient mice. We find that, in the absence of CD47, thymocyte positive and negative selection processes are not altered. Indeed, our data demonstrates that the absence of CD47 does not influence the strength of TCR signalling in thymocytes. Furthermore, in agreement with a role for CD47-CD172a interactions in CD172a⁺ dendritic cell migration, we report a reduced proportion of thymic dendritic cells expressing CD172a in CD47-deficient mice. As the total proportion of dendritic cells is maintained, this creates an imbalance in the proportion of CD172a⁺ and CD172a^{low} dendritic cells in the thymus. Together, these data indicate that the altered proportion of thymic dendritic cell subsets does not have a primordial influence on thymic selection processes.

Introduction

The role of the thymus is to allow differentiation of useful T cells while eliminating potentially auto-reactive cells (1). To achieve this task, production of mature T cells must follow intricate selection events. Immature T cells undergo rapid proliferation and extensive apoptosis. Thymus integrity thus relies on efficient phagocytosis. In addition, T cell maturation relies on efficient movement/migration of cells within the thymus (2). One molecule shown to impact on phagocytosis, cell death and migration is CD47 (3,4). CD47 is ubiquitously expressed while CD172a, its cellular ligand, is limited to neuronal tissues and cells of the myeloid lineage, including phagocytes such as macrophages (5).

The mechanism by which CD47 facilitates phagocytosis of apoptotic cells has been recently described (6). Upon receiving apoptotic signals, CD47 is redistributed on the cell surface, resulting in decreased interactions with CD172a on the phagocytes. Importantly, CD47-CD172a interactions actively inhibit phagocytosis through the intracellular activation of SHP molecules binding to CD172a (7). The decreased SHP signal allows efficient signalling of calreticulin on the apoptotic cell through LDL-receptor-related protein on the phagocyte. These findings provide a rationale to the observation that CD47-deficient cells are rapidly phagocytosed when placed in the context of CD47-sufficient cells (8). Hence, CD47 has been described as a self-ligand (9). This feature unfortunately precludes the generation of bone marrow chimeras, where CD47-deficient bone marrow is used to reconstitute a CD47-sufficient host (8,10). Of note, within the CD47-deficient mice, compensatory mechanisms are present to prevent constant phagocytosis of all cells; otherwise these mice would not be viable.

CD47 ligation has also been shown to directly induce cell death both *in vitro* (3) and *in vivo* (11,12). For instance, cross-linking of CD47 induces cell death in T cells, B cells and B chronic-lymphoid-leukemia (13-15). Moreover, CD47 facilitates CD95-induced apoptosis in T cells (16). Interestingly, negative selection of thymocytes, which induces the apoptotic elimination of potentially auto-reactive T cells, is also dependent on CD95 ligation (17).

However, ligation of CD47 does not always result in cell death. Some have shown that it promotes (18-21), while others demonstrate that it can also inhibit (22,23), T cell activation. Indeed, it has been suggested that the outcome of CD47 ligation depends on the epitope bound by CD47 antibody (3) or the integrin associated to the CD47 molecule (23). Consequently, the physiological role of CD47 *in vivo* in relation to its ability to induce T cell apoptosis/proliferation is still subject to debate. Interestingly, in CD47-deficient mice, there is a reduced proportion of peripheral T cells, suggesting that CD47 interferes with T cell homeostasis (24,25).

Finally, CD47 has been implicated in the migration of CD172a⁺ myeloid-derived cells (5). Indeed, we and others have recently demonstrated that migration of CD172a⁺ dendritic cells (DC) to secondary lymphoid organs is impaired in the absence of CD47 (26,27). This results in an altered balance of DC subsets with a decreased proportion of CD11c⁺CD172a⁺ DC in secondary lymphoid organs.

Herein, we take advantage of the CD47-deficient mouse model to examine the contribution of this molecule in T cell differentiation. We unexpectedly find that CD47 does not alter T cell differentiation, despite its described role in phagocytosis, cell death and co-stimulation. However, our results suggest that CD47-CD172a interactions contribute to the migration of CD172a⁺ DC to the thymus. CD47-deficient mice may thus help unravel the role of various DC subsets in the thymus and suggests that an altered proportion in DC subtypes has little bearing on thymic selection processes.

Methods

Mice

CD47-deficient mice, provided by Dr. Oldenborg, were backcrossed 18 generations on BALB/c background. BALB/c and DO11.10 mice were obtained from Jackson Labs. CD47 mutation was bred onto the DO11.10 transgenic mice at the CHUM SPF facility. TCR 3A9 and rat-insulin promoter (RIP)-driven hen egg lysozyme (HEL) transgenic expression (28) were backcrossed 6 to 8 generations to CD47-deficient BALB/c mice, while maintaining the H2^k locus. By PCR reaction, we verified that major insulin-dependent diabetes (idd) loci were of BALB/c origin in the transgenic backcrossed mice. All mice were used between 5 and 12 weeks of age. The 3A9 TCR and RIP-HEL transgenic mice were maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital (MRH) SPF housing facility. Studies were approved by the CHUM and MRH ethics committee.

Cellular preparation

Thymi were harvested and passed through a fine nylon mesh (BD BioSciences, Mississauga, Canada) or, for DC preparation, they were treated with 1mg/ml of collagenase V (Sigma, St-Louis, USA), incubated 15 minutes at 37°C, passed through a fine nylon mesh and washed with cold RPMI 1640 10% FCS. Embryonic thymi were collected on days 15 to 19 of gestation. Each embryo was genotyped by PCR and livers were stained for CD47 to determine the phenotype. Wild-type mice (CD47⁺ staining, neomycin⁻ PCR) were compared to heterozygous mutants (CD47⁺ staining, neomycin⁺ PCR) and CD47-deficient littermates (CD47⁻ staining, neomycin⁺ PCR).

Histology

Thymi from 6-week old mice were fixed in formaldehyde, mounted in paraffin and stained for H&E. The images were acquired using a Nikon microscope (100X) and analyzed using MetaMorph software (Molecular Devices, Downingtown, USA). For TUNEL (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland), 3µm thick sections were cut and placed on Probe-on Plus

microscope slides (ThermoFisher, Nepean, Canada). dUTP labelling of DNA strand breaks was visualized using a Leica DMRE microscope.

Detection of thymocyte proliferation

BALB/c and CD47-deficient mice were injected i.p. with 1 mg of BrdU (BD Biosciences, Mississauga, Canada). 2 hours later they were sacrificed and thymocytes were stained with anti-BrdU according to manufacturer's instructions (BD Biosciences, Mississauga, Canada).

Activation of thymocytes

Home-made anti-TCR antibody (clone H57-597), anti-CD28 (clone 37.51, 10 μ g/ml) and anti-CD47 (miap301, 10 μ g/ml from BD Biosciences, Mississauga, Canada) were coated in 96-well plates as previously described (29). Thymocytes were incubated at 5x10⁵ cells/well for 16h prior to staining.

In vivo thymic deletion

BALB/c and CD47-deficient mice were injected i.p. with 500 μ g anti-TCR H57-597 and thymi were examined 6h later for expression of various cell surface markers. DO11.10 transgenic BALB/c and CD47-deficient mice were injected i.p. with 10mg ovalbumin (OVA) (Sigma, St-Louis, USA) and CD69 expression was assessed on various thymocyte subsets 16h later.

Flow cytometry

Cells were stained at 10⁶ cells/50 μ l in PBS containing 10%FCS, 0.01% NaN₃. Antibodies were purchased from Biolegend (San Diego, CA), except for anti-CD172a, anti-caspase-3 and anti-Bcl-2 (BD Biosciences, Mississauga, Canada). TUNEL detection was performed using APO-Direct™ according to manufacturer's instructions (BD Biosciences, Mississauga, Canada). Cells were acquired using a FACS Calibur (BD, Oakville, Canada) and analyzed with FlowJo (Tree Star, Ashland, USA) or CellQuest (BD, Oakville, Canada) softwares.

Statistics

Unless otherwise noted, a paired two-tailed student T test was performed.

Results

T cell differentiation in CD47-deficient mice

Immature T cell differentiation in the thymus is characterized by the expression profile of CD4 and CD8 molecules. We thus compared the profiles from the thymus of wild-type and CD47-deficient mice (Figure 1a). CD47-deficient mice showed a slightly reduced proportion of CD4⁺CD8⁺ cells and an equal and opposite increase in the CD4⁺CD8⁻ compartment. Further characterization of the CD4⁻CD8⁻ compartment, using CD44 and CD25 to differentiate DN1 to DN4 populations (30), reflected a small decrease in the CD44⁻CD25⁺ DN3 compartment. A compilation of the results demonstrates that these differences are reproducible and statistically significant (Figure 1b and c). Although these differences were found to be highly reproducible, they did not compare to the striking two-fold reduction in thymic cellularity of CD47-deficient thymi (Table 1). Moreover, histology sections showed an altered thymic architecture in CD47-deficient mice, where the cortico-medullary junction is blurred and the medulla is spotted with thymocyte-dense regions (Figure 2). Together, these observations suggest a potential defect in thymocyte maturation in the absence of CD47.

The observed decrease in cellularity could be due to increased apoptosis, decreased proliferation or a decreased number of thymocyte progenitors. The latter explanation is rather unlikely since the proportion of DN1 thymocytes, which includes thymic progenitors, is similar or slightly increased in CD47-deficient thymi (Figure 1). We next tested the possibility that thymocytes showed a decrease in proliferative capacity. Among all thymocytes, the DN3 and DN4 subsets carry the highest proliferation potential which extensively contributes to determining the thymic cellularity. We injected WT and CD47-deficient mice with BrdU and labelled DN T cell subsets. BrdU profiles were comparable between WT and CD47-deficient mice, suggesting that the decrease in thymic cellularity could not be attributed to a defect in cellular proliferation (Figure 3a). Similarly, we found no increase in apoptotic thymocytes from CD47-deficient mice, as detected by caspase-3, and the expression of the anti-apoptotic molecule Bcl-2 was identical for all thymic subsets

(Figure 3b and data not shown). Moreover, the level of spontaneous thymocyte apoptosis was not increased in CD47-deficient mice as detected by TUNEL staining in freshly isolated thymocytes, in thymocytes kept in culture overnight, or in thymic sections (Figure 4). Thus, the decreased thymic cellularity did not appear to originate from a decrease in thymic progenitors, decreased proliferation or increased apoptosis.

Thymic cellularity is remarkably susceptible to peripheral factors. It was thus possible that the low grade inflammation present in the periphery of CD47-deficient mice (31) was responsible for the decrease in thymic cellularity. Of interest, CD4⁺CD8⁺ thymocytes are most sensitive to stress and, as shown in Figure 1, in CD47-deficient mice the CD4⁺CD8⁺ thymocytes show a slight decrease in proportion with a parallel increase in CD4⁺CD8⁻ thymocytes. To evaluate the contribution of inflammation to the decrease in thymic cellularity observed in CD47-deficient thymocytes, we examined embryonic thymi. Indeed, fetal thymic differentiation proceeds independently of peripheral factors. If peripheral inflammation contributes to the decrease in thymic cellularity, then CD47-deficient fetal thymi should show normal thymic differentiation and normal thymic cellularity. We interbred CD47 heterozygous mice and examined the thymi from embryos aged between 15 to 19 days. We found no difference in the maturation of thymocytes and comparable thymic cellularity between wild type and CD47-deficient littermates (data not shown).

CD47 in negative selection

Although the decrease in thymic cellularity in CD47-deficient mice may be explained by peripheral inflammatory responses, the role of CD47 in thymic selection processes remains to be defined. On the one hand, CD47 can serve as a co-stimulatory molecule and promote T cell activation (18-21). On the other hand, CD47 potentiates CD95-induced cell death (16). As co-stimulation and CD95 are two crucial factors in the process of negative selection (17,32,33), we aimed to determine the impact of CD47 on negative selection.

Negative selection results in the apoptosis of potentially auto-reactive T cells as a consequence of strong TCR interactions with its MHC-self-peptide ligand. One sensitive

means of measuring TCR-induced apoptosis *in vitro* in thymocytes is to quantify the level of CD4 and CD8 reduction on CD4⁺CD8⁺ thymocytes, a process defined as DP dulling (34). Although this assay can also be used to quantify positive selection signals (35), in the context of high affinity anti-TCR ligation, it unarguably measures the level of negative selection. The strength of the TCR signal is also reflected by the level of CD69 expression. Therefore, we stimulated thymocytes *in vitro* using plate-bound anti-TCR with and without anti-CD47 antibodies to directly evaluate the co-stimulatory potential of CD47 ligation and found that CD47 stimulation did not increase DP dulling or CD69 expression (Figure 5a). These results suggest that CD47 ligation does not potentiate the TCR signal provided to thymocytes. However, it must be noted that there exists only one antibody in mice directed against CD47. In humans, various antibodies directed towards different epitopes have revealed a different contribution to CD47 co-stimulation (3). To more directly examine the effect of CD47 on negative selection, we chose to evaluate the thymocyte responses of CD47-deficient mice.

We first quantified the level of DP dulling, as an indicator of the sensitivity of thymocytes to undergo negative selection. Thymocytes from BALB/c and CD47-deficient mice were stimulated with anti-TCR in the presence or absence of anti-CD28 antibodies. As expected, CD28 stimulation potentiated the TCR signal and decreased the threshold of activation (32). However, we revealed no differences in the TCR-induced DP dulling of wild-type vs CD47-deficient CD4⁺CD8⁺ thymocytes (Figure 5b). As noted above, CD47 has a described co-stimulatory potential. We therefore verified the role of CD47 regarding the modulation of TCR signals by evaluating CD69 expression. Wild-type vs CD47-deficient immature CD4⁺CD8⁺ thymocytes and mature CD4⁺CD8⁻ thymocytes responded similarly to TCR stimulation (Figure 5b). Again, providing CD28 co-stimulation efficiently potentiated the TCR signal for both CD4⁺CD8⁺ and CD4⁺CD8⁻ thymocytes and the response observed was similar in both groups of mice, as detected by CD69 expression.

To corroborate these *in vitro* findings, we injected anti-TCR in BALB/c and CD47-deficient mice and examined the extent of thymocyte activation 6h later. As shown in

Figure 6a, both immature $CD4^+CD8^+$ and mature $CD4^+CD8^-$ thymocytes from BALB/c and CD47-deficient mice responded similarly to *in vivo* TCR stimulation as monitored by the level of CD69 expression. Together, these results suggest that the absence of CD47 does not directly influence thymocyte survival or signalling threshold both *in vitro* and *in vivo*.

Yet, *in vivo* defects in thymic selection are more easily revealed in the context of a monoclonal rather than a polyclonal TCR repertoire. To generate CD47-deficient mice carrying a monoclonal TCR repertoire, we bred BALB/c CD47-deficient mice to DO11.10 TCR transgenic mice. In the resulting DO11.10 CD47-deficient mice, the monoclonal T cell repertoire recognizes the OVA antigen with high affinity. Upon injection of OVA in DO11.10 mice we efficiently induced CD69 expression on mature thymocytes (Figure 6b). Moreover, injection of OVA in DO11.10 TCR transgenic CD47-deficient mice induced CD69 expression similarly to CD47 sufficient controls (Figure 6b).

Physiological TCR-antigen affinities in vivo

Systemic OVA injections lead to expression of antigen throughout the thymus. However, negative selection of self-reactive thymocytes occurs in the medulla and is mediated at least in part by AIRE-expressing medullary thymic epithelial cells (36). Elimination of the self-reactive $CD4^+CD8^-$ semi-mature thymocytes found in the medulla is also partially dependent on CD95 (17) and CD47 has been shown to impact on CD95 induced-apoptosis (16). Consequently, we postulated that the absence of CD47 may impact negative selection of semi-mature thymocytes in the medulla. To address this issue, we resorted to yet another TCR transgenic system, where negative selection of thymocytes is dependent on AIRE expression in the medulla (37,38). Indeed, the 3A9 TCR recognizes HEL in the context of MHC H2^k, and we have shown that HEL expression under the rat insulin promoter is sufficient to mediate efficient negative selection of thymocytes (39). We introgressed the 3A9 TCR along with the HEL transgenes on the CD47-deficient BALB/c background for 6 to 8 generations, all the while maintaining the H2^k locus. Note that the insertion of the TCR transgene alone yielded normal positive selection of thymocytes (Figure 7a left panels show that the proportion of $CD4^+CD8^-$ thymocytes is similar in BALB/c and CD47-deficient 3A9

TCR transgenic H2^k-mice). However, in the presence of HEL, 3A9 TCR H2^k BALB/c thymocytes did not undergo negative selection (Figure 7a compare top panels). This is reminiscent of the phenotype observed in NOD.H2k mice where the 3A9 TCR single transgenic and 3A9 TCR:HEL double transgenic mice show a similar proportion of CD4⁺CD8⁻ thymocytes (39,40). Finally, CD47-deficient mice expressing both the 3A9 TCR and HEL transgenes showed a slight but non-significant reduction in the proportion of CD4⁺CD8⁻ thymocytes when compared to BALB/c counterparts (Figure 7a and b, *p value* = 0.09). The small decrease in CD4⁺CD8⁻ thymocytes was not associated with an increase in TCR signal. Indeed, CD5 and CD69 expression on CD4⁺CD8⁻ thymocytes was identical for both BALB/c and CD47-deficient 3A9 TCR:HEL double transgenic H2^k mice (Figure 7c). Moreover, in this TCR transgenic model, negative selection is associated with a decreased proportion of TCR 1G12 clonotype⁺ cells and a down-regulation of TCR levels (39). However, all CD4⁺CD8⁻ thymocytes expressed high levels of 1G12 in the TCR:HEL CD47-deficient mice, similar to CD47-sufficient mice (Figure 7c). Interestingly, CD47 deletion introgressed onto the B10.Br genetic background also did not influence the elimination of autoreactive T cells (data not shown). Together, these data demonstrate that CD47-deficiency does not impact negative selection of thymocytes, even when antigen is expressed in the appropriate thymic medullary compartment.

Together, these data show that the absence of CD47 does not influence thymocyte selection processes. Indeed, CD47 did not seem to impact on thymocyte phagocytosis or cell death. Still, its contribution to the migration of thymic CD172a⁺ cells remained to be assessed. In particular, we aimed at defining the various DC subsets in the thymus.

Thymic DC subsets are altered in proportion in the absence of CD47

The characterization of DC subsets has relied in the past on CD8 α expression, defining the CD8 α ⁺ DC and CD8 α ⁻ DC subsets. However, DC can “acquire” CD8 α expression from their neighbouring cells, hindering the analysis of thymic DC subsets. Recently, CD172a expression was identified as a marker expressed on CD11c⁺CD8 α ⁻ DC in the thymus (41). As we and others have previously demonstrated migration defects in CD11c⁺CD8 α ⁻

CD172a⁺ DC subsets in the absence of CD47 (26,27), we questioned the impact of CD47-deficiency on the relative proportion of each thymic DC subset.

First, we wanted to evaluate the efficiency of CD172a marker to define the various DC subsets in the absence of any enrichment procedures other than collagenase treatment to allow their extraction from the thymic tissue. This approach allows us to reveal unbiased proportions of DC subsets in the thymus and to determine cell numbers. Figure 8a shows that the thymic DC expressing high levels of CD172a also express CD11b, another cell marker usually found on CD11c⁺CD8 α ⁻ DC (42). Moreover, we demonstrate that the DC distribution in the thymus of our reference strain, BALB/c, is similar to what has been previously observed in the C57BL/6 strain with a much higher proportion of CD172a^{low} cells. Still, a significant number of CD172a^{high} cells were readily detectable amounting to 0,044% \pm 0,020% of total thymic cells, or approximately 70 000 CD172a⁺ DC per thymus.

Second, we examined the thymic DC subsets in CD47-deficient mice on the BALB/c genetic background. Because CD47-deficiency could potentially affect CD172a ligand expression, we examined the level of CD172a on CD11c⁺CD11b⁻ and CD11c⁺CD11b⁺ thymic DC from BALB/c and CD47-deficient mice. As expected, CD11c⁺CD11b⁻ DC expressed lower levels of CD172a than the CD11c⁺CD11b⁺ thymic DC subset (Figure 8b). However, CD47-deficient DC showed comparable CD172a expression levels to their wild-type counterparts. These results suggest that, when gating on CD11c^{high} cells, CD11b and CD172a can be used interchangeably to define the various thymic DC subsets in both BALB/c and CD47-deficient mice.

Third, we evaluated the proportion of the various thymic DC subsets in both strains. We found a significant reduction of CD11c⁺CD11b⁺CD172a⁺ thymic DC in CD47-deficient mice (Figure 8c, right panel). Accordingly, as the total proportion of DC remains constant for BALB/c and CD47-deficient mice (Figure 8c, left panel), the CD11c⁺CD11b⁻CD172a^{low} DC subset is proportionally increased. Thus, thymi from CD47-deficient mice show an imbalance in the proportion of various DC subsets.

Finally, because of the potential impact of peripheral inflammation on thymic differentiation, we also verified the proportion of CD11c⁺CD11b⁺CD172a⁺ thymic DC in TCR transgenic mice, where thymic cellularity was not affected by the absence of CD47 (Figure 8e). Note that as mouse age dramatically impacts thymic cellularity, we have selected a relatively narrow age group to assess thymic cellularity. TCR transgenic mice aged between 10 and 12 weeks are shown in Figure 8e. A Student T test was performed resulting in a *p value* = 0.25. Importantly, when mice are included regardless of age (n = 10) the *p value* = 0.65 (data not shown). Hence, these data clearly demonstrate that CD47 deletion does not influence thymic cellularity upon insertion of the 3A9 TCR transgene. CD172a expression level was not affected by the presence of the TCR transgene, even in the absence of CD47 (Figure 8d). Insertion of the 3A9 TCR transgene did not influence the proportion of DC subsets in the thymus when compared to non-transgenic mice (compare Figure 8c and 8e, right panels), where CD47-deficient 3A9 TCR transgenic mice also demonstrate a decrease in CD11c⁺CD11b⁺CD172a⁺ DC proportion (Figure 8e). Moreover, as for non-transgenic mice, the total proportion of DC was similar in all strains (data not shown), suggesting that the decrease in CD11c⁺CD11b⁺CD172a⁺ DC is associated with an increase in CD11c⁺CD11b⁻CD172a^{low} DC. In summary, our results demonstrate that CD47 regulates the proportion of thymic DC subsets.

Discussion

CD47-deficient mice show a severe decrease in thymic cellularity. Knowing that CD47 contributes to the inhibition of phagocytosis, one may postulate that the decrease in thymocyte number is due to an accelerated phagocytosis. However, we have three reasons to exclude this possibility.

First, CD47-deficient mice must develop compensatory mechanisms in the absence of this seemingly essential “don’t-eat-me-signal”, otherwise these mice would not be viable. In fact CD47-deficient macrophages do not phagocytose CD47-deficient cells (10). The apparent consequence of CD47-deficiency on phagocytosis is an accelerated clearance of red blood cells, particularly on the NOD background (9,43). This suggests that erythrocytes are highly dependent on CD47 for survival. Alternatively, NOD mice, which are highly prone to auto-immune diseases, develop accelerated auto-immune haemolytic anemia in the absence of CD47.

Second, we have shown that CD47-deficient thymi obtained from embryos lacking peripheral T cells have a normal thymic cellularity. Moreover, we observed that insertion of either DO11.10 or the 3A9 TCR transgene on CD47-deficient mice also restored thymic cellularity (DO11.10 = $450 \times 10^6 \pm 65 \times 10^6$ vs DO11.10 TCR CD47-deficient mice $368 \times 10^6 \pm 56 \times 10^6$ *p value* = 0.14 and Figure 8e). In fact, insertion of TCR transgenes limits the TCR repertoire and prevents peripheral T cell activation to environmental antigens. Together, these results suggest that the peripheral inflammatory Th1 responses to environmental antigens in CD47-deficient mice are responsible for the decrease in thymic cellularity (31).

Finally, CD47-deficient thymocytes do not show a modulation of the level of apoptosis. In fact, caspase-3 and Bcl-2 levels, as well as the proportion of TUNEL+ cells, are comparable. Together, these observations suggest that the decrease in thymic cellularity in CD47-deficient mice is not due to an increase in spontaneous phagocytosis.

Regardless of the probable role of peripheral inflammation on thymic cellularity, we could still address the impact of CD47-deficiency on thymocyte selection. Indeed, upon *in vitro* TCR stimulation, CD47-deficient thymocytes efficiently down-regulated CD4 and CD8 and up-regulated CD69 markers *in vitro*. CD28 co-stimulation was not affected by the absence of CD47 on thymocytes. Moreover, systemic *in vivo* injection of anti-TCR or OVA in non-transgenic and DO11.10 TCR transgenic mice also demonstrated efficient stimulation of thymocytes even in the absence of CD47. Finally, positive selection was normal in CD47-deficient mice. Indeed, in the 3A9 TCR transgenic mice, the proportion of transgenic CD4 T cells generated in the absence of CD47 was similar to that of CD47-sufficient mice. Together, these data clearly show that signalling through CD47 is not necessary to modulate thymocyte TCR signals.

The observations are surprising given that CD47 can modulate peripheral T cell responses (18-23) and that peripheral T cell numbers are reduced in CD47-deficient mice (24)(data not shown). However, as for CD47-deficient mice, CD28-deficiency also causes no apparent defect in thymic selection (44), suggesting that CD47 and CD28 may act redundantly in the control of thymic selection processes. Interestingly, CD172a has a described molecular homology to CD28 (45). Of note, except for CD28, members of the CD28 family deliver inhibitory signals (46). As CD47 is the counter ligand for CD172a, it could be presumed that the physiological role of CD47-CD172a interactions would be inhibitory. Importantly, CD172a signals intracellularly through SHP inhibitory molecules (7). Yet, little is known about the intracellular machinery linking CD47 to modulation of T cell activation.

Another important role of CD47-CD172a interactions relates to the controlled cellular migration of CD172a⁺ myeloid-derived cells both *in vitro* (47-49) and *in vivo* (24,26,27,50,51). We demonstrate that CD172a⁺ DC are decreased in proportion in the thymus of CD47-deficient mice. This observation supports the view that not all thymic DC differentiate within the thymus from thymocyte precursors (52). Indeed, parabiosis

experiments suggest that CD8 α ⁻ thymic DC are imported from the blood (53). Because CD47-CD172a interactions have been shown to regulate the migration of CD172a⁺ cells, we thus suggest that CD11c⁺CD11b⁺CD172a⁺ DC do not derive from intrathymic precursors; rather, their migration to the thymus could rely on CD47-CD172a interactions. As bone marrow chimera or parabiosis experiments cannot be performed using CD47-deficient mice (as CD47 deficient viable cells are rapidly phagocytosed by CD47 sufficient cells (8)), this issue cannot be easily resolved and will require further *in vitro* experimentation.

Certainly, the role of the different DC subsets in the thymus remains ill-defined, in part due to the inherent low number of these cells in the thymus and, more importantly, to the technical difficulties in characterizing the DC subsets (54). It is generally assumed that DC in the thymus are important for regulating negative selection of thymocytes as they are found in the medulla and at the cortico-medullary region. However, we found that the imbalance in DC proportion did not impact on the negative selection of thymocytes. It remains possible that CD11c⁺CD11b⁺CD172a⁺ DC specifically present a subset of peripheral antigens not expressed in the thymus and may thus contribute to the targeted elimination of a small subset of auto-reactive T cells. In that regard, it is interesting to note that the defect in negative selection of thymocytes in NOD.*H2k* mice was previously significantly associated to *idd13*, where Bim expression, included within the *idd13* loci, was shown to be dysregulated in NOD mice (40,55). CD47 is located on chromosome 16 and is not located near any known auto-immune susceptibility loci. However, CD172a is highly polymorphic between strains (56) and is also located within the *idd13* loci. Further studies are needed to determine whether the polymorphisms present in CD172a indeed influence the regulation of thymic DC subsets.

CD47 is gaining grounds as a therapeutic target for haematological cancers. The original finding showed that cross-linking of surface CD47 induced preferential elimination of leukemic cells *in vitro* (13,14). More recently, a murine monoclonal antibody directed against the extracellular portion of human CD47 was generated (11). It effectively prolongs

mouse survival against human multiple myeloma, acute lymphoblastic leukemia and B-cell chronic lymphocytic leukemia cell lines (11,12). As CD47 has become a potential therapeutic target, our knowledge pertaining to the *in vivo* functions of CD47 may help unravel potential side-effects. Indeed, the potential immediate consequences of blocking CD47 interactions to CD172a include an increase in non-specific phagocytosis and an increase in anemia due to susceptibility of red blood cells. In addition, prolonged anti-CD47 treatment may alter the distribution of myeloid cells and cause an increase in susceptibility to pathogens (24,50). Our current data suggests that this treatment will have little or no impact on thymocyte differentiation, suggesting that T cell reconstitution following bone marrow transplants should remain effective.

Acknowledgements: We wish to thank Drs. Adrian Liston, Aude Fahrer and Nathalie Labrecque for discussion and critical review of this manuscript, Miguel Chagnon for the statistical analyses, Anna Daisy for expert technical support on histology sections and the animal house staff of the CHUM and HMR for curating the mouse colonies. This work was supported by the CIHR Senior Research Fellowship awarded to SL. FGD, CB and VD are recipients of a Diabète Québec Scholarship. The authors have no financial conflict of interest.

References:

- 1 Siggs, O. M., Makaroff, L. E., and Liston, A. 2006. The why and how of thymocyte negative selection. *Curr Opin Immunol* 18:175.
- 2 Yin, X., Chtanova, T., Ladi, E., and Robey, E. A. 2006. Thymocyte motility: mutants, movies and migration patterns. *Curr Opin Immunol* 18:191.
- 3 Pettersen, R. D. 2000. CD47 and death signaling in the immune system. *Apoptosis* 5:299.
- 4 Brown, E. J. and Frazier, W. A. 2001. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 11:130.
- 5 van Beek, E. M., Cochrane, F., Barclay, A. N., and van den Berg, T. K. 2005. Signal regulatory proteins in the immune system. *J Immunol* 175:7781.
- 6 Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., Bratton, D. L., Oldenborg, P. A., Michalak, M., and Henson, P. M. 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123:321.
- 7 Fujioka, Y., Matozaki, T., Noguchi, T., Iwamatsu, A., Yamao, T., Takahashi, N., Tsuda, M., Takada, T., and Kasuga, M. 1996. A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion. *Mol Cell Biol* 16:6887.
- 8 Blazar, B. R., Lindberg, F. P., Ingulli, E., Panoskaltsis-Mortari, A., Oldenborg, P. A., Iizuka, K., Yokoyama, W. M., and Taylor, P. A. 2001. CD47 (integrin-associated protein) engagement of dendritic cell and macrophage counterreceptors is required to prevent the clearance of donor lymphohematopoietic cells. *J Exp Med* 194:541.
- 9 Oldenborg, P. A., Zheleznyak, A., Fang, Y. F., Lagenaur, C. F., Gresham, H. D., and Lindberg, F. P. 2000. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288:2051.
- 10 Wang, H., Madariaga, M. L., Wang, S., Van Rooijen, N., Oldenborg, P. A., and Yang, Y. G. 2007. Lack of CD47 on nonhematopoietic cells induces split macrophage tolerance to CD47null cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13744.
- 11 Kikuchi, Y., Uno, S., Kinoshita, Y., Yoshimura, Y., Iida, S., Wakahara, Y., Tsuchiya, M., Yamada-Okabe, H., and Fukushima, N. 2005. Apoptosis inducing bivalent single-chain antibody fragments against CD47 showed antitumor potency for multiple myeloma. *Leuk Res* 29:445.
- 12 Uno, S., Kinoshita, Y., Azuma, Y., Tsunenari, T., Yoshimura, Y., Iida, S., Kikuchi, Y., Yamada-Okabe, H., and Fukushima, N. 2007. Antitumor activity of a

- monoclonal antibody against CD47 in xenograft models of human leukemia. *Oncol Rep* 17:1189.
- 13 Mateo, V., Brown, E. J., Biron, G., Rubio, M., Fischer, A., Deist, F. L., and Sarfati, M. 2002. Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization. *Blood* 100:2882.
- 14 Mateo, V., Lagneaux, L., Bron, D., Biron, G., Armant, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. 1999. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* 5:1277.
- 15 Pettersen, R. D., Hestdal, K., Olafsen, M. K., Lie, S. O., and Lindberg, F. P. 1999. CD47 signals T cell death. *J Immunol* 162:7031.
- 16 Manna, P. P., Dimitry, J., Oldenborg, P. A., and Frazier, W. A. 2005. CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 280:29637.
- 17 Kishimoto, H. and Sprent, J. 2001. A defect in central tolerance in NOD mice. *Nat Immunol* 2:1025.
- 18 Tichioni, M., Deckert, M., Mary, F., Bernard, G., Brown, E. J., and Bernard, A. 1997. Integrin-associated protein (CD47) is a comitogenic molecule on CD3-activated human T cells. *J Immunol* 158:677.
- 19 Seiffert, M., Brossart, P., Cant, C., Cella, M., Colonna, M., Brugger, W., Kanz, L., Ullrich, A., and Buhring, H. J. 2001. Signal-regulatory protein alpha (SIRPalpha) but not SIRPbeta is involved in T-cell activation, binds to CD47 with high affinity, and is expressed on immature CD34(+)CD38(-) hematopoietic cells. *Blood* 97:2741.
- 20 Piccio, L., Vermi, W., Boles, K. S., Fuchs, A., Strader, C. A., Facchetti, F., Cella, M., and Colonna, M. 2005. Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRPbeta2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation. *Blood* 105:2421.
- 21 Reinhold, M. I., Lindberg, F. P., Kersh, G. J., Allen, P. M., and Brown, E. J. 1997. Costimulation of T cell activation by integrin-associated protein (CD47) is an adhesion-dependent, CD28-independent signaling pathway. *J Exp Med* 185:1.
- 22 Waclavicek, M., Majdic, O., Stulnig, T., Berger, M., Baumruker, T., Knapp, W., and Pickl, W. F. 1997. T cell stimulation via CD47: agonistic and antagonistic effects of CD47 monoclonal antibody 1/1A4. *J Immunol* 159:5345.
- 23 Li, Z., Calzada, M. J., Sipes, J. M., Cashel, J. A., Krutzsch, H. C., Annis, D. S., Mosher, D. F., and Roberts, D. D. 2002. Interactions of thrombospondins with alpha4beta1 integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior. *J Cell Biol* 157:509.
- 24 Lindberg, F. P., Bullard, D. C., Caver, T. E., Gresham, H. D., Beaudet, A. L., and Brown, E. J. 1996. Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. *Science* 274:795.

- 25 Van, V. Q., Darwiche, J., Raymond, M., Lesage, S., Bouguermouh, S., Rubio, M., and Sarfati, M. 2008. Cutting edge: CD47 controls the in vivo proliferation and homeostasis of peripheral CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells that express CD103. *J Immunol* 181:5204.
- 26 Hagnerud, S., Manna, P. P., Cella, M., Stenberg, A., Frazier, W. A., Colonna, M., and Oldenborg, P. A. 2006. Deficit of CD47 Results in a Defect of Marginal Zone Dendritic Cells, Blunted Immune Response to Particulate Antigen and Impairment of Skin Dendritic Cell Migration. *J Immunol* 176:5772.
- 27 Van, V. Q., Lesage, S., Bouguermouh, S., Gautier, P., Rubio, M., Levesque, M., Nguyen, S., Galibert, L., and Sarfati, M. 2006. Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *Embo J* 25:5560.
- 28 Akkaraju, S., Ho, W. Y., Leong, D., Canaan, K., Davis, M. M., and Goodnow, C. C. 1997. A range of CD4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis. *Immunity* 7:255.
- 29 Lesage, S., Charron, J., and Hugo, P. 2001. Inhibitory effects of T-cell stimulation and co-stimulation observed at high concentrations of plate-bound antibodies. *J Immunol Methods* 255:23.
- 30 Zuniga-Pflucker, J. C. 2004. T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol* 4:67.
- 31 Bouguermouh, S., Van, V. Q., Martel, J., Gautier, P., Rubio, M., and Sarfati, M. 2008. CD47 Expression on T Cell Is a Self-Control Negative Regulator of Type 1 Immune Response. *J Immunol* 180:8073.
- 32 Punt, J. A., Osborne, B. A., Takahama, Y., Sharrow, S. O., and Singer, A. 1994. Negative selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *J Exp Med* 179:709.
- 33 Lesage, S., Charron, J., Winslow, G., and Hugo, P. 1997. Induction of thymocyte deletion by purified single peptide/major histocompatibility complex ligands. *J Immunol* 159:2078.
- 34 Swat, W., Ignatowicz, L., von Boehmer, H., and Kisielow, P. 1991. Clonal deletion of immature CD4⁺8⁺ thymocytes in suspension culture by extrathymic antigen-presenting cells. *Nature* 351:150.
- 35 Santori, F. R. and Vukmanovic, S. 2004. Delineation of signals required for thymocyte positive selection. *J Immunol* 173:5517.
- 36 Mathis, D. and Benoist, C. 2007. A decade of AIRE. *Nat Rev Immunol* 7:645.
- 37 Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L., and Goodnow, C. C. 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 4:350.
- 38 Liston, A., Gray, D. H., Lesage, S., Fletcher, A. L., Wilson, J., Webster, K. E., Scott, H. S., Boyd, R. L., Peltonen, L., and Goodnow, C. C. 2004. Gene dosage--

- limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *J Exp Med* 200:1015.
- 39 Lesage, S., Hartley, S. B., Akkaraju, S., Wilson, J., Townsend, M., and Goodnow, C. C. 2002. Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes. *J Exp Med* 196:1175.
- 40 Liston, A., Lesage, S., Gray, D. H., O'Reilly, L. A., Strasser, A., Fahrner, A. M., Boyd, R. L., Wilson, J., Baxter, A. G., Gallo, E. M., Crabtree, G. R., Peng, K., Wilson, S. R., and Goodnow, C. C. 2004. Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity* 21:817.
- 41 Lahoud, M. H., Proietto, A. I., Gartlan, K. H., Kitsoulis, S., Curtis, J., Wettenhall, J., Sofi, M., Daunt, C., O'Keefe, M., Caminschi, I., Satterley, K., Rizzitelli, A., Schnorrer, P., Hinohara, A., Yamaguchi, Y., Wu, L., Smyth, G., Handman, E., Shortman, K., and Wright, M. D. 2006. Signal regulatory protein molecules are differentially expressed by CD8- dendritic cells. *J Immunol* 177:372.
- 42 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. *J Immunol* 164:2978.
- 43 Oldenborg, P. A., Gresham, H. D., Chen, Y., Izui, S., and Lindberg, F. P. 2002. Lethal autoimmune hemolytic anemia in CD47-deficient nonobese diabetic (NOD) mice. *Blood* 99:3500.
- 44 Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K. P., Kundig, T. M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P. S., Thompson, C. B., and Mak, T. W. 1993. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261:609.
- 45 Fahrner, A. M., Bazan, J. F., Papathanasiou, P., Nelms, K. A., and Goodnow, C. C. 2001. A genomic view of immunology. *Nature* 409:836.
- 46 Greenwald, R. J., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23:515.
- 47 Liu, Y., O'Connor, M. B., Mandell, K. J., Zen, K., Ullrich, A., Buhring, H. J., and Parkos, C. A. 2004. Peptide-mediated inhibition of neutrophil transmigration by blocking CD47 interactions with signal regulatory protein alpha. *J Immunol* 172:2578.
- 48 de Vries, H. E., Hendriks, J. J., Honing, H., De Lavalette, C. R., van der Pol, S. M., Hooijberg, E., Dijkstra, C. D., and van den Berg, T. K. 2002. Signal-regulatory protein alpha-CD47 interactions are required for the transmigration of monocytes across cerebral endothelium. *J Immunol* 168:5832.
- 49 Liu, Y., Buhring, H. J., Zen, K., Burst, S. L., Schnell, F. J., Williams, I. R., and Parkos, C. A. 2002. Signal regulatory protein (SIRPalpha), a cellular ligand for CD47, regulates neutrophil transmigration. *J Biol Chem* 277:10028.

- 50 Verdrengh, M., Lindberg, F. P., Ryden, C., and Tarkowski, A. 1999. Integrin-associated protein (IAP)-deficient mice are less susceptible to developing *Staphylococcus aureus*-induced arthritis. *Microbes Infect* 1:745.
- 51 Fukunaga, A., Nagai, H., Noguchi, T., Okazawa, H., Matozaki, T., Yu, X., Lagenaur, C. F., Honma, N., Ichihashi, M., Kasuga, M., Nishigori, C., and Horikawa, T. 2004. Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1 regulates the migration of Langerhans cells from the epidermis to draining lymph nodes. *J Immunol* 172:4091.
- 52 Wu, L. and Liu, Y. J. 2007. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 26:741.
- 53 Donskoy, E. and Goldschneider, I. 2003. Two developmentally distinct populations of dendritic cells inhabit the adult mouse thymus: demonstration by differential importation of hematogenous precursors under steady state conditions. *J Immunol* 170:3514.
- 54 Shortman, K. and Naik, S. H. 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 7:19.
- 55 Zucchelli, S., Holler, P., Yamagata, T., Roy, M., Benoist, C., and Mathis, D. 2005. Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics. *Immunity* 22:385.
- 56 Barclay, A. N. and Brown, M. H. 2006. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 6:457.

Figures

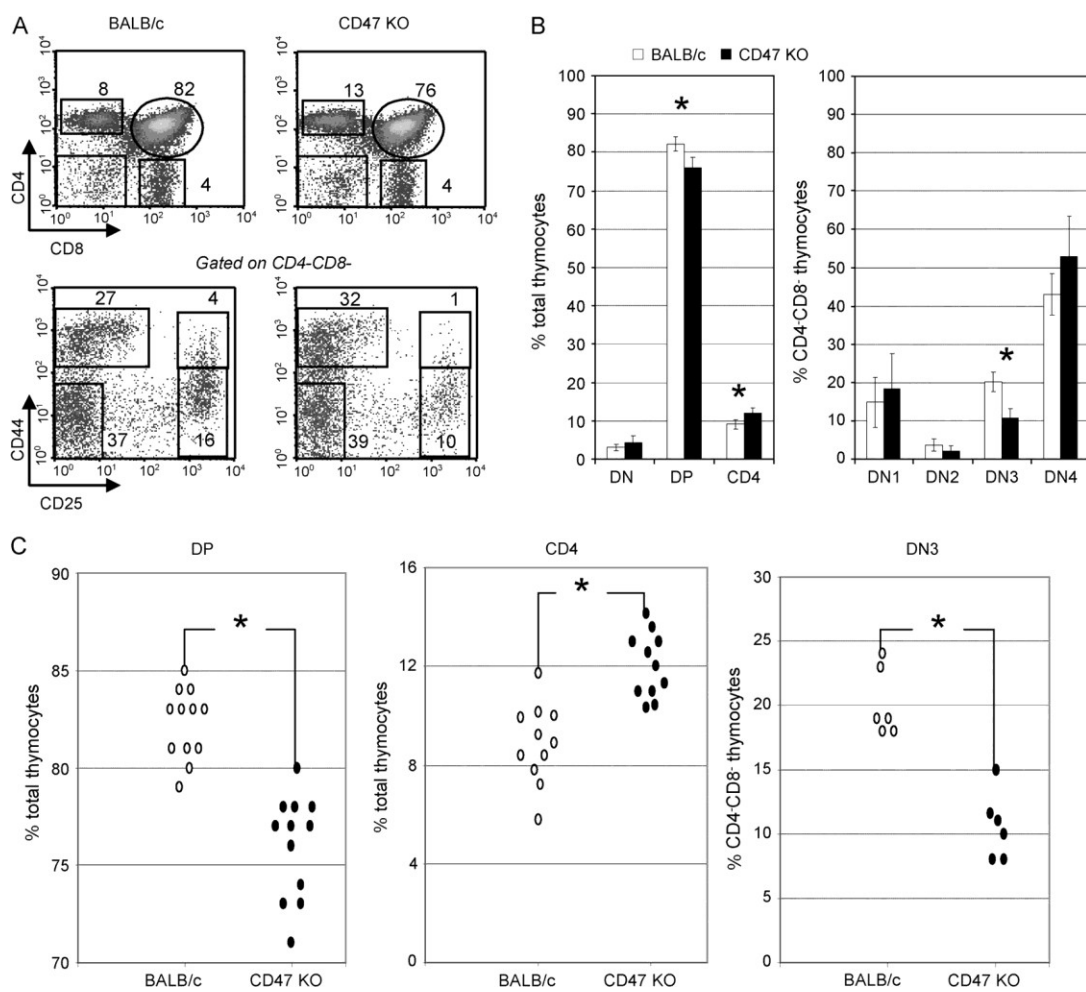


FIGURE 1. Moderate effects of CD47-deletion on thymocyte differentiation. Thymocytes from BALB/c and CD47-deficient mice were stained with CD4, CD8, CD44 and CD25. (A) Representative thymocyte profiles of CD4 and CD8 expression (top) and of CD44 and CD25 expression on CD4⁺CD8⁻ thymocytes (bottom) are shown. (B) Statistical compilation of all thymocyte subsets. DN, CD4⁻CD8⁻; DP, CD4⁺CD8⁺; CD4, CD4⁺CD8⁻; DN1, CD44⁺CD25⁻; DN2, CD44⁺CD25⁺; DN3, CD44⁻CD25⁺; DN4, CD44⁻CD25⁻. *, Student T test p value < 0.0001. (C) For all statistically significant differences obtained in “B”, the results are represented for each mouse. BALB/c, empty circles; CD47-deficient mice, filled circles. Note that the scales were adjusted to facilitate visualization of the data.

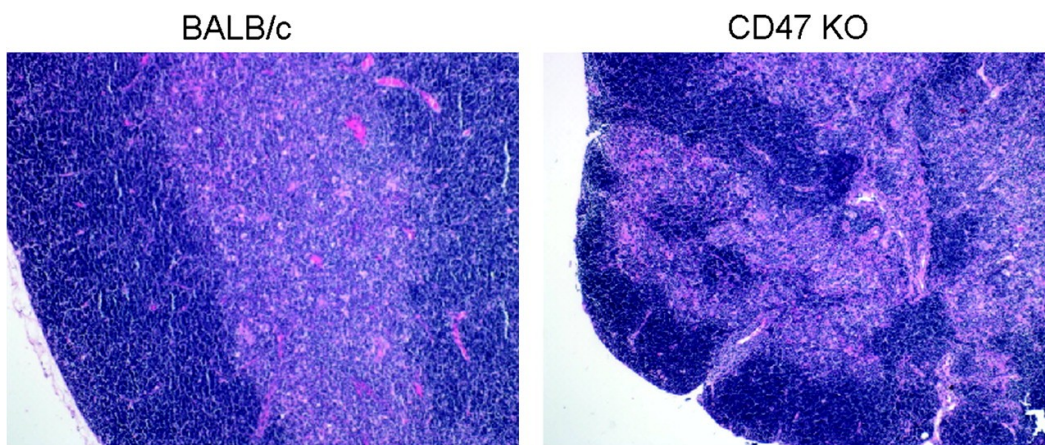


FIGURE 2. *Altered thymus histology sections in CD47-deficient mice.* Representative H & E staining of thymic sections from 6 week-old mice.

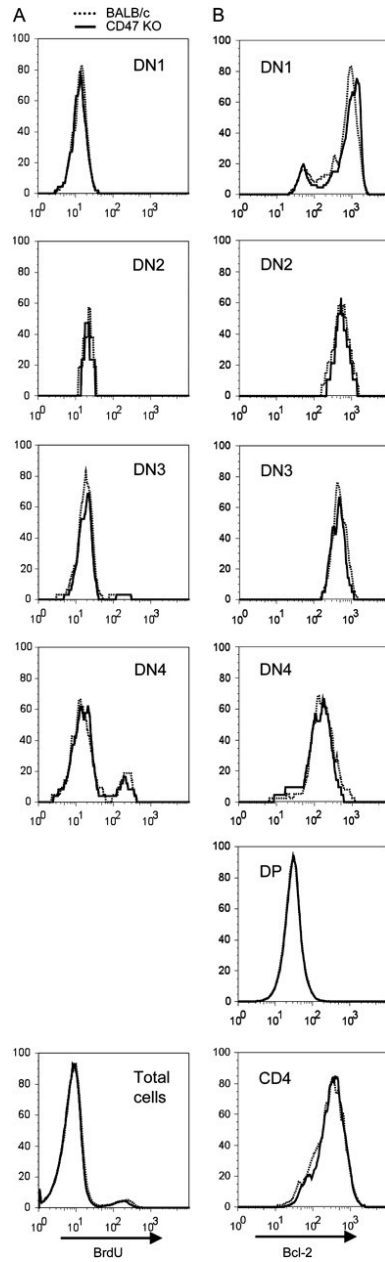


FIGURE 3. *Thymocyte proliferation and apoptosis is unaffected in CD47-deficient mice.* BrdU incorporation (A) and Bcl-2 levels (B) is shown for BALB/c (dotted lines) and CD47-deficient (solid lines) thymocytes. BrdU was injected 2 hours prior to thymic extraction. Profiles are shown for various thymocyte subsets as indicated.

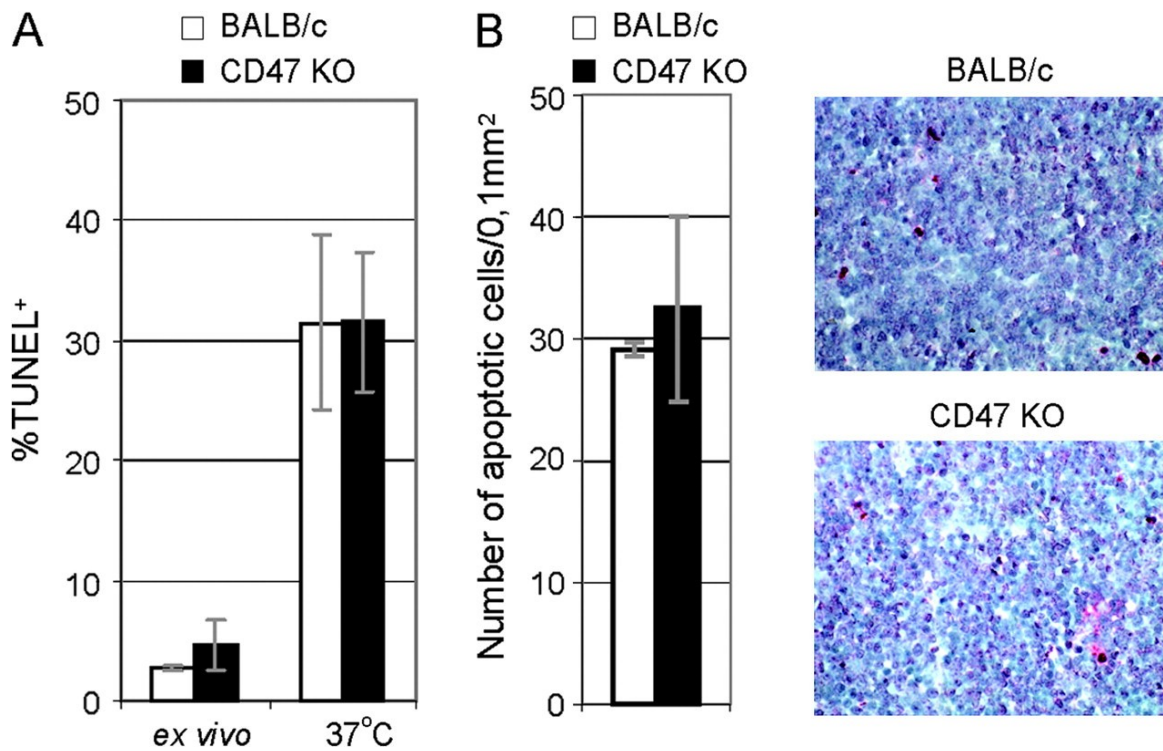


FIGURE 4. *CD47-deficient thymi show no increase in apoptotic bodies.* (A) The proportion of TUNEL-positive cells is shown for BALB/c and CD47-deficient thymocytes freshly isolated (n=3) or cultured overnight at 37°C (n=6). (B) Left: TUNEL-positive cells within the thymic cortex were counted on a total of 30μm² surface area at a magnification of 63X. Right: Results are expressed as number of apoptotic cells / surface area (0.1mm²).n = 3.

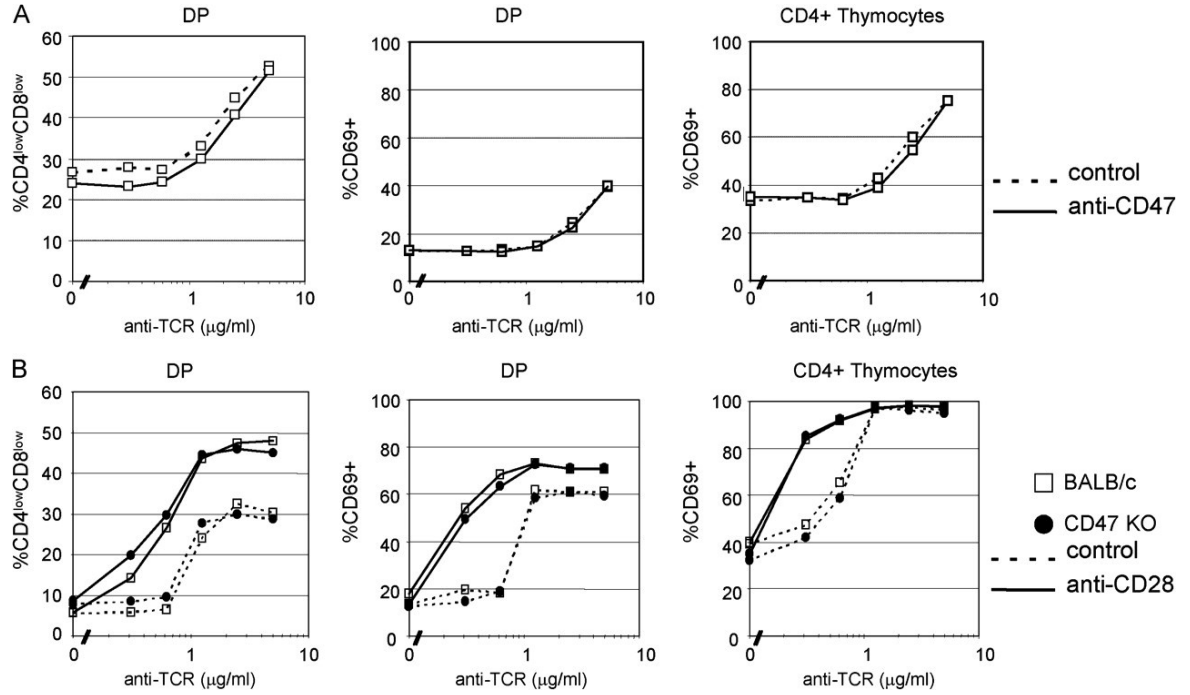


FIGURE 5. Indirect effect of CD47 on thymocytes survival or signalling threshold. Thymocytes from BALB/c (empty square) and CD47-deficient (filled circle) mice were stimulated with anti-TCR *in vitro* without (dotted line) and with (solid line) (A) anti-CD47 or (B) anti-CD28. DP dulling was measured by calculating the proportion of CD4^{low}CD8^{low} expression. The percentage of CD69⁺ activated cells among CD4⁺CD8⁺ and CD4⁺CD8⁻ thymocytes is also shown. The data are representative of at least 5 independent experiments.

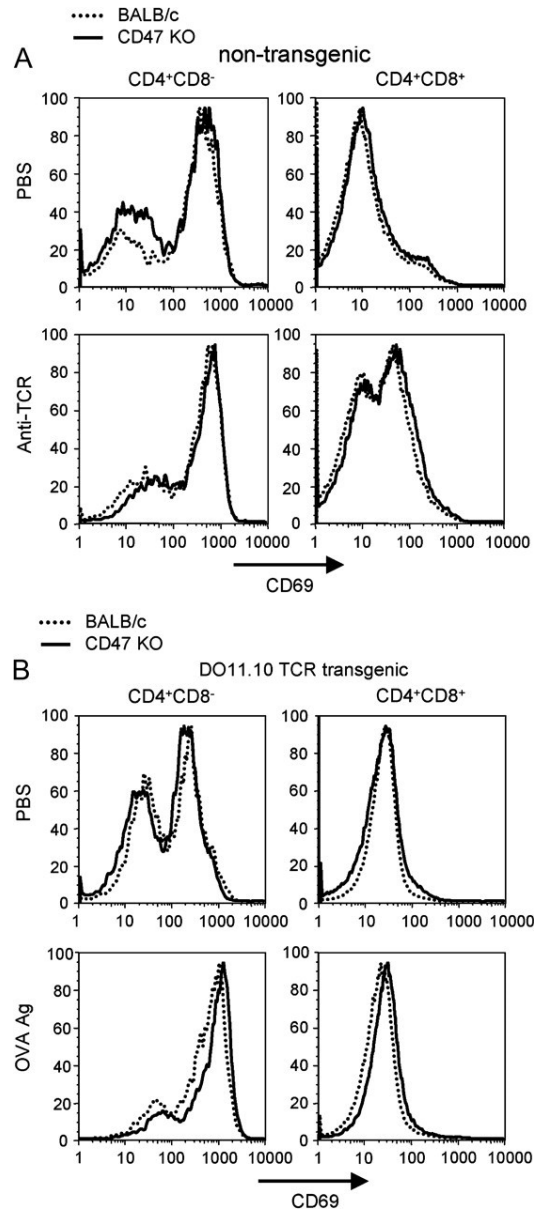


FIGURE 6. In vivo antigenic stimulation does not reveal a role for CD47 in thymocyte deletion. (A) Non-transgenic and (B) DO11.10 TCR transgenic thymi from BALB/c (dotted line) and CD47-deficient (solid line) mice were analysed following the respective i.p. administration of anti-TCR antibody and OVA. Control mice received PBS injections. Thymocyte activation was measured by CD69 expression on various subsets. n = 4.

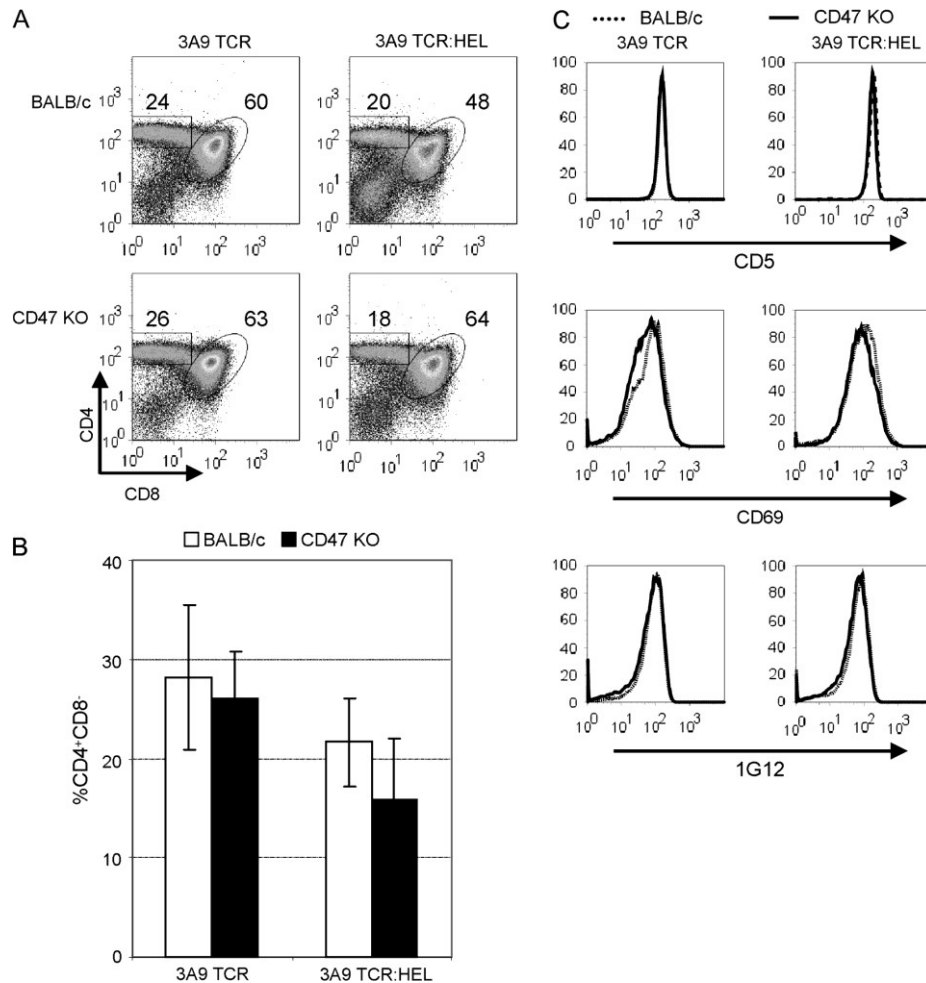


FIGURE 7. *Negative selection of thymocytes is unaffected in 3A9 TCR:HEL CD47-deficient mice.* (A) Thymocytes from 3A9 TCR single transgenic or 3A9 TCR:HEL double transgenic H2^k-mice either wild-type or CD47-deficient were analyzed for CD4 and CD8 expression. The numbers indicate the percentage of each cell subset. (B) Compilation of the proportion of CD4⁺CD8⁻ thymocytes in the various strains, as indicated. n>5. (C) CD5, CD69 and 1G12 TCR clonotype expression is shown for CD4⁺CD8⁻ thymocytes. Left panels compare 3A9 TCR transgenic mice and right panels show 3A9 TCR:HEL transgenic H2^k-mice on BALB/c (dotted lines) or CD47-deficient background (solid lines).

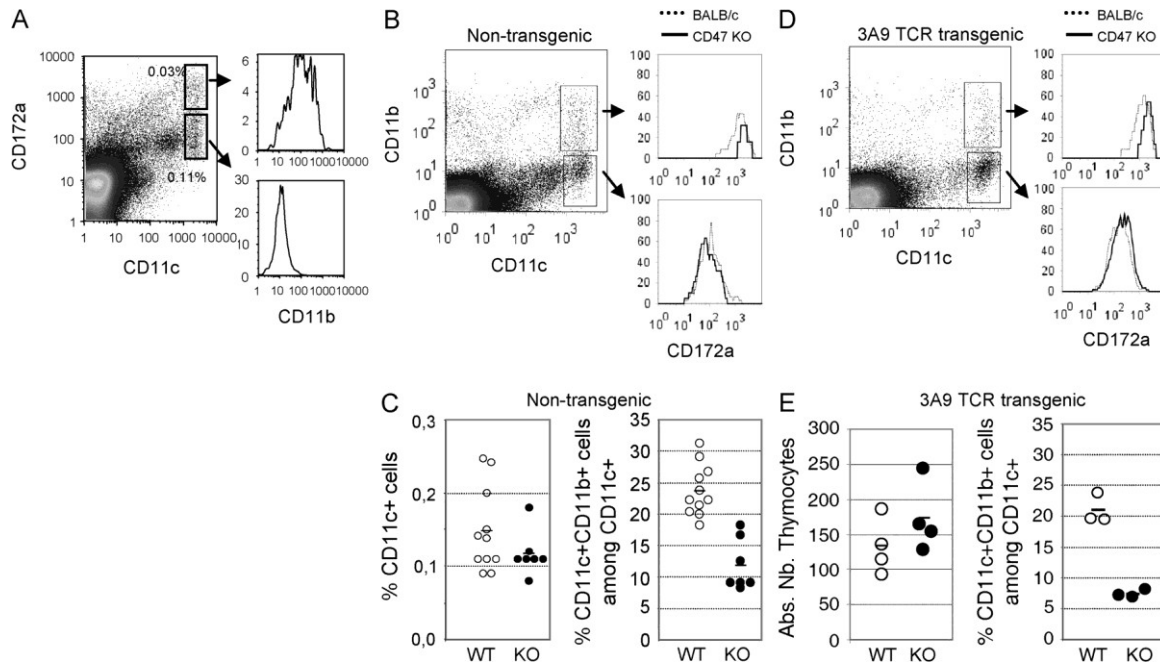


FIGURE 8. Altered proportion of thymic DC subsets in CD47-deficient mice. (A) Total thymocytes from BALB/c: CD11c⁺ CD172a^{high} DC subset expresses CD11b, in contrast to the CD11c⁺CD172a^{low} DC subset. n = 10. (B) Non-transgenic and (D) 3A9 TCR transgenic H2^k BALB (dotted lines) and CD47-deficient (solid lines) mice are analyzed for the comparative level of CD172a expression on CD11c⁺CD11b⁺ and CD11c⁺CD11b⁻ DC subsets. (C) BALB/c (WT) mice (open circles) compared to the CD47-deficient (KO) mice (closed circles). The proportion of total CD11c⁺ cells is similar in both strains (left panel, p = 0.2), while the proportion of CD11c⁺CD11b⁺ cells is reduced in CD47-deficient mice (right panel, p < 0.0001). (E) Left panel: Thymic cellularity of 3A9 TCR transgenic H2^k-mice is not reduced by the absence of CD47. Right panel: The proportion of CD11c⁺CD11b⁺ cells is reduced in CD47-deficient 3A9 TCR transgenic H2^k-mice (p < 0.001). The dash represents the mean value for all mice.

ANNEXE 2

Title :

IL-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone NOD mice

Running title: IL-10 limits DN T cell expansion

Authors: Erin E. Hillhouse^{a,b}, Claudine Beauchamp^{a,b}, Geneviève Chabot-Roy^a, Véronique Dugas^{a,b}, Sylvie Lesage^{a,b}

a Immunology-oncology Section, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada

b Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

Abstract

Regulatory T cells appear to show great potential for use in cellular therapy. In particular, CD4-CD8⁻ (DN) T cells, which compose 1 to 3% of total T lymphocytes, exhibit prominent antigen-specific immune tolerance properties and confer immune tolerance in models of allografts and xenografts. We have recently demonstrated that autoimmune-diabetes prone mice carry fewer DN T cells and that this phenotype contributes to autoimmune-diabetes susceptibility, suggesting that increasing DN T cell number in autoimmune-prone individuals may be of therapeutic interest. To achieve this goal, we must first determine whether the remaining DN T cells in autoimmune-prone mice are functional. In addition, we must identify the parameters which regulate the numbers of DN T cells. Herein, we evaluate the immunoregulatory properties of DN T cells in the autoimmune-prone NOD genetic background. Using the 3A9 TCR transgenic mice, we demonstrate that DN T cells from both diabetes-resistant B10.Br and genetically autoimmune-prone NOD.*H2^k* mice show an equivalent immuno-regulatory potential on a per cell basis. However, upon stimulation, there is a tenfold increase in the number of 3A9 TCR transgenic DN T cells that produce IL-10 from NOD.*H2^k* mice in comparison to B10.Br mice. We further demonstrate that IL-10 facilitates DN T cell apoptosis and thus may regulate the number of DN T cells. Together, our results demonstrate that, although reduced in number, DN T cells from mice carrying an autoimmune-prone genetic background exhibit a potent cytotoxic potential and that DN T cell expansion is regulated at least in part by IL-10.

Keywords: autoimmune diabetes, IL-10, immune regulation, T cells, transgenic mice

Introduction

Many different T cell subsets have been shown to regulate immune responses and/or autoimmunity including CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ naturally occurring T cells (nTregs), IL-10-producing CD4⁺ Tr1 cells, TGF- β -producing CD4⁺ Th3 cells, CD8⁺CD28⁻ T cells, CD4⁻CD8⁻ (DN, double negative) T cells, CD4⁺CD8⁺ (DP, double positive) T cells, and Natural Killer T (NKT) cells¹⁻³. The contribution of these respective subtypes to the proper control of immune tolerance and prevention of autoimmune disease remains to be defined. Their diverse antigenic specificity and/or distinct mode of action hint that the contribution of each of these T cell subsets to specific peripheral tolerance requirements may vary². Hence, there is a need to further examine the contribution of various T cell subsets to autoimmune predisposition.

Of these regulatory T cell subsets, CD4-CD8- (DN) T cells compose 1%–3% of peripheral T lymphocytes in both mice and humans^{4,5}. Importantly, the insertion of a TCR transgene has facilitated the identification and isolation of DN T cells, as well as their implication in antigen-specific immunosuppression⁶⁻¹². Indeed, using various TCR transgenic mouse models, it has been shown that DN T cells carry a unique immunoregulatory potential, which resides in their ability to specifically suppress T cells in an antigen-specific manner¹³⁻¹⁸. DN T cells acquire antigen-specific peptide/MHC complexes through their interaction with antigen presenting cells and can subsequently present peptide/MHC complexes to CD8 T cells and eliminate the latter^{13, 17}. Interestingly, these characteristics are equally shared by human DN T cells⁴. Moreover, non-transgenic DN T cells can also efficiently eliminate activated B cells presenting the cognate antigen⁵. Taken together, these data demonstrate that the immunosuppressive function of DN T cells is mediated, at least in part, through the antigen-specific elimination of activated T or B cells.

This antigen-specific immunoregulatory function of DN T cells was further revealed in the context of transplant tolerance mouse models^{13, 14, 19}. Pre-transplant treatment with donor-lymphocyte infusion (DLI) results in a significant increase in the proportion of antigen-

specific DN T cells in accepted allografts and xenografts^{13, 14, 19}. In addition, *in vivo* transfer of antigen-specific DN T cell clones prevents skin and cardiac allograft rejection^{13, 15}. Activated DN T cells were also shown to protect from graft-vs-host disease and antigen-induced autoimmune diabetes^{16, 18}. Therefore, the relatively rare DN T cell subset exhibits a remarkably potent immunosuppressive potential in multiple model systems, from transplantation to autoimmunity.

More recently, our group investigated the role of DN T cells in spontaneous models of autoimmune-diabetes. We took advantage of the 3A9 TCR:insHEL transgenic system, where the 3A9 TCR transgene recognizes a peptide from hen egg lysozyme (HEL) in the context of I-A^k²⁰, while the insHEL transgene enforces expression of HEL in the pancreatic tissue²¹. TCR:insHEL BALB.K mice are relatively resistant to autoimmune-diabetes progression and the deletion of CD47 in this strain is sufficient to break immune tolerance leading to a high diabetes incidence in TCR:insHEL CD47-deficient BALB.K mice²². Interestingly, the proportion of DN T cells was much reduced in the autoimmune-diabetes prone CD47-deficient mice and a single transfer of DN T cells in the CD47-deficient BALB.K transgenic model was sufficient to prevent autoimmune diabetes onset²². Of relevance, we also showed that both NOD non-transgenic and TCR transgenic autoimmune diabetes-prone mouse models exhibited a low number of DN T cells relative to other autoimmune diabetes-resistant strains²². Together, these results suggest that restoring DN T cell number in autoimmune-prone mice prevents diabetes onset and may be of therapeutic interest for type 1 diabetes.

The primary objective of this study was thus to determine whether the activity of DN T cells is naturally impaired in the spontaneous autoimmune diabetes-prone NOD genetic background. We opted to compare 3A9 TCR DN T cells from autoimmune resistant B10.Br and autoimmune-prone NOD.H2^k mice⁹. Surprisingly, DN T cells originating from both genetic backgrounds efficiently eliminate their target cells demonstrating that the cytotoxic function of DN T cells is not impeded in autoimmune-prone mice. However, we find that DN T cells derived from the NOD genetic background produce more IL-10, which reduces

the extent of DN T cell expansion. Altogether, the association of DN T cells to autoimmune diabetes susceptibility is most probably due to the homeostatic regulation of DN T cells.

Results

3A9 TCR transgenic DN T cells are cytotoxic towards B cells

Using non-transgenic and TCR transgenic models, it has been previously shown that DN T cells are cytotoxic towards T cells or B cells^{5, 7, 13, 23}. We first aimed to determine whether DN T cells observed in 3A9 TCR transgenic mice carried a cytotoxic potential. To obtain purified DN T cells, we isolated 3A9 TCR transgenic T cells on the basis of CD4⁻CD8⁻1G12⁺ expression. Importantly, we show that 1G12⁺ DN T cells do not express DX5 or stain with aGal-Cer CD1d-tetramer (Figure 1a), suggesting that they are not CD4⁻CD8⁻NKT cells. Moreover, following antigen-stimulation (anti-CD3, anti-CD28, IL-2 and IL-4), at least 90% of DN T cells remain CD4⁻CD8⁻FoxP3⁻, with some experiments reaching purities above 99% (Figure 1b and data not shown). We subsequently demonstrate that these highly purified 3A9 DN T cells from both B10.Br and NOD.*H2^k* mice express a high level of granzyme B upon antigenic stimulation in the presence of cytokines (Figure 1c). Moreover, 3A9 DN T cells from both strains efficiently stain with anti-CD107a, a degranulation marker.

As DN T cells in other systems are cytotoxic towards either T cells or B cells^{5, 7, 13, 23}, we next wanted to determine the specificity of 3A9 DN T cells. Using activated B and T cells as targets for activated 3A9 DN T cells from the B10.Br strain, we show that B10.Br 3A9 DN T cells efficiently eliminated HEL-antigen loaded B cells (Figure 1d). This killing is completely inhibited by the presence of EGTA suggesting a dependence on perforin/granzyme granules to mediate the cytotoxicity²⁴. Moreover, the 3A9 DN T cells eliminated B cells in an antigen-specific manner, as they did not eliminate B cells in the absence of HEL (Figure 2a, left) Surprisingly, 3A9 DN T cells were unable to eliminate T cells (Figure 1d), as opposed to the DN T cells from 2C TCR and P14 TCR transgenic models^{13, 18}. We are tempted to suggest that this difference is attributed to MHC-restriction, where MHC class II-restricted 3A9 DN T cells have a different specificity compared to MHC class I-restricted 2C TCR and P14 TCR DN T cells. Notwithstanding,

these data suggest that 3A9 DN T cells from the B10.Br background are directly cytotoxic towards B cells.

3A9 DN T cells from B10.Br and NOD.*H2^k* mice show comparable antigen-specific deletion of activated B cells

We have previously shown that a reduction in DN T cell number is associated with autoimmune disease predisposition²². These results do not preclude the fact that DN T cell function may also be altered in autoimmune-prone mice, further contributing to disease susceptibility. Therefore, we investigated whether the immuno-regulatory potential of DN T cells from a NOD genetic background was impaired. Surprisingly, NOD.*H2^k* 3A9 DN T cells were able to eliminate activated B cells loaded with HEL antigen (Figure 2a, right). As for the B10.Br 3A9 DN T cells, this response was both antigen-specific and inhibited by EGTA. These results suggest that DN T cells from either strain of mice exhibited cytotoxicity towards activated B cells. Interestingly, the suppressive activity of B10.Br 3A9 DN T cells appeared to exceed that of the NOD.*H2^k* 3A9 DN T cells based on the absolute value of their cytotoxicity (Figure 2a, left and right panels, respectively). However, it should be noted that the relative difference in the cytotoxic activity of B10.Br and NOD.*H2^k* 3A9 DN T cells is indeed equivalent as the background levels of cytotoxicity are increased for the control target cells from the B10.Br background. Therefore, variations between the spontaneous release of ⁵¹Cr from target cells of the B10 and NOD backgrounds, rather than the DN T cells themselves, may account for the differences observed in the absolute values of the cytotoxicity.

To directly compare the cytotoxic efficiency of 3A9 DN T cells from both strains, we generated F1 (B10.Br x NOD.*H2^k*) mice, where F1 B cells could be used as common targets for 3A9 DN T cells from both genetic backgrounds. Our results clearly demonstrate that 3A9 TCR DN T cells from both B10.Br and NOD.*H2^k* background were equally cytotoxic towards B cells (Figure 2b). Based on these results, we conclude that, on a per cell basis, the DN T cell cytotoxic function is not impeded in the autoimmune-prone NOD genetic background.

3A9 DN T cells from NOD.*H2^k* mice produce more IL-10

Although the cytotoxic efficiency of 3A9 TCR DN T cell from either B10.Br or NOD.*H2^k* mice was comparable, we sought to investigate the existence of any other potential functional differences between DN T cells from these diabetes-resistant and -susceptible strains. Upon further phenotypic characterization of 3A9 DN T cells from B10.Br and NOD.*H2^k* mice, we found that DN T cells that had undergone antigenic activation in the presence of cytokines produced equivalent amounts of IFN γ (data not shown). Interestingly, however, the production of IL-10 was considerably elevated in NOD.*H2^k* 3A9 DN T cells (Figure 3a). Indeed, the culture supernatant of 3A9 DN T cells from NOD.*H2^k* mice contained tenfold more IL-10 when compared to those of B10.Br mice. This increased quantity of IL-10 in the supernatant reflects an increased proportion of NOD.*H2^k* 3A9 DN T cells efficiently producing IL-10 (Figure 3b). 3A9 DN T cells from the NOD genetic background are, thus, functionally different from those of the B10.Br strain in terms of IL-10 production.

IL-10 does not affect the cytotoxic potential of 3A9 DN T cells

IL-10 is primarily defined as an immunosuppressive cytokine and has been shown to impede different aspects of T cell responses²⁵. More importantly, IL-10 had been previously shown to reduce the cytotoxic potential of 2C TCR DN T cells²⁶. As a result, we verified the ability of IL-10 to hinder the cytotoxic function of 3A9 DN T cells. The cytotoxic potential of 3A9 DN T cells from B10.Br and NOD.*H2^k* mice was thus assessed in the presence or absence of IL-10. Interestingly, the expression of granzyme B and CD107a (Figure 4a) as well as the antigen-specific cytotoxic activity of 3A9 DN T cells from either mouse strain was not affected by the presence of IL-10 in the culture (Figure 4b).

IL-10 impedes 3A9 DN T cell *in vitro* expansion

Still, the activation of the 3A9 DN T cells in the presence of IL-10 revealed a different alteration in DN T cells. Indeed, we noted that the yield of 3A9 DN T cells cultured in the

presence of IL-10 was repeatedly lower. We, thus, quantified the expansion of 3A9 DN T cells from B10.Br and NOD.*H2^k* mice, in the presence or absence of IL-10. In each experiment, 3A9 DN T cells from B10.Br mice showed a significant reduction in cell expansion when cultured in the presence of IL-10 (Figure 5a, left). Notably, the expansion of 3A9 DN T cells from NOD.*H2^k* mice, cultured in the absence of additional IL-10, was significantly lower than that of DN T cells from B10.Br mice. Moreover, although NOD.*H2^k* 3A9 DN T cells efficiently produce IL-10, this response is not completely saturated as the addition of IL-10 to the cultures of 3A9 DN T cells from NOD.*H2^k* mice slightly reduced their expansion (Figure 5a, right). These results demonstrate that IL-10 restrains DN T cells expansion and suggest that the reduced expansion potential of 3A9 DN T cells from NOD.*H2^k* mice compared to that of B10.Br mice is the result of their elevated IL-10 production.

IL-10 facilitates DN T cell apoptosis.

Next, we wanted to determine the mechanism by which the presence of IL-10 influenced DN T cell expansion. Cellular expansion is a balance between the rate of proliferation and the rate of cell death. Therefore, we first verified the impact of IL-10 on DN T cell proliferation *in vitro*. Using CFSE-labelled 3A9 DN T cells, we demonstrate that IL-10 did not affect the proliferative response of DN T cells of either mouse strain (Figure 5b). These data indicate that the difference in DN T cell expansion potential between the two strains was not a consequence of a defect in cellular proliferation. In addition, these results demonstrate that IL-10 does not affect DN T cell proliferation.

Therefore, to explain the decrease in cellular expansion, we suspected that IL-10 facilitated DN T cell apoptosis. The percentage of apoptotic 3A9 DN T cells upon a 6 to 8 day culture was monitored by Annexin V staining (Figure 6). First, a higher proportion of 3A9 DN T cells from NOD.*H2^k* mice, which spontaneously produce high levels of IL-10, underwent apoptosis when compared to the B10.Br counterpart (compare Figures 6a and 6b without additional IL-10). Second, the percentage of apoptotic 3A9 DN T cells from B10.Br mice was elevated when IL-10 was added to the culture. Moreover, although this tendency was not significant overall, 3A9 DN T cells from NOD.*H2^k* mice also showed a slight increase

in apoptosis in some experiments when IL-10 was added to the culture, which is most probably attributed to the high level of endogenous IL-10 production by these cells. To further confirm the finding that IL-10 facilitated DN T cell apoptosis, we cultured 3A9 DN T cells from NOD.*H2^k* mice, which produce high levels of endogenous IL-10, with 10µg/ml of an antibody targeting the IL-10 receptor. Indeed, the presence of this blocking antibody resulted in an increase in the cellular expansion of 3A9 DN T cells from NOD.*H2^k* mice (Figure 7a), as well as a decrease in their level of apoptosis (Figure 7b). Together, these results suggest that IL-10 impedes DN T cell expansion and correlates with an increase in DN T cell apoptosis.

Discussion

DN T cells are rare and potent immunosuppressive cells, which eliminate their target T cells or B cells in an antigen-specific manner^{5, 13}. Importantly, the insertion of a TCR transgene facilitates the identification and isolation of DN T cells, as well as their implication in antigen-specific immunosuppression⁶⁻¹². Indeed, the DN T cell subset exhibits a potent immunosuppressive potential in multiple model systems, including graft rejection^{13-15, 19}, graft-vs-host disease¹⁶ and autoimmune diabetes¹⁸. We have recently demonstrated that autoimmune-diabetes prone mice exhibit fewer DN T cells than the autoimmune-resistant mouse strains²². In addition, we have shown that, in a syngenic 3A9 TCR BALB.K transgenic system, a single transfer of DN T cells is sufficient to confer resistance to diabetes progression²². These results suggest that modulation of DN T cell number may be of therapeutic interest, if DN T cell function is not affected in autoimmune diabetes-prone individuals. Herein, we examined the cytotoxic activity of DN T cells from both autoimmune diabetes-resistant and -prone mice. We further explored the role of IL-10 production by DN T cells from the NOD genetic background in the regulation of DN T cell expansion.

To compare the function of DN T cells in the autoimmune-resistant and -prone mice, we took advantage of the 3A9 TCR transgene, as it has been interbred to both the autoimmune-resistant B10.Br and autoimmune-prone NOD.*H2^k* strains. Indeed, apart from the MHC locus, NOD.*H2^k* mice are genetically identical to the NOD strain. Therefore, comparison of 3A9 DN T cells from B10.Br and NOD.*H2^k* mice allows us to define whether the autoimmune-prone NOD genetic background influences DN T cell function. Using this model, we have provided compelling evidence that the cytotoxic ability was similar between the two strains. This result supports the view that autologous transfer of DN T cells in autoimmune-prone mice or individuals may be of therapeutic interest. We aim to further explore this novel antigen-specific therapeutic avenue.

DN T cells isolated from the non-transgenic system demonstrate antigen-specific cytotoxicity towards both T cells and B cells⁵. Interestingly, DN T cells from various TCR transgenic models have been reported to specifically eliminate CD8 T cells¹³⁻¹⁸, while we report that the 3A9 DN T cells target B cells. We believe that the difference in target cell specificity may be attributed to MHC-restriction where the 2C and P14 TCR transgenes, most commonly used to study DN T cell cytotoxicity, are both MHC class I-restricted, as opposed to the 3A9 TCR transgene, which is MHC class II-restricted. Notably, since the 3A9 TCR transgene is class II restricted, these transgenic mice hold a very limited number of HEL-specific CD8 T cells. Nevertheless, we extensively tested the cytotoxic potential of 3A9 DN T cells towards T cells by using total spleen, purified CD4 or purified CD8 T cells from 3A9 TCR transgenic mice (Figure 1d and data not shown). We have also attempted to pre-immunize the 3A9 TCR transgenic mice using HEL antigen with or without adjuvant. Yet, in all of these conditions, 3A9 DN T cells were unable to eliminate the 3A9 TCR transgenic CD4 or CD8 targets (data not shown). Consequently, we propose that MHC specificity dictates the cellular target of DN T cells, where the class II-restricted 3A9 DN T cells specifically recognize the HEL-peptide presented by I-A^k molecules at the surface of B cells. The study of DN T cell function in additional MHC class I and class II-restricted TCR transgenic models should help resolve this issue. Alternatively, isolation of DN T cells from non-transgenic mice may also help further unravel their function in immune tolerance.

We have previously shown that the proportion of DN T cells was reduced in autoimmune-prone mice. Our present results show that the cytotoxic function of DN T cells from autoimmune-prone mice is comparable to that of autoimmune-resistant mice. Upon further comparison of DN T cell functions between these strains, we went on to demonstrate that DN T cells from the NOD.*H2^k* background produce more IL-10, which limits their expansion potential. Although others have previously shown that IL-10 inhibits the cytotoxic function of DN T cell²⁷, we herein demonstrate that IL-10 has no direct effect on

DN T cell cytotoxicity towards activated B cells in the 3A9 TCR transgenic setting. One possibility for this discrepancy is the nature of the DN T cells utilized in these assays. Indeed, IL-10 inhibited the cytotoxic potential of DN T cell clones²⁶, whereas we demonstrate that IL-10 does not influence the cytotoxic potential of primary cell cultures. Nonetheless, despite our observation that IL-10 had no direct effect on DN T cell cytotoxicity on a per cell basis, it must be noted that IL-10 would ultimately have a secondary effect on DN T cell cytotoxicity since the presence of IL-10 results in a reduction in their cellular expansion, which will subsequently decrease the magnitude of the global cytotoxic response.

The pro-apoptotic role of IL-10 has also been reported for other cell types, including monocytes, Th1 cells, and dendritic cells²⁵. It should be noted that the role of IL-10 in diabetes progression is controversial, and has been demonstrated to both protect from and accelerate disease development. For instance, daily IL-10 subcutaneous treatment of 9–10-week-old NOD mice delayed the onset of diabetes, reduced the severity of insulinitis and significantly reduced disease incidence²⁸. Furthermore, systemic administration with an IL-10/Fc fusion protein in female NOD mice from 5 to 25 weeks of age blocked diabetes development and provided lasting protection after treatment was terminated²⁹. In contrast to these immunosuppressive effects of IL-10, the transgenic expression of IL-10 by insulin-producing pancreatic β cells or glucagon-producing pancreatic α cells led to an accelerated onset of diabetes in NOD mice³⁰⁻³³. These findings suggest that the IL-10 location plays a deciding role on the outcome of diabetes development where systemic IL-10 confers protection whereas islet-specific IL-10 exacerbates diabetes progression. It is tempting to speculate that the presence of IL-10 within the pancreatic islets impedes DN T cell expansion and thereby inhibits their immunoregulatory function, while systemic administration of IL-10 dominantly contributes to other immunosuppressive mechanisms.

Interestingly, IL-10 genetic polymorphisms have been associated with autoimmune diabetes susceptibility, as well as in the progression of various autoimmune diseases, such as lupus, rheumatoid arthritis, and colitis^{25, 34, 35}. Clearly, IL-10 has an impact on a multitude of autoimmune disorders and extensive studies are required to define the mechanistic contribution of these genetic polymorphisms to the various pathologies. Although the *Il10* gene is not located within an insulin-dependent diabetes (*Idd*) susceptibility locus, IL-10 production by T cells is regulated at least in part by genetic polymorphisms encoded within the *Idd5.1* susceptibility locus³⁶. As a result, we are currently investigating whether the *Idd5* susceptibility locus plays a role on the regulation DN T cell number.

We have previously reported that a single transfer of DN T cells in the CD47-deficient BALB.K transgenic model was sufficient to prevent autoimmune diabetes onset²². Other regulatory T cell subsets have been shown to confer protection from diabetes progression, such as Foxp3⁺ Tregs³⁷⁻³⁹ and NKT cells^{40, 41}. Interestingly, both of these cell types also produce IL-10^{39, 41, 42}. Moreover, it has recently been shown that in the absence of IL-10 signalling there is a subsequent decrease in the both the expression of Foxp3 by Tregs as well as their suppressive activity⁴³. This contrasts with our study where increased IL-10 signalling has no effect on DN T cell function yet facilitated DN T cell apoptosis resulting in decreased cell numbers. These observations highlight the interdependent cellular complexity of *in vivo* immune regulation.

Other than IL-10 production, DN T cells have an intriguing resemblance to NKT cells. They both carry a similar phenotype, where both DN T cells and a subset of NKT cells express TCR β yet lack CD4 and CD8 co-receptor expression^{22, 44, 45}; they both demonstrate cytotoxic activity as shown throughout this manuscript and^{46, 47}; they are both present in lower numbers in NOD mice and they both confer protection from diabetes development^{22, 48}. Moreover, we have recently shown that the CD47 pathway is implicated in the regulation of DN T cell numbers²², while NKT cell numbers are regulated by *Idd13*^{49, 50}, a

diabetes-susceptibility locus which encodes the highly polymorphic cellular ligand of CD47, namely CD172a^{51, 52}. Together, these data strongly suggest that DN T cells carry an NKT cell-like phenotype. Notwithstanding, we have identified DN T cells in non-transgenic mice that are phenotypically similar to 3A9 TCR transgenic DN T cells. Indeed, as demonstrated herein for 3A9 TCR transgenic DN T cells (Figure 1a), the DN T cells isolated from non-transgenic mice lack DX5 expression and do not stain with CD1d-tetramer²². Taken together, these results suggest that although DN T cells exhibit similarities to NKT cells, they compose a unique subset.

In summary, evaluating the role of DN T cells in the 3A9 TCR transgenic setting has highlighted their antigen-specific mode of action towards activated B cells. Moreover, we have demonstrated that the cytotoxic potential of DN T cells on a per cell basis is not altered in autoimmune-prone mice or in the presence of IL-10. However, IL-10 facilitates DN T cell apoptosis resulting in an inefficient cellular expansion *in vitro*. We have previously shown that the CD47 pathway influences the proportion of DN T cells *in vivo*²². Future studies should decipher the contribution of both the IL-10 and the CD47 pathway in the homeostatic regulation of DN T cells. Altogether, as the cytotoxic function of DN T cells is normal in genetically autoimmune-prone mice, we propose that the association of DN T cells to diabetes resistance is most probably due to the regulation of DN T cell number. Therefore, with regards to new approaches in cellular therapy, our main focus should lie on the restoration and expansion of DN T cell numbers in an antigen-specific manner, which may contribute to immune-regulation and prevent autoimmune disease progression.

Methods

Mice

3A9 TCR⁵³ and insHEL (ILK-3)²¹ transgenic mice on B10.Br, NOD.*H2^k* and F1 (B10.Br x NOD.*H2^k*) background have been previously described⁹. Studies were approved by the Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee overseen by the Canadian Council for Animal Protection.

Flow cytometry

6–12-wk old non-diabetic mice (Diastix negative) were analyzed. Single cell suspensions of lymphoid organs were prepared by mechanical disruption through a 70 µm sterile cell strainer (BD Biosciences). NH₄Cl was used for erythrocyte lysis of single cell suspensions from spleens. αGal-Cer-loaded CD1d-tetramer is a generous gift from Dr. David Serreze. Intracellular staining for granzyme B (16G6, eBiosciences) and IL-10 (JES5-16E3, Biolegend) were performed using BD Biosciences Cytotfix/Cytoperm Kit. The FITC Anti-Mouse/Rat Foxp3 Staining Set was used for Foxp3 staining according to the manufacturer's instructions (eBiosciences). Anti-clonotypic 1G12 antibody, specific to the 3A9 TCR⁵⁴, was detected using APC-labelled anti-mouse IgG1 (clone X56, BD Biosciences). PerCP-labelled CD8α (53-6.7) and PerCP-labelled 7-AAD were purchased from BD Pharmingen. All other antibodies and staining reagents were purchased from Biolegend. Data was collected on a FACSCalibur or FACS LSR II (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Treestar).

Cell purification

Prior to DN T cell sorting, cell suspensions were stained with biotin-labelled anti-mouse B220 antibody (RA3 6B2, Biolegend) and B220+ cells were removed using the EasySep™ biotin selection kit (Stem Cell). The B220 negative fraction was then stained with antibodies to CD4, CD8 and 3A9 TCR (using the 1G12 clone) and sorted using a FACS Vantage (BD Biosciences) for CD4⁺CD8⁻1G12⁺ DN T cells (purity > 90%). For some

experiments, DN T cells were obtained by removing CD4, CD8 and B220 positive cells using the EasySep™ biotin selection kit. This procedure efficiently removed CD4⁺, CD8⁺ and B220⁺ cells (< 10% contaminating cells). B and T cells were also selected using the EasySep™ PE selection kit, respectively staining for B220 or CD3 (purity > 85%). Similar results were obtained when B and T cells were sorted (purity > 95%).

Cellular expansion

Sorted DN T cells (250 000 cells/ml) were cultured in the presence of plate-bound anti-CD3 (1µg/ml, 145-2C11) and anti-CD28 (10µg/ml, 37.51) with IL-2 (30U/ml), IL-4 (30 U/ml) ± IL-10 (10ng/ml) or anti-IL-10R (10µg/ml, 1B1.3a) for 5 to 7 days, in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 1% Penicillin Streptomycin (Invitrogen), 1% HEPES 1M (GIBCO) and 0.1% 2-mercaptoethanol 1000X (GIBCO). Cytokines were purchased at Feldan Bio. Cell cultures were monitored daily for confluence and cytokine supplemented media was added when cell density was > 1x10⁶ cells/ml. Cell number was quantified by trypan blue exclusion.

Cytotoxic potential

DN T cells were sorted or enriched using using the EasySep™ biotin selection kit as described above and cultured in the presence of either soluble anti-CD3 and irradiated APCs (T-depleted spleen cells, 2.5 Gy, 250 000 cells/ml) or plate-bound anti-CD3 and anti-CD28, with IL-2, IL-4 ± IL-10, at the same concentrations as indicated for cellular expansion. For granzyme B detection, cells were re-stimulated at day three for 4h with PMA (50ng/ml) (Sigma), ionomycin (0.5µg/ml) (Sigma), and Brefeldin A (10 µg/ml) (Sigma), prior to intracellular staining. For CD107a (LAMP1) staining, we replaced Brefeldin A with mononesin (2nM) (BD biosciences) and the anti-CD107a antibody was added during the 4h re-stimulation⁵⁵.

Cytotoxicity

Sorted or enriched DN T cells were stimulated 7 days *in vitro* with either soluble anti-CD3 and irradiated APCs or plate-bound anti-CD3 and anti-CD28, IL-2, IL-4 ± IL-10. LPS

(1 μ g/ml) and anti-CD3 + irradiated APCs + IL-2 were used to stimulate B and T cells, respectively, *in vitro* for 2 days, and HEL antigen (1mg/ml) (Sigma) was added in the last 24h of culture. Target cells were washed and loaded with 50 μ Ci 51 Cr (Perkin Elmer) for 90 min. DN T cells and target cells were quantified by trypan blue exclusion prior to co-culture in order to obtain the desired DN T cell to target cell ratio. DN T cells and target cells were incubated for 3h in the presence or absence of EGTA (0.16mM) (J. T. Baker). %Cytotoxicity = $100 * (E - S) / (M - S)$, where E = experiment, S = spontaneous and M = maximal release.

Measurement of cytokines in the supernatant of cultured DN T cells

DN T cells were sorted from TCR transgenic B10.Br and NOD.*H2^k* mice and cultured for 3 days with soluble anti-CD3, irradiated APCs, IL-2 and IL-4. The amount of IL-10 from the supernatant of cultured DN T cells was measured by an ELISA kit (Biolegend) according to the manufacturer's protocol.

Proliferation assay

For proliferation assays, sorted DN T cells were labelled with CFSE (2 μ M) (Invitrogen) and washed twice in cold supplemented RPMI prior to culture. CFSE-labelled DN T cells were cultured in the presence of plate-bound anti-CD3, anti-CD28, with IL-2, IL-4 \pm IL-10, as above. CFSE dilution was monitored by flow cytometry.

Apoptosis assay

Sorted DN T cells were cultured in the presence of plate-bound anti-CD3 and anti-CD28, with IL-2, IL-4 \pm IL-10 for 6 to 8 days. Apoptosis was quantified by flow cytometry using Annexin-V.

Statistics

The paired student's *t* test or the Mann-Whitney U statistical test was applied where appropriate.

Acknowledgements

We thank Dr C. C. Goodnow for generously providing the mice, Dr. D. Serreze for generously providing CD1d-tetramer staining reagent, Dr. L. Zhang for helpful comments on the cytotoxicity assay, Drs N. Labrecque and M. Guimond for critical review of the manuscript, A.N. Pelletier for statistical analyses, M. Asselin, M. J. Guyon and the staff of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center for curating the mouse colony. This work was supported by a Career Development Award from the Juvenile Diabetes Research Foundation International and from the Canadian Foundation for Innovation. E.H., C.B. and V.D. respectively hold graduate scholarships from CIHR, Diabète Québec and FRSQ. S.L. holds a FRSQ Junior Scholarship.

References:

- 1 Qin HY, Mukherjee R, Lee-Chan E, Ewen C, Bleackley RC, Singh B. A novel mechanism of regulatory T cell-mediated down-regulation of autoimmunity. *Int Immunol* 2006; **18**: 1001-15.
- 2 Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006; **25**: 195-201.
- 3 Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000; **21**: 573-83.
- 4 Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M *et al*. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8-double-negative regulatory T cells. *Blood* 2005; **105**: 2828-35.
- 5 Zhang ZX, Ma Y, Wang H, Arp J, Jiang J, Huang X *et al*. Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, fas-fas ligand-independent pathway. *J Immunol* 2006; **177**: 6920-9.
- 6 Bruno L, Fehling HJ, von Boehmer H. The alpha beta T cell receptor can replace the gamma delta receptor in the development of gamma delta lineage cells. *Immunity* 1996; **5**: 343-52.
- 7 Caveno J, Zhang Y, Motyka B, Teh SJ, Teh HS. Functional similarity and differences between selection-independent CD4-CD8- alphabeta T cells and positively selected CD8 T cells expressing the same TCR and the induction of anergy in CD4-CD8-alphabeta T cells in antigen-expressing mice. *J Immunol* 1999; **163**: 1222-9.
- 8 Fritsch M, Andersson A, Petersson K, Ivars F. A TCR alpha chain transgene induces maturation of CD4- CD8- alpha beta+ T cells from gamma delta T cell precursors. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 828-37.
- 9 Lesage S, Hartley SB, Akkaraju S, Wilson J, Townsend M, Goodnow CC. Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2002; **196**: 1175-88.
- 10 Terrence K, Pavlovich CP, Matechak EO, Fowlkes BJ. Premature expression of T cell receptor (TCR)alphabeta suppresses TCRgammadelta gene rearrangement but permits development of gammadelta lineage T cells. *J Exp Med* 2000; **192**: 537-48.
- 11 Viret C, Janeway CA, Jr. Self-specific MHC class II-restricted CD4-CD8- T cells that escape deletion and lack regulatory activity. *J Immunol* 2003; **170**: 201-9.
- 12 von Boehmer H, Kirberg J, Rocha B. An unusual lineage of alpha/beta T cells that contains autoreactive cells. *J Exp Med* 1991; **174**: 1001-8.
- 13 Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 2000; **6**: 782-9.

- 14 Young KJ, Yang L, Phillips MJ, Zhang L. Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood* 2002; **100**: 3408-14.
- 15 Chen W, Ford MS, Young KJ, Zhang L. Infusion of in vitro-generated DN T regulatory cells induces permanent cardiac allograft survival in mice. *Transplant Proc* 2003; **35**: 2479-80.
- 16 Young KJ, DuTemple B, Phillips MJ, Zhang L. Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells. *J Immunol* 2003; **171**: 134-41.
- 17 Ford McIntyre MS, Young KJ, Gao J, Joe B, Zhang L. Cutting edge: In vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression. *J Immunol* 2008; **181**: 2271-5.
- 18 Ford MS, Chen W, Wong S, Li C, Vanama R, Elford AR *et al.* Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development. *Eur J Immunol* 2007; **37**: 2234-41.
- 19 Chen W, Ford MS, Young KJ, Cybulsky MI, Zhang L. Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival. *J Immunol* 2003; **170**: 1846-53.
- 20 Allen PM, Matsueda GR, Evans RJ, Dunbar JB, Jr., Marshall GR, Unanue ER. Identification of the T-cell and Ia contact residues of a T-cell antigenic epitope. *Nature* 1987; **327**: 713-5.
- 21 Akkaraju S, Ho WY, Leong D, Canaan K, Davis MM, Goodnow CC. A range of CD4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis. *Immunity* 1997; **7**: 255-71.
- 22 Dugas V, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Hillhouse EE, Lesage S. Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes. *J Autoimmun.*
- 23 Priatel JJ, Utting O, Teh HS. TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J Immunol* 2001; **167**: 6188-94.
- 24 He JS, Ostergaard HL. CTLs contain and use intracellular stores of FasL distinct from cytolytic granules. *J Immunol* 2007; **179**: 2339-48.
- 25 Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 683-765.
- 26 Zhang ZX, Stanford WL, Zhang L. Ly-6A is critical for the function of double negative regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 1584-92.
- 27 Marra LE, Zhang ZX, Joe B, Campbell J, Levy GA, Penninger J *et al.* IL-10 induces regulatory T cell apoptosis by up-regulation of the membrane form of TNF-alpha. *J Immunol* 2004; **172**: 1028-35.
- 28 Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M. Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; **71**: 169-75.

- 29 Zheng XX, Steele AW, Hancock WW, Stevens AC, Nickerson PW, Roy-Chaudhury P *et al.* A noncytolytic IL-10/Fc fusion protein prevents diabetes, blocks autoimmunity, and promotes suppressor phenomena in NOD mice. *J Immunol* 1997; **158**: 4507-13.
- 30 Balasa B, Van Gunst K, Jung N, Balakrishna D, Santamaria P, Hanafusa T *et al.* Islet-specific expression of IL-10 promotes diabetes in nonobese diabetic mice independent of Fas, perforin, TNF receptor-1, and TNF receptor-2 molecules. *J Immunol* 2000; **165**: 2841-9.
- 31 Wogensen L, Huang X, Sarvetnick N. Leukocyte extravasation into the pancreatic tissue in transgenic mice expressing interleukin 10 in the islets of Langerhans. *J Exp Med* 1993; **178**: 175-85.
- 32 Wogensen L, Lee MS, Sarvetnick N. Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of beta cells in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1994; **179**: 1379-84.
- 33 Moritani M, Yoshimoto K, Tashiro F, Hashimoto C, Miyazaki J, Ii S *et al.* Transgenic expression of IL-10 in pancreatic islet A cells accelerates autoimmune insulinitis and diabetes in non-obese diabetic mice. *Int Immunol* 1994; **6**: 1927-36.
- 34 Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA *et al.* Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 2009.
- 35 Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G *et al.* Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 2008; **40**: 1319-23.
- 36 Greve B, Vijaykrishnan L, Kubal A, Sobel RA, Peterson LB, Wicker LS *et al.* The diabetes susceptibility locus Idd5.1 on mouse chromosome 1 regulates ICOS expression and modulates murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004; **173**: 157-63.
- 37 Wu AJ, Hua H, Munson SH, McDevitt HO. Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 12287-92.
- 38 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.
- 39 Jaeckel E, von Boehmer H, Manns MP. Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; **54**: 306-10.
- 40 Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, Laloux V, Carnaud C, Bendelac A *et al.* Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med* 1998; **188**: 1831-9.
- 41 Hammond KJ, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI, Baxter AG. alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent

- diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 1998; **187**: 1047-56.
- 42 Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002; **168**: 1080-6.
- 43 Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H *et al.* Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 2009; **10**: 1178-84.
- 44 Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med* 1994; **180**: 1171-6.
- 45 Exley M, Garcia J, Balk SP, Porcelli S. Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J Exp Med* 1997; **186**: 109-20.
- 46 Arase H, Arase N, Kobayashi Y, Nishimura Y, Yonehara S, Onoe K. Cytotoxicity of fresh NK1.1+ T cell receptor alpha/beta+ thymocytes against a CD4+8+ thymocyte population associated with intact Fas antigen expression on the target. *J Exp Med* 1994; **180**: 423-32.
- 47 Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M *et al.* Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 2000; **191**: 661-8.
- 48 Baxter AG, Kinder SJ, Hammond KJ, Scollay R, Godfrey DI. Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 1997; **46**: 572-82.
- 49 Chen YG, Driver JP, Silveira PA, Serreze DV. Subcongenic analysis of genetic basis for impaired development of invariant NKT cells in NOD mice. *Immunogenetics* 2007; **59**: 705-12.
- 50 Esteban LM, Tsoutsman T, Jordan MA, Roach D, Poulton LD, Brooks A *et al.* Genetic control of NKT cell numbers maps to major diabetes and lupus loci. *J Immunol* 2003; **171**: 2873-8.
- 51 Takenaka K, Prasolava TK, Wang JC, Mortin-Toth SM, Khalouei S, Gan OI *et al.* Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 2007; **8**: 1313-23.
- 52 Barclay AN, Brown MH. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**: 457-64.
- 53 Ho WY, Cooke MP, Goodnow CC, Davis MM. Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med* 1994; **179**: 1539-49.
- 54 Van Parijs L, Peterson DA, Abbas AK. The Fas/Fas ligand pathway and Bcl-2 regulate T cell responses to model self and foreign antigens. *Immunity* 1998; **8**: 265-74.

55 Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M *et al.* Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003; **281**: 65-78.

Figures

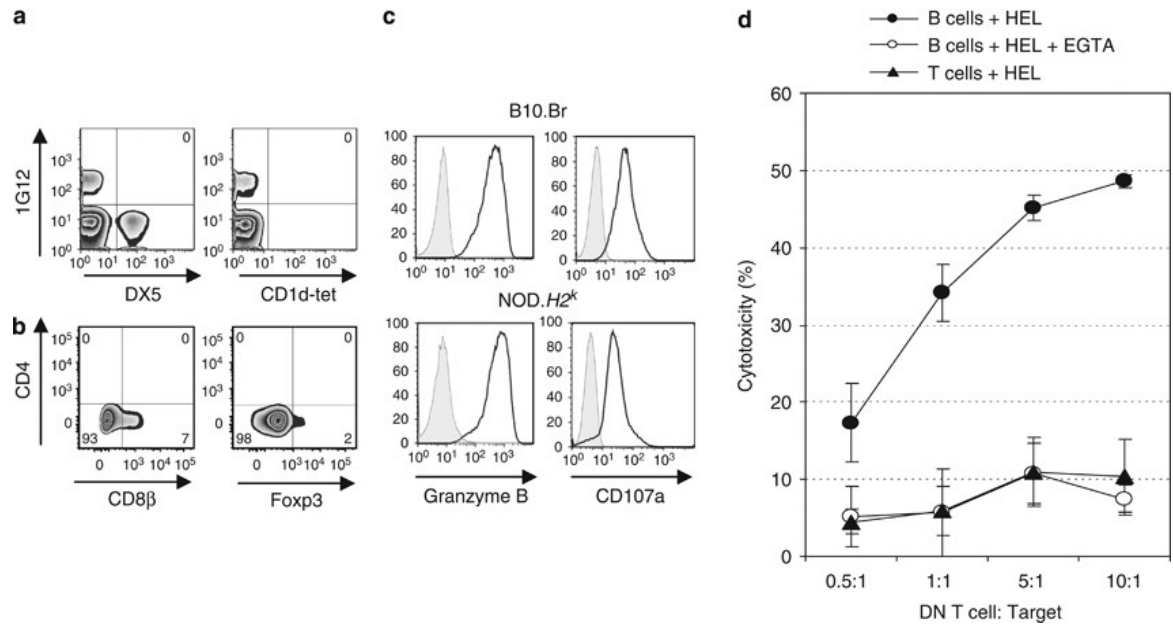


Figure 1: 3A9 DN T cells efficiently eliminate activated B cells. A) 3A9 TCR B10.Br splenocytes were stained for CD4, CD8, 1G12, DX5 and CD1d-tetramer. DX5 (left panel) and CD1d-tetramer (right panel) expression is shown for CD4⁺CD8⁻ gated cells relative to 1G12 expression. B) B10.Br 3A9 DN T cells were cultured with anti-CD3, anti-CD28, IL-2 and IL-4. After 7 days, DN T cells were stained CD4, CD8 β , and Foxp3 expression. C) B10.Br and NOD.H2^k 3A9 DN T cells cultured for 3 days with anti-CD3, APCs, IL-2 and IL-4. *Left panels*, Intracellular expression of granzyme B with (thick) or without cytokine stimulation (shaded). *Right panels*, CD107a expression with (thick) or without (shaded) PMA and ionomycin restimulation. D) The percent specific lysis is shown for 3A9 B10.Br DN T cells towards HEL-pulsed LPS-activated B cells or anti-CD3, APC and IL-2 activated T cells in the presence, or not, of EGTA. All data is representative of at least 3 independent experiments.

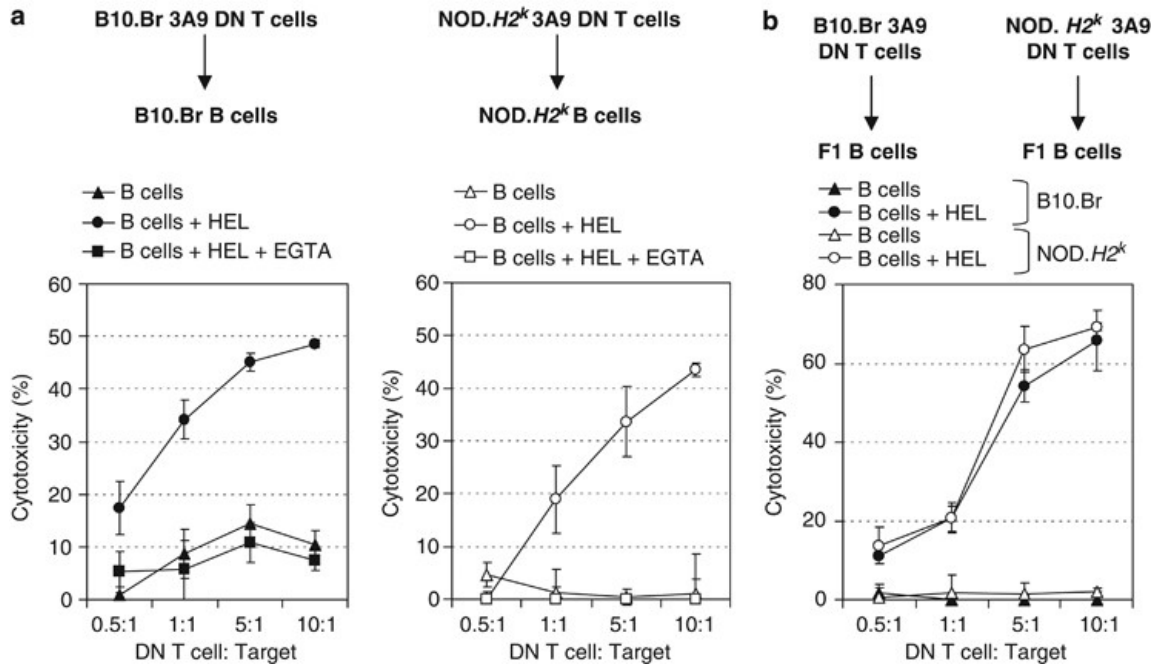


Figure 2: The cytotoxic function of 3A9 DN T cells from autoimmune-prone mice is not impaired. 3A9 DN T cells and B cells were isolated from the spleens of TCR transgenic B10.Br or NOD.H2^k mice. A) The percent specific lysis is shown for B10.Br (left) and NOD.H2^k (right) 3A9 DN T cells towards HEL-pulsed LPS-activated B cells from B10.Br and NOD.H2^k mice, respectively. EGTA was added in some conditions, as indicated. B) The percent specific lysis is shown for B10.Br (filled shapes) and NOD.H2^k (open shapes) 3A9 DN T cells towards a common target, HEL-pulsed LPS-activated F1 (B10.Br X NOD.H2^k) B cells. Representative of 4 independent experiments.

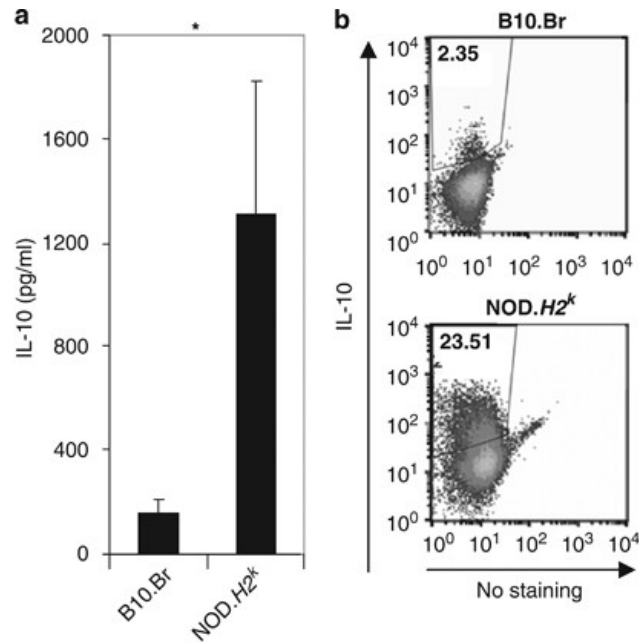


Figure 3. DN T cells from the diabetes-susceptible mice produce greater quantities of IL-10. 3A9 DN T cells were isolated from the spleen of TCR transgenic B10.Br or NOD.H2^k mice and cultured in the presence of anti-CD3, APCs, IL-2 and IL-4 for 3 days. A) IL-10 levels were quantified by ELISA from the 3-day culture supernatant. Mean \pm SD of at least 3 independent experiments. B) IL-10 was measured by intracellular staining. Representative of at least 3 independent experiments. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney U).

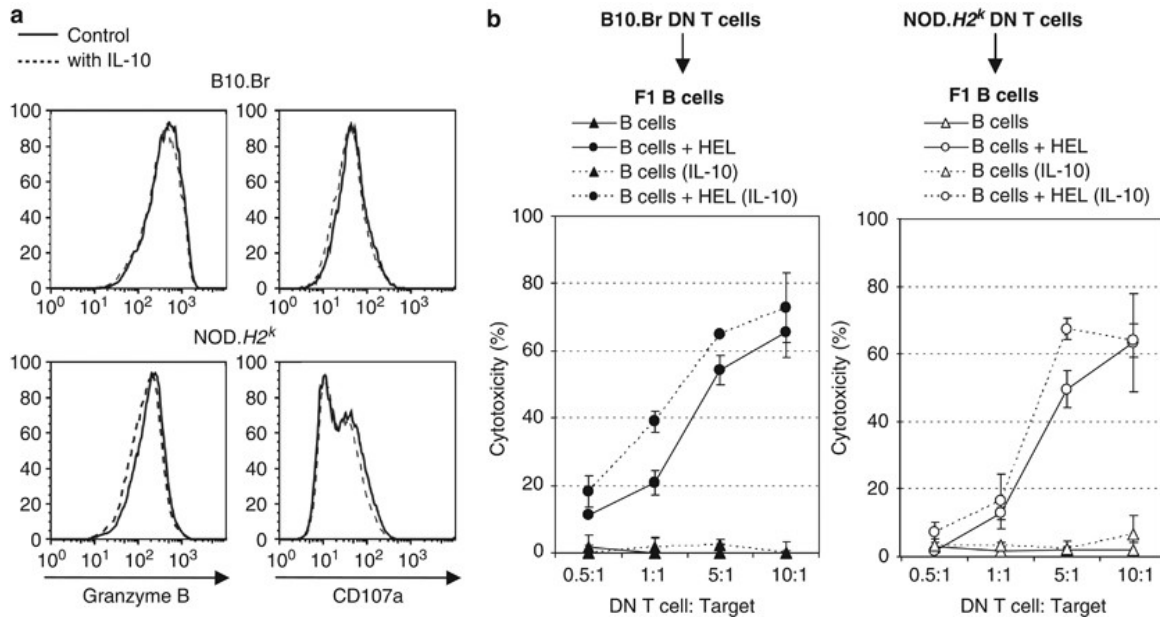


Figure 4. IL-10 does not impede DN T cell cytotoxic function. DN T cells and B cells were isolated from spleens of 3A9 TCR transgenic B10.Br or NOD.H2^k mice. A) Intracellular expression of granzyme B (left panels) and CD107a expression (right panels) are shown for DN T cells cultured in the presence of anti-CD3, anti-CD28, IL-2, IL-4 (solid) and IL-10 (dotted). B) The percent specific lysis is shown for 3A9 B10.Br and NOD.H2^k DN T cells that were cultured with (dotted) or without IL-10 (solid) towards HEL-pulsed LPS-activated F1 (B10.Br X NOD.H2^k) B cells. Representative of at least 3 independent experiments.

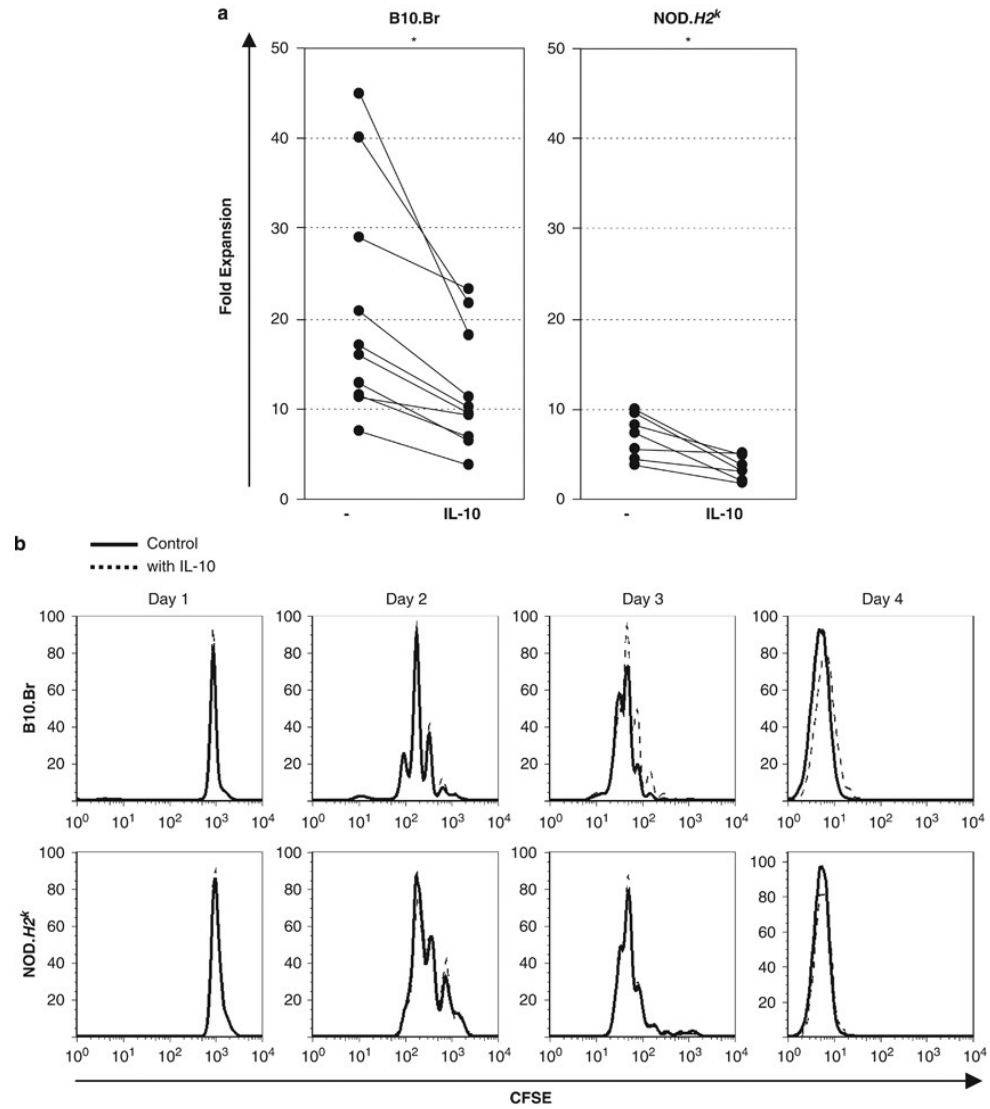


Figure 5. IL-10 impedes DN T cell expansion but not DN T cell proliferation. 3A9 DN T cells were sorted from B10.Br or NOD.H2^k mice and activated using anti-CD3, anti-CD28, IL-2, and IL-4. A) Cellular expansion is shown for 3A9 DN T cells that were stimulated as described above \pm IL-10 for 6 to 8 days. * $p < 0.05$ (Paired student's *t* test). B) Cellular proliferation was measured using CFSE-labelled 3A9 DN T cells that were stimulated as described above with (dotted) or without (solid) IL-10. Representative of at least 3 independent experiments.

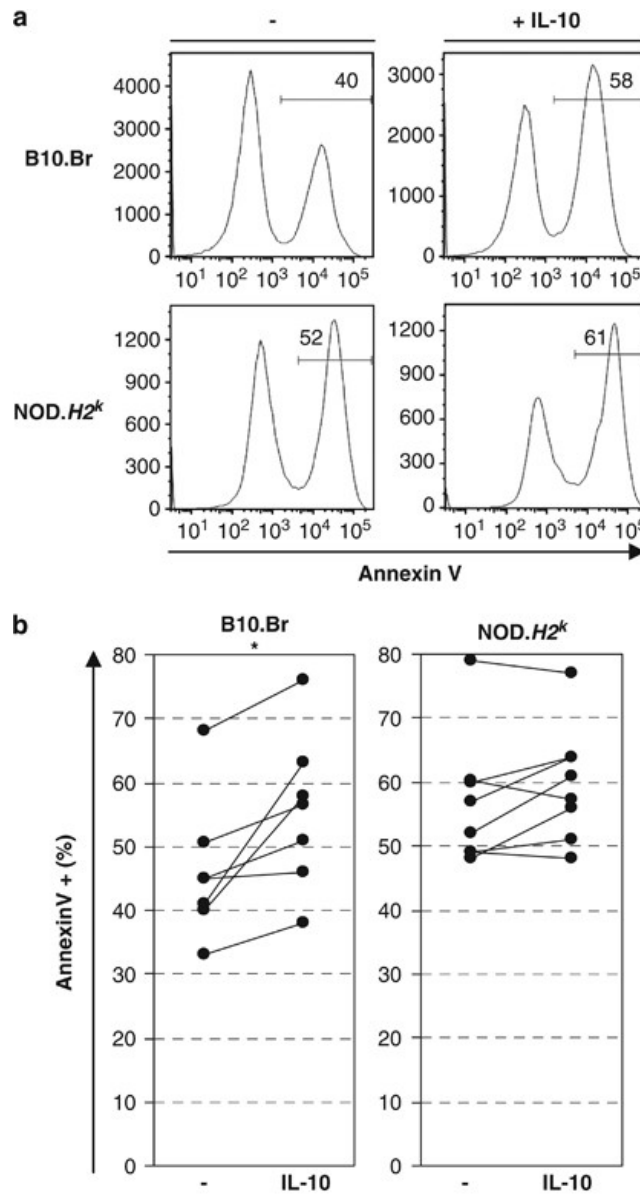


Figure 6. IL-10 increases cellular apoptosis. 3A9 DN T cells were isolated from the spleens of B10.Br and NOD.H2^k mice and stimulated with anti-CD3, anti-CD28, IL-2 and IL-4 ± IL-10 for 5 to 7 days. Amount of apoptotic cells was quantified by Annexin V staining. A) Representative results are shown. B) A compilation of all experiments are shown. *p < 0.05 (Paired student's *t* test).

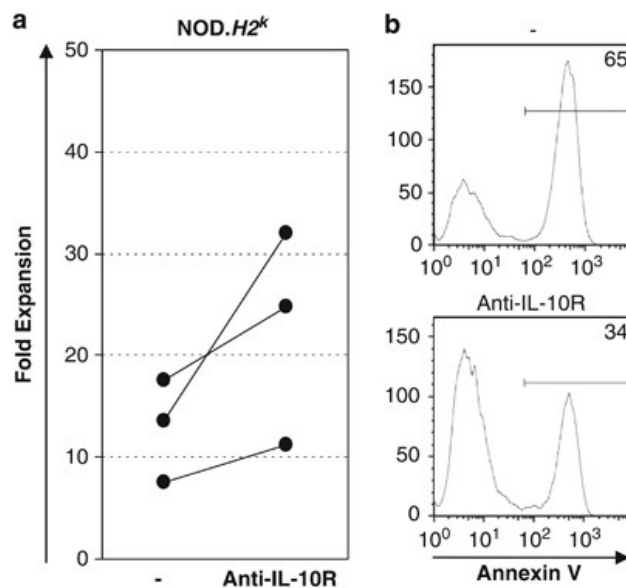


Figure 7. Blocking IL-10 signalling increases DN T cell expansion while decreasing DN T cell apoptosis. Sorted NOD.H2^k 3A9 DN T cells were stimulated with anti-CD3, anti-CD28, IL-2 and IL-4 ± anti-IL-10R for 7 days. A) Cellular expansion was quantified by cell count using trypan blue exclusion. B) The amount of apoptotic DN T cells was quantified by Annexin V staining.

ANNEXE 3

CHAPTER 2: T CELLS

1. Véronique Dugas

University of Montreal, Department of Microbiology and Immunology, Montreal, Quebec, Canada

Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Cellular Immunogenetics Unit, Montreal, Quebec, Canada

2. Sylvie Lesage

University of Montreal, Department of Microbiology and Immunology, Montreal, Quebec, Canada

Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Cellular Immunogenetics Unit, Montreal, Quebec, Canada

3. Marie Vilquin

Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Cellular Immunogenetics Unit, Montreal, Quebec, Canada

Lille University of Sciences and Technologies, Villeneuve d'Ascq, France

INTRODUCTION:

T cells are necessary and sufficient for the progression of various autoimmune pathologies, such as T1D, RA and thyroiditis. For instance, transfer of T cells from a diabetic mouse to an otherwise healthy mouse is sufficient to induce autoimmune diabetes progression [1]. Also, in individuals affected by SLE, T cells are known to be hyperactive and resistant to apoptosis [2]. Moreover, patients suffering from RA show elevated amounts of the inflammatory cytokine IL-17, a cytokine produced by a subset of CD4 T cells [3]. Clearly, T lymphocytes are implicated in the susceptibility of these diseases as well as other autoimmune pathologies. The defects in T cell function that lead to autoimmune pathologies can result from various immune check points involved in imposing T cell tolerance to self-tissues. Some critical events in the control of T cell tolerance will be discussed below. Moreover, we will describe how defects in T cell tolerance induction may contribute to autoimmune disease susceptibility and progression.

Overview of T cell differentiation and function

The thymus is a primary lymphoid organ wherein proceeds the early education of immature T cells, hereafter referred to as thymocytes. Indeed, thymocytes which recognize self-peptides with low affinity in the context of MHC class I or II molecules will differentiate into naïve T cells expressing CD8 or CD4 co-receptor, respectively. These T lymphocytes will then exit the thymus, migrate to the periphery and travel through secondary lymphoid organs in search of a pathogen. Defects in the ability of T cells to recognize pathogens and mount an efficient response lead to an impaired capacity to fight infections, which can result in deleterious consequences for the host. Consequently, the T cell responses must be intricately tuned to allow adequate recognition of pathogenic antigens, all the while precluding T cell activation upon binding to self-antigens. Consequently, both central and peripheral tolerance mechanisms are responsible for establishing this balance.

Central tolerance

The role of the thymus is to generate functional T cells, while eliminating autoreactive T cells. This is achieved by way of positive and negative thymic selection processes, which

collectively are commonly referred to as central tolerance. During positive selection, thymocytes with a low affinity for self-MHC peptide complexes are allowed to mature. This ensures that thymocytes which emigrate from the thymus will sufficiently recognize both self-peptide/MHC complexes, which will promote T cell survival, and pathogenic-peptide/MHC complexes presented at the surface of a professional antigen-presenting cell (APC), namely dendritic cells (DC), macrophages and B cells, which will induce an efficient immune response. On the other hand, T cell discrimination between self and non-self proteins is critical in the prevention of autoimmune reactions. Negative selection is the process that entails the elimination of thymocytes exhibiting a strong affinity or avidity for self-peptides before they escape from the thymus. Indeed, thymic DC (tDC) and medullary thymic epithelial cells (mTEC) constitutively process and present self-peptides to thymocytes. If the strength of the interaction between the T cell receptor (TCR) on the thymocyte and the peptide/MHC complex on the APC exceeds a certain threshold, the T cell will be subject to apoptosis, a tightly regulated cell death process that does not lead to inflammation. Therefore, negative selection should allow for the efficient elimination of most autoreactive T cells. Nevertheless, defects in the negative selection process will enhance susceptibility to autoimmune diseases.

In this regard, a defect in the induction of the Bcl-2 family member Bim, a pro-apoptotic mediator, correlates with impaired negative selection [4]. As suggested, Bim^{-/-} animals show an increase in susceptibility to autoimmune diseases and develop severe kidney autoimmune disease (24). Moreover, Bim expression is dysregulated in autoimmune diabetes-prone NOD mice [5], a commonly used murine model that is also susceptible to other autoimmune deficiencies, such as thyroiditis and SLE [6, 7]. Moreover, abnormally low and high thresholds for positive and negative thymocyte selections, respectively, are also responsible for an increased proportion of autoreactive T cells in the NOD mouse and possibly in other mouse strains, as well [8-10].

Negative selection is also dependent on the efficiency of antigen presentation by tDC and mTECs. tDCs present ubiquitously expressed self-antigens to immature thymocytes

resulting in the apoptosis of thymocytes which have a high affinity to self-antigens. Consequently, this limits the export of autoreactive T cells from the thymus into the periphery. However, not all antigens are expressed by DCs circulating in the thymus. Some tissue-specific antigens (TSA) remain sequestered within organs such as the skin, eyes, brain, pancreas, etc. It has recently been shown that mTECs specialize in the presentation of TSA to thymocytes, a mechanism regulated by Autoimmune regulator (Aire) [11]. Aire expression is mainly restricted to mTECs [12]. Therefore, defects in Aire should lead to an increase in autoimmune susceptibility to specific organs. Indeed, Aire-deficient mice develop autoimmune responses to a limited set of antigens, where the antigenic specificity is conferred by the genetic background of the mouse strain [11, 13]. More importantly, mutations in *AIRE* are responsible for causing the autosomal recessive Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy (APECED) pathology, where patients develop massive lymphocytic infiltrations and produce multiple autoantibodies to various tissues [14-16]. Finally, Aire-deficient mice have facilitated the identification of the biological role of this protein in the induction of negative selection and tolerance to tissue-specific self-antigens [11, 17-19]. In summary, negative selection generally induces apoptosis of thymocytes that are specific for ubiquitously or ectopically expressed self-antigens. As a result, reported defects in negative selection processes have been associated with a direct increase in susceptibility to autoimmune disease progression.

Peripheral tolerance

Although thymic selection processes promote the maturation of T cells that are not self-reactive, a sizeable proportion of autoreactive T cells can be found in periphery. In an attempt to control autoimmune responses in the periphery, some T cells with a relatively high affinity for self-peptide/MHC complexes are spared from negative selection and undergo a distinct differentiation programme which leads to immune regulation [20]. The most studied regulatory T cell population is defined as “natural” (ie: originating from the thymus) lymphocytes which express both the CD4 co-receptor and the activation marker CD25 (nTregs). In humans, as in mice, the up-regulation of the transcription factor FOXP3 is a requisite step for the differentiation and function of nTregs [21]. However, FOXP3

expression is not limited to nTregs as is also expressed by CD4 T cells which acquire their regulatory phenotype and function in the periphery, giving rise to the term “inducible” Tregs (iTregs). Indeed, in the presence of IL-2 and TGF- β and in the absence of inflammatory cytokines, naïve CD4 T cells up-regulate the expression of FOXP3 and become potent regulators [22]. Importantly, when Tregs encounter an APC presenting a peptide for which they are specific, they become activated and abrogate the proliferation of surrounding T cells via IL-2 deprivation, cell-to-cell contact and secretion of immunoregulatory cytokines, such as IL-10 [23]. Clearly, Tregs play a prominent role in peripheral tolerance mechanisms [24].

As Tregs are central to the maintenance of peripheral tolerance, it is not surprising to find that genetic defects in *FOXP3*, which precludes the appropriate generation and function of Tregs, are associated with autoimmune diseases in both humans and mice. In humans, individuals bearing mutations in the *FOXP3* gene develop a multi-organ autoimmune disease that is usually lethal before the age of 2 [25]. Similarly, the Scurfy mouse model, which carries a mutation in *Foxp3*, also presents a severe autoimmune phenotype comparable to the disease observed in humans [26]. Together, these data demonstrate that a defect in the regulation of Tregs is sufficient to confer an increased risk of developing an autoimmune disease. Despite the lack of a clear association between Treg number and the prevalence of any given autoimmune disease, several different groups have highlighted functional defects in Tregs from patients suffering from relapsing-remitting MS [21]. Moreover, many pathways associated with type 1 diabetes predisposition might affect Treg function, such as the CTLA-4 and the IL-2/CD25 pathways. In particular, the insulin-dependent diabetes 3 (*Idd3*) locus, which defines a susceptibility region for autoimmune diabetes in NOD mice, encompasses the *Il2* gene, where genetic variants of this gene have been identified [27, 28]. Although it is tempting to suggest that the biological contribution of *Il2* genetic variants alters Treg function and, thus, increases autoimmune susceptibility, the mechanism of action of the *Il2* variants has not been fully determined and is subject to debate [27-32]. Finally, even though CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ Tregs are the most extensively studied, other subtypes of immunoregulatory T cells have also been identified for their role

in tolerance maintenance, such as CD8 α intraepithelial lymphocytes [33] and double negative T lymphocytes [34, 35]. However, their role in the prevention of autoimmune disease progression remains to be fully established.

As discussed above, mechanisms involved in the presentation of TSA are present in the thymus. Indeed, AIRE has proven to be a requisite for an efficient selection of non-autoreactive thymocytes. However, it has recently been proposed that AIRE could also be expressed in the periphery in order to further delete self-specific T cells. For instance, extrathymic Aire-expressing cells (eTACs) reside mainly in T-cell zones located in secondary lymphoid organs [36]. These stromal cells are positive for MHC class II expression and are, thus, presumably capable of antigen presentation [36, 37]. Even though it has been demonstrated that eTACs can directly interact with and delete autoreactive T cells, their precise role in autoimmune disease prevention remains to be established.

Another key mechanism which limits aberrant autoreactive T cell responses in the periphery is tolerance induction as defined by the “two signal model”. This model illustrates the intrinsic activation requirement of naïve T cells to receive both a TCR signal (recognition of a peptide-MHC complex) as well as co-stimulation signals. More specifically, after emigrating from the thymus, naïve T lymphocytes circulate within lymphoid organs aiming to encounter an APC presenting an antigen for which they exhibit sufficient affinity. However, the interaction between the TCR and a peptide-MHC complex alone is insufficient to induce the full T cell activation necessary to provoke an immune response. Consequently, APCs upregulate co-stimulatory molecules, such as CD80 and CD86, only in presence of inflammation [38]. Naïve T cells, which constitutively express the counter-ligand, CD28, can, thus, be fully activated to induce an immune response. In absence of this co-stimulatory signal, the T cell will either become non-responsive or will become subject to apoptosis, two mechanisms of peripheral tolerance induction that are respectively referred to as anergy and activation-induced cell death (AICD). As a result, in the absence of inflammation, a potentially autoreactive T cell will either become unresponsive or will be removed from the circulation. Interestingly, deletion of co-

stimulatory molecules, such as CD80 and CD86 or CD28 in NOD mice accelerates the onset and severity of autoimmune diabetes [39, 40], further highlighting the importance of tight regulation of co-stimulation for the prevention of autoimmune disease. The loss of CD80 and CD86 co-stimulatory proteins also leads to a dramatic decrease in Treg numbers in the thymus and periphery [41], which may explain part of the mechanism by which these molecules contribute to the maintenance of immune tolerance. Moreover, it should be noted that activated T cells up-regulate the expression of CTLA-4, an inhibitor of T cell activation which competes with CD28 for binding to CD80 and CD86 [42] and is directly involved in anergy induction as well as the control of Treg function [43, 44]. The expression of CTLA-4 is crucial in order to avoid lymphoproliferative disorders, as it leads to cell cycle arrest, inhibition of CD25 and CD69 up-regulation, decreased IL-2 production as well as an increased threshold for subsequent activation (56). Indeed, CTLA-4 deficiency leads to massive lymphoproliferation and multi-organ tissue infiltration leading to death within 3 to 4 weeks of age [45, 46]. This fulminant immune response to multiple tissues underlines the critical role of CTLA-4 in the induction of immune tolerance. The contribution of CTLA-4 genetic variants to autoimmune susceptibility has been confirmed in both mice and humans [47, 48]. Specifically, in NOD mice, the *Idd5.1* autoimmune diabetes susceptibility locus includes *Ctla-4* as a candidate gene. Furthermore, through recent GWAS, genetic variants of *CTLA-4* have been associated with susceptibility to numerous autoimmune diseases, including SLE, RA, Grave's and celiac diseases [49]. The biological implications for different CTLA-4 genetic variants are under current investigation [50-53].

Finally, other defects in co-stimulation pathways have been associated with autoimmunity. Indeed, PD-1 (programmed death 1) also acts as a negative regulator expressed on the surface of activated T and B cells. PD-1 is thought to be responsible for the maintenance of long term tolerance following activation, mainly by limiting T cell function [54]. Deficiencies in PD-1 are known to induce spontaneous autoimmunity in different mouse strains, notably autoimmune cardiomyopathy in BALB/c mice [55] and a lupus-like disease in C57BL/6 mice, an otherwise auto-immune resistant strain [56]. Moreover,

polymorphisms in PD-1 have been associated with various autoimmune pathologies in numerous human cohorts, pinpointing its role in tolerance induction [54].

Peripheral tolerance is also maintained by immune-regulation of the Th1/Th2/Th17 pathways. Indeed, in 1986, Mosmann showed that CD4 T cells can be separated into two distinct populations according to their cytokine production profile, namely Th1 and Th2 [57]. Th1 cells produce IL-2 and IFN- γ pro-inflammatory cytokines and promote cytotoxic and inflammatory responses, while Th2 cells secrete IL-4 and IL-10, both of which are associated with immune deviation and tolerance induction. Another pro-inflammatory subset of CD4 T cells has recently been identified and is designated Th17 for its prominent potential at producing the IL-17 cytokine, a chemotactic cytokine facilitating the recruitment of neutrophils [58]. Other than IL-17, Th17 cells also produce a vast array of pro-inflammatory cytokines, including IL-1, IL-6, IL-8, IL-22 and TNF α , which are known to recruit and activate monocytes, macrophages, neutrophils and other innate immune cells. In particular, Th17 cells have been associated with MS and RA pathologies, while Th1 contribute to T1D and MS [59-62]. Evidence that Th17 contribute to autoimmune progression has been recently revealed by various genetic deletions in molecules contributing to Th17 differentiation, such as IL-12, IL-23 and IL-25 [63, 64].

Alterations in the balance of immune-regulation in favor of Th1 or Th17 immune responses may promote autoimmunity. IL-12 and IL-23 are cytokines which respectively promote Th1 and Th17 differentiation [65-67]. Genetic variants of both of these cytokines are included within autoimmune diabetes susceptibility regions, where *IL12* is located within *Idd4* and *IL23* is included within the *Idd3* interval [68, 69]. Interestingly, the IL-12p40 gene product can pair with IL-12p35 to form the Th1 promoting IL-12 cytokine or with IL-23p19 to create the Th17 promoting IL-23 cytokine [70]. Therefore, understanding the biological role of IL12p40 genetic variants may generate interesting therapeutic targets playing a central role in both Th1 and Th17 phenotypes. In contrast, IL-21 specifically impacts Th17, not Th1, differentiation. IL-21 is also implicated in chronic infections and the generation of memory T cells [71-73], which may contribute to autoimmune

progression. In autoimmune prone NOD mice, pancreatic levels of IL-21 increase during diabetes development whereas the genetic ablation of the IL-21 pathway prevents autoimmune diabetes progression [69, 74]. Together, these results suggest that an intricate balance of the immune regulation of Th subsets is at play in defining the susceptibility to autoimmune diseases.

CONCLUSION:

T cells, which develop in the thymus, must recognize self-peptide/MHC proteins with sufficient affinity in order to promote their maturation and survival. Yet, they must not recognize self-peptide/MHC complexes with ample affinity to induce an immune response. This dichotomy between self/non-self recognition has been a central theme in trying to understand the role of the immune response. Other than central tolerance, which is mostly mediated by negative selection, potentially autoreactive T cells are also subject to peripheral tolerance mechanisms, such as inhibition by Tregs, anergy, AICD and immune-regulation of the various Th pathways. Both co-stimulatory molecules and cytokines are key players in the regulation of the majority of the pathways involved in peripheral tolerance induction. Here, we have highlighted evidence demonstrating that alterations in any of these pathways which facilitate T cell activation are sufficient to increase the susceptibility to autoimmune disease progression. However, it should be noted that autoimmune diseases are multi-factorial. Essentially, although genetic ablation leads to severe phenotypes, the role of subtle genetic variants encoded within the genome only slightly increases the risk of developing autoimmunity. The following chapters will describe how other cellular subsets contribute to autoimmune disease progression.

REFERENCES:

- 1 Haskins, K., Pathogenic T-cell clones in autoimmune diabetes: more lessons from the NOD mouse. *Adv Immunol* 2005. 87: 123-162.
- 2 La Cava, A., Lupus and T cells. *Lupus* 2009. 18: 196-201.
- 3 Chabaud, M., Durand, J. M., Buchs, N., Fossiez, F., Page, G., Frappart, L. and Miossec, P., Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1999. 42: 963-970.
- 4 Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Zhang, L. C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J. M. and Strasser, A., BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 2002. 415: 922-926.
- 5 Liston, A., Lesage, S., Gray, D. H., O'Reilly, L. A., Strasser, A., Fahrner, A. M., Boyd, R. L., Wilson, J., Baxter, A. G., Gallo, E. M., Crabtree, G. R., Peng, K., Wilson, S. R. and Goodnow, C. C., Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity* 2004. 21: 817-830.
- 6 Many, M. C., Maniratunga, S. and Deneff, J. F., The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996. 104 Suppl 3: 17-20.
- 7 Silveira, P. A. and Baxter, A. G., The NOD mouse as a model of SLE. *Autoimmunity* 2001. 34: 53-64.
- 8 Kwon, H., Jun, H. S., Yang, Y., Mora, C., Mariathasan, S., Ohashi, P. S., Flavell, R. A. and Yoon, J. W., Development of autoreactive diabetogenic T cells in the thymus of NOD mice. *J Autoimmun* 2005. 24: 11-23.
- 9 Kishimoto, H. and Sprent, J., A defect in central tolerance in NOD mice. *Nat Immunol* 2001. 2: 1025-1031.
- 10 Lesage, S., Hartley, S. B., Akkaraju, S., Wilson, J., Townsend, M. and Goodnow, C. C., Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2002. 196: 1175-1188.
- 11 Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C. and Mathis, D., Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002. 298: 1395-1401.
- 12 Hubert, F. X., Kinkel, S. A., Webster, K. E., Cannon, P., Crewther, P. E., Proeitto, A. I., Wu, L., Heath, W. R. and Scott, H. S., A specific anti-Aire antibody reveals aire expression is restricted to medullary thymic epithelial cells and not expressed in periphery. *J Immunol* 2008. 180: 3824-3832.

- 13 Jiang, W., Anderson, M. S., Bronson, R., Mathis, D. and Benoist, C., Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency. *J Exp Med* 2005. 202: 805-815.
- 14 Peterson, P., Org, T. and Rebane, A., Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nat Rev Immunol* 2008. 8: 948-957.
- 15 An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet* 1997. 17: 399-403.
- 16 Mathis, D. and Benoist, C., Aire. *Annu Rev Immunol* 2009. 27: 287-312.
- 17 Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Chen, Z., Berzins, S. P., Benoist, C. and Mathis, D., The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* 2005. 23: 227-239.
- 18 Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L. and Goodnow, C. C., Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 2003. 4: 350-354.
- 19 Liston, A., Gray, D. H., Lesage, S., Fletcher, A. L., Wilson, J., Webster, K. E., Scott, H. S., Boyd, R. L., Peltonen, L. and Goodnow, C. C., Gene dosage--limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *J Exp Med* 2004. 200: 1015-1026.
- 20 Andre, S., Tough, D. F., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S. V. and Bayry, J., Surveillance of antigen-presenting cells by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications. *Am J Pathol* 2009. 174: 1575-1587.
- 21 Brusko, T. M., Putnam, A. L. and Bluestone, J. A., Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev* 2008. 223: 371-390.
- 22 Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. and Wahl, S. M., Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003. 198: 1875-1886.
- 23 Vignali, D. A., Collison, L. W. and Workman, C. J., How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008.
- 24 Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. and Ono, M., Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008. 133: 775-787.
- 25 Bussone, G. and Mouthon, L., Autoimmune manifestations in primary immune deficiencies. *Autoimmun Rev* 2009. 8: 332-336.
- 26 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., The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001. 27: 20-21.

- 27 Yamanouchi, J., Rainbow, D., Serra, P., Howlett, S., Hunter, K., Garner, V. E., Gonzalez-Munoz, A., Clark, J., Veijola, R., Cubbon, R., Chen, S. L., Rosa, R., Cumiskey, A. M., Serreze, D. V., Gregory, S., Rogers, J., Lyons, P. A., Healy, B., Smink, L. J., Todd, J. A., Peterson, L. B., Wicker, L. S. and Santamaria, P., Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nat Genet* 2007. 39: 329-337.
- 28 Kamanaka, M., Rainbow, D., Schuster-Gossler, K., Eynon, E. E., Chervonsky, A. V., Wicker, L. S. and Flavell, R. A., Amino acid polymorphisms altering the glycosylation of IL-2 do not protect from type 1 diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009. 106: 11236-11240.
- 29 Anderson, A. C., Chandwaskar, R., Lee, D. H. and Kuchroo, V. K., Cutting Edge: The Idd3 Genetic Interval Determines Regulatory T Cell Function through CD11b+CD11c- APC. *J Immunol* 2008. 181: 7449-7452.
- 30 Sgouroudis, E., Albanese, A. and Piccirillo, C. A., Impact of protective IL-2 allelic variants on CD4+ Foxp3+ regulatory T cell function in situ and resistance to autoimmune diabetes in NOD mice. *J Immunol* 2008. 181: 6283-6292.
- 31 Tang, Q., Adams, J. Y., Penaranda, C., Melli, K., Piaggio, E., Sgouroudis, E., Piccirillo, C. A., Salomon, B. L. and Bluestone, J. A., Central Role of Defective Interleukin-2 Production in the Triggering of Islet Autoimmune Destruction. *Immunity* 2008.
- 32 McGuire, H. M., Vogelzang, A., Hill, N., Flodstrom-Tullberg, M., Sprent, J. and King, C., Loss of parity between IL-2 and IL-21 in the NOD Idd3 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009.
- 33 Lambolez, F., Kronenberg, M. and Cheroutre, H., Thymic differentiation of TCR alpha beta(+) CD8 alpha alpha(+) IELs. *Immunol Rev* 2007. 215: 178-188.
- 34 Ford, M. S., Chen, W., Wong, S., Li, C., Vanama, R., Elford, A. R., Asa, S. L., Ohashi, P. S. and Zhang, L., Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development. *Eur J Immunol* 2007. 37: 2234-2241.
- 35 Dugas, V., Beauchamp, C., Chabot-Roy, G., Hillhouse, E. E. and Lesage, S., Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes. *J Autoimmun.*
- 36 Gardner, J. M., Devoss, J. J., Friedman, R. S., Wong, D. J., Tan, Y. X., Zhou, X., Johannes, K. P., Su, M. A., Chang, H. Y., Krummel, M. F. and Anderson, M. S., Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science* 2008. 321: 843-847.
- 37 Lee, J. W., Epardaud, M., Sun, J., Becker, J. E., Cheng, A. C., Yonekura, A. R., Heath, J. K. and Turley, S. J., Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat Immunol* 2007. 8: 181-190.
- 38 Linsley, P. S. and Ledbetter, J. A., The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993. 11: 191-212.

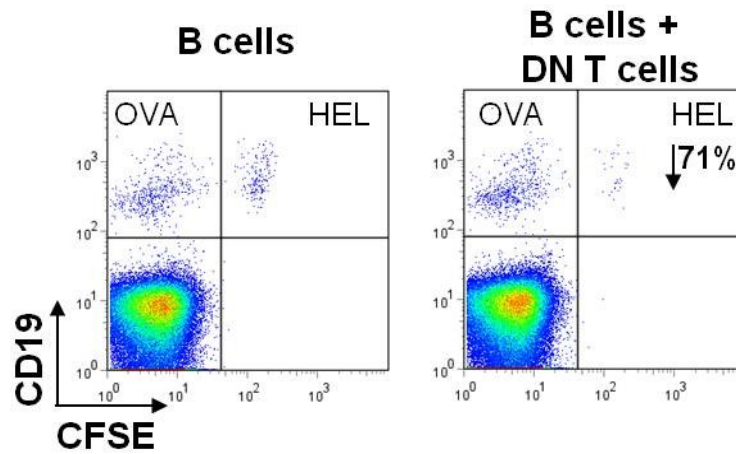
- 39 Lesage, S. and Goodnow, C. C., Organ-specific autoimmune disease: a deficiency of tolerogenic stimulation. *J Exp Med* 2001. 194: F31-36.
- 40 Salomon, B., Lenschow, D. J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A. and Bluestone, J. A., B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000. 12: 431-440.
- 41 Zeng, M., Guinet, E. and Nouri-Shirazi, M., B7-1 and B7-2 differentially control peripheral homeostasis of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Transpl Immunol* 2009. 20: 171-179.
- 42 Greenwald, R. J., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H., The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005. 23: 515-548.
- 43 Greenwald, R. J., Boussiotis, V. A., Lorschach, R. B., Abbas, A. K. and Sharpe, A. H., CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 2001. 14: 145-155.
- 44 Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T. and Sakaguchi, S., CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008. 322: 271-275.
- 45 Chambers, C. A., Cado, D., Truong, T. and Allison, J. P., Thymocyte development is normal in CTLA-4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997. 94: 9296-9301.
- 46 Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A. and Sharpe, A. H., Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995. 3: 541-547.
- 47 Hill, N. J., Lyons, P. A., Armitage, N., Todd, J. A., Wicker, L. S. and Peterson, L. B., NOD Idd5 locus controls insulinitis and diabetes and overlaps the orthologous CTLA4/IDDM12 and NRAMP1 loci in humans. *Diabetes* 2000. 49: 1744-1747.
- 48 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., Herr, M. H., Dahlman, I., Payne, F., Smyth, D., Lowe, C., Twells, R. C., Howlett, S., Healy, B., Nutland, S., Rance, H. E., Everett, V., Smink, L. J., Lam, A. C., Cordell, H. J., Walker, N. M., Bordin, C., Hulme, J., Motzo, C., Cucca, F., Hess, J. F., Metzker, M. L., Rogers, J., Gregory, S., Allahabadi, A., Nithiyanthan, R., Tuomilehto-Wolf, E., Tuomilehto, J., Bingley, P., Gillespie, K. M., Undlien, D. E., Ronningen, K. S., Guja, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Savage, D. A., Maxwell, A. P., Carson, D. J., Patterson, C. C., Franklyn, J. A., Clayton, D. G., Peterson, L. B., Wicker, L. S., Todd, J. A. and Gough, S. C., Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003. 423: 506-511.
- 49 Maier, L. M. and Hafler, D. A., Autoimmunity risk alleles in costimulation pathways. *Immunol Rev* 2009. 229: 322-336.

- 50 Vijayakrishnan, L., Slavik, J. M., Illes, Z., Greenwald, R. J., Rainbow, D., Greve, B., Peterson, L. B., Hafler, D. A., Freeman, G. J., Sharpe, A. H., Wicker, L. S. and Kuchroo, V. K., An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. *Immunity* 2004. 20: 563-575.
- 51 Anjos, S. M. and Polychronakos, C., Functional evaluation of the autoimmunity-associated CTLA4 gene: The effect of the (AT) repeat in the 3'untranslated region (UTR). *J Autoimmun* 2006.
- 52 Chen, Z., Stockton, J., Mathis, D. and Benoist, C., Modeling CTLA4-linked autoimmunity with RNA interference in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006. 103: 16400-16405.
- 53 Araki, M., Chung, D., Liu, S., Rainbow, D. B., Chamberlain, G., Garner, V., Hunter, K. M., Vijayakrishnan, L., Peterson, L. B., Oukka, M., Sharpe, A. H., Sobel, R., Kuchroo, V. K. and Wicker, L. S., Genetic evidence that the differential expression of the ligand-independent isoform of CTLA-4 is the molecular basis of the Idd5.1 type 1 diabetes region in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2009. 183: 5146-5157.
- 54 Fife, B. T. and Bluestone, J. A., Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* 2008. 224: 166-182.
- 55 Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N. and Honjo, T., Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 2001. 291: 319-322.
- 56 Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. and Honjo, T., Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999. 11: 141-151.
- 57 Steinman, L., A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007. 13: 139-145.
- 58 Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. and Harrington, L. E., IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007. 25: 821-852.
- 59 Kroenke, M. A., Carlson, T. J., Andjelkovic, A. V. and Segal, B. M., IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med* 2008. 205: 1535-1541.
- 60 Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y. and Hirano, T., Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity* 2008. 29: 628-636.

- 61 Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W. L., Sorensen, O., Bleackley, R. C. and Power, R. F., IFN-gamma gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1995. 154: 4874-4882.
- 62 Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. and Kuchroo, V. K., IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009.
- 63 Kleinschek, M. A., Owyang, A. M., Joyce-Shaikh, B., Langrish, C. L., Chen, Y., Gorman, D. M., Blumenschein, W. M., McClanahan, T., Brombacher, F., Hurst, S. D., Kastelein, R. A. and Cua, D. J., IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2007. 204: 161-170.
- 64 Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S. A., Gorman, D., Kastelein, R. A. and Sedgwick, J. D., Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003. 421: 744-748.
- 65 Adorini, L., Interleukin 12 and autoimmune diabetes. *Nat Genet* 2001. 27: 131-132.
- 66 Zhou, L., Ivanov, II, Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D. E., Leonard, W. J. and Littman, D. R., IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007. 8: 967-974.
- 67 Huber, M., Brustle, A., Reinhard, K., Guralnik, A., Walter, G., Mahiny, A., von Low, E. and Lohoff, M., IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008. 105: 20846-20851.
- 68 Simpson, P. B., Mistry, M. S., Maki, R. A., Yang, W., Schwarz, D. A., Johnson, E. B., Lio, F. M. and Alleva, D. G., Cuttine edge: diabetes-associated quantitative trait locus, *Idd4*, is responsible for the IL-12p40 overexpression defect in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Immunol* 2003. 171: 3333-3337.
- 69 Spolski, R., Kashyap, M., Robinson, C., Yu, Z. and Leonard, W. J., IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008.
- 70 Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F. and Kastelein, R. A., Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000. 13: 715-725.
- 71 Elsaesser, H., Sauer, K. and Brooks, D. G., IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science* 2009. 324: 1569-1572.

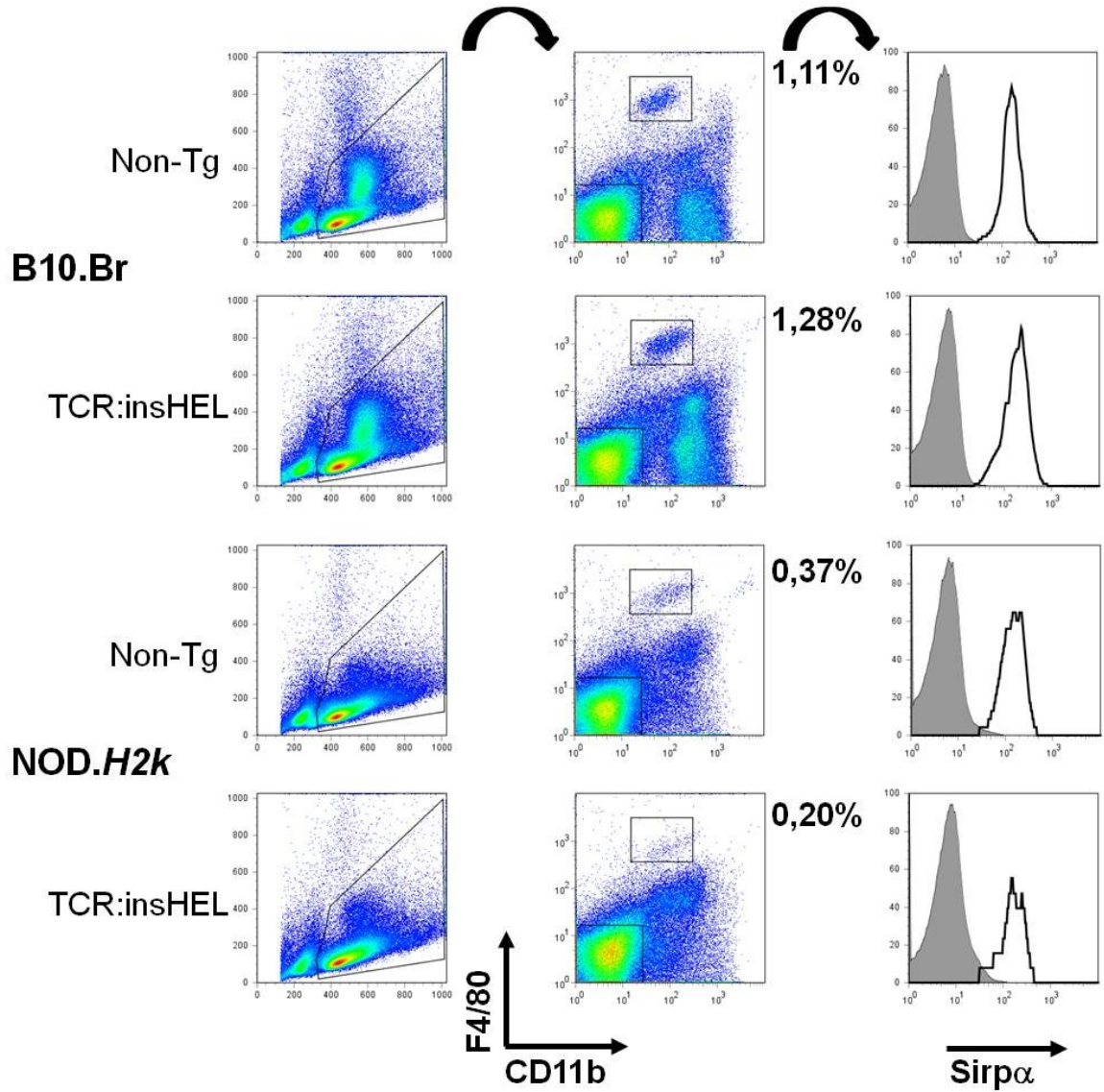
- 72 Frohlich, A., Kisielow, J., Schmitz, I., Freigang, S., Shamshiev, A. T., Weber, J., Marsland, B. J., Oxenius, A. and Kopf, M., IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science* 2009. 324: 1576-1580.
- 73 Yi, J. S., Du, M. and Zajac, A. J., A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science* 2009. 324: 1572-1576.
- 74 Sutherland, A. P., Van Belle, T., Wurster, A. L., Suto, A., Michaud, M., Zhang, D., Grusby, M. J. and von Herrath, M., Interleukin-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2009. 58: 1144-1155.

ANNEXE 4



DN T cell eliminate activated B cells *in vivo*. LPS-activated B cells loaded with HEL (CFSE+) or OVA (CFSE-) peptides were mixed in a 1:1 ratio and injected in *Rag*^{-/-} B10.Br mice. 24 hours following transfer, 1million of DN T cells were injected in half of the mice. Animals were sacrificed 18 hours after the second transfer and spleens were analyzed for the presence of B cells. Representative of at least 3 experiments.

ANNEXE 5



The proportion of Sirp α^{hi} macrophages is reduced in NOD.H2k mice. The spleen of B10.Br and NOD.H2k non-transgenic and TCR:insHEL transgenic mice were analyzed for the proportion of F4/80 $^+$ CD11b $^+$ macrophages. Expression level of Sirp α on these cells is shown.