

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Étude d'une population de lymphocytes T associée à la résistance  
au diabète auto-immun**

Par  
Claudine Beauchamp

Département de Microbiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences  
en Microbiologie et Immunologie

Février, 2008

© Claudine Beauchamp, 2008



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**Étude d'une population de lymphocytes T associée à la résistance  
au diabète auto-immun**

présenté par :  
Claudine Beauchamp

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Réjean Lapointe  
Président-rapporteur

Sylvie Lesage  
Directeur de recherche

Jean-Francois Gauchat  
Membre du jury

## **Résumé**

Le diabète auto-immun est causé par la destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques productrices d'insuline. Cette destruction est causée par le système immunitaire, et les lymphocytes T sont suffisants pour causer la maladie. Pour étudier les composantes immunitaires de cette maladie, nous étudions un modèle unique de souris prédisposée (NOD) et résistante au diabète auto-immun. L'insertion de transgènes, contrôlant le répertoire de lymphocytes T, a permis l'identification d'une population rare de lymphocytes T CD4- CD8- (DN) ayant un phénotype similaire dans les deux souches de souris. Nous démontrons que cette population de lymphocytes DN T, présentes en proportion plus élevée dans les organes lymphoïdes secondaires et les îlots pancréatiques dans la souris résistante, a un phénotype similaire à une population lymphocytaire impliquée dans la régulation immunitaire dans un modèle d'allogreffes et de xéno-greffes. Nous suggérons que les cellules DN T jouent un rôle dans la tolérance auto-immune. La compréhension de la fonction régulatrice de ce type cellulaire permettra le développement de nouvelles approches thérapeutiques permettant la prévention de maladies auto-immunes.

### **Mots-clés :**

Diabète auto-immun, souris NOD, modèle transgénique, lymphocytes T CD4-CD8-, régulation.

## **Abstract**

Autoimmune diabetes results from the immune-mediated destruction of insulin-producing  $\beta$  cells in the pancreas where effector T cells are sufficient for disease development and progression. To study the immunological components of this disease, we use a unique mouse model of diabetes-susceptible mice (NOD) and diabetes-resistant mice (B10.Br). The transgenes insertion in NOD.*H2k* and B10.Br, which control the T cells repertoire, revealed a rare CD4-CD8- (DN) T cell subset, with a similar phenotype in both resistant and susceptible mice. Here we demonstrate that this DN T cell subset is associated with diabetes resistance : DN T cells are present in greater proportion in the secondary lymphoid organs and in the infiltrated islets of autoimmune disease-resistant mice compared with autoimmune-susceptible mice, and are reminiscent of a cell type associated with immuno-regulatory properties in heart allo- and xeno-grafts. We suggest that the DN T cell subset plays a role in autoimmune tolerance. Understanding the regulatory function of this cell type will allow the development of novel cellular therapy strategies able to prevent the development of autoimmune diseases.

## **Key words :**

Autoimmune diabetes, NOD mice, transgenic model, CD4-CD8- T cells, regulation.

## Table des matières

<b>Liste des figures .....</b>	<b>iv</b>
<b>Liste des sigles et abréviations.....</b>	<b>v</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>viii</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Immunologie.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Le système immunitaire.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2 L'immunité acquise.....</b>	<b>1</b>
1.1.2.1 Le CMH.....	2
1.1.2.2 Les lymphocytes T.....	3
1.1.2.3 L'activation des lymphocytes T.....	5
<b>1.1.3 La tolérance centrale.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.4 La tolérance périphérique .....</b>	<b>7</b>
1.1.4.1 Mécanismes de tolérance intrinsèques aux lymphocytes T auto-réactifs.....	8
1.1.4.2 Mécanismes de tolérance extrinsèques aux lymphocytes T auto-réactifs.....	10
<b>1.1.5 Les populations régulatrices en périphérie.....</b>	<b>11</b>
1.1.5.1 Les mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs.....	11
1.1.5.2 Les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> régulateurs.....	12
1.1.5.3 Les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> régulateurs.....	13
1.1.5.4 Les lymphocytes T CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> régulateurs.....	14
<b>1.1.6 Le bris de tolérance .....</b>	<b>15-A</b>

<b>1.2</b>	<b>Diabète auto-immun .....</b>	<b>16</b>
1.2.1	Le pancréas .....	16
1.2.2	Le développement du diabète auto-immun.....	17
1.2.3	Les auto-antigènes et les auto-anticorps .....	19
1.2.4	L'incidence du diabète auto-immun .....	21
1.2.5	Les facteurs génétiques de prédisposition.....	23
1.2.5.1	Gènes prédisposants chez l'humain .....	23
1.2.5.2	Gènes prédisposants chez la souris .....	24
1.2.6	Les facteurs environnementaux de prédisposition .....	26
<b>1.3</b>	<b>L'étude du diabète auto-immun chez la souris.....</b>	<b>28</b>
1.3.1.	L'historique de la souris NOD .....	28
1.3.2	Le développement du diabète auto-immun chez la souris NOD .....	28
1.3.3	Les défauts identifiés chez la souris NOD.....	29
1.3.4	Les différents modèles de souris NOD TCR transgéniques .....	30
1.3.4.1	La souris transgénique 8.3-NOD .....	30
1.3.4.2	La souris transgénique 4.1-NOD .....	31
1.3.4.3	La souris BDC2.5.....	32
1.3.5	Notre modèle murin: la souris NOD double transgénique.....	32
1.3.5.1	L'insertion des transgènes sur des fonds génétiques différents.....	33
1.3.5.2	L'incidence de diabète chez les souris transgéniques .....	34
<b>1.4</b>	<b>Raisonnement et hypothèse .....</b>	<b>35</b>
	<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODE .....</b>	<b>36</b>

<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1 Analyse des populations de lymphocytes T dans les souris transgéniques</b> .....	<b>49</b>
<b>3.2 Rôle de la sélection négative thymique sur les proportions de cellules DN 1G12<sup>+</sup></b> .....	<b>54</b>
<b>3.3 Caractérisation des cellules DN 1G12<sup>+</sup></b> .....	<b>56</b>
3.3.1 Marqueurs d'activation .....	56
3.3.2 Marqueurs de cellules régulatrices.....	60
<b>3.4 Phénotype et expansion des cellules DN 1G12<sup>+</sup></b> .....	<b>61</b>
3.4.1 Comparaison des cellules DN 1G12 <sup>+</sup> aux cellules de souris lpr/lpr .....	61
3.4.2 Comparaison des cellules DN 1G12 <sup>+</sup> aux cellules NKT.....	62
3.4.3 Comparaison des cellules DN 1G12 <sup>+</sup> aux cellules aberrantes $\gamma\delta$ .....	65
3.4.4 Comparaison des cellules DN 1G12 <sup>+</sup> aux cellules DN T régulatrices.....	68
<b>3.5 Fonction des cellules DN 1G12<sup>+</sup> réduite dans la souris NOD.H2k</b> .....	<b>69</b>
<b>3.6 Cellules DN retrouvées dans un modèle non transgénique</b> .....	<b>79</b>
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION</b> .....	<b>83</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>97</b>
<b>Annexe I</b> .....	<b>ix</b>



**Liste des figures**

<b>Figure 1 : La proportion de cellules DN 1G12<sup>+</sup> est diminuée dans la souris NOD.H2k prédisposée au diabète.....</b>	<b>50</b>
<b>Figure 2 : Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ne sont pas soumises à la sélection négative .....</b>	<b>55</b>
<b>Figure 3 : Le phénotype des cellules DN 1G12<sup>+</sup> est différent du phénotype des populations cellulaires connues.....</b>	<b>57</b>
<b>Figure 4 : Le phénotype des cellules DN 1G12<sup>+</sup> est différent du phénotype des cellules NKT .....</b>	<b>63</b>
<b>Figure 5 : Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> sont anergiques <i>in vitro</i>, et démontrent un potentiel d'expansion en présence de cytokines .....</b>	<b>66</b>
<b>Figure 6 : Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> produisent de la perforine et de la granzyme B suite à leur activation <i>in vitro</i>.....</b>	<b>70</b>
<b>Figure 7 : Les cellules DN T provenant de la souris B10.Br résistante au diabète ont une activité cytotoxique efficace <i>in vitro</i> envers les cellules T CD8<sup>+</sup> .....</b>	<b>72</b>
<b>Figure 8 : La proportion de cellules T CD8<sup>+</sup> est augmentée dans le pancréas de souris NOD.H2k prédisposées au diabète.....</b>	<b>75</b>
<b>Figure 9 : Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> de la souris NOD.H2k prédisposée au diabète produisent efficacement de l'IL-10, une cytokine régulatrice .....</b>	<b>77</b>
<b>Figure 10 : Les cellules DN T sont diminuées dans la souris NOD non-transgénique .....</b>	<b>81</b>

## Liste de sigles et abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

APC : *allophycocyanin*

AICD : *activation-induced cell death*, mort cellulaire programme induite

ARNm : acide ribonucléique messenger

B10.Br TCR : souris B10.Br exprimant le TCR 3A9

B10.Br Dbl : souris B10.Br exprimant le TCR 3A9 et insHEL

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

BB : souche de rats diabétiques *BioBreeding*

BD : compagnie Becton Dickson

BTLA : *B and T-lymphocyte attenuator*

BrdU : bromodéoxyuridine

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CPM : comptes par minute, unité de mesure de radioactivité

CTLA-4 : *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

DN : double négative (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>)

DPT-1 : *Diabetes Prevention Trial*

EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale

EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique

EGTA : *ethylene glycol tetraacetic acid*

ELISA : *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorter*

FITC : *fluorescein isothiocyanate*

FoxP3 : *Forkhead Box P3*

FSC : *foward scatter*

GAD65 : *glutamic acid decarboxylase 65*

HBSS : *Hank's Balanced Salt Solution*

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

HLA : *human leukocyte antigen*

HRP : *Horse Radish Peroxidase*

IA-2 : *islet antigen-2*

ICA : *islet cell antibody*, anticorps dirigés contre les cellules d'îlots pancréatiques

Idd : *insulin-dependant diabetes*

IDDM : *insulin dependant diabetes mellitus*

IFN : interféron

IGRP : *islet-specific glucose 6-phosphatase catalytic subunit-related protein*

IL : interleukine

insHEL : transgène HEL inséré sous le promoteur de l'insuline

ITPR3 : *inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3*

lpr/lpr : souche de souris homozygote pour la mutation lpr/lpr

N : normale

NK : *natural killer cell*

NKT : *natural killer T cell*

NOD : souche de souris *Non-Obese Diabetic*

NOD.H2k : souche de souris NOD congénique pour l'haplotype H-2<sup>k</sup>

NOD.H2k TCR : souris NOD.H2k exprimant le TCR 3A9

NOD.H2k Dbl : souris NOD.H2k exprimant le TCR 3A9 et insHEL

nTregs : *natural T regulatory cells*, lymphocytes T régulateurs naturels

PBS : *phosphate buffer saline*

PD-1 : *programmed cell death 1*

PE : phycoérythrine

PerCP : *peridinin chlorophyll protein*

pLN : *pancreatic lymph node*, ganglion pancréatique

PTPN22 : *protein tyrosine phosphatase receptor type 22*

RT-PCR : *reverse transcription-polymerase chain reaction*

SVF : sérum de veau fœtal

T<sub>C</sub> : T cytotoxique

TCR : *T cell receptor*, récepteur de cellule T

TCR 3A9 : récepteur de cellules T transgénique, spécifique à l'antigène HEL

TGF : *tumor growth factor*

TNF : *tumor necrosis factor*

T<sub>H</sub> : *T helper*

TMB : 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine, substrat de l'enzyme HRP

U : unités

VNTR : *variable nucleotide tandem repeats*

## **Remerciements**

À ma superviseure, Dr. Sylvie Lesage, qui m'a fait confiance en mettant entre mes mains un projet aussi original et intéressant. Merci pour ta patience, ton énergie, ta passion pour la recherche, ainsi que tes nombreux conseils.

À mes copines du laboratoire, qui sont venues mettre de la vie dans le laboratoire au cours de ma deuxième année de maîtrise et sont devenues de véritables amies. Par votre appui et vos rires, vous avez gravé dans ma mémoire un incroyable souvenir de ce périple. Je vous adore et vous souhaite le meilleur.

À mes amis, ma deuxième famille, qui m'ont encouragé, ont partagé mon excitation et compris l'intérêt de mon travail. Votre amour m'est précieux. Parmi eux, un merci particulier à Francis Nadeau, qui a partagé ma vie pendant quelques années, et qui depuis a continué de m'épauler dans les pires moments comme dans les meilleurs.

À ma famille, qui a toujours cru en moi et m'a donné l'impression que le travail que j'accomplissais comptait vraiment. Un remerciement distinctif à ma mère, qui m'a toujours poussé à travailler fort et à aller plus loin. Maman, jamais je n'aurais pu passer à travers ma maîtrise sans ton appui et ton amour inconditionnel. Ce mémoire n'est pas uniquement le fruit de mon travail, mais aussi le fruit du tien. J'espère que tu en es fière et que tu es fière de toi.

# **CHAPITRE 1 : INTRODUCTION**

## **1.1 L'immunologie**

### **1.1.1 Le système immunitaire**

Le système immunitaire est constitué de molécules et de cellules qui ont pour fonction principale d'empêcher le développement de maladies infectieuses et de cancers, sans toutefois affecter l'organisme (le Soi). Le système immunitaire peut être divisé en 2 catégories, soit le système immunitaire inné et le système immunitaire acquis ou adaptatif. Le système immunitaire inné constitue une défense de première ligne, non spécifique, permettant de limiter l'invasion des pathogènes dans le corps. Le système immunitaire acquis, pour sa part, se développe plus lentement, mais permet une élimination efficace et spécifique de pathogènes [1-3]. Ce système est basé sur la reconnaissance très précise de récepteurs et de ligands, et constitue notre intérêt principal.

### **1.1.2 L'immunité acquise**

De toute évidence, le système immunitaire acquis est composé d'une multitude d'interactions, toutes aussi importantes les unes que les autres; le portrait de ce système, décrit dans ce chapitre, est en fait une revue des concepts de base qui sont utiles à la compréhension des travaux de recherche détaillés dans ce document.

L'immunité acquise est médiée principalement de lymphocytes T et B [1-3]. Les lymphocytes B portent à leur surface une immunoglobuline agissant comme récepteur (*B cell receptor*, BCR). Lorsque le BCR capte son antigène soluble, la cellule B devient activée, se différencie en plasmocyte et initie la production des anticorps dirigés contre l'antigène; ceci constitue la réponse humorale. La cellule B peut aussi être impliquée dans la présentation de l'antigène à d'autres lymphocytes. Les lymphocytes T, pour leur part, portent à leur surface un récepteur (*T cell receptor*, TCR) qui reconnaît un antigène présenté par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sur une autre cellule, appelée une cellule présentatrice d'antigène (CPA). Une grande majorité des TCR reconnaît un antigène de nature peptidique, tandis que certains moins nombreux ont la capacité de reconnaître un antigène lipidique. Cette interaction active la cellule T, et induit l'expression de molécules de surface interagissant avec leurs ligands à la surface de d'autres cellules; ceci décrit la réponse à médiation cellulaire. Les lymphocytes T seront décrits avec davantage d'attention, puisqu'ils constituent le sujet principal de cet ouvrage.

#### *1.1.2.1 Le CMH*

Le CMH est une molécule importante dans la réponse immune à médiation cellulaire [1-3]. Les molécules de CMH de classe I, exprimées de façon constitutive sur les cellules nucléées de l'organisme, présentent aux TCR des peptides provenant du milieu intracellulaire, et sont donc impliquées dans les réactions visant à éliminer les cellules anormales ou infectées par une infection virale. Les molécules de classe II,

exprimées sur les CPA, les cellules de Langerhans dans la peau, les cellules épithéliales thymiques et sur certaines cellules T activées, présentent pour leur part des peptides d'antigènes extracellulaires (eg. bactéries, parasites ou protéines), ce qui permet l'établissement d'une réponse contre ceux-ci. De toute évidence, ces molécules de CMH doivent être très polymorphiques afin de présenter un maximum d'antigènes, et ainsi diriger des réponses immunologiques permettant le maintien de l'organisme. Le répertoire de lymphocytes T est lui aussi diversifié, afin d'assurer la reconnaissance d'une multitude d'épitopes présentés par ces molécules de CMH; la diversité des lymphocytes T est créée dans le thymus par la formation de TCR ayant des spécificités variables.

#### *1.1.2.2 Les lymphocytes T*

Les lymphocytes T sont les deuxièmes plus importants en nombre dans le système immunitaire, suivant les lymphocytes B. Une très grande majorité de ces lymphocytes T possèdent à leur surface un TCR constitué d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  (TCR $\alpha\beta$ ), parmi lesquels deux types sont prédominants: certains interagissent avec le complexe peptide-CMH de classe II et possèdent à leur surface un co-récepteur CD4 (lymphocytes T CD4<sup>+</sup>), tandis que d'autres interagissent avec le complexe peptide-CMH de classe I et ont le co-récepteur CD8 (lymphocytes T CD8<sup>+</sup>). En plus d'exprimer différents co-récepteurs, ces deux types de lymphocytes T possèdent des fonctions très distinctes (discutées à la section 1.1.2.3). Ceux-ci sont très importants dans l'établissement de réponses immunes adaptatives [1-3].



Tandis que la grande majorité des lymphocytes T issus du thymus portent à leur surface un TCR $\alpha\beta$  ainsi qu'un co-récepteur CD4 ou CD8, certains précurseurs, à la suite d'une maturation différente, deviendront des lymphocytes exprimant un type différent de TCR composé de chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  (TCR $\gamma\delta$ ), sans exprimer de co-récepteur CD4 ou CD8 [1-3]. Ces TCR $\gamma\delta$  peuvent eux aussi être très variables; certains peuvent reconnaître des molécules de CMH non-classique, alors que d'autres reconnaissent un antigène non peptidique sans nécessiter son apprêtement ou sa présentation par une molécule de CMH. La fonction des lymphocytes T  $\gamma\delta$  n'est pas complètement élucidée, mais ces cellules semblent jouer un rôle important dans l'immunité contre les bactéries [4-6].

Les lymphocytes NKT (*natural killer T cell*) font aussi partie de la famille des lymphocytes provenant du thymus. Distinctifs par l'expression à leur surface de molécules associées aux cellules NK, les lymphocytes NKT, dont certains expriment le co-récepteur CD4, reconnaissent des glycolipides dans le contexte du CD1d, un CMH de classe I non-classique [1-3]. Leur TCR s'avère moins variable que les autres lymphocytes T, vu la faible diversité de la chaîne  $\alpha$ , justifiant leur appellation de cellules NKT invariantes. Ces cellules sont multifonctionnelles puisqu'elles jouent un rôle dans l'immunité contre les microbes et sont impliquées dans le rejet de tumeurs et dans la réponse auto-immune (revu en [7]).

### 1.1.2.3 L'activation des lymphocytes T

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont généralement une fonction auxiliaire (*T helper*, T<sub>H</sub>), permettant l'activation des réponses humorales par les cellules B et cytotoxique par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Brièvement, les lymphocytes T<sub>H</sub> sont initialement activés par les CPA suite à la reconnaissance du TCR avec le complexe du CMH de classe II présentant un peptide. La reconnaissance antigénique n'est pas suffisante pour l'activation des lymphocytes T puisqu'un signal de co-stimulation est lui aussi requis; la liaison du CD28 à son ligand B7 constitue le deuxième signal nécessaire pour l'activation du lymphocyte. Suite à l'activation des lymphocytes T<sub>H</sub>, ceux-ci vont ensuite se lier de façon spécifique au complexe peptide-CMH de classe II des lymphocytes B, qui seront eux aussi activés, différenciés en plasmocytes, et produiront des anticorps. Les lymphocytes T<sub>H</sub> vont aussi produire des cytokines, qui auront pour effet de moduler une multitude de types cellulaires. Entre autres, certaines cytokines seront impliquées dans le déclenchement d'une réponse à médiation cellulaire par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. L'association du TCR de ces lymphocytes au complexe peptide-CMH de classe I des cellules infectées ou altérées, en association avec les cytokines, vont stimuler la différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en lymphocytes T cytotoxiques (T<sub>C</sub>) et permettre la lyse des cellules à éliminer [1-3].

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont été classifiés selon leur patron de production de cytokines. Ainsi, les lymphocytes T<sub>H1</sub> produisent l'IFN $\gamma$ , le TNF $\beta$  et d'autres cytokines inflammatoires impliquées dans les réponses à médiation cellulaire, tandis que les

lymphocytes  $T_H2$  produisent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10, impliquées dans les réponses humorales. Les cytokines  $T_H1$  ont pour effet d'inhiber la réponse  $T_H2$ , et vice-versa. Une troisième type de lymphocytes  $T_H$ , nommés  $T_H17$ , sécrète majoritairement de l'IL-17 et de l'IL-6. Cette population, jouant un rôle dans l'inflammation, est vraisemblablement impliquée dans l'élimination de pathogènes différents de ceux éliminés par les réponses  $T_H1$  et  $T_H2$  (revu en [8]). Finalement, certaines cytokines, telles que le  $TGF\beta$ , ont pour but de contrôler les réponses immunes, et sont appelées cytokines régulatrices [1-3]. Celles-ci sont produites par des lymphocytes T dits régulateurs, qui seront décrits davantage à la section 1.1.5.

### ***1.1.3 La tolérance centrale***

Les lymphocytes T sont produits dans le thymus à partir de progéniteurs hématopoïétiques provenant de la moelle osseuse [1-3]. Le lymphocyte T immature, suite à une maturation et de nombreux réarrangements, exprimera à sa surface un TCR ayant une spécificité donnée. Les réarrangements productifs de TCR permettront la formation d'environ 25 millions de spécificités [9], impliquant que certains lymphocytes T aient une spécificité contre des antigènes du soi. Le thymus doit donc effectuer une sélection parmi la grande variété de lymphocytes T produits, afin de conserver ceux qui permettront une protection contre les infections sans toutefois causer des dommages aux composantes de l'organisme. Deux processus distincts permettent une telle sélection : la sélection négative et la sélection positive. Tout d'abord, la sélection positive implique la présentation de peptide du Soi, qui sont les seuls présents dans le thymus, présentés sur

une molécule de CMH du Soi. Seuls les lymphocytes T reconnaissant avec une faible avidité ces complexes seront choisis pour survivre. Ceux ne reconnaissant pas ces complexes seront éliminés par apoptose, tandis que la sélection négative permet l'élimination des lymphocytes ayant une trop forte avidité pour les complexes peptide du Soi-CMH du Soi, qui entrent eux aussi en apoptose. Les lymphocytes T ayant survécu à ces deux sélections, c'est-à-dire ceux capables d'établir une réponse par leur reconnaissance du CMH du Soi tout en tolérant les composantes du Soi, peuvent par la suite sortir du thymus, et former le répertoire en périphérie. Par contre, les mécanismes de tolérance centrale ne sont pas sans faille, et peuvent laisser s'échapper en périphérie des lymphocytes T auto-réactifs qui sont en effet détectés en périphérie chez des individus en bonne santé [10, 11]. Afin d'éviter le développement de réponses contre des antigènes du Soi, certains mécanismes d'établissement de tolérance en périphérie se sont développés au cours de l'évolution.

#### ***1.1.4 La tolérance périphérique***

Tel que mentionné précédemment, certains lymphocytes auto-réactifs peuvent s'échapper du thymus, et sont ainsi une menace pour l'intégrité des composantes du Soi. La tolérance périphérique a pour but d'empêcher l'activation de ces lymphocytes auto-réactifs, et s'effectue en les éliminant par apoptose ou en empêchant leur activation ou leur différenciation, afin d'éviter les dommages aux tissus. Ces mécanismes peuvent être intrinsèques, impliquant des modifications biochimiques ou dans l'expression génique, et extrinsèques aux lymphocytes auto-réactifs.

#### 1.1.4.1 Mécanismes de tolérance intrinsèques aux lymphocytes T auto-réactifs

L'ignorance et l'anergie sont deux mécanismes impliqués dans l'inactivation des lymphocytes T auto-réactifs. L'ignorance des auto-antigènes constitue le mécanisme le plus simple de tolérance des lymphocytes auto-réactifs. Lorsque l'auto-antigène est présent en trop faible concentration pour initier une réponse [12], ou lorsqu'il est séquestré dans un organe immunologiquement privilégié [13, 14], le lymphocyte T auto-réactif n'établit tout simplement pas de réponse, limitant ainsi les risques de développer une réponse contre le Soi.

Dans d'autres cas, la rencontre entre le lymphocyte et l'antigène peut mener à l'anergie clonale de ce lymphocyte; ce mécanisme rend la cellule, quoique toujours vivante, fonctionnellement inapte à établir une réponse. L'anergie clonale est le résultat de la liaison *in vitro* du TCR à son ligand en absence de molécules de co-stimulation (CD28), habituellement requises pour activer les lymphocytes T et qui constituent un signal de « danger » indiquant la nécessité de la réponse immune [15]. Des études ont aussi démontré que l'anergie *in vivo* requiert la liaison d'une molécule inhibitrice, le CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4*) sur le ligand B7 [16, 17]. Le CTLA-4, dont l'expression est augmentée suite à l'activation des lymphocytes T, semble augmenter leur seuil d'activation ayant pour effet de réguler la réponse immune [18-21]. PD-1 (*programmed cell death 1*) et BTLA (*B and T-lymphocyte attenuator*), deux autres molécules inhibitrices, envoient des signaux négatifs qui ont pour effet de limiter l'activation lymphocytaire lorsqu'elles se lient à leurs ligands de la famille de B7 [22-

24]. Une régulation à la hausse de la molécule inhibitrice CD5, en fonction de la capacité de chaque TCR à reconnaître des auto-antigènes, permet aussi d'empêcher l'activation des lymphocytes T auto-réactifs [25, 26].

Les cytokines sont aussi impliquées dans le maintien de la tolérance périphérique. Tel que mentionné à la section 1.1.2.3, les cytokines  $T_H1$  et  $T_H2$  produites par les lymphocytes T peuvent avoir un effet inhibiteur; la production de cytokines  $T_H1$  a un effet antagoniste sur les réponses  $T_H2$ , et vice-versa. Ces cytokines permettent ainsi une modification phénotypique limitant l'auto-réactivité suite à l'activation complète des lymphocytes T [1-3].

L'apoptose des lymphocytes auto-réactifs est aussi une méthode très efficace pour prévenir des réponses auto-immunes. Ainsi, la stimulation répétitive du TCR sans la présence de co-stimulation va induire l'expression de Fas (CD95) qui, lorsque lié à son ligand FasL, mène à la délétion du lymphocyte potentiellement dangereux; ce processus est appelé mort cellulaire programmée induite (*activation-induced cell death*, AICD) [27, 28].

#### 1.1.4.2 Mécanismes de tolérance extrinsèques aux lymphocytes T auto-réactifs

Certaines populations en périphérie ont comme rôle de contrôler les réponses immunes et s'assurer de la tolérance des lymphocytes T auto-réactifs. On peut mentionner l'implication des CPA, principalement les cellules dendritiques, et des cellules régulatrices. Les cellules dendritiques ont la capacité, même lorsqu'elles ne sont pas activées, d'internaliser des antigènes solubles et de les présenter sur des molécules de CMH en absence d'inflammation, d'infection ou d'adjuvant [29-31]. Évidemment, l'absence de molécules de co-stimulation à leur surface, vu l'état basal de ces cellules dendritiques immatures, va induire l'anergie ou la délétion des lymphocytes T reconnaissant ces complexes de CMH-peptide du Soi, tel que décrit dans la section précédente. Une population ayant un phénotype particulier, découverte chez le rat, pourrait même avoir comme rôle unique d'induire la tolérance des lymphocytes T [32, 33]. De plus, les cellules dendritiques ont la capacité d'activer une population distincte de lymphocytes T capables de réguler l'activation d'autres lymphocytes [34, 35]. Ces lymphocytes, produits par le thymus ou en périphérie, sont appelés lymphocytes T régulateurs. Leur activation a pour effet d'inhiber la prolifération des lymphocytes auto-réactifs. La régulation exercée par ce type cellulaire a un effet sur la prévention de l'auto-immunité, mais peut aussi contrôler la réponse des lymphocytes T dans la réponse au non-Soi. Les cellules régulatrices ont été abondamment étudiées au cours de la dernière décennie, et plusieurs populations distinctes jouant ce rôle ont été identifiées.

### ***1.1.5 Les populations régulatrices en périphérie***

Plusieurs populations de lymphocytes T ayant des fonctions régulatrices ont été identifiées. Celles-ci diffèrent par leur origine, par l'expression de certaines molécules, par leurs mécanismes d'action ou par leur implication dans la prévention de certaines maladies.

#### ***1.1.5.1 Les mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs***

Les lymphocytes T régulateurs peuvent contrôler les réactions immunitaires en limitant la prolifération et l'activation par trois processus distincts : la sécrétion de cytokines régulatrices, l'inhibition de la prolifération dépendante du contact et la lyse des cellules cibles [36]. Tout d'abord, certaines cellules régulatrices produisent des cytokines qui auront une action à distance. L'action des cytokines immunorégulatrices, telles que l'IL-10 et TGF $\beta$ , implique principalement la modulation de l'expression génique des cellules cibles, qui dicte l'activité de ces cellules. Certaines autres cellules doivent avoir un contact étroit avec les cellules cibles afin que leur contrôle soit efficace. Dans ce cas, les interactions entre les molécules de surface vont causer une inhibition des lymphocytes réactifs. Dans d'autres cas, les lymphocytes régulateurs sécrètent des molécules, telles que les granzymes et la perforine, capables d'induire la lyse des cellules cibles [37, 38]. Les mécanismes de régulation varient selon la population régulatrice étudiée.



### 1.1.5.2 Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs

Ce type de lymphocytes T régulateurs a été étudié avec beaucoup d'intérêt au cours des dernières années. Certains lymphocytes T régulateurs, exprimant le CD4, le CD25 et le facteur de transcription FoxP3 (*Forkhead Box P3*) (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), proviennent du thymus, et sont donc appelés lymphocytes T régulateurs naturels (*natural T regulatory cells*, nTregs) [39]. Le facteur de transcription FoxP3 s'avère important au développement et fonction de ces lymphocytes régulateurs [40-42], et sa mutation provoque une lympho-prolifération massive responsable de nombreux syndromes auto-immuns [43]. De par la spécificité de leur TCR, ces nTregs reconnaissent principalement des antigènes du Soi [44], et sont donc fortement impliqués dans la régulation des cellules effectrices auto-immunes; leur fonction nécessite le contact entre les lymphocytes régulateurs et les lymphocytes régulés, en plus de la production de cytokines (IL-10, TGFβ) qui s'est aussi avérée très importante [45-50].

Certains autres sont induits en périphérie à partir des lymphocytes T<sub>H</sub> naïfs, soit par la présence de cytokines ou de faibles doses d'antigènes. La stimulation du TCR par de faibles doses d'antigènes en présence de la cytokine TGFβ induit la production de FoxP3 dans certains lymphocytes T<sub>H</sub> CD4<sup>+</sup> [51-53]. Ces lymphocytes régulateurs induits ont donc un phénotype similaire aux nTregs dans leur expression du CD4 et de FoxP3, mais l'expression de CD25 peut être variable.

Deux autres types de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs peuvent être induits en périphérie, mais ceux-ci n'expriment pas constitutivement FoxP3. Tout d'abord, des études impliquant l'administration orale de faibles doses d'antigène a permis la découverte d'une population régulatrice de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> nommé T<sub>H</sub>3 [54, 55]. Le mécanisme d'action de cette population implique principalement la production de TGFβ. Parallèlement, la stimulation répétée du TCR de lymphocytes naïfs par des antigènes provenant de pathogènes, en présence d'IL-10, mène à la formation d'une autre population régulatrice, appelée Tr1, productrice d'IL-10 et de TGFβ [56-58]. Celle-ci est impliquée dans le contrôle d'allergies et de l'inflammation lors d'infections [59-61].

#### *1.1.5.3 Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> régulateurs*

Une grande variété de populations de lymphocytes CD8<sup>+</sup> ont aussi démontré une fonction régulatrice dans plusieurs modèles, quoique leurs caractéristiques et implications dans la tolérance sont moins bien connues que les lymphocytes CD4<sup>+</sup> régulateurs. Une certaine population de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> régulateurs reconnaît le CMH de classe I Qa-1 sur les cellules cibles CD4<sup>+</sup>, et empêchent, par des mécanismes encore inconnus, la prolifération de ceux-ci [62, 63]. Ce mécanisme de régulation serait entre autres impliqué dans la protection contre l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) murine et dans la tolérance suite à des transplantations [64-68]. Certains autres lymphocytes régulateurs CD8<sup>+</sup>, dont le phénotype est variable, exercent leur fonction principalement par la production d'IL-10, qui supprime la production de

cytokines inflammatoires ainsi que la prolifération cellulaire [69-72]. Un autre groupe de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> régulateurs, exprimant celui-ci FoxP3 (CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>), a aussi été identifié [73-76]. Cette population a pour cible les CPA, qui deviennent tolérogènes suite au contact avec les cellules régulatrices qui ont pour effet de réguler à la baisse l'expression de molécules de co-stimulation et d'adhésion [77]. Conséquemment, les CPA ainsi modifiées n'activent plus les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, prodiguant une tolérance au niveau endothélial [78, 79]. Les populations régulatrices CD8<sup>+</sup> sont donc très diverses, autant phénotypiquement que fonctionnellement.

#### *1.1.5.4 Les lymphocytes T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (double négatifs, DN) régulateurs*

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et les cellules NKT sont aussi considérés comme des régulateurs naturels, vu leur production dans le thymus. Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont principalement impliqués dans l'immuno-régulation dans l'épithélium et dans la peau [3], et dans les activités anti-tumorales [80]. Les NKT, par leur forte production de cytokines, ont été associées à la régulation des réactions impliquées dans de nombreuses maladies auto-immunes [81-83].

Il existe une autre population de lymphocytes T régulateurs encore peu étudiée. Ces lymphocytes, se développant à l'extérieur du thymus [84], et n'exprimant pas les co-récepteurs CD4 ou CD8, ont démontré une fonction régulatrice chez la souris [85-90] et chez l'humain [91]. Les lymphocytes DN régulateurs portent un TCR $\alpha\beta$  sans exprimer des marqueurs de cellules NKT, ni le FoxP3, les rendant phénotypiquement distincts.

De plus, leur mécanisme d'action est particulièrement complexe [92]. Ces cellules ont la capacité d'acquérir des complexes CMH-peptide sur les CPA et les présenter à leur surface, permettant de piéger les lymphocytes T ayant la même spécificité antigénique. Les molécules impliquées dans ce transfert de membrane cellulaire ne sont pas connues, mais certaines expériences ont démontré que le TCR joue un rôle crucial dans le processus, et par le fait même sur la fonction des cellules DN; en effet, le blocage du TCR diminue vivement l'efficacité d'élimination des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> par les cellules DN [86]. La fonction de cette population régulatrice implique donc un contact étroit entre la cellule régulatrice et sa cible, au cours de laquelle la liaison Fas-FasL déclenche les mécanismes ayant pour but l'apoptose des lymphocytes allo-réactifs [89]. Dans le cas des xénogreffes, les lymphocytes DN régulateurs sont capables de tuer les lymphocytes réactifs aux xéno-antigènes en sécrétant des granzymes et des perforines [38]. Les lymphocytes DN régulateurs limitent donc l'expansion des lymphocytes répondant aux antigènes provenant d'allogreffes et xénogreffes cardiaques, permettant ainsi d'imposer et de maintenir une tolérance ayant pour conséquence de prolonger la durée de vie de ces greffes.

### ***1.1.6 Le bris de tolérance***

La tolérance au Soi, imposée par des mécanismes centraux et périphériques, empêche les lymphocytes potentiellement auto-réactifs de développer une réponse contre les composantes du Soi. Par contre, pour des raisons diverses, des gènes ou molécules impliquées dans l'établissement de la tolérance peuvent être mutés ou dysfonctionnels, permettant ainsi l'activation et la prolifération des lymphocytes auto-réactifs à l'origine d'une réponse contre une protéine, une cellule ou un organe du Soi. Ce phénomène, appelé bris de tolérance, cause des dommages à l'organisme, qui seront diagnostiqués et associés à une maladie auto-immune. Le diabète auto-immun, la sclérose en plaques, la thyroïdite et l'arthrite rhumatoïde font partie de ce regroupement de maladies; le diabète auto-immun sera défini davantage dans la section suivante.

## **1.2 Le diabète auto-immun**

Le diabète auto-immun est une maladie affectant des cellules spécialisées dans le pancréas. Les mécanismes impliqués dans la maladie, et les facteurs causant une prédisposition, seront décrits dans cette section.

### **1.2.1 Le pancréas**

Le pancréas est un organe à la fois endocrine et exocrine. Le tissu exocrine est impliqué dans la digestion. Les cellules acineuses qui le forment produisent des enzymes digestives, qui sont acheminées dans le duodénum, de concert avec une solution aqueuse de  $\text{HCO}_3^-$  produit par les cellules des canaux excréteurs pancréatiques. Le tissu endocrine, pour sa part, est le principal régulateur de la glycémie sanguine, par les hormones qu'il produit. Les cellules endocrines, beaucoup moins abondantes que les cellules exocrines, sont regroupées en petites grappes nommées îlots de Langerhans. Les deux types cellulaires les plus importants dans les îlots de Langerhans sont les cellules  $\alpha$ , qui produisent le glucagon, et les cellules  $\beta$  productrices d'insuline; ces deux hormones ont des effets diamétralement opposés, et par le fait même complémentaires. L'insuline a pour rôle de diminuer le glucose sanguin par son utilisation et son stockage, tandis que le glucagon est requis pour que le foie libère du glucose et ainsi augmenter le glucose sanguin. L'insuline a aussi la capacité de diminuer la concentration sanguine de lipides et d'acides aminés.

De façon plus détaillée, lorsque du glucose est absorbé lors de la prise prandiale, et retrouvé par la suite dans le sang, le niveau de glucose sanguin lui-même agit comme régulateur permettant la stimulation des cellules  $\beta$  qui produisent et sécrètent l'insuline. Cette hormone, libérée à son tour dans la circulation sanguine, facilite alors l'entrée du glucose dans les cellules dépendantes de l'insuline par le recrutement des transporteurs de glucose à la surface cellulaire, et le glucose sera utilisé comme source d'énergie. Le surplus est mis en réserve dans le foie suite à la glycogénèse, c'est-à-dire la transformation du glucose en glycogène. L'insuline est donc absolument requise pour la croissance normale et le bon fonctionnement des cellules [92].

### **1.2.2 Le développement du diabète auto-immun**

Le diabète auto-immun est la conséquence de la destruction des cellules  $\beta$  productrices d'insuline dans les îlots de Langerhans. Cette destruction est causée par une activation du système immunitaire acquis, ciblée précisément contre les cellules  $\beta$ . Le diabète auto-immun a aussi été nommé diabète de type 1, diabète juvénile, puisqu'il se développe généralement durant l'enfance, ainsi que diabète insulino-dépendant, pour la dépendance à l'insuline suivant l'établissement de la maladie.

Les mécanismes impliqués dans l'initiation et le développement du diabète auto-immun ne sont pas parfaitement connus, mais la présence d'infiltrats léucocytaires dans les îlots pancréatiques de patients diabétiques, contenant des lymphocytes B et T, des cellules NK et des monocytes/macrophages [93-96], témoigne de l'implication de ces

cellules dans la réactivité contre les cellules  $\beta$ ; il est à noter que les lymphocytes T sont généralement prédominants dans ces infiltrats et qu'ils s'avèrent essentiels pour le développement de la maladie. Il est présumé que l'exposition d'antigènes provenant de ces cellules  $\beta$  par leur apoptose ou leur nécrose, lors du renouvellement du tissu ou causée par un facteur environnemental, est le point de départ de l'auto-immunité impliquée dans le développement du diabète. Ces antigènes sont alors apprêtés par les CPA (macrophages, cellules dendritiques ou lymphocytes B) et présentés sur un CMH aux lymphocytes T naïfs dans les ganglions drainant le pancréas (ganglions pancréatiques, pLN) [97]. À ce stade, les lymphocytes T activés, dont le TCR reconnaît les auto-antigènes, acquièrent les molécules d'adhésion nécessaires pour la migration vers le pancréas [98]. Ces lymphocytes T sont d'autant plus activés lorsqu'ils rencontrent à nouveau l'auto-antigène dans les îlots, et sont retenus dans le tissu pancréatique, causant ainsi l'insulite. Par la suite, ces leucocytes établissent alors une réponse contre les cellules  $\beta$ .

Des études chez la souris ont démontré que les lymphocytes T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  sont importants dans le développement du diabète [99], mais les mécanismes précis impliqués dans la destruction des cellules  $\beta$  ne sont que peu connus. Selon les hypothèses émises, les lymphocytes T  $CD4^+$   $T_H1$  activent dans les pLN les cellules cytotoxiques  $CD8^+$  [100] par leur production d'interleukine-2 (IL-2). Dans les îlots, les cellules  $CD8^+$  peuvent alors se lier au CMH de classe I exprimé à la surface des cellules  $\beta$ , puis causer la mort de ces cellules par la liaison de Fas avec FasL, et par la production de perforine et granzyme B. L'attaque des cellules  $\beta$  par les lymphocytes  $CD4^+$  doit



évidemment être indirecte, en raison de l'absence de molécules de CMH de classe II à leur surface. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 peuvent donc produire des cytokines de type T<sub>H</sub>1, telles que l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) et le *tumor necrosis factor* alpha et bêta (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ), qui sont cytotoxiques pour les cellules  $\beta$ . La production de cytokines par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 permet aussi le recrutement et l'activation de macrophages [101, 102], dont la production de radicaux libres et de cytokines T<sub>H</sub>1 (IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) vont aussi être toxiques pour les cellules  $\beta$  ([103-105], revu en [106]).

Ces événements présumés mèneront à la destruction des cellules  $\beta$ , causant par le fait même un déficit en insuline, qui est habituellement diagnostiqué lorsque 60 à 80% de ces cellules ont été détruites [107]. Ce déficit se doit d'être compensé par un contrôle strict de la glycémie, maintenu par des injections quotidiennes d'insuline par les patients. Un mauvais contrôle de la glycémie peut entraîner des rétinopathies [108], des néphropathies [109], des neuropathies [110] ainsi que des maladies cardiovasculaires [111], causes majeures de la morbidité et la mortalité chez les patients diabétiques. L'absence de traitements curatifs ou préventifs contre le diabète auto-immun justifie l'absolue nécessité de la recherche dans le domaine.

### **1.2.3 Les auto-antigènes et les auto-anticorps**

Au cours des années soixante-dix, des anticorps dirigés contre des protéines exprimées dans les îlots de Langerhans (*islet cell antibody*, ICA) ont été identifiés [112],

témoignant de l'activité des cellules B productrices d'anticorps. Depuis, des études ont permis d'identifier les antigènes ciblés par ces ICA; ceux-ci sont principalement dirigés contre l'insuline [113], l'acide glutamique décarboxylase GAD65 [114], la tyrosine phosphatase IA-2 [115], ainsi que d'autres moins bien définis. Ces trois auto-anticorps sont les plus étudiés, surtout pour leur forte spécificité et sensibilité [116], et sont vraisemblablement présents avant le développement du diabète de type 1. Le rôle de ces ICA dans le développement du diabète auto-immun ne semble pas être dominant, puisque les auto-anticorps ne provoquent pas à eux seuls la destruction des cellules  $\beta$ . Par contre, l'étude de grandes cohortes, constituées d'individus de la population générale ou provenant de la famille immédiate de patients atteints de diabète de type 1, ont mis en lumière la valeur prédictive de la présence d'un ou plusieurs de ces auto-anticorps [117, 118]. En effet, dans les familles immédiates des patients atteints, étudiées au cours de l'étude *Diabetes Prevention Trial* (DPT-1), 98% des individus ayant au moins un auto-anticorps, et 80% des individus ayant au moins deux auto-anticorps, développent le diabète. De plus, les individus ayant deux auto-anticorps avaient 68% de risque de développer la maladie dans une période de 5 ans, et le risque s'élève à 100% chez les individus possédant trois auto-anticorps [119].

Plusieurs auteurs suggèrent que l'insuline, le seul auto-antigène unique aux cellules  $\beta$ , est une molécule clé dans l'initiation du développement du diabète auto-immun, et serait donc responsable de la cascade d'événements dirigés contre les cellules  $\beta$  [120, 121]. Il a été démontré, chez les patients diabétiques, qu'environ la moitié des lymphocytes T présents dans les pLN reconnaissent l'épitope 1-15 de la chaîne A de

l'insuline [121]. Ces lymphocytes réactifs à l'insuline ont par ailleurs une activité cytotoxique envers les cellules  $\beta$  du pancréas [122]. Cette notion est appuyée par des expériences chez la souris NOD. Plus précisément, une étude a démontré que le peptide de l'insuline B:9-23 s'avérait un déterminant important dans le développement du diabète auto-immun chez la souris, puisque son absence ou sa mutation prévenait la maladie [120, 123].

#### ***1.2.4 L'incidence du diabète auto-immun***

Le diabète auto-immun constitue environ 90% des cas de diabète diagnostiqués en bas âge, se développant majoritairement avant l'âge de 15 ans, et 10% des cas de diabète diagnostiqués à l'âge adulte; contrairement à plusieurs autres maladies auto-immunes, le diabète auto-immun touche autant les deux sexes. Une augmentation annuelle de l'incidence du diabète auto-immun d'approximativement 3% a été rapportée [124, 125]; cette augmentation est d'autant plus importante dans les pays qui affichaient une incidence plus faible [124]. Le projet Diamond a aussi mis en lumière une plus forte augmentation de l'incidence dans les groupes plus jeunes (0-4 ans), majoritairement en Europe [126].

Le diabète auto-immun est une maladie à trait complexe, influencée par des facteurs génétiques et environnementaux (décrits dans les sections 1.2.5 et 1.2.6), et a donc une incidence variable selon la région et la population étudiées. Par exemple, l'incidence varie beaucoup entre les populations juives et arabes retrouvées en Israël,

démontrant l'influence des facteurs génétiques [127]. Aussi, des populations génétiquement semblables mais ayant un environnement différent (eg. la Finlande et la Carélie russe) ont une incidence très différente [128]. Une vaste étude mondiale, réalisée en collaboration avec l'Organisation mondiale de la santé, a mis en lumière la variation de l'incidence observée parmi les populations de 100 régions, distribuées dans 50 pays. Les régions de Zunyi en Chine, et de Caracas au Venezuela, ont des incidences très faibles (0,1/100 000 par année) tandis que la Sardaigne, en Italie, et la Finlande arrivent en tête de liste avec respectivement 37.8/100 000 et 40.9/100 000 par année, démontrant une forte variabilité selon la région étudiée [126]. L'incidence est particulièrement élevée en Europe et en Amérique du Nord, laissant présager que des facteurs génétiques transmis de génération en génération par des ancêtres d'origine européenne sont en cause dans le développement du diabète auto-immun. Par contre, l'incidence s'est aussi avérée élevée dans des pays d'origine autre qu'européenne, indiquant qu'à la fois les facteurs génétiques, environnementaux, et même comportementaux, sont impliqués dans la prédisposition à la maladie.

Plus près de chez nous, Polychronakos et Legault ont étudié l'incidence du diabète de type 1 au Québec chez des individus de moins de 18 ans entre les années 1989 et 2000 [129]. Leurs résultats indiquent que l'incidence annuelle du diabète auto-immun est stable au Québec, se maintenant à 15/100 000, et que l'âge de l'établissement du diabète n'a pas diminué comme dans les pays européens. L'incidence est par contre plus élevée que préalablement évaluée lors d'une étude s'étalant de 1971 à 1983, alors qu'elle s'établissait à 9,3/100 000 [130].

### **1.2.5 Les facteurs génétiques de prédisposition**

#### **1.2.5.1 Gènes prédisposants chez l'humain**

Le diabète auto-immun est une des maladies polygéniques les plus étudiées. Ces nombreux travaux ont permis, avec le temps, d'identifier des gènes cibles associés à la prédisposition à cette maladie. Ceux-ci sont appelés IDDM (*insulin-dependant diabetes mellitus*) chez l'humain, et se voient attribuer un chiffre correspondant à l'ordre de leur découverte. L'avènement tout récent du séquençage du génome chez l'humain facilitera l'étude de ces gènes.

Le locus du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II a été identifié comme principal acteur dans la prédisposition et la résistance au diabète chez l'humain, et s'est vu attribuer le nom de IDDM1 [131]. Le CMH est nommé HLA (*human leukocyte antigen*) chez l'humain et les différents loci du HLA classe II, situés sur le chromosome 6, sont appelés HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR. Il est maintenant établi que les allèles DRB1\*04-DQA1\*0301-DQB1\*0302 (DR4-DQ8) et DRB1\*03-DQA1\*0501-DQB1\*0201 (DR3-DQ2) sont impliqués dans la prédisposition [132], dont le risque relatif se situe entre 3 et 50, tandis que les allèles DRB1\*15-DQA1\*0102-DQB1\*0602 confèrent une résistance dominante des individus contre le diabète de type 1 [133-137]. Par contre, seul un faible nombre d'individus portant les allèles de prédisposition mentionnés ci-dessus développent la maladie. Ceci a mené les groupes de recherche à investiguer l'influence des gènes indépendants du CMH de classe II, ayant une implication dans le développement du diabète de type 1.

Ces études ont permis de révéler l'influence, quoique moins importante (risque relatif inférieur à 3) de tels gènes, dont les polymorphismes influencent la prédisposition à cette maladie. Parmi ceux-ci, mentionnons le gène de l'insuline [138], CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) [139], ITPR3 (*inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3*) [140], PTPN22 (*protein tyrosine phosphatase receptor type 22*) [141, 142], ainsi que la région contenant les gènes de l'IL-21 [143] et du récepteur à l'IL-2 [144]. La prédisposition associée au gène de l'insuline, appelé IDDM2, est en fait causée par un polymorphisme dans les régions VNTR (*variable nucleotide tandem repeats*) flanquant la molécule d'insuline [145, 146], affectant donc son expression dans le thymus et par le fait même la tolérance des cellules T à cette protéine [147, 148]. Ces régions sont uniques à l'homme.

#### 1.2.5.2 Gènes prédisposants chez la souris

L'étude des régions de prédisposition chez la souris a été rendue possible grâce à l'utilisation de souris congéniques. Les régions ainsi identifiées dans la souris NOD, et aussi appelées *Idd* (*insulin-dependant diabetes*), permettent d'associer des gènes cibles au développement du diabète auto-immun chez la souris. Les régions de prédisposition identifiées chez la souris correspondent aux gènes de prédisposition identifiés chez l'humain, indiquant donc que le modèle murin est un modèle adéquat pour étudier le diabète auto-immun.

L'identification de la région principale de prédisposition *Idd1* [150-153], située dans le locus du CMH sur le chromosome 17, a mis en lumière 2 gènes de prédisposition, I-A et I-E. Les nombreuses études effectuées sur les souris transgéniques ont par la suite permis l'association du CMH I-A<sup>E7</sup> au développement du diabète auto-immun [154, 155]. Ce CMH associé à la prédisposition chez la souris s'avère homologue au locus HLA-DQ8 chez l'humain en structure et en fonction [156]. Dans les deux cas, la présence d'un acide aminé chargé à la position du résidu 57 de la chaîne  $\beta$  altère la liaison au peptide présenté par le CMH, et serait ainsi en partie responsable de la présence de lymphocytes auto-réactifs [157-161].

La région de prédisposition *Idd5.1* contient *CTLA-4*, un gène aussi associé au diabète chez l'humain, produisant une protéine dont la fonction est d'inhiber l'activation des lymphocytes [162, 163]. La région *Idd3* contient, pour sa part, les gènes codant pour les cytokines IL-2 et IL-21 [164-166], qui diffère de la région de prédisposition retrouvée chez l'humain, puisque celle-ci contient entre autres le récepteur de l'IL-2, et non la cytokine elle-même. Par contre, ces deux observations tendent à démontrer l'implication des processus induits par la voie de l'IL-2 dans le diabète auto-immun. Parmi les autres gènes candidats dans les régions de prédisposition, on peut retrouver *Nramp1* (*Idd5.2*) [162], *Vav3* (*Idd18*), *Lck* (*Idd9.1*) et *4-1bb* (*Idd9.3*) [167].

Quoique les gènes diffèrent entre les deux entités, l'étude parallèle de l'humain et de la souris permet donc de mettre en évidence l'importance de certaines voies biologiques dans la prédisposition à ce phénomène de bris de tolérance. Dans les deux

cas, les régions de prédisposition sont associées à la formation ou à la fonction des lymphocytes T, qui sont les principaux responsables du développement du diabète de type 1.

### **1.2.6 Les facteurs environnementaux de prédisposition**

Les études effectuées chez les couples de jumeaux identiques (monozygotiques) ont démontré que la concordance du développement du diabète de type 1 ne dépassait pas 43% [167], indiquant donc que les gènes ne sont pas les seuls responsables dans le développement de la maladie, et donc que des facteurs environnementaux sont impliqués dans le développement du diabète de type 1. Une des théories émergentes est la théorie de l'hygiène, selon laquelle une réduction des infections chez les enfants en bas âge induit une augmentation de l'incidence de diabète [168, 169]. Une étude européenne a démontré que l'incidence du diabète est plus faible dans les régions ayant une forte densité démographique, favorisant ainsi la propagation d'infection et les probabilités de contact avec des pathogènes en bas âge [170]. Cette théorie est appuyée par l'étude de modèles animaux; en effet, les souris NOD et les rats BB, principaux modèles du diabète de type 1, ont une incidence considérablement plus élevée lorsqu'ils sont maintenus dans des animaleries limitant l'exposition à certains pathogènes ([171-175], revu en [176]).

Les virus sont aussi considérés comme étant impliqués dans le développement du diabète de type 1. Les principaux suspects sont les virus des oreillons [177], de la rubéole [178], les rotavirus [179], les entérovirus (eg. Coxsackie [180], echovirus [181]), le parvovirus B19 [182] et les herpesvirus (eg. cytomegalovirus [183, 184], virus



Epstein-Barr [185]). Dans les années 70, la rubéole congénitale a été associée au développement du diabète de type 1 [186-188], mais les campagnes massives de vaccination, ayant eu pour effet une chute drastique de l'incidence de rubéole, n'ont pas empêché une recrudescence de l'incidence de la maladie observée dans les 50 dernières années. Plus récemment, les études effectuées sur le virus Coxsackie B4 ont permis de déterminer que l'infection joue un rôle dans l'établissement du diabète, mais n'était pas impliquée dans l'initiation de l'auto-immunité dirigée contre les îlots pancréatiques [189]. La recherche d'un fort lien causal entre des facteurs viraux et le développement de l'auto-immunité dirigée contre le pancréas est donc très complexe.

L'alimentation est aussi une candidate dans la prédisposition ou la résistance au diabète de type 1. Certains facteurs, tels que la consommation précoce du lait de vache [190, 191], de céréales [192, 193] et de certains fruits et légumes [194], ainsi que l'absorption prénatale ou en bas âge de vitamine D [195, 196], sont mis en cause. Par contre, les résultats des recherches sur différentes cohortes sont discordants, rendant encore une fois difficile l'identification de facteurs ayant une corrélation directe avec le développement du diabète auto-immun.

### **1.3 L'étude du diabète auto-immun chez la souris**

Tel que mentionné dans la section précédente, l'étude du diabète auto-immun sur des modèles murins ont mis en lumière les différents gènes, molécules et facteurs en cause dans le développement de la maladie. La souris NOD constitue un outil pratique pour cette étude, puisque plusieurs aspects du diabète qu'elle développe sont similaires au diabète auto-immun chez l'humain.

#### **1.3.1. L'historique de la souris NOD**

La découverte de la souris NOD s'est faite par hasard en 1974 [197]. Alors qu'un laboratoire japonais sélectionnait une lignée prédisposée au développement de cataractes à partir de la lignée Jcl :ICR, des souris femelles ayant une forte glycémie et une perte de poids rapide ont été identifiées. Par la suite, des croisements entre frères et sœurs ont créé une lignée de souris développant spontanément le diabète auto-immun, nommée NOD.

#### **1.3.2 Le développement du diabète auto-immun chez la souris NOD**

La souris NOD développe le diabète auto-immun sans nécessiter l'induction de la maladie. Contrairement à l'humain, chez lequel les deux sexes ont une incidence similaire, les femelles NOD (60-80%) développent plus le diabète que les mâles (20-30%), évoquant l'influence hormonale chez la souris [197]. Dans ce modèle, le diabète

est précédé par infiltration progressive du pancréas par les cellules du système immunitaire. À environ 3 ou 4 semaines d'âge, l'infiltration pancréatique débute, jusqu'à ce que les lymphocytes envahissent la zone autour des îlots; à ce stade, l'infiltration est nommée péri-insulite. Par la suite, l'infiltration se propage à l'intérieur des îlots, et devient sévère à environ 10 semaines. Les infiltrats causent alors des dommages aux cellules  $\beta$  productrices d'insuline, qui mènera au développement du diabète, s'établissant à 12-14 semaines d'âge chez la femelle, et un peu plus tard chez le mâle (revu en [198]).

### **1.3.3 Les défauts identifiés chez la souris NOD**

Tel que décrit à la section 1.2.5.2, le développement du diabète auto-immun chez la souris NOD est fortement relié à l'expression de molécules de CMH I-A<sup>g7</sup>, le principal facteur de prédisposition génétique. Plusieurs gènes associés à la génération et l'activation des lymphocytes T ont été associés au développement de la maladie. La souris est aux prises avec des problèmes de tolérance centrale [199-201], ainsi qu'une tolérance périphérique défectueuse permettant l'activation de lymphocytes auto-réactifs [202-207]. Le diabète développé par les souris NOD est semblable en plusieurs points au diabète auto-immun humain. En effet, dans les deux cas, l'immuno-régulation périphérique est déficiente, les lésions pancréatiques sont causées par les lymphocytes, l'environnement semble avoir une influence sur l'incidence de la maladie, le CMH de classe II cause une prédisposition génétique, le contrôle est polygénique, et il est possible d'observer une réponse humorale contre les îlots pancréatiques. Ces

ressemblances justifient l'utilisation de la souris NOD comme outil dans l'étude du diabète auto-immun.

#### **1.3.4 Les différents modèles de souris NOD TCR transgéniques**

L'insertion de TCR transgéniques dans la souris NOD permet d'augmenter le ratio de lymphocytes réactifs face à un antigène exprimé par les cellules  $\beta$ , que celui-ci soit endogène ou lui-aussi un transgène. Les souris transgéniques constituent donc des outils essentiels dans l'étude des mécanismes régissant la génération et l'activation des lymphocytes impliqués dans le développement du diabète auto-immun. Ces transgènes peuvent de plus être introduits dans des souches murines résistantes au développement du diabète auto-immun, permettant ainsi d'étudier l'influence des gènes de prédisposition et de résistance dans la maladie. Voici quelques exemples des modèles murins qui ont été développés afin d'étudier le diabète auto-immun.

##### **1.3.4.1 La souris transgénique 8.3-NOD**

Les antigènes ciblés par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> impliqués dans le diabète sont très peu connus. Par contre, plusieurs lymphocytes T CD8<sup>+</sup> retrouvés dans les îlots de souris NOD diabétiques expriment une même chaîne TCR $\alpha$  (V $\alpha$ 17-J $\alpha$ 42) et sont spécifiques au CMH de classe I H-2K<sup>d</sup> [208, 209]. Cette observation indique que ces lymphocytes pathogènes, qui exercent une cytotoxicité envers les cellules  $\beta$ , ont vraisemblablement un ligand commun. Ces cellules ont été utilisées afin de créer une

lignée de souris NOD transgénique pour ce TCR, nommée 8.3-NOD, qui développe plus rapidement le diabète [210]. La disponibilité de cette lignée transgénique a permis d'identifier le ligand physiologique, le peptide IGRP<sub>206-214</sub> (*islet-specific glucose 6-phosphatase catalytic subunit-related protein*) [211]. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> reconnaissant ce dernier ligand sont augmentés dans le sang des souris dont l'insulite a laissé place au diabète [212]. Ce modèle de souris transgénique a donc permis de démystifier la spécificité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> impliquée dans la maladie.

#### 1.3.4.2 La souris transgénique 4.1-NOD

Plusieurs modèles de souris transgéniques, dont le TCR reconnaît le CMH de classe II I-A<sup>g7</sup>, le facteur de prédisposition le plus important dans le développement du diabète chez la souris NOD, ont été développés. De façon similaire au modèle 8.3-NOD, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> provenant d'une souris NOD diabétique, et dont le TCR reconnaît un auto-antigène non identifié de cellules  $\beta$  dans le contexte du CMH I-A<sup>g7</sup>, ont été isolés et clonés (clone NY4.1) [213]. Ce clone a permis l'insertion des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR transgénique dans la souris NOD, augmentant ainsi le nombre de lymphocytes auto-réactifs responsables de l'accélération du développement du diabète. La souris transgénique 4.1-NOD a entre autres été utilisée dans l'étude de l'influence de l'haplotype du CMH sur la sélection, positive ou négative, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auto-réactifs dans le thymus, ainsi que le rôle de ces lymphocytes dans le développement du diabète [209, 214].

### 1.3.4.3 La souris BDC2.5

La souris BDC2.5, aussi sur fond génétique NOD, est aussi un modèle transgénique dont le TCR reconnaît le CMH I-A<sup>g7</sup> [215]. Générée de la même façon que les deux modèles précédents, la souris BDC2.5 possède un TCR reconnaissant un peptide dont la composition est incertaine . Une étude a démontré que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> BDC2.5 répondent à un peptide de GAD65 ayant une structure particulière, peut-être à cause de l'internalisation et la présentation de ce peptide par les CPA [216, 217]. Étonnamment, l'insertion de ce TCR transgénique diminue l'incidence de développement du diabète chez la souris NOD [218]. Cette résistance serait causée par une régulation de la réponse auto-immune par les lymphocytes NKT présents dans cette souris [206, 218, 219].

### 1.3.5 Notre modèle murin: la souris NOD double transgénique

Le modèle de souris NOD double transgénique a été développé dans le laboratoire de Dr. Christopher Goodnow, en Australie, afin d'étudier les facteurs indépendants du CMH régissant la fonction des lymphocytes T dans le développement du diabète auto-immun. Puisqu'il est maintenant convenu que le CMH de classe II I-A<sup>g7</sup> est le facteur de prédisposition le plus important dans le développement du diabète auto-immun chez la NOD, il s'avérait nécessaire d'induire l'expression d'un CMH différent. Pour cette raison, la souris NOD, dans ce modèle a été rendue congénique pour le CMH H-2<sup>k</sup> (NOD.H2k). L'importance du CMH dans la prédisposition du diabète est alors évidente, puisque la souris NOD.H2k ne développe plus le diabète ([220, 221], revu en

[198]). Afin de rétablir le phénotype diabétique, deux transgènes ont été insérés dans ces souris pour induire l'auto-réactivité contre un antigène du pancréas. Le premier est évidemment un TCR transgénique, le TCR 3A9 (V $\alpha$ 3/V $\beta$ 8.2), permettant d'obtenir une plus forte proportion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auto-réactifs [222]. Le modèle du Dr. Goodnow diffère des trois modèles présentés précédemment puisque l'antigène reconnu par ce TCR transgénique est en fait un antigène dont l'expression est induite dans les cellules  $\beta$  du pancréas, et non un antigène naturellement retrouvé dans ces cellules. Le transgène d'un xéno-antigène, le lysozyme d'œuf de poule (*hen egg lysozyme*, HEL), est introduit sous le promoteur de l'insuline du rat, induisant ainsi l'expression de l'antigène HEL à la surface des cellules  $\beta$  pancréatiques, à très faible niveau dans le thymus et sous forme soluble dans le sang [223]. Le peptide 46-61 de l'antigène HEL peut être reconnu par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, portant le TCR 3A9, dans le contexte d'un CMH de classe II autre que le CMH I-A<sup>g7</sup>, plus précisément le CMH I-A<sup>k</sup> [224]. Ce modèle possède donc un antigène exprimé par les cellules  $\beta$  pancréatiques, et pour lequel certains lymphocytes T sont spécifiques, recréant ainsi les conditions impliquées dans le développement du diabète auto-immun.

#### 1.3.5.1 L'insertion des transgènes sur des fonds génétiques différents

Afin d'étudier les facteurs impliqués dans la tolérance et la prédisposition au diabète auto-immun, les deux mêmes transgènes, insHEL et TCR 3A9, ont été insérés sur un fond génétique particulièrement résistant à l'auto-immunité en général, c'est-à-dire la souris B10.Br [225]. Cette souris exprime naturellement l'haplotype H-2<sup>k</sup> du

CMH, ce qui permet la comparaison directe avec la souris NOD.*H2k* double transgénique. Le modèle ainsi obtenu permet l'étude des facteurs reliés aux lymphocytes T, tout en excluant l'impact du CMH.

#### 1.3.5.2 L'incidence de diabète chez les souris doubles transgéniques

Chez la souris NOD.*H2k* femelle exprimant les deux transgènes, l'incidence du diabète auto-immun s'établit à 90%, et se développe entre les 8<sup>e</sup> et 24<sup>e</sup> semaines de vie. Ce modèle transgénique de souris NOD reflète bien la prédisposition au diabète. Par opposition à la souris NOD, les femelles B10.Br exprimant les deux transgènes ne développent le diabète qu'à 20%, principalement entre 4 et 12 semaines, constituant ainsi un bon modèle de résistance face à l'auto-immunité. Les souris NOD.*H2k* et B10.Br TCR transgéniques (sans antigène) ne développent pas de diabète [225]. L'utilisation de ces deux types de souris est donc biologiquement valable, vu le maintien de la tolérance et la prédisposition face au développement de la maladie auto-immune suite à l'insertion de transgènes, témoin de l'influence des gènes autres que le CMH sur la prédisposition et la résistance .



#### **1.4 Raisonement et hypothèse**

La souris NOD portant un CMH prédisposant (I-A<sup>g7</sup>) développe très tôt une inflammation, menant au développement de l'insulite en très bas âge, et éventuellement au diabète. Cette même inflammation pourrait être la cause de la dérégulation des lymphocytes T, par la suite capables d'établir une réponse contre un auto-antigène du pancréas. Par opposition à cette théorie, nous émettons l'hypothèse qu'il existe, antérieurement à l'inflammation, une variation dans la fonction ou la proportion des lymphocytes T, qui rendrait la NOD I-A<sup>g7</sup> prédisposée au diabète. Cette variation serait reliée à des gènes de prédisposition à la maladie. Par contre, puisque la souris NOD I-A<sup>g7</sup> développe rapidement de l'inflammation, il est difficile d'étudier les lymphocytes T dans un contexte non-inflammatoire.

L'intérêt du développement du modèle de souris NOD.*H2k* double transgénique est évident, puisque les lymphocytes T sont les principaux responsables du développement du diabète auto-immun. Ce modèle, antigène spécifique et indépendant du CMH, permet l'étude de la contribution des lymphocytes T dans la maladie dans un modèle non-inflammatoire. L'utilisation des souris TCR transgéniques permet l'étude des lymphocytes T dans un contexte non-inflammatoire, vu l'absence de l'antigène. Les souris B10.Br double et TCR transgéniques seront aussi utilisées, afin de comparer la proportion des différentes populations de lymphocytes T dans un contexte de résistance au diabète auto-immun. Une éventuelle variation lymphocytaire sera étudiée de façon approfondie.

## **CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **Souris**

Les souris de souches B10.Br, NOD.*H2k* et NOD sont maintenues à l'animalerie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Les souris utilisées pour l'étude sur les cellules transgéniques sont les suivantes : B10.Br TCR 3A9 et B10.Br TCR 3A9:insHEL, NOD.*H2k* TCR 3A9 et NOD.*H2k* TCR 3A9:insHEL. Les souris utilisées pour l'étude des cellules non-transgéniques sont les suivantes : B10.Br et NOD. L'expression des transgènes de insHEL et TCR est vérifiée par PCR effectué sur des bouts d'oreilles prélevés lors de l'identification des souris.

### **Prélèvement et préparation des organes**

Les souris ayant le génotype approprié sont euthanasiées entre 7 et 12 semaines par dislocation cervicale. Suite à la vérification de l'absence de signes vitaux, la souris est disséquée, et selon les besoins de l'expérience, de multiples organes sont prélevés.

La rate, le thymus, six ganglions lymphatiques (axiaux, branchiaux et inguinaux) et les deux ganglions pancréatiques sont prélevés séparément dans du tampon de cytométrie (*phosphate buffered saline* [PBS] 1x, 2% sérum de veau fœtal [SVF] décomplémenté, 0,05% NaN<sub>3</sub>). Les organes sont écrasés sur des filtres de nylon 70µm (BD Falcon). Les cellules spléniques sont par la suite traitées au NH<sub>4</sub>Cl 0,84% afin de lyser les globules rouges, puis lavées avec du tampon de cytométrie. Les îlots pancréatiques sont prélevés et préparés différemment. Le péritoine de la souris est

ouvert, puis la cage thoracique est coupée et retirée. Le foie est déplacé vers le haut du corps de la souris, permettant ainsi de dégager le conduit biliaire. À l'aide d'une pince, l'entrée de ce conduit dans l'intestin est bloquée. Sous un microscope (grossissement 25-50X), une aiguille 30G placée sur une seringue est introduite dans le conduit, et 3 ml d'une solution de collagénase V (1mg/ml dans du *Hank's Balanced Salt Solution* [HBSS] sans SVF) est injectée afin de dégrader le tissu pancréatique. Le pancréas gonflé est alors retiré de la cavité péritonéale, mis dans la solution de collagénase V et conservé sur glace. Le pancréas injecté à la collagénase V est incubé 20 minutes dans un bain-marie à 37°C, permettant la digestion efficace des tissus. Le pancréas est agité pour permettre la séparation des tissus, puis lavé avec du HBSS froid 10% SVF pour arrêter l'action de l'enzyme. À l'aide d'un microscope à inversion (grossissement 6X), les îlots pancréatiques sont prélevés, et par la suite défaits de façon à libérer les cellules contenues dans ces structures et former une suspension cellulaire.

Un aliquot de chaque suspension cellulaire est utilisé pour effectuer les comptes cellulaires à l'hématimètre dans du bleu de trypan 0,016% (GIBCO), permettant de compter uniquement les cellules viables. Les suspensions cellulaires sont maintenues à 4°C jusqu'au moment l'utilisation, la journée même.

### **Marquages de surface**

Les marquages de surface sur les cellules de souris transgéniques sont effectués dans des plaques de 96 puits non stériles à fond en V (Sarstedt). Les suspensions cellulaires sont ajoutées dans les plaques à raison de  $1 \times 10^5$  à  $1 \times 10^6$  cellules par puits. Les anticorps anti-souris, préalablement titrés pour déterminer la concentration optimale,

sont ajoutés aux cellules dans un volume final de 50µl de tampon de cytométrie. Les cellules sont mises en incubation pendant 30 minutes à 4°C. Par la suite, les puits sont lavés 2 fois avec le tampon de cytométrie. Lors des lavages, 100µl de tampon de cytométrie est ajouté à chacun des puits. La plaque est alors centrifugée pendant 3 minutes à 1200 RPM, puis le surnageant est retiré. Lorsqu'une deuxième étape de marquage s'impose, par exemple la streptavidine pour les anticorps couplés à la biotine, celle-ci est ajoutée à sa concentration optimale et la plaque est incubée une deuxième fois pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules sont à nouveau lavées 2 fois, puis resuspendues dans 400µl de tampon de cytométrie et les échantillons sont lus par un FACS Calibur. La liste détaillée des anticorps est située à l'Annexe I.

Le 1G12, un anticorps monoclonal de type IgG1 non-couplé à un fluorochrome, permet le marquage du TCR transgénique clonotypique. Afin de visualiser ce marquage au FACS, les cellules sont incubées une deuxième fois, cette fois en présence d'anti-IgG1 (clone X56) APC.

### **Marquage intracytoplasmique de FoxP3**

Suite aux marquages de surface expliqués précédemment, les cellules sont lavées dans le tampon de cytométrie. Ce marquage intracytoplasmique est réalisé à l'aide de la trousse eBiosciences pour marquage de Foxp3 de souris et de rat, incluant l'anticorps anti-FoxP3 FITC (clone FJK-16s). Le protocole présenté dans ce document est tiré du protocole établi et optimisé par la compagnie. Les cellules sont incubées avec le tampon de fixation eBioscience *Fix/Perm* (contenant de la paraformaldéhyde) pendant 2 heures à

4°C. Suite à la fixation, les cellules sont lavées avec le tampon de perméabilisation eBioscience, puis les sites de liaison non-spécifique aux anticorps sont bloqués par l'incubation avec l'anticorps anti-récepteur Fc $\gamma$  (clone 2.4G2) pendant 15 minutes à 4°C. L'anticorps anti-FoxP3 (1 $\mu$ g par million de cellules) dilué dans le tampon de perméabilisation est ajouté aux cellules, et incubé pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules sont lavées dans le tampon de perméabilisation, et par la suite resuspendues dans 400 $\mu$ l de tampon de cytométrie. Les échantillons sont conservés à 4°C jusqu'à l'utilisation; la fixation des cellules permet de conserver les échantillons plus longtemps : pour cette raison, ceux-ci peuvent être lus au FACS Calibur la journée même ou le lendemain.

### **Étude de l'anergie in vitro**

Les rates de souris sont préparées tel que décrit précédemment. Les différentes populations sont isolées en utilisant la technologie de séparation magnétique. Les cellules de rate d'une souris B10.Br TCR 3A9 sont marquées à 10<sup>8</sup> cellules/ml avec l'anti-CD4 PE et l'anti-CD8 PE, dilués dans le tampon de séparation (PBS 1X, 0,01% EDTA, 2% SVF), durant 15 minutes à température pièce. Suite aux lavages, les cellules sont incubées à 1x10<sup>8</sup> cellules/ml en présence de cocktail de sélection, constitué de tétramères formés de deux anticorps, un spécifique au fluorochrome PE et l'autre spécifique au dextran, pendant 15 minutes. Ensuite, une solution contenant des billes de fer magnétiques couvertes de dextran est incubée 10 minutes avec les cellules, permettant aux cellules exprimant une molécule reconnue par les anticorps couplés à la

biotine de se lier aux particules magnétiques. Sans lavages préalables, le tube contenant les cellules marquées est inséré dans un aimant, dans laquelle les cellules liées aux billes magnétiques se collent sur la paroi du tube. Les cellules non liées aux parois sont récupérées, et réinsérées dans l'aimant. Cette étape est répétée 2 fois, puis les suspensions cellulaires sont lavées. Les cellules CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> sont par la suite marquées au 1G12 puis marquées à nouveau à l'anti-IgG1 biotinylé, et séparées par aimant à l'aide du cocktail de sélection spécifique à la biotine. Les cellules CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>1G12<sup>-</sup> sont alors mises en suspensions dans du RPMI supplémenté sans sérum et incubées 30 minutes à 37°C avec de la mitomycine C (12,5 µg/ml). Les cellules sont par la suite lavées et remises dans le milieu de culture supplémenté contenant 10% SVF. Les cellules ainsi obtenues sont les cellules présentatrices d'antigène (CPA). L'autre population est constituée des cellules CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>1G12<sup>+</sup>, donc des cellules DN 1G12<sup>+</sup>.

Les cellules de rate d'une souris B10.Br non transgénique sont marquées à 10<sup>8</sup> cellules/ml avec un cocktail d'anticorps biotinylé (CD8, TER119, CD11b, Gr-1 et CD45R) à température pièce, et séparées par aimant. Seule la fraction ne s'étant pas liée à la paroi est conservée. Ces cellules CD4<sup>+</sup> (pureté>90%) sont par la suite marquées à l'anti-CD25 PE à température pièce, lavées, puis séparées par aimant selon leur expression de CD25. Les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont les cellules régulatrices (Tregs), tandis que les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> sont les cellules naïves CD4<sup>+</sup>. Chacune des suspensions cellulaires est ajustée à 5x10<sup>4</sup> cellules/ml.

Les différentes populations sont mises en culture à raison de 5x10<sup>4</sup> cellules par puits en présence du même nombre de CPA, de 1µg/ml d'anti-CD3 et de 30U/ml d'IL-2 lorsque indiqué. La culture, d'un volume final de 200µl dans chaque puits, est mise en

incubation pendant 66 à 72h à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. On ajoute alors de la thymidine tritiée (<sup>3</sup>H) à la plaque pendant 6 heures à 37°C. Le contenu des différents puits est récolté et le matériel radioactif ainsi recueilli sur des papiers absorbants est déposé dans 2 ml de liquide de scintillement (CytoScint). L'émission de radioactivité β est alors lue.

### **Tri cellulaire**

Les suspensions cellulaires de rate sont marquées à une concentration de  $2 \times 10^7$  cellules/ml stérilement dans du tampon de séparation. Les cellules sont marquées avec l'anti-CD8 FITC (clone 53-6.7), l'anti-CD4 PE (clone GK1.5) et le 1G12 non-couplé, révélé dans une deuxième étape de marquage grâce à l'anti-IgG1 APC (clone X56), avec les contrôles négatifs et positifs appropriés. La suspension cellulaire est filtrée sur une membrane de nylon à pores de 70µm permettant d'éliminer les agrégats cellulaires. Au FACS VantageSE, les populations cellulaires sont triées, dans un flot de tampon de cytométrie commercial stérile (BD *FACS Flow*), selon leur expression de CD4, CD8 et TCR 3A9. Ainsi, les cellules exprimant le CD4 et le TCR 3A9 (CD4<sup>+</sup>1G12<sup>+</sup>), le CD8 et le TCR 3A9 (CD8<sup>+</sup>1G12<sup>+</sup>), le TCR 3A9 sans exprimer le CD4 et CD8 (doubles négatives, DN 1G12<sup>+</sup>), et les cellules n'exprimant aucun de ces marqueurs (cellules présentatrices d'antigènes, CPA) sont purifiées et récoltées dans du RPMI 1640 supplémenté (10% SVF, 1% HEPES, 0,1% β-mercaptoéthanol, 100U/ml pénicilline, 100µg/ml streptomycine). De façon générale, ces populations ont une pureté de 90% et plus. Un aliquot des échantillons récoltés est ajouté dans le bleu de trypan 0,016%, et

les cellules viables triées sont comptées à l'hématimètre. Les CPA ainsi triées reçoivent une dose d'irradiation de 20 Gy par un irradiateur au cobalt afin d'inhiber sa croissance.

### **Expansions in vitro**

Un nombre déterminé de cellules DN 1G12<sup>+</sup> triées est mis en présence du même nombre de cellules présentatrices d'antigènes, à raison de  $5 \times 10^4$  cellules de chaque population par ml. Cette culture est additionnée d'anti-CD3 soluble 1 µg/ml (clone 145-2C11), d'IL-2 (30U/ml) et d'IL-4 (30U/ml). La suspension cellulaire est mise en plaque à raison de 1ml/puit dans une plaque 24 puits stériles (Sarstedt), et incubée pendant 7 jours à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules atteignent la confluence pendant l'activation, les cellules sont divisées en plusieurs puits et le volume et les concentrations d'anti-CD3, IL-2 et IL-4 sont ajustés en conséquence. Suite à l'activation, les cellules sont récoltées, lavées dans du RPMI supplémenté, puis remises en plaque en présence de cytokines, mais sans ajouter les CPA et l'anti-CD3. Les cellules sont mises en incubation dans ces conditions de repos pendant 3 jours à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. À la fin de cette dernière étape, les cellules viables sont comptées à l'hématimètre dans du bleu de trypan 0,016%. Le taux d'expansion est calculé en divisant le nombre de cellules à la fin de l'expansion par le nombre de cellules initialement mises en culture.



### **Activation de lymphocytes in vitro**

Chaque population de lymphocytes triés ( $CD4^+1G12^+$ ,  $CD8^+1G12^+$  et DN  $1G12^+$ ) est mise dans une plaque stérile de 96 puits à fond rond (Sarstedt) à raison  $5 \times 10^4$  cellules par puits en présence du même nombre de CPA, d'anti-CD3 soluble ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), et dans certains puits d'IL-2 ( $30 \text{U/ml}$ ) et d'IL-4 ( $30 \text{U/ml}$ ). La culture, d'un volume final de  $200 \mu\text{l}$  dans chaque puits, est mise en incubation pendant 72h à  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ .

### **Marquage intracytoplasmique de cytokines, perforine et granzyme B**

Suite à l'activation des lymphocytes, les cellules sont récoltées et restimulées *in vitro* pendant 4h à  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  en présence de phorbol 12-myristate 13-acétate ( $50 \text{ng/ml}$ ) et d'ionomycine ( $500 \text{ng/ml}$ ). De plus, l'exocytose des molécules solubles est bloquée par l'ajout de brefeldine A ( $10 \mu\text{g/ml}$ ). Suite à l'incubation, les cellules sont lavées deux fois au tampon de cytométrie. La perméabilisation membranaire et la fixation subséquente sont rendues possibles grâce à la trousse BD *Cytofix/Cytoperm*, et le protocole présenté dans ce document est basé sur le protocole établi par BD Biosciences. La solution de fixation BD *Cytofix/Cytoperm* (contient 4% paraformaldéhyde) est ajoutée aux cellules, puis incubé 20 minutes à  $4^\circ\text{C}$ . Les cellules sont ensuite lavées avec la solution de perméabilisation BD *Perm/Wash* (contenant du SVF et de la saponine), qui maintient la perméabilité membranaire des cellules. Les sites de liaison non-spécifique aux anticorps sont bloqués grâce à une étape d'incubation de 10 minutes des cellules en présence d'anticorps se liant aux récepteurs  $\text{Fc}\gamma$  (clone

2.4G2). Les cellules sont à nouveau lavées avec la solution de perméabilisation, puis resuspendues dans la même solution dans laquelle les anticorps sont préalablement dilués à leur concentration optimale. Cette technique permet de détecter la production de cytokines grâce aux anticorps anti-IL10 (clone JES6-5H4) PE et anti-IFN $\gamma$  (clone XMG1.2) biotine, ainsi que des molécules impliquées dans la lyse cellulaire grâce aux anticorps anti-perforine (clone eBioOMAK-D) FITC et anti-granzyme B (clone 16G6) PE. Suite à des lavages avec le tampon de perméabilisation, les cellules sont resuspendues dans du tampon de cytométrie pour être lues au FACS Calibur.

### ELISA

Suite à l'activation des lymphocytes *in vitro*, le surnageant est récolté et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'utilisation pour l'ELISA. Lors de la première étape d'ELISA, l'anticorps de capture de cytokines, dilué dans un tampon carbonate ( $\text{NaHCO}_3$  100mmol/L,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  33,5mmol/L, pH9,5), est ajouté dans des plaques 96 puits à fond plat Maxisorp (NUNC) et laissé à  $4^{\circ}\text{C}$  toute la nuit. Ensuite, les plaques sont lavées simplement par immersion dans le tampon de lavage (PBS 1X, 0,5% Tween-20) puis les sites de liaison non-spécifique sont bloqués pendant 2 heures par le tampon de dilution (PBS 1X, 10% SVF), puis lavées à nouveau. Les échantillons de surnageant, ainsi que les standards, sont dilués dans ce même tampon, puis incubés dans les puits pendant 2 heures. Les anticorps de capture permettent l'immobilisation des cytokines présentes dans le surnageant, qui seront liées par les anticorps de détection couplés à la biotine, ajoutés suite au lavage des puits. Cette étape de détection d'une heure est suivie par de

nouveaux lavages. Le ligand de la biotine, l'avidine, couplée à une molécule de HRP (*horse radish peroxidase*) est ajouté afin de lier le sandwich d'anticorps et de cytokine. Ce ligand est mis en incubation dans la plaque pendant 30 minutes, puis l'excédant est lavé par de nouveaux lavages permettant de diminuer le bruit de fond de l'essai. La solution de TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine), substrat du HRP, est ajoutée aux puits. Lorsque catalysé avec la HRP, le TMB produit une coloration bleutée dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de cytokines mobilisées par les anticorps. La réaction est arrêtée par l'ajout d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N, qui fait passer la coloration au jaune. La plaque est lue à 450nm au plus tard 30 minutes après l'arrêt de la réaction. La concentration de cytokines retrouvée dans chaque puits est par la suite calculée grâce à l'équation établie par l'analyse de la courbe standard.

### *Cytotoxicité in vitro*

Les rates de souris B10.Br et NOD.*H2k* sont préparées tel que décrit précédemment. Les cellules sont mises dans du RPMI 1640 supplémenté à une concentration de  $5 \times 10^6$  cellules/ml, mises en flasques et additionnées de 1mg/ml de peptide HEL. Cette suspension cellulaire est incubée 6h, permettant ainsi aux cellules de présenter à leur surface le peptide HEL. Les cellules sont par la suite lavées avec du PBS, puis  $1 \times 10^7$  cellules sont injectées dans les souris. Les cellules préparées à partir de rates de souris B10.Br sont injectées dans les souris B10.Br TCR et Db1, tandis que les cellules préparées à partir de rates de souris NOD.*H2k* sont injectées dans les souris NOD.*H2k* TCR et Db1. Quatorze jours plus tard, la rate des souris injectées est prélevée et préparée. Les cellules de rates sont marquées à l'aide d'anti-CD4, d'anti-CD8 et

d'anti-CD45R biotine pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite incubées avec le cocktail de sélection, puis avec les billes magnétiques, tel que décrit précédemment. Les cellules récoltées suite à la sélection sont des cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD45R<sup>-</sup>, appelées les cellules DN. Parallèlement, les cellules de rate d'une souris n'exprimant pas le TCR transgénique sont marquées avec l'anti-CD4 et l'anti-CD8 biotine, et soumises à la séparation par aimant afin d'obtenir les cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> agissant comme CPA. Les CPA ainsi récoltées reçoivent une dose d'irradiation de 20 Gy par un irradiateur au cobalt afin d'inhiber sa croissance. Les cellules DN sont mises en culture à un ratio 1:1 avec les CPA, en présence de 1mg/ml d'antigène HEL, et de 30U/ml d'IL-2 et d'IL-4 pendant 3 jours à 37°C 5% CO<sub>2</sub>.

Le jour suivant, les cellules cibles (CD4, CD8 ou cellules totales) provenant de rates de souris TCR ou Dbl, ainsi que les CPA irradiées provenant de rates de souris n'exprimant pas le TCR transgénique, sont sélectionnées et mises en culture ensemble à un ratio 1:1 en présence de 1mg/ml d'antigène HEL, et de 30U/ml d'IL-2 pendant 2 jours à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Suite à l'incubation des cellules cibles, celles-ci sont lavées et mises en culture pendant 90 minutes en agitation avec 20μCi de <sup>51</sup>Cr. Les cellules en division incorporent alors le <sup>51</sup>Cr. Les cellules sont ensuite lavées dans du RPMI 1640 supplémenté. Elles seront ajoutées aux puits de cytotoxicité à raison de 5x10<sup>3</sup> cellules/puit.

Les cellules DN, suite aux 3 jours de culture *in vitro*, sont elles aussi lavées, puis ajoutées aux cellules cibles en faisant varier leur concentration (de 1x10<sup>5</sup> à 5x10<sup>3</sup> cellules/puit) afin d'obtenir des ratios différents. Ces cultures sont mises en incubation dans les plaques 96 puits, et incubées 3h à 37°C 5%CO<sub>2</sub> dans un volume final de 250μl

en présence d'IL-2 et d'IL-4 (30U/ml), de peptide HEL (1mg/ml) et de CPA fraîches. Celles-ci proviennent de cellules de rate de souris n'exprimant pas le TCR transgénique, qui ont été préparées puis irradiées à 20 Gy par un irradiateur au cobalt afin d'inhiber sa croissance. Les CPA sont ajoutées aux cultures à raison de  $5 \times 10^4$  cellules/puit. Suite à l'incubation des cellules DN et de leurs éventuelles cibles, les plaques de cultures sont centrifugées et 100ml du surnageant est prélevé afin de mesurer la relâche du  $^{51}\text{Cr}$ .

Certains puits ont été additionnés de HCl, qui provoque la lyse de toutes les cellules, et sont donc considérés comme la relâche maximale de l'essai. À l'opposé, les puits témoins de la relâche minimale ne contiennent pas de cellules DN, et ainsi les cellules cibles ne sont pas lysées. La relâche dans chacune des conditions est calculée en divisant le taux de relâche du  $^{51}\text{Cr}$  dans un puit par la relâche maximale dans les puits contenant du HCl. Le résultat ainsi obtenu est un pourcentage de cytotoxicité. (Remerciements à Geneviève Chabot-Roy pour la mise au point de l'essai de cytotoxicité)

### **Marquages de surface des cellules DN dans les souris non-transgéniques**

Les rates de souris B10.Br et NOD non-transgéniques sont préparées tel que décrit précédemment. Afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour effectuer les marquages de surface, nous procédons à l'enrichissement en utilisant la technologie de séparation magnétique. Les cellules sont marquées à raison de  $2 \times 10^7$  cellules/ml de tampon de sélection avec un cocktail d'anticorps couplés à la biotine pendant 30 minutes: CD45R (clone RA3 6B2), CD4 (clone GK1.5), CD8 (clone 53-6.7) et CD49b (clone DX5). Suite aux lavages, les cellules sont incubées à  $1 \times 10^8$  cellules/ml en

présence de cocktail de sélection, constitué de tétramères formés de deux anticorps, un spécifique à la biotine et l'autre spécifique au dextran, pendant 15 minutes. Ensuite, une solution contenant des billes de fer magnétiques couvertes de dextran est incubée 10 minutes avec les cellules, permettant aux cellules exprimant une molécule reconnue par les anticorps couplés à la biotine de se lier aux particules magnétiques. Sans lavages préalables, le tube contenant les cellules marquées est inséré dans un aimant, dans laquelle les cellules liées aux billes magnétiques se collent sur la paroi du tube. Les cellules non liées aux parois sont récupérées, et réinsérées dans l'aimant. Cette étape est répétée 2 fois. Les cellules récupérées sont comptées et marquées à raison de  $1 \times 10^6$  cellules par puit dans du tampon de cytométrie, avec les anticorps anti-CD5 (clone 53.6-72) FITC et anti-TCR $\beta$  (clone H57-597) APC. La streptavidine PerCP et le tétramère CD1d PE permettent de détecter les contaminants. Après des lavages au tampon de cytométrie, les échantillons sont resuspendus dans 400 $\mu$ l et lus au FACS.

## **CHAPITRE 3 : RÉSULTATS**

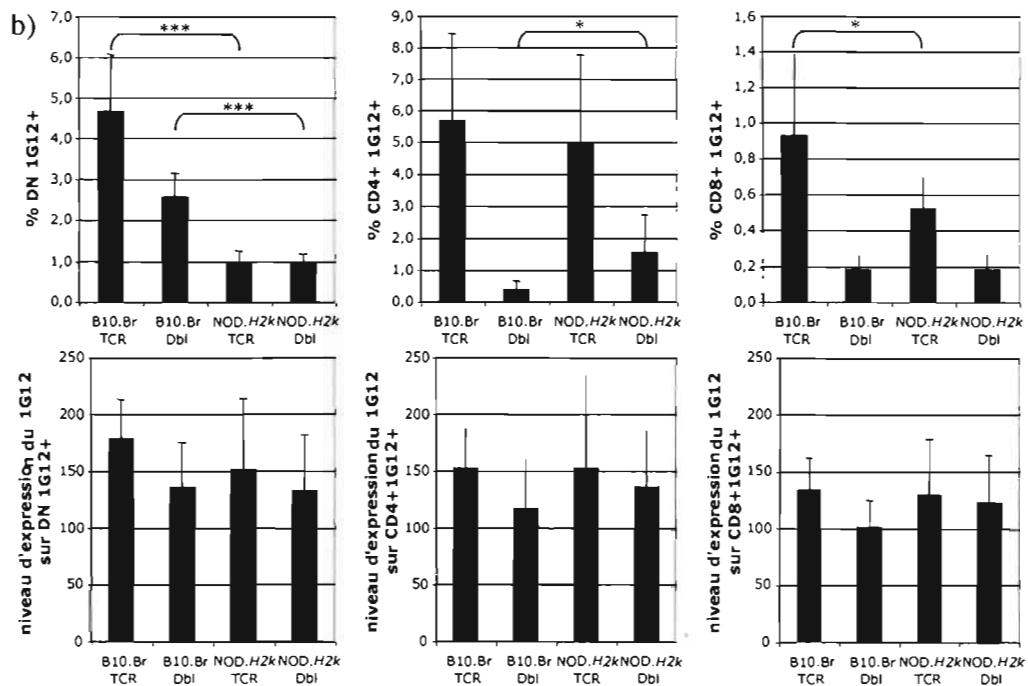
### **3.1 Analyse des populations de lymphocytes T dans les souris transgéniques**

L'étude des populations de lymphocytes T chez les souris transgéniques B10.Br résistantes au diabète, et chez les souris NOD.*H2k* prédisposées au diabète, a été effectuée sur un grand nombre de souris dont l'âge médian se situait entre 8 et 10 semaines (figure 1a). Afin d'alléger les résultats, les souris possédant comme unique transgène le TCR 3A9 sont ci-après nommées TCR (B10.Br TCR, NOD.*H2k* TCR), et les souris double transgéniques possédant à la fois le TCR 3A9 et l'antigène HEL exprimé sous le promoteur de l'insuline sont ci-après nommées Dbl (B10.Br Dbl, NOD.*H2k* Dbl). Les souris TCR sont utiles pour leur plus grande proportion de cellules 1G12<sup>+</sup>, tandis que les souris Dbl démontrent leur phénotype lorsque l'antigène est présent dans la souris. L'analyse des proportions cellulaires a été effectuée par marquages de surface sur les organes lymphoïdes secondaires, soit la rate (figure 1b), les ganglions lymphatiques (figure 1c) et les ganglions pancréatiques (figure 1d).

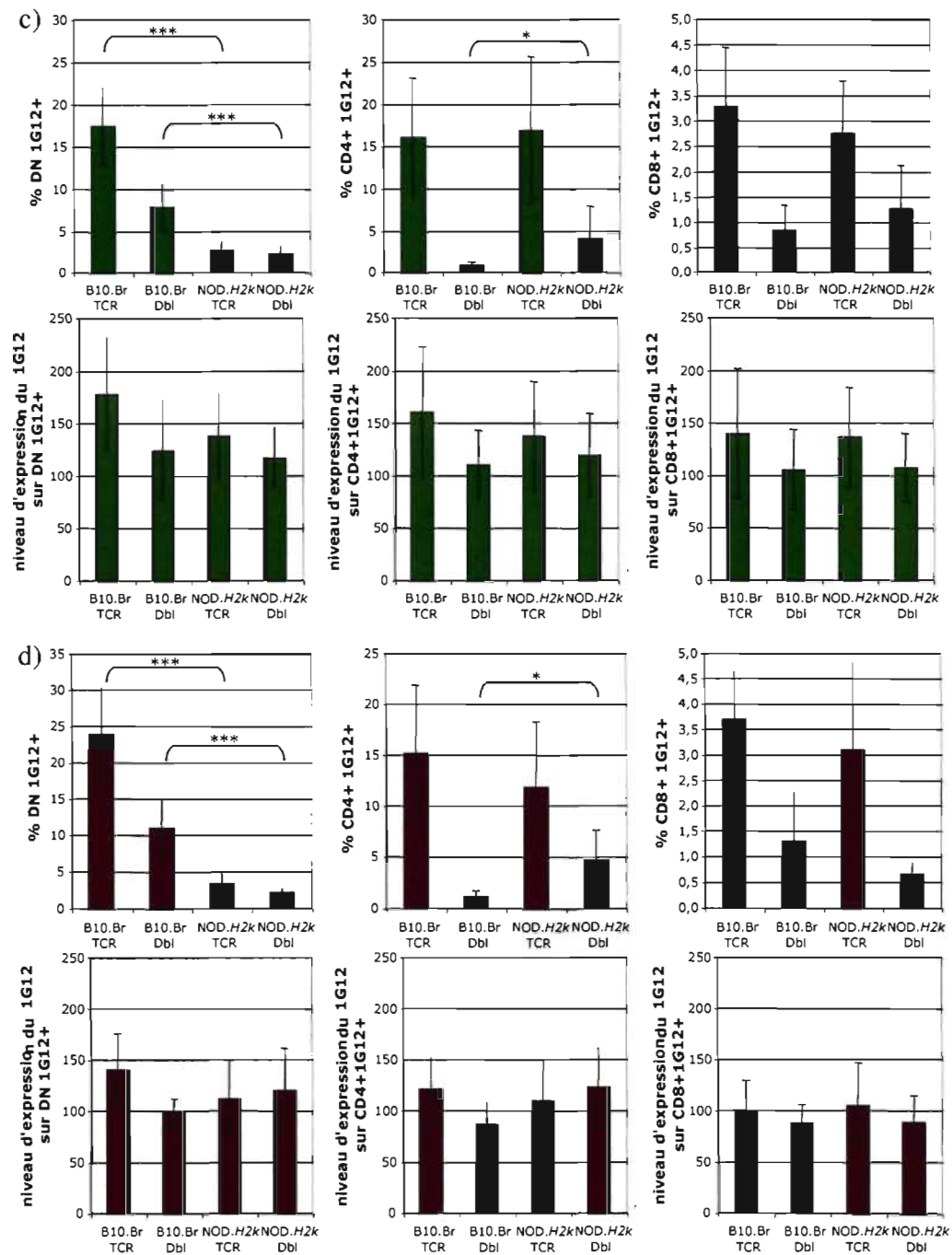
Tout d'abord, les pourcentages des populations majeures de lymphocytes exprimant le TCR transgénique, c'est-à-dire les cellules DN 1G12<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>1G12<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>1G12<sup>+</sup>, ainsi que le niveau d'expression du TCR transgénique sur ces populations ont été analysés dans la rate des souris des deux souches, TCR et Dbl transgéniques (figure 1b). Le panneau supérieur gauche représente le pourcentage de cellules DN 1G12<sup>+</sup> retrouvées dans chacune des souris. On observe une diminution fortement

a)

	Souche	Génotype	Nombre de souris	Âge des souris en semaines (médiane)
Rate	B10.Br	TCR	n = 10	7,6 - 11,9 (9,55)
	B10.Br	Dbl	n = 10	7 - 11,4 (8,7)
	NOD.H2k	TCR	n = 8	5,6 - 13,4 (9,5)
	NOD.H2k	Dbl	n = 9	7 - 11,9 (10)
Ganglions	B10.Br	TCR	n = 9	7,6 - 11,9 (9,6)
	B10.Br	Dbl	n = 7	7 - 11,4 (9,9)
	NOD.H2k	TCR	n = 6	7,7 - 10,7 (9,5)
	NOD.H2k	Dbl	n = 8	7 - 11,9 (10)
Ganglions pancréatiques	B10.Br	TCR	n = 6	7,6 - 10,6 (8,6)
	B10.Br	Dbl	n = 7	7 - 10,3 (8,85)
	NOD.H2k	TCR	n = 5	5,6 - 10,1 (8,45)
	NOD.H2k	Dbl	n = 6	7 - 10,1 (8)







**Figure 1 - La proportion de cellules DN 1G12+ est diminuée dans la souris NOD.H2k prédisposée au diabète.** a) Tableau représentant les groupes de souris utilisés pour l'étude des proportions cellulaires. La rate (b), les ganglions lymphatiques (c) et les ganglions pancréatiques (d) des groupes de souris présentés en (a) ont été marqués pour leur expression du CD4, du CD8 et du TCR transgénique (1G12). Les graphiques représentent les pourcentages de cellules DN 1G12+, CD4+1G12+ et CD8+1G12+, ainsi que le niveau d'expression du TCR transgénique (1G12) sur ces populations. \*p<0,05 \*\*\*p<0,001

significative ( $p < 0,001$ ) de cette population dans la souris NOD.*H2k*, autant TCR que Dbl, lorsque comparée avec la souris B10.Br. Le panneau supérieur central représente le pourcentage de cellules  $CD4^+1G12^+$ , qui s'avère augmenté ( $p < 0,05$ ) chez la souris NOD.*H2k* Dbl comparativement à la souris B10.Br Dbl. Le panneau supérieur gauche illustre le pourcentage de cellules  $CD8^+1G12^+$  dans les différents types de souris. Il existe une différence significative ( $p < 0,05$ ) dans la proportion de ces cellules entre les souris B10.Br TCR et NOD.*H2k* TCR, mais l'absence de différence significative dans les souris Dbl élimine la possibilité que cette population soit grandement responsable d'une augmentation de l'incidence de diabète dans la souris NOD.*H2k*, puisque seules les souris Dbl ont le potentiel de développer le diabète. Les panneaux inférieurs représentent le niveau d'expression du TCR 3A9 dans les populations mentionnées ci-dessus. Contrairement aux proportions des populations lymphocytaires, le niveau d'expression du TCR 3A9, marqué par le 1G12, ne varie pas significativement d'une souris à l'autre, et ce sur chacun des sous-groupes cellulaires. Ce facteur n'a donc pas une influence sur l'incidence de diabète.

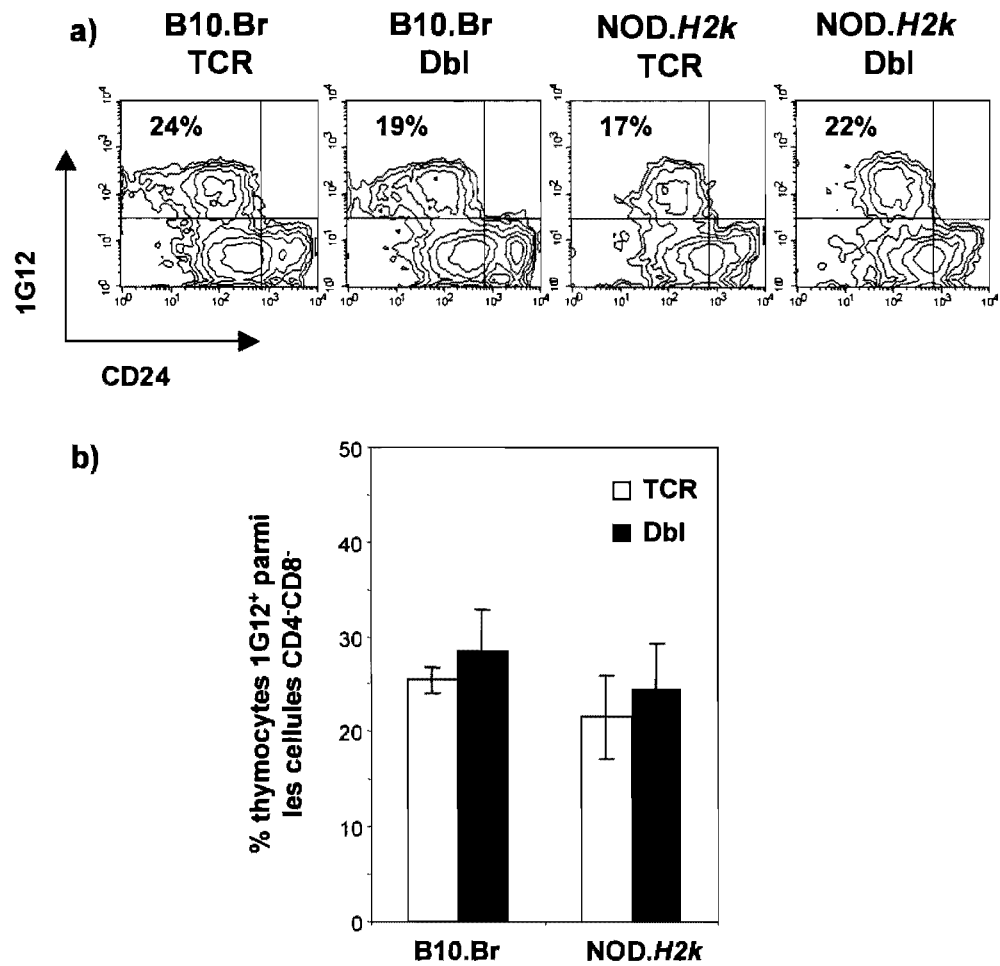
Les résultats observés dans les ganglions lymphatiques (figure 1c) et les ganglions pancréatiques (figure 1d) sont identiques aux résultats obtenus dans la rate, à l'exception faite que les proportions de cellules retrouvées dans les deux types de ganglions sont plus élevées. Cette augmentation est reliée à une présence réduite de lymphocytes B dans les ganglions, impliquant donc une plus forte proportion de lymphocytes T lorsque leur nombre est comparé au nombre total de cellules dans l'organe.

Cette analyse a mis en lumière que la différence la plus flagrante entre la souris B10.Br résistante et la souris NOD.*H2k* prédisposée se situe dans le pourcentage de cellules DN 1G12<sup>+</sup>. Un pourcentage plus élevé de lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup> a aussi été observé dans les îlots pancréatiques de la souris B10.Br (figure 8a). Cette population pourrait donc avoir un rôle dans la tolérance face à l'établissement du diabète auto-immun chez la souris B10.Br. Cette population constitue donc le sujet principal de ce présent document, et des figures subséquentes. Une différence dans le pourcentage de cellules CD4<sup>+</sup>1G12<sup>+</sup> est aussi observable, mais celles-ci ont préalablement été étudiées dans une autre étude [226] dont le résultat sera discuté dans le chapitre 4.

La figure 1 permet aussi de constater une diminution de proportion des populations cellulaires 1G12<sup>+</sup> dans les souris Dbl, c'est-à-dire les souris exprimant l'antigène reconnu par ce TCR transgénique, par rapport aux souris TCR de la même souche. Cette observation laisse présager l'influence de la sélection négative lors de la reconnaissance de l'antigène HEL par le TCR transgénique dans le thymus. Cette sélection négative causerait donc la mort d'une majorité de cellules 1G12<sup>+</sup>, diminuant ainsi leur proportion en périphérie. Pour vérifier l'influence de la sélection effectuée dans le thymus, des marquages de surface ont été effectués dans cet organe afin de vérifier la proportion de la population d'importance, les cellules DN 1G12<sup>+</sup>.

### **3.2 Rôle de la sélection négative thymique sur les proportions de cellules DN 1G12<sup>+</sup>**

Puisque le nombre de cellules DN 1G12<sup>+</sup> est diminué dans les souris Dbl, il s'avérait nécessaire de vérifier l'impact de la sélection négative sur la génération de cette population. Les thymocytes de souris B10.Br et NOD.H2k, TCR et Dbl, ont été marqués avec le CD4, le CD8 et le 1G12 afin de cibler les cellules DN 1G12<sup>+</sup>, permettant de vérifier l'influence de la sélection négative sur la proportion de cette population cellulaire dans le thymus. Ces cellules ont aussi été marquées avec le CD24, un marqueur permettant d'évaluer la maturation des thymocytes, ce qui permet la discrimination entre cellules matures et les thymocytes immatures CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. La figure 2a montre l'expression du 1G12 et du CD24 sur les cellules CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. Le cadran supérieur gauche de chaque cytogramme permet de constater que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> expriment un faible niveau de CD24, indiquant un phénotype de cellules matures. Les chiffres démontrent que les proportions de cellules DN 1G12<sup>+</sup> dans chacune des souris sont similaires, contrairement aux observations en périphérie. La figure 2b illustre le pourcentage de cellules 1G12<sup>+</sup> parmi la population de lymphocytes DN des souris B10.Br et NOD.H2k. Ces résultats ne montrent pas de différence significative entre les souris B10.Br et NOD.H2k, ni entre les souris TCR et Dbl. La sélection négative dans le thymus ne semble donc pas être en cause dans la diminution du pourcentage de cellules DN 1G12<sup>+</sup>. Un défaut de sélection négative a préalablement été identifié dans la souris NOD [200, 225], mais ne semble pas être en cause dans la proportion de cellules DN 1G12<sup>+</sup>.



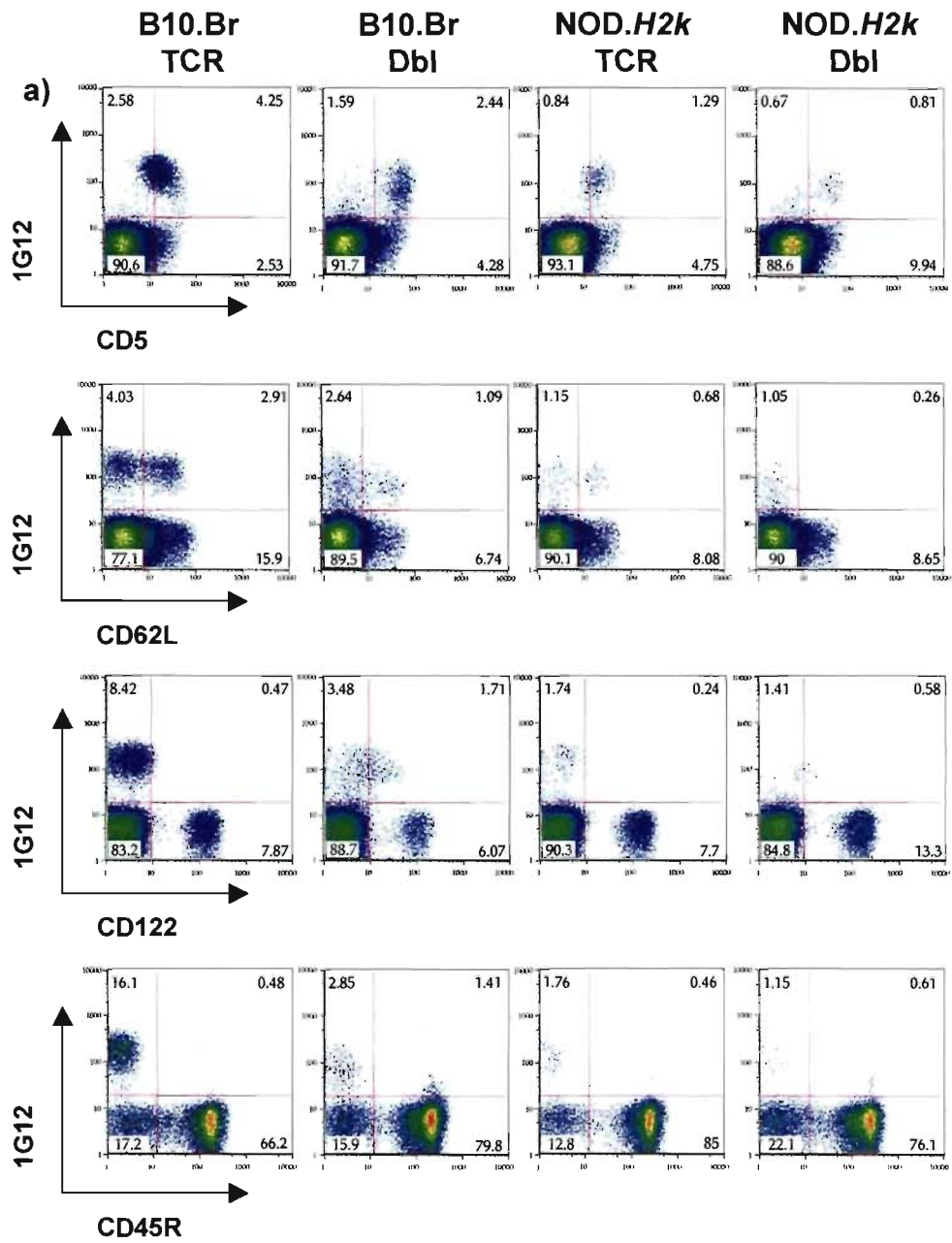
**Figure 2 - Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ne sont pas soumises à la sélection négative.** Les thymocytes de souris B10.Br et NOD.H2k soit TCR et DbI sont marqués pour CD4 et CD8, et l'expression du 1G12 et de CD24 est vérifiée sur la population de cellules DN (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>). a) Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> expriment un faible niveau de CD24. b) Des pourcentages similaires de cellules DN 1G12<sup>+</sup> peuvent être retrouvés dans le thymus des différentes souris. n=3

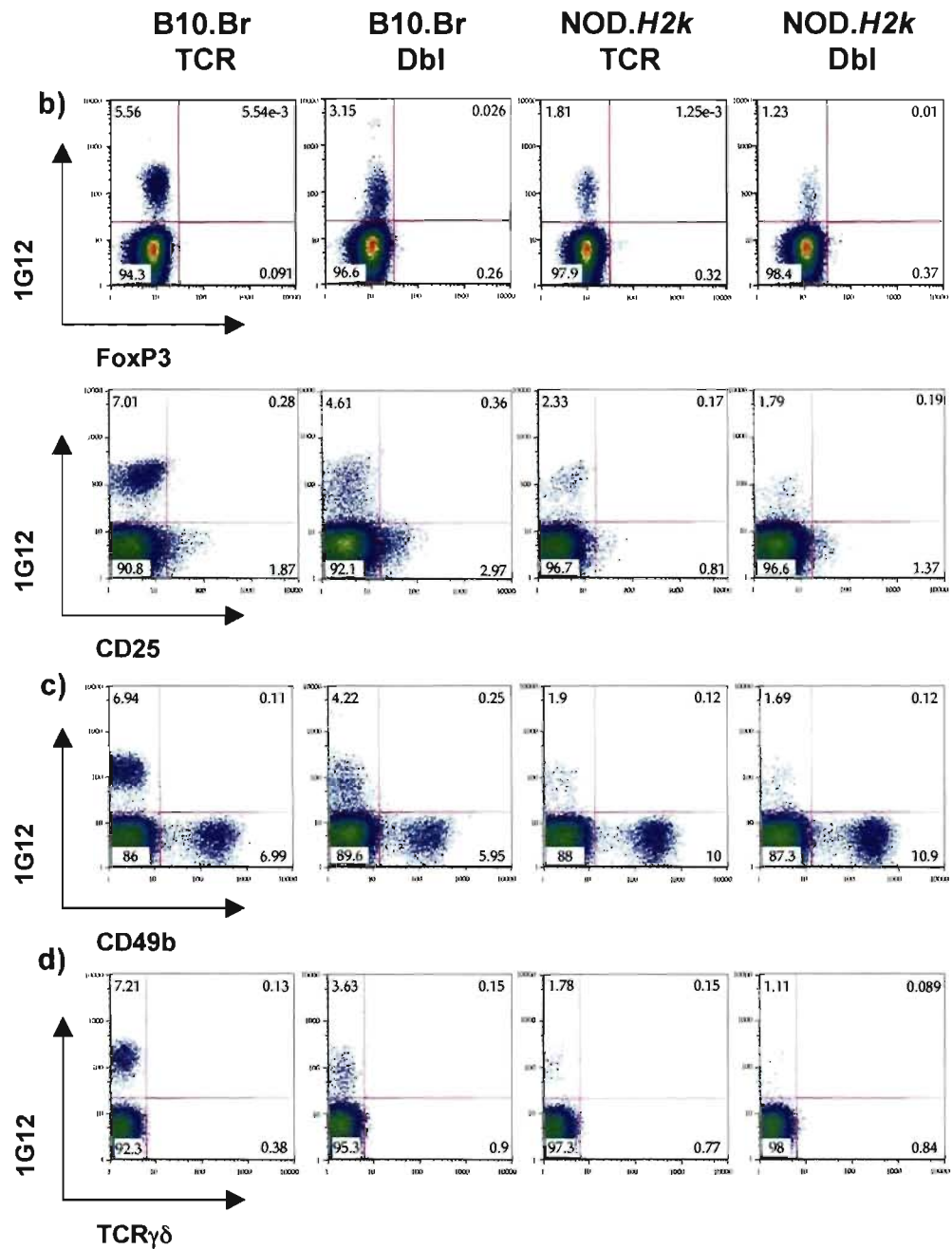
### 3.3 Caractérisation des cellules DN 1G12+

Le phénotype de la population cellulaire d'intérêt, les cellules DN 1G12<sup>+</sup>, a par la suite été vérifié en périphérie dans les souris B10.Br résistantes et NOD.H2k prédisposées, autant dans les souris Dbl que TCR. Les résultats présentés par les cytogrammes à la figure 3 sont ceux obtenus par marquage des cellules de rate de ces souris, et sont similaires dans les ganglions lymphatiques et les ganglions pancréatiques (résultats non montrés). Les cytogrammes montrent l'expression du 1G12 et des autres molécules, de surface ou intracytoplasmiques, parmi les cellules DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Chacun des panneaux présentés dans cette figure est représentatif d'au moins 3 expériences indépendantes. De gauche à droite, les colonnes représentent le profil des souris B10.Br TCR, B10.Br Dbl, NOD.H2k TCR et NOD.H2k Dbl, tel qu'indiqué.

#### 3.3.1 Marqueurs d'activation

Tout d'abord, les molécules de CD5, CD62L, CD122 et CD45R sont examinées afin de déterminer l'état d'activation des cellules T DN 1G12<sup>+</sup> (figure 3a). Le CD5 est une molécule de signalisation dont l'expression peut être associée à un certain niveau d'activation. La population de cellules DN 1G12<sup>+</sup>, représentée dans la partie supérieure de chaque cytogramme, a une expression quelque peu variable de CD5 lorsque la souris TCR est comparée à la souris Dbl (figure 3a, 1<sup>ère</sup> rangée). En effet, le CD5 est exprimé de façon dite intermédiaire sur les cellules DN 1G12<sup>+</sup> dans les souris TCR, tandis que l'expression de l'antigène dans les souris Dbl accroît l'expression du CD5 puisque les







cellules DN 1G12<sup>+</sup> y sont plus activées. Quoique différent dans les souris Dbl et TCR, le phénotype des cellules DN 1G12<sup>+</sup> selon leur expression de CD5 en surface est similaire chez les deux souches de souris. Le CD62L est une sélectine dont l'expression indique aussi le degré d'activation des lymphocytes T, puisque l'activation des cellules cause la diminution de l'expression de cette molécule (figure 3a, 2<sup>e</sup> rangée). Tel que démontré par les cytogrammes, les cellules DN 1G12<sup>+</sup> expriment, dans toutes les souris étudiées, le CD62L de façon hétérogène, indiquant que la présence de l'antigène n'influence pas l'expression du CD62L. L'expression du CD122 (figure 3a, 3<sup>e</sup> rangée), la chaîne  $\beta$  du récepteur de l'IL-2, démontre un profil similaire à celui du CD5, c'est-à-dire un niveau d'expression intermédiaire dans la souris TCR et une régulation à la hausse en présence de l'antigène. Les deux souches de souris ont un profil d'expression du CD122 similaire. Finalement, le CD45R, habituellement un marqueur associé aux lymphocytes B, peut être exprimé par les lymphocytes T. En effet, son expression sur les cellules T révèle une activation des celles-ci. Les cytogrammes illustrant l'expression du CD45R sur les cellules démontrent que la population de cellules DN 1G12<sup>+</sup> est négative pour CD45R. Les cellules qui semblent double positives (cadran supérieur droit) sont en fait le fruit d'une interaction entre l'anticorps anti-CD45R et l'anti-IgG1 qui permet de révéler l'expression du TCR transgénique. Une mise au point est nécessaire en ce sens, mais il est tout de même évident que la population 1G12<sup>+</sup> se trouve dans le cadran supérieur gauche, indiquant l'absence du CD45R en surface. Le patron d'expression de chacune de ces molécules démontre donc que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ont un phénotype de cellules naïves, et que le phénotype est similaire dans la souris B10.Br et la souris NOD.H2k. Aussi, la présence de l'antigène dans les souris

Dbl augmente l'expression des marqueurs d'activation CD5 et CD122, mais le niveau d'activation ne diffère pas entre les souris B10.Br et NOD.H2k.

### 3.3.2 Marqueurs de cellules régulatrices

Il a été mentionné précédemment que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> pourraient jouer un rôle dans la tolérance face à l'établissement du diabète auto-immun chez la souris B10.Br. En parallèle, certaines molécules ont été associées à des cellules jouant un rôle de régulation des réponses immunes, par exemple le CD25, et le facteur de transcription FoxP3. Des marquages pour ces deux molécules ont donc été effectués sur les cellules DN 1G12<sup>+</sup> (figure 3b). Le marquage intracytoplasmique a été réalisé pour le facteur de transcription FoxP3 (figure 3b, 1<sup>ère</sup> rangée) sur les cellules DN, et les cytogrammes permettent de constater que la population 1G12<sup>+</sup> n'exprime pas le FoxP3, et ce, dans les deux souches de souris, TCR ou Dbl. De la même manière, un marquage de surface pour la molécule CD25 (figure 3b, 2<sup>e</sup> rangée) révèle que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> n'expriment pas de CD25. Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> n'expriment donc pas de marqueurs habituellement associés au phénotype régulateur, et la présence de l'antigène dans les souris ne modifie pas les profils d'expression de ces molécules. De plus, il est à noter que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> de souris B10.Br et NOD.H2k ont des profils de cytométrie semblables pour ces deux molécules. L'expression de ces molécules, et autres molécules de surface, a été associée à des populations lymphocytaires particulières. Pour cette raison, les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ont été comparées à ces autres populations.

### **3.4 Phénotype et expansion des cellules DN 1G12<sup>+</sup>**

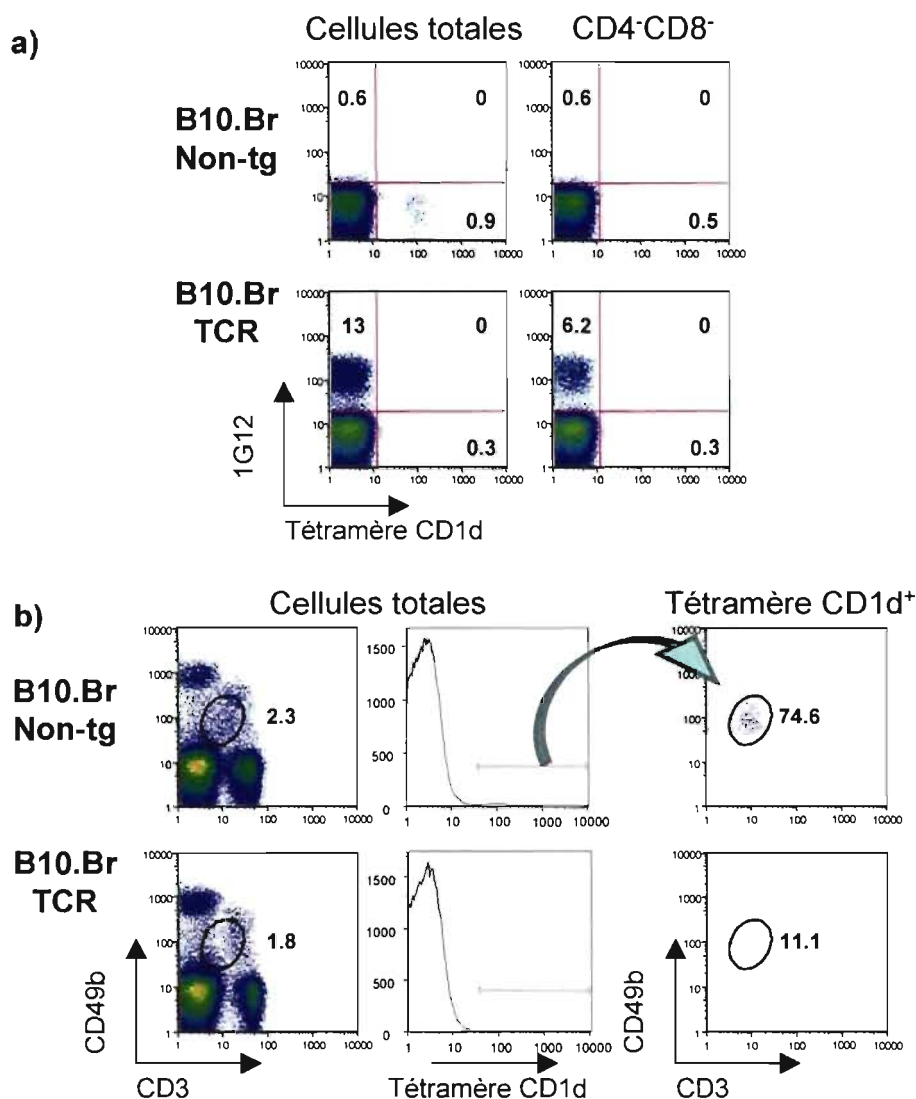
Les cellules T DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) sont rares, et représentent généralement moins de 1% des cellules chez la souris et l'homme [85, 90, 226]. Plusieurs populations cellulaires n'exprimant pas les co-récepteurs CD4 et CD8 mais exprimant un TCR $\alpha\beta$  ont déjà été étudiées, dont les cellules NKT, les cellules retrouvées dans les souris *lpr/lpr*, les cellules aberrantes  $\gamma\delta$  et les cellules DN T régulatrices. Afin de vérifier si le phénotype des cellules DN 1G12<sup>+</sup> est similaire au phénotype de ces populations de cellules DN T, et est par le fait même déjà connu, nous avons vérifié l'expression de certains marqueurs sur notre population de cellules DN 1G12<sup>+</sup>.

#### **3.4.1 Comparaison des cellules DN 1G12<sup>+</sup> aux cellules de souris *lpr/lpr***

La première population à laquelle a été comparée la population de cellules DN 1G12<sup>+</sup> est la population de cellules retrouvée dans la souris *lpr/lpr* [227]. Il est connu que la souris *lpr/lpr*, aux prises avec une mutation dans le gène de Fas, a un syndrome de lymphoprolifération. Parmi les cellules retrouvées dans cette souris, il existe une population de cellules DN T auto-immunes exprimant un marqueur de cellules B, le CD45R. Tel que mentionné plus haut dans cette section, les cellules DN 1G12<sup>+</sup> n'expriment pas le CD45R (figure 3a, 4<sup>e</sup> rangée) dans les deux souches de souris, autant dans les souris *Dbl* que *TCR*, impliquant que les DN 1G12<sup>+</sup> ont un phénotype différent de cette population.

### 3.4.2 Comparaison des cellules DN 1G12<sup>+</sup> aux cellules NKT

La seconde population à laquelle a été comparée la population de cellules DN 1G12<sup>+</sup> est la population de cellules NKT. Les cellules NKT expriment un TCR ayant une grande spécificité pour la molécule de CMH non-classique CD1d associé à des molécules  $\alpha$ -Gal-Cer [228]. Cette population cellulaire exprime certains marqueurs, tels que le CD49b. Le marquage du CD49b (figure 3c) a démontré que la population de cellules DN 1G12<sup>+</sup> n'exprime pas cette molécule à sa surface, ce qui diffère des cellules NKT. Le CD49b n'est par contre pas exclusif aux cellules NKT, et le marquage pour cette molécule ne permet pas nécessairement l'identification de toutes les cellules NKT. Il est donc nécessaire de vérifier l'expression de plus d'un marqueur de surface afin d'exclure la possibilité que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> aient un phénotype de cellules NKT. Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> expriment le CD62L de façon hétérogène, et des niveaux intermédiaires de CD5 et CD122 (figure 3a), tandis que les cellules NKT expriment de forts niveaux de CD5 et CD122 mais sont négatives pour le CD62L. Afin de démontrer indéniablement que le phénotype des cellules DN 1G12<sup>+</sup> diverge de celui des cellules NKT, le Dr. David Serreze nous a gentiment fourni le tétramère CD1d. La figure 4 illustre les marquages dans la souris B10.Br TCR, ainsi que ceux dans une souris B10.Br non-transgénique servant de contrôle. Tout d'abord, les rates des deux types de souris ont été marquées pour CD4, CD8, le TCR 3A9 et le TCR canonique des cellules NKT (figure 4a). L'expression du TCR 3A9 et la liaison au tétramère ont été vérifiées dans les cellules totales (panneaux de droite) ainsi que dans les cellules DN (panneaux de gauche). La souris non-transgénique n'exprime évidemment pas le TCR 3A9 (1G12<sup>-</sup>),



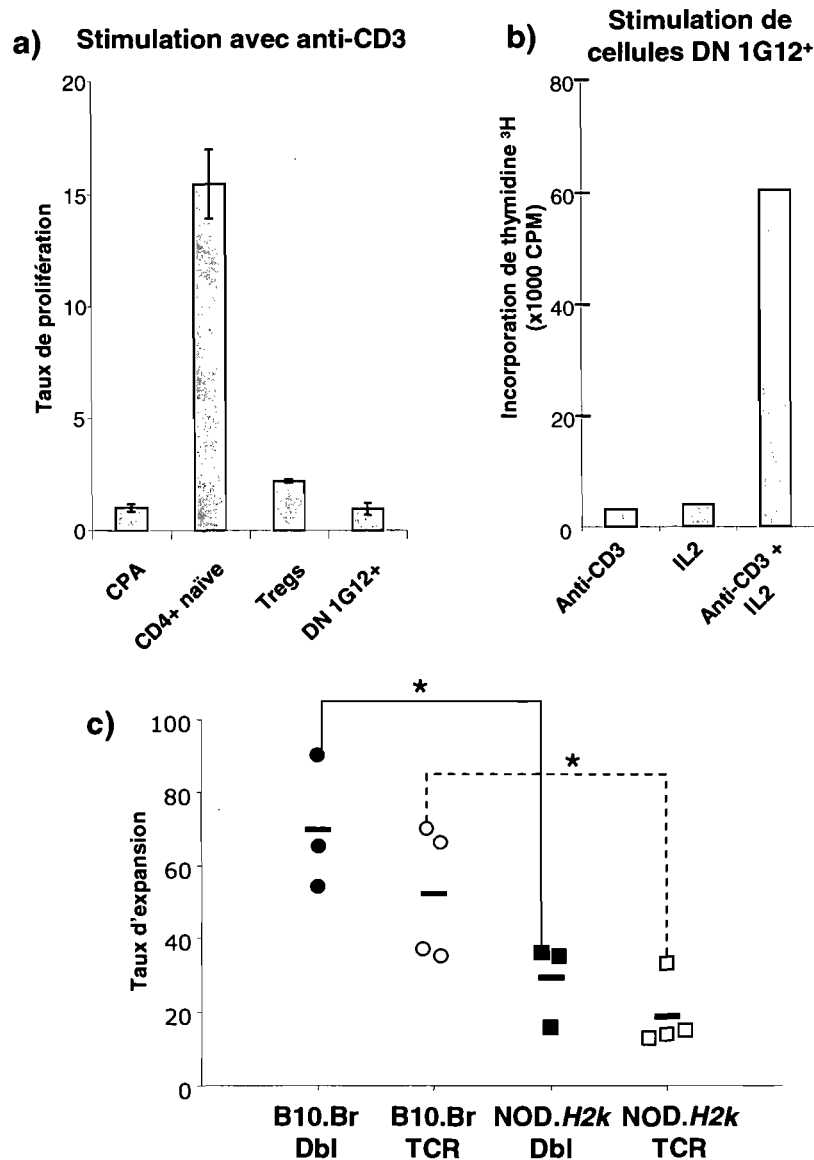
**Figure 4 - Le phénotype des cellules DN 1G12<sup>+</sup> est différent du phénotype des cellules NKT.** Les cellules de rate de souris B10.Br TCR et non-transgénique (non-tg) sont analysées pour leur liaison au tétramère CD1d. **a)** L'expression du 1G12 et la liaison au CD1d sont vérifiées sur les cellules totales et sur la population de cellules DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). **b)** Le cytogramme de gauche montre le pourcentage de cellules NKT CD49b<sup>int</sup>CD3<sup>int</sup> parmi les cellules totales. L'histogramme central permet de sélectionner les cellules CD1d<sup>+</sup> parmi les cellules totales. Le cytogramme de droite montre l'expression de CD3 et CD49b sur les cellules CD1d<sup>+</sup>. B10.Br non-tg n=1, B10.Br TCR n=2. Des résultats similaires ont été obtenus dans les souris NOD.H2k non-tg (n=1) et NOD.H2k TCR (n=1).

mais permet de visualiser la population de cellules qui se lie au tétramère CD1d, c'est-à-dire les cellules NKT. Les cytogrammes illustrant les résultats obtenus dans la souris B10.Br TCR démontrent que les cellules totales 1G12<sup>+</sup> sont tétramère CD1d<sup>-</sup> (panneau inférieur gauche), et plus particulièrement que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ne se lient pas au tétramère CD1d (panneau inférieur droit). Les cytogrammes de la souris B10.Br TCR permettent aussi de mettre en évidence un profil de cellules tétramère CD1d<sup>+</sup> différent de celui de la souris B10.Br non-transgénique. En effet, la proportion de cellules tétramère CD1d<sup>+</sup> est diminuée dans la souris TCR, et le profil de cytométrie semble quelque peu différent. Pour cette raison, la population de NKT dans les souris B10.Br non-transgénique et TCR a été analysée plus attentivement (figure 4b). Les panneaux de gauche montrent la proportion, parmi les cellules totales, de cellules ayant un phénotype de cellules NKT, c'est-à-dire ayant des niveaux intermédiaires de CD3 et CD49b (2,3% dans la souris non-transgénique, 1,8% dans la souris TCR). Par contre, en analysant les cellules tétramère CD1d<sup>+</sup> (panneaux du centre), il est possible de constater que le peu de cellules tétramère CD1d<sup>+</sup> dans la souris B10.Br TCR ne sont en fait pas des cellules NKT puisqu'elles sont négatives pour le CD3, contrairement à celles retrouvées dans la souris B10.Br non-transgénique (panneaux de droite). L'insertion du TCR transgénique semble de surcroît interférer avec la génération de cellules NKT, ce qui prouve que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ne sont pas des cellules NKT. Des résultats similaires ont été obtenus dans les souris NOD.*H2k* TCR et non transgénique (données non présentées).

### 3.4.3 Comparaison des cellules DN 1G12<sup>+</sup> aux cellules aberrantes $\gamma\delta$

La troisième population à laquelle a été comparée la population de cellules DN 1G12<sup>+</sup> est la population de cellules aberrantes  $\gamma\delta$ . Il est essentiel de rappeler que le modèle utilisé dans cette étude est composé d'un TCR transgénique, de type  $\alpha\beta$ . L'expression forcée du TCR $\alpha\beta$  dans les souris peut donc modifier le développement normal des lymphocytes T, produisant des cellules aberrantes  $\gamma\delta$  exprimant à la fois un TCR $\alpha\beta$  et un TCR $\gamma\delta$  à leur surface [229-232]. Puisque le TCR 3A9 transgénique inséré dans notre souris est un TCR $\alpha\beta$ , nous avons vérifié la présence de TCR $\gamma\delta$  sur les cellules DN 1G12<sup>+</sup>. Dans ce dessein, les cellules ont été marquées avec l'anticorps anti-TCR $\delta$  (figure 3d), et les cytogrammes démontrent que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> expriment leur TCR $\alpha\beta$  sans pour autant exprimer le TCR $\delta$ . Le phénotype observé est similaire dans les deux souches de souris, autant dans les souris Dbl que les souris TCR. Par contre, les cellules aberrantes  $\gamma\delta$  n'expriment pas nécessairement le TCR $\gamma\delta$  à la surface [229]. Toutefois, il est connu que cette population est capable de répondre à une stimulation avec l'anti-CD3 *in vitro*.

Une étude de stimulation *in vitro* a donc été réalisée sur les cellules DN 1G12<sup>+</sup> (figure 5). Différentes populations cellulaires ont été stimulées avec des CPA et de l'anti-CD3 (figure 5a). La prolifération cellulaire est mesurée grâce à l'ajout de <sup>3</sup>H-thymidine radioactive en fin de culture. Les cellules en prolifération intègrent la <sup>3</sup>H-thymidine à l'ADN; celle-ci est par la suite quantifiée par un lecteur de radioactivité. Le taux de prolifération est établi par une comparaison entre l'incorporation de la <sup>3</sup>H-



**Figure 5 - Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> sont anergiques *in vitro*, et démontrent un potentiel d'expansion en présence de cytokines.** a) La prolifération de diverses populations en réponse à une stimulation avec l'anti-CD3 et des CPA est vérifiée par incorporation de thymidine radioactive. La prolifération est présentée sous forme de taux, calculé en fonction du contrôle négatif (les CPA). L'histogramme est présenté sous forme de taux de prolifération afin de diminuer la variabilité entre les expériences. Cet histogramme représente la moyenne de 3 expériences. b) Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> sont mises en culture dans différentes conditions. La prolifération est mesurée par l'incorporation de thymidine radioactive. n=1 c) Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> de chaque type de souris sont mises en expansion *in vitro*. Leur taux d'expansion est calculé selon le nombre initial de DN 1G12<sup>+</sup> en culture et du nombre de cellules récoltées à la fin de l'expérience. Chaque symbole représente une expérience indépendante. Le trait indique la moyenne. \* p < 0.05



thymidine des CPA seules et des autres populations cellulaires. Les CPA irradiées seules, en présence d'anti-CD3, ne prolifèrent pas, ce qui constitue un contrôle négatif pour les expériences de prolifération. Le taux de prolifération de cet échantillon est fixé à 1. Lorsque les cellules CD4<sup>+</sup> naïves sont mises en culture en présence d'anti-CD3 et de CPA, leur prolifération est considérable (taux de prolifération avoisinant 15 fois). Cette prolifération constitue un contrôle positif, démontrant l'efficacité des conditions de stimulation. Des cellules régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Tregs) ont de plus été isolées et mises en culture avec les CPA et l'anti-CD3. Il est connu que cette population est anergique face à une telle stimulation, révélée par une absence de prolifération. Les cellules DN 1G12<sup>+</sup>, mises en culture dans ces mêmes conditions, ont une prolifération aussi négligeable que les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et les CPA seules (taux de prolifération avoisinant 1), démontrant ainsi que cette population est elle aussi anergique. Cette anergie est par le fait même brisée lorsque l'IL-2, une cytokine favorisant la prolifération des lymphocytes T, est ajoutée au milieu de culture (figure 5b). En effet, lorsque les cellules DN 1G12<sup>+</sup> sont mises en culture en présence de l'anti-CD3 et de CPA uniquement, on ne détecte pas de prolifération. Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ont aussi été mises en présence de CPA, sans anti-CD3, mais avec l'IL-2, une cytokine ayant la capacité de stimuler la prolifération. Dans ces conditions, l'anergie n'est toujours pas brisée, potentiellement à cause d'un manque de stimulation du TCR, démontré par une incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine toujours aussi faible. Par contre, lorsque l'IL-2 est ajoutée au milieu de culture, en plus de l'anti-CD3 et des CPA, l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine avoisine 60 000 CPM, indiquant une forte prolifération des DN 1G12<sup>+</sup> dans ces conditions. Cette caractéristique démontre sans aucun doute que les cellules DN

1G12<sup>+</sup> ont un phénotype différent des cellules aberrantes  $\gamma\delta$ , qui prolifèrent en réponse à l'anti-CD3.

#### 3.4.4 Comparaison des cellules DN 1G12<sup>+</sup> aux cellules DN T régulatrices

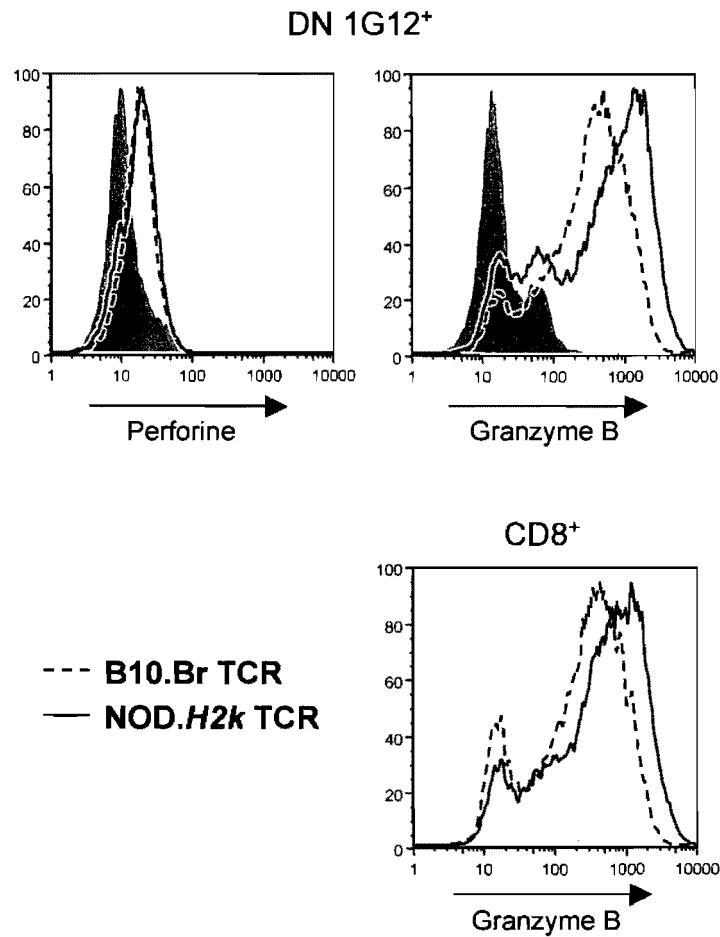
La dernière population à laquelle a été comparée la population de cellules DN 1G12<sup>+</sup> est la population de cellules DN T régulatrices. Tel que mentionné dans l'introduction, ces cellules sont impliquées dans la tolérance face à l'allogreffe et la xéno greffe. Elles n'expriment pas le CD25 et le FoxP3, mais sont anergiques *in vitro* lorsque stimulées avec l'anti-CD3. Les figures 3b, 5a et 5b décrites précédemment démontrent que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> n'expriment pas le FoxP3 ni le CD25, qu'elles sont anergiques lorsque stimulées avec l'anti-CD3 mais que l'ajout au milieu de culture d'IL-2 brise l'anergie. Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> sont donc similaires aux cellules DN T impliquées dans la tolérance, renforçant l'hypothèse selon laquelle cette population aurait une implication dans la prévention de l'établissement du diabète auto-immun.

Les études sur les cellules DN T régulatrices, décrites ci-dessus, ont révélé que leur prolifération *in vitro* est optimale lorsque celles-ci sont mises en culture en présence d'IL-2 et d'IL-4 [86]. Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ont été isolées des souris B10.Br et NOD.H2k, TCR et DbI, et mises en culture dans ces conditions afin de déterminer leur capacité maximale d'expansion dans un temps donné, c'est-à-dire 7 jours de stimulation suivis de 3 jours de repos (figure 5c). Le taux d'expansion est calculé en divisant le nombre de cellules récoltées à la fin du processus d'expansion par le nombre de DN

1G12<sup>+</sup> initialement mis en culture. Chacune des formes représente une expérience indépendante. La moyenne des taux d'expansion obtenus démontre qu'il y a une variation dans le taux d'expansion des souris Dbl en comparaison avec les souris TCR. Cette différence a été observée dans les deux souches de souris, mais ne s'avère pas statistiquement significative. En revanche, le taux d'expansion moyen, de 69,7 fois, des cellules DN 1G12<sup>+</sup> de souris B10.Br Dbl est significativement plus élevé que le taux d'expansion, de 29 fois, des cellules provenant de la souris NOD.H2k Dbl. De la même manière, les cellules DN 1G12<sup>+</sup> de souris B10.Br TCR ont un taux d'expansion de 52 fois, qui s'avère statistiquement plus élevé que le taux d'expansion des cellules de souris NOD.H2k TCR se situant à 18,75 fois. Cette variation est la première différence phénotypique entre les DN 1G12<sup>+</sup> de la souris B10.Br résistante et la souris NOD.H2k prédisposée.

### **3.5 Fonction des cellules DN 1G12<sup>+</sup> réduite dans la souris NOD.H2k**

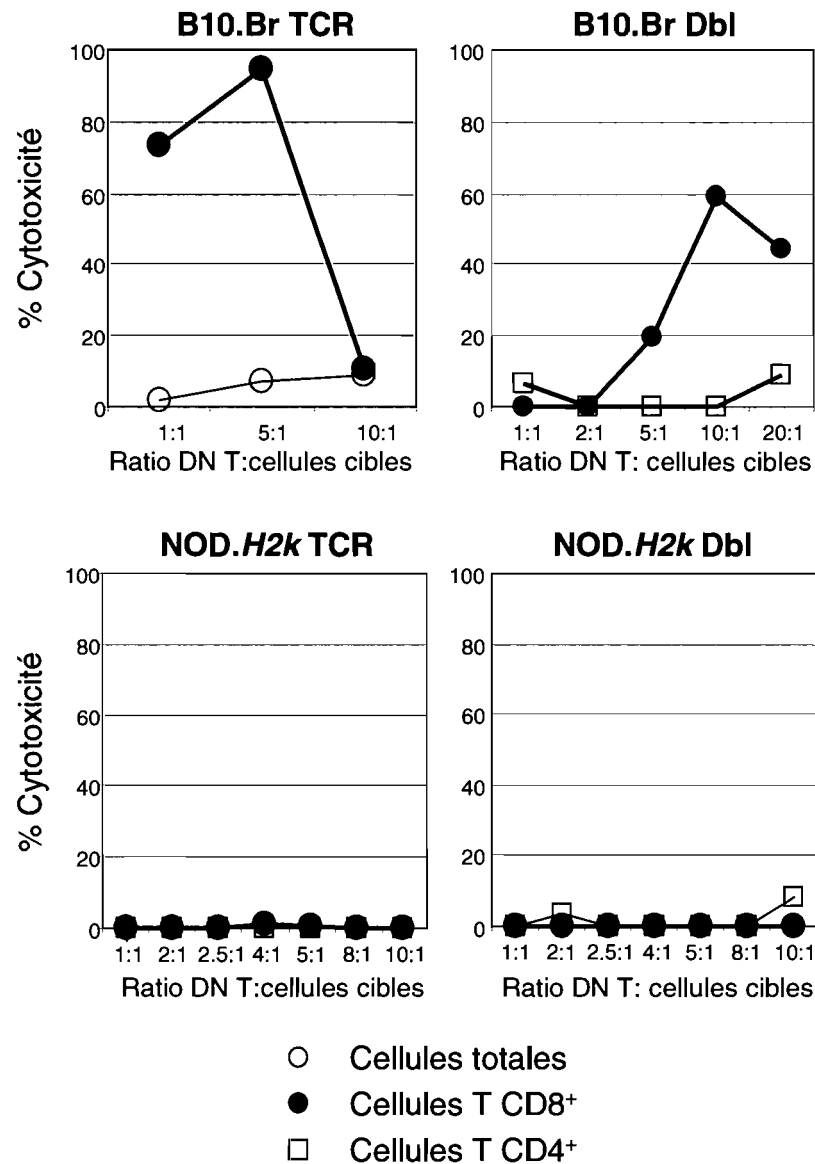
Les cellules DN T régulatrices exercent leur fonction en éliminant les cellules T effectrices CD8<sup>+</sup> soit par l'interaction directe de Fas avec son ligand à la surface cellulaire, soit par la sécrétion de perforine et de granzyme B, dont la fonction est de lyser les cellules cibles. La contribution de FasL dans la fonction des cellules DN 1G12<sup>+</sup> n'a pas été évaluée, compte tenu du fait que le marquage de cette molécule sur les cellules primaires ne peut être détecté par cytométrie. Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ont donc été testées pour vérifier leur production de granzyme B et de perforine *in vitro* (figure 6). Les histogrammes du haut illustrent les marquages de perforine (à gauche) et de



**Figure 6 - Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> produisent de la perforine et de la granzyme B suite à leur activation *in vitro*.** Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> de la race des souris B10.Br TCR et NOD.H2k TCR sont analysées pour leur production de perforine et granzyme B suite à leur activation *in vitro* avec de l'anti-CD3, de l'IL-2 et de l'IL-4. Les histogrammes gris représentent les cellules DN 1G12<sup>+</sup> non-stimulées, les histogrammes hachurés représentent les cellules provenant des souris B10.Br TCR et les histogrammes pleins représentent les cellules provenant des souris NOD.H2k TCR. Le graphique inférieur montre la production de granzyme B par les cellules T CD8<sup>+</sup> comme contrôle. n=3

granzyme B (à droite) sur les cellules DN 1G12<sup>+</sup>. Le panneau inférieur droit présente le contrôle positif pour la granzyme B, puisqu'il est connu que les cellules T CD8<sup>+</sup> exercent leur fonction cytotoxique par la sécrétion de perforine et granzyme B. Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> non-stimulées (histogramme gris) ne produisent pas de perforine, mais suite à l'activation, la production de perforine est régulée à la hausse au même niveau dans les souris B10.Br TCR (ligne hachurée) et NOD.H2k TCR (ligne pleine). La production de granzyme B (panneau supérieur droit) est elle aussi accrue suite à l'activation *in vitro*, et ce dans les deux souches de souris TCR, quoique légèrement supérieure dans la souris NOD.H2k TCR (ligne pleine). Les DN 1G12<sup>+</sup> peuvent donc exercer leur fonction cytotoxique par la sécrétion de molécules capables de lyser les cellules cibles.

Afin de déterminer la cible de l'action lytique des cellules DN T, celles-ci ont été utilisées dans des essais de cytotoxicité *in vitro* (figure 7). Pour se faire, elles ont été mises en présence de différentes populations cellulaires préalablement activées, soit des cellules de rate totale, des cellules T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. La cytotoxicité est mesurée par la relâche de <sup>51</sup>Cr par les cellules cibles lorsque les cellules DN T sont capables de lyser lesdites cibles, et les courbes présentées à la figure 7 sont réalisées grâce à la mise en culture *in vitro* de différents ratios de cellules DN T : cellules cibles. Le test de cytotoxicité a été effectué avec des cellules DN T, ainsi que des cellules cibles, provenant des souris B10.Br TCR (graphique supérieur gauche), B10.Br Db1 (graphique supérieur droit), NOD.H2k TCR (graphique inférieur gauche) et NOD.H2k Db1 (graphique inférieur droit). Tout d'abord, les cellules DN T de souris B10.Br TCR ont



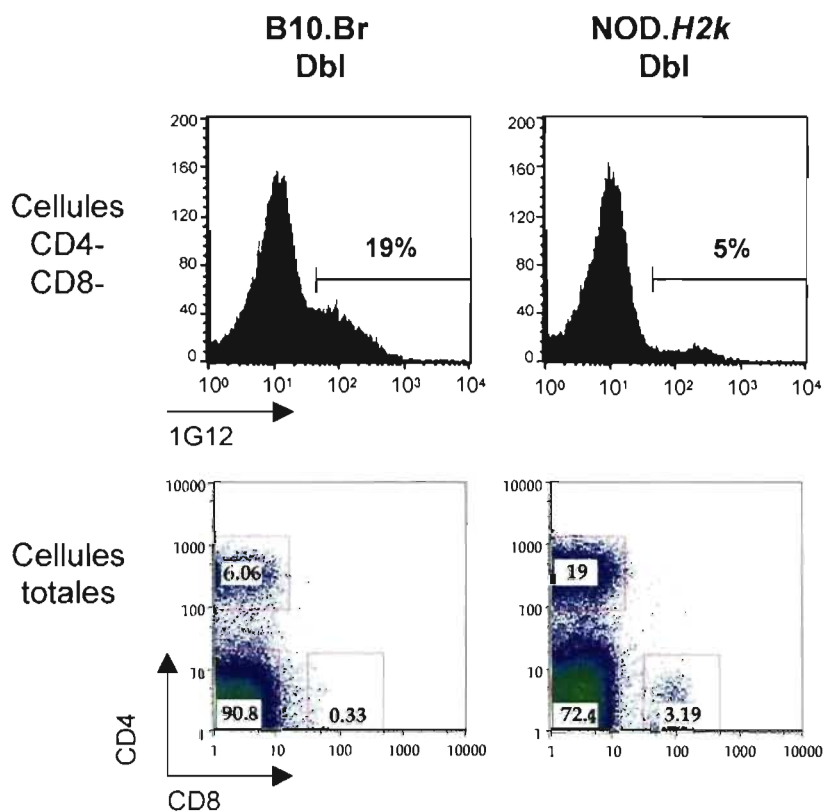
**Figure 7 - Les cellules DN T provenant de la souris B10.Br résistante au diabète ont une activité cytotoxique efficace *in vitro* envers les cellules T CD8+ . (voir matériel et méthode). Les cellules cibles utilisées proviennent des mêmes souris que les cellules DN T, pour chacune des conditions. Le pourcentage de cytotoxicité est calculé selon la formule suivante: (relâche  $^{51}\text{Cr}$  de l'échantillon)/(relâche  $^{51}\text{Cr}$  maximale). B10.Br TCR n=1; B10.Br DbI n=1; NOD.H2k TCR n=2; NOD.H2k DbI n=2.**

été mises en contact de cellules cibles totales et CD8<sup>+</sup>. Les cellules DN T sont capables de lyser les cibles CD8<sup>+</sup>, générant un pourcentage de 73,2% de cytotoxicité à un ratio 1 :1, qui augmente à 94,6% en augmentant le ratio à 5 :1. Le point indiquant un pourcentage de cytotoxicité beaucoup plus faible (10,7%) à un ratio de 10 :1 semble être un point surprenant, qui n'a pu être rectifié puisque cet essai n'a été effectué qu'une seule fois. Les pourcentages de cytotoxicité, plus faibles que les précédents, obtenus en utilisant comme cibles des cellules totales correspondent donc à la lyse des cellules CD8<sup>+</sup> présentes parmi celles-ci. Les cellules DN T de souris B10.Br Dbl se sont montrées elles aussi capables de lyser les cellules cibles CD8<sup>+</sup>, mais à un ratio plus élevé. En effet, la cytotoxicité est détectable à partir d'un ratio 5 :1 de cellules DN T versus les cellules cibles CD8<sup>+</sup> (19,4%), et est davantage efficace dans un ratio de 10 :1 (59,4%). Tel que vu dans le cas de la souris B10.Br TCR, la courbe de cytotoxicité dans la souris B10.Br Dbl comprend un point plutôt surprenant à un ratio de 20 :1 (44,6%), qui ne peut être rectifié, faute d'un nombre suffisant d'expériences identiques. L'essai de cytotoxicité a aussi été réalisé en utilisant les cellules CD4<sup>+</sup> comme cibles dans la souris B10.Br Dbl seulement. Les résultats obtenus indiquent un très faible pourcentage de cytotoxicité uniquement aux ratios 1 :1 et 20 :1, laissant présager que ces points sont très peu valables. Pour ce qui est des expériences faites avec des cellules des souris NOD.H2k TCR et Dbl, les résultats sont particulièrement éloquentes. Les courbes démontrent clairement que peu importe les cellules mises en présence de ces DN T, celles-ci n'ont pas la capacité de causer la lyse des cellules cibles, puisque les pourcentages de cytotoxicité obtenus avoisinent tous 0%. L'activité cytotoxique des cellules DN T est donc accrue dans la souris B10.Br résistante au diabète, et semble

dirigée contre les cellules CD8<sup>+</sup>. Malgré leur forte production de granzyme B et de perforine, les cellules DN T de la souris NOD.*H2k* n'ont pas une telle activité.

Cette activité réduite des cellules DN T dans la souris NOD.*H2k* prédisposée au diabète auto-immun se reflète dans les populations cellulaires retrouvées dans les îlots de Langerhans (figure 8). Les îlots pancréatiques des souris B10.Br Dbl (cytogramme de gauche) et NOD.*H2k* Dbl (cytogramme de droite) ont été prélevés puis marqués. Les souris Dbl sont utilisées puisque la présence de l'antigène dans le pancréas de ces souris provoque l'infiltration des lymphocytes TCR transgénique. Tel que mentionné précédemment, les lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup> sont présents en plus grand nombre dans les îlots pancréatiques de la souris B10.Br Dbl (figure 8a). Les différentes proportions de cellules CD4<sup>+</sup>, DN et CD8<sup>+</sup> ont été vérifiées dans les deux types de souris (figure 8b). Quoique toutes les proportions varient, le pourcentage de cellules CD8<sup>+</sup> est le résultat le plus intéressant, puisque les cellules DN T sont capables d'induire leur lyse. La souris B10.Br Dbl résistante au diabète, dans laquelle les cellules DN T éliminent efficacement les cellules CD8<sup>+</sup> *in vitro*, celles-ci sont retrouvées en très faible proportion dans les îlots pancréatiques (0,33%). D'un autre côté, la souris NOD.*H2k* prédisposée au diabète, dans laquelle les cellules DN T n'ont pas une activité cytotoxique efficace, montre une plus grande proportion de cellules CD8<sup>+</sup> (3,19%). Nos résultats suggèrent que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ont donc une activité cytotoxique efficace *in vivo* dans les îlots pancréatiques, vraisemblablement en éliminant la population lymphocytaire qui pourrait être en cause dans le développement du diabète auto-immun chez ces souris.

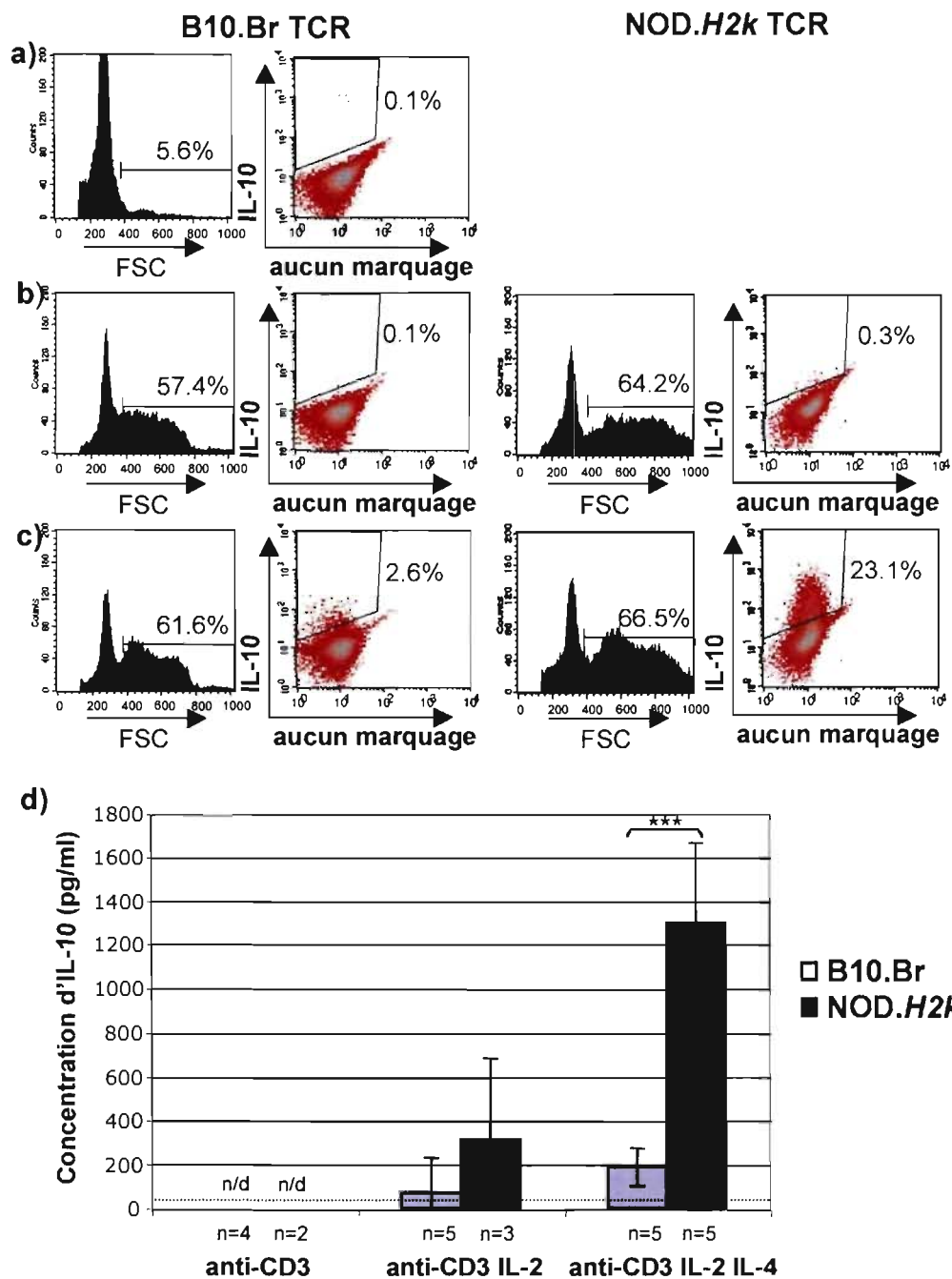




**Figure 8 - La proportion de cellules T CD8<sup>+</sup> est augmentée dans le pancréas des souris NOD.H2k prédisposées au diabète. a)** Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> sont présentes dans les îlots pancréatiques de souris B10.Br et NOD.H2k DbI. n≥3 **b)** Les îlots de Langerhans de souris B10.Br et NOD.H2k DbI sont analysés pour leur proportion de cellules CD8<sup>+</sup>. n=2.

Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ont aussi été testées pour leur production de cytokines. Suite à leur activation *in vitro*, les cellules DN 1G12<sup>+</sup> étaient fixées, perméabilisées, puis marquées pour leur production intracellulaire d'IL-10. Les surnageants des cultures ont aussi été conservés, afin de doser la quantité de cytokines présentes suite à cette activation. La cytokine étudiée à la figure 9 est l'IL-10, reconnue comme ayant des fonctions de régulation, et sa présence a été décelée par marquage intracytoplasmique et par ELISA. Le TGFβ, aussi relié à une action inhibitrice, a été testée par ELISA, mais n'a pas été détectée (résultats non présentés), et n'est donc pas produit par les cellules DN 1G12<sup>+</sup>.

Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> des deux lignées de souris ont été mises en culture dans différentes conditions (figure 9 a, b, c). Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> de B10.Br TCR uniquement ont tout d'abord été mises en présence de CPA et d'anti-CD3 (figure 9 a). Dans ces conditions, les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ne sont pas stimulées, tel que présenté par le faible pourcentage de cellules ayant une taille cellulaire accrue (histogramme de gauche), et la proportion de cellules productrices d'IL-10 est pratiquement nulle (cytogramme de gauche), tel que présenté dans la région supérieure gauche. Lorsque l'IL-2 est ajoutée au milieu de culture (figure 9b), l'anergie est brisée, tel que mentionné auparavant. En effet, autant dans la souris B10.Br TCR que NOD.H2k TCR, les graphiques FSC montrent une augmentation considérable de la taille cellulaire. Par contre, ces conditions ne sont pas suffisantes pour induire la production d'IL-10, puisque le pourcentage de cellules productrices est extrêmement faible. L'ajout de l'IL-4, en plus de l'IL-2, de l'anti-CD3 et des CPA, s'avère nécessaire pour induire la production



**Figure 9 - Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> de la souris NOD.H2k prédisposée au diabète produisent efficacement de l'IL-10, une cytokine régulatrice. Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> provenant de la rate des souris B10.Br TCR et NOD.H2k sont analysées pour leur production d'IL-10 suite à leur stimulation *in vitro* avec a) l'anti-CD3, b) l'anti-CD3 et l'IL-2 et c) l'anti-CD3, l'IL-2 et l'IL-4. Les histogrammes FSC représentent la taille cellulaire, et les pourcentages dans les cytogrammes démontrent la proportion de cellules productrices d'IL-10. n<sub>≥</sub>3 d) L'IL-10 est quantifié dans le surnageant de culture par ELISA. L'histogramme illustre la moyenne en picogrammes par ml. La ligne pointillée indique le niveau de détection de l'ELISA (32 pg/ml). n/d=non-déTECTABLE. p<0,001 n<sub>≥</sub>2.**

d'IL-10 par les cellules DN 1G12<sup>+</sup> (figure 9c). Effectivement, les histogrammes FSC montrent toujours une augmentation de la taille cellulaire, témoin d'une réponse des cellules DN 1G12<sup>+</sup> aux conditions de culture, et les cytogrammes illustrant la proportion de cellules productrices d'IL-10 montrent une augmentation. Alors qu'il était attendu que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> de la souris B10.Br TCR produisent plus d'IL-10 que la souris NOD.H2k TCR puisque cette dernière a une incidence de diabète accrue, les cytogrammes démontrent qu'une proportion augmentée de cellules DN 1G12<sup>+</sup> produisent de l'IL-10 dans la souris NOD.H2k TCR (23,1%) par rapport à la souris B10.Br TCR (2,6%), représentant une différence de 9 fois. Cette augmentation dans la souris NOD.H2k TCR est aussi observable dans les résultats obtenus par ELISA (figure 9 d). L'histogramme illustre la concentration moyenne d'IL-10 (pg/ml) retrouvée dans les différentes expériences d'ELISA, dont le nombre varie selon la souche de souris ou les conditions de culture. La présence d'IL-10 dans les cultures de cellules DN 1G12<sup>+</sup> de souris B10.Br TCR et NOD.H2k TCR avec l'anti-CD3 et les CPA n'a pas pu être établie par l'ELISA, puisque les résultats obtenus se situaient en dessous de la limite de détection se situant à 32pg/ml. L'ajout d'IL-2 à la culture montre une augmentation de la concentration d'IL-10 dans les surnageants de culture, mais tel qu'illustré par les barres de déviation standard, la variabilité des résultats obtenus limite l'établissement de conclusions valables. Par contre, lorsqu'il y a à la fois de l'IL-2 et de l'IL-4, la concentration d'IL-10 détectée dans le surnageant des cultures est plus importante. La concentration moyenne obtenue dans la culture de cellules DN 1G12<sup>+</sup> de souris B10.Br TCR est de 186,3 pg/ml, tandis que la concentration moyenne obtenue pour la souris NOD.H2k TCR est 1297,2 pg/ml, et cette différence est hautement significative ( $p < 0,001$ ). En conclusion, les cellules DN 1G12<sup>+</sup> de la souris NOD.H2k TCR

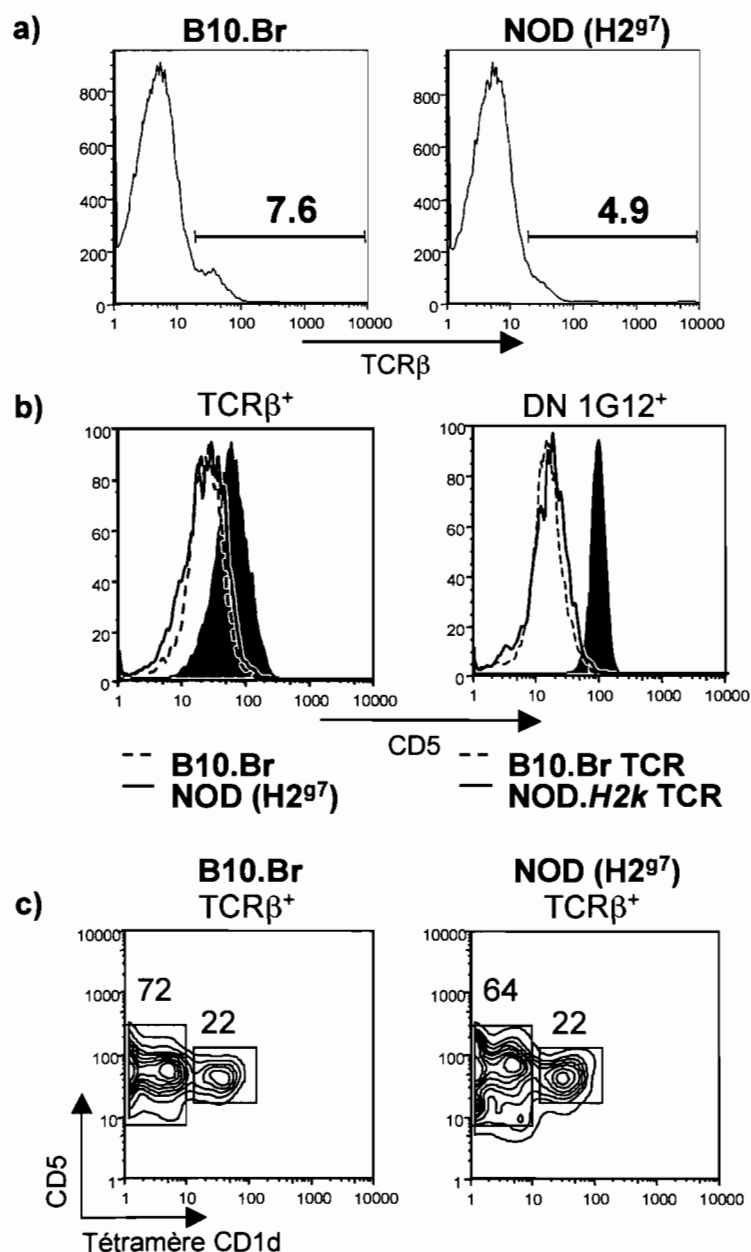
prédisposée au diabète, produit une quantité d'IL-10 significativement supérieure à celle des cellules DN 1G12<sup>+</sup> de souris B10.Br TCR.

### **3.6 Cellules DN retrouvées dans un modèle non transgénique**

Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> étudiées dans ce document proviennent de souris transgéniques, et pourraient être considérées comme un artefact relié à l'introduction de transgènes dans les souris. Par contre, des cellules DN T ont été identifiées dans les souris non transgéniques, quoiqu'en plus faible proportion [226]. La présence des cellules DN T a donc été vérifiée dans les souris B10.Br et NOD non transgéniques (figure 10), afin de déterminer s'il était possible de constater une variation dans la proportion de cellules DN T, similaire à celle observée dans les souris transgéniques. Il est à noter que la souris NOD non transgénique a un CMH H-2<sup>g7</sup>, différent du CMH H-2<sup>k</sup> inséré dans les souris NOD transgéniques.

Puisque la population de cellules DN T est présente en très faible proportion dans les souris non transgéniques, il s'avérait nécessaire de diminuer la quantité de cellules sur laquelle les marquages devaient être effectués, de façon à bien distinguer les cellules d'importance. Les cellules de rate de souris B10.Br et NOD ont été marquées avec les anticorps anti-CD45R, anti-CD4, anti-CD8 et anti-CD49b, et les cellules négatives pour ces marqueurs ont été récoltées, puisque les marquages de surface sur les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ont permis de déterminer que cette population cellulaire n'exprimait aucun de ces antigènes. Un marquage du TCR $\beta$  sur la population sélectionnée permet de mettre en

évidence la population d'intérêt, les cellules DN T. Les histogrammes (figure 10a) démontrent que les cellules DN T, c'est-à-dire les cellules  $\text{TCR}\beta^+$ , sont retrouvées en plus grande proportion dans la souris B10.Br (histogramme de gauche, 7,6%) comparativement à la souris NOD (histogramme de droite, 4,9%). Les proportions sont donc effectivement distinctes entre la souris B10.Br et la souris NOD, avec une prépondérance dans la souris B10.Br résistante au diabète auto-immun. Le niveau d'expression du CD5 sur les cellules DN T non transgéniques a aussi été vérifié (figure 10b), et comparé aux cellules DN  $1\text{G}12^+$ . Le panneau de gauche monte l'expression de CD5 sur les cellules DN  $\text{TCR}\beta^+$  de la souris B10.Br (ligne hachurée) et de la souris NOD (ligne pleine) en comparaison avec la forte expression du CD5 sur la population lymphocytaire  $\text{CD}4^+$  (histogramme gris). Les cellules DN T non transgéniques expriment donc un niveau intermédiaire de CD5. Ce résultat est comparable à celui des cellules DN  $1\text{G}12^+$  (panneau de gauche) dont l'expression de CD5 dans les souris B10.Br TCR (ligne hachurée) et NOD.H2k TCR (ligne pleine) est légèrement inférieur à celui des lymphocytes  $\text{CD}4^+$  (histogramme gris). Les cellules DN T non transgéniques sont donc phénotypiquement similaires aux cellules DN  $1\text{G}12^+$ . Un marquage avec le tétramère CD1d a aussi été effectué sur les DN  $\text{TCR}\beta^+$  dans les deux souches de souris non transgéniques (figure 10c), afin de déterminer si les cellules ainsi sélectionnées sont des cellules NKT. Les cellules DN  $\text{TCR}\beta^+$ , dont le niveau d'expression est intermédiaire, ne se lient pas de façon majoritaire au tétramère CD1d dans la souris B10.Br (panneau de gauche) ni dans la souris NOD (panneau de droite). Les 22% de cellules tétramère  $\text{CD}1\text{d}^+$  sont donc, dans les deux cas, des cellules NKT contaminant les



**Figure 10 - Les cellules T DN sont diminuées dans la souris NOD non-transgénique.** **a)** Les cellules sélectionnées CD45R<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD49b<sup>-</sup> (selon matériel et méthodes) sont marquées pour TCRβ. Les chiffres représentent les pourcentages de cellules positives. **b) panneau de gauche** L'histogramme gris montre le niveau de CD5 sur les cellules TCRβ<sup>+</sup> dans la souris non-transgénique comme contrôle, en comparaison avec les cellules DN TCRβ<sup>+</sup> de souris B10.Br (ligne pointillée) et NOD (ligne pleine). **panneau de droite** Le contrôle (gris) montre le niveau de CD5 sur les cellules CD4<sup>+</sup>, en comparaison avec les cellules DN 1G12<sup>+</sup> de souris B10.Br TCR (ligne pointillée) et NOD.H2k TCR (ligne pleine). **c)** Le marquage avec le tétramère CD1d montre seulement 20% de contamination de cellules NKT parmi les DN TCRβ<sup>+</sup>. n=2

cellules sélectionnées et présentées dans la figure 10 a. Les résultats obtenus dans la souris non transgénique indiquent donc que les cellules DN T sont augmentées en proportion chez la souris B10.Br résistante tout comme dans le modèle transgénique, et que le phénotype de ces cellules est similaire au phénotype des cellules DN 1G12<sup>+</sup>. Les cellules DN T semblent donc être bel et bien impliquées dans la tolérance face au développement du diabète.



## **CHAPITRE 4 : DISCUSSION**

L'étude des souris NOD.*H2k* et B10.Br transgéniques a permis d'identifier une population lymphocytaire augmentée en nombre dans la souche résistante au développement du diabète auto-immun (figure 1 et 8a). Cette population de lymphocytes T 1G12<sup>+</sup>, caractérisée par une absence des co-récepteurs CD4 et CD8 à leur surface, est retrouvée en plus grande proportion dans les souris B10.Br dont la résistance au diabète est démontrée par la faible incidence de la maladie, tel que mentionné dans la section 1.3.5.2. De plus, la différence observée au niveau de la population de cellules DN 1G12<sup>+</sup> est visible en présence et en absence de l'antigène. Cette observation appuie l'hypothèse de départ, selon laquelle un défaut inhérent aux lymphocytes T de la souris NOD est en cause dans le développement du diabète auto-immun, défaut autre que le niveau d'expression du TCR transgénique, vu l'expression similaire observée dans toutes les souris. En effet, la plus grande proportion des lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup>, autant dans la souris TCR que Dbl de la souche B10.Br comparativement à la souris NOD.*H2k*, indique que le défaut lymphocytaire dans la souris NOD.*H2k* n'est pas causé par l'inflammation rapidement, puisque l'absence de l'antigène n'induit pas une augmentation de la population. Pour cette raison, nous avons choisi d'étudier cette population lymphocytaire plutôt inhabituelle. Par ailleurs, puisque la proportion de cellules DN 1G12<sup>+</sup> est diminuée dans la souris NOD.*H2k* dont la prédisposition à l'auto-immunité est bien connue, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle cette population pourrait avoir un rôle dans la tolérance face au diabète auto-immun, de la même façon

dont certaines populations de lymphocytes DN T, décrits à la section 1.1.5.4, réussissent à contrôler certains processus immunitaires.

Le thymus, organe permettant le développement des lymphocytes T, produit principalement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sélectionnés sur un CMH de classe I, alors que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont sélectionnés sur un CMH de classe II. Dans notre modèle, il est possible d'identifier à la figure 1 une population lymphocytaire pouvant sembler à l'encontre des principes généraux d'immunologie, c'est-à-dire la génération de lymphocytes CD8<sup>+</sup> 1G12<sup>+</sup>. Cette population peut sembler aberrante, puisque le TCR transgénique a été originalement construit afin de reconnaître l'antigène HEL dans un contexte de CMH de classe II I-A<sup>K</sup>. Par contre, l'observation de populations similaires a en fait été décrite dans d'autres modèles transgéniques; certains TCR transgéniques, par exemple le 2C et le HY, peuvent reconnaître à la fois les CMH de classes I et II, et par le fait même générer des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>, démontrant ainsi leur promiscuité [234, 235]. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>1G12<sup>+</sup>, malgré la spécificité de leur TCR, peuvent donc être sélectionnés sur un CMH de classe I dans le thymus, et tout de même avoir la capacité de reconnaître des molécules de classe II en périphérie.

Le groupe du Dr. Christopher Goodnow, ayant développé ce modèle transgénique unique permettant d'étudier la fonction thymique altérée de la souris NOD, a découvert un défaut de sélection négative, permettant l'export, en périphérie, d'une plus grande proportion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>1G12<sup>+</sup> auto-réactifs [201, 226]. Cette observation, aussi démontrée à la figure 1, a comme origine un défaut dans l'expression

de la protéine Bim, impliquée dans l'apoptose, et permettant l'élimination de lymphocytes auto-réactifs dans le thymus. Les lymphocytes T  $CD4^+1G12^+$  sont donc retrouvés en plus grande proportion dans la souris NOD.*H2k* Dbl, lorsqu'elle est comparée à la souris B10.Br Dbl. Puisque cette population a préalablement été étudiée, que sa cause est connue et que le phénotype n'est pas observable en absence d'inflammation (i.e. lorsque l'antigène est absent), elle ne constituait pas un intérêt pour nos recherches. Par contre, l'impact du défaut d'expression de Bim sur les lymphocytes DN  $1G12^+$  n'avait pas encore été étudié, et ce défaut aurait pu être à l'origine de la disproportion de cette population chez la souris NOD. Les marquages effectués dans le thymus des souris (figure 2) ont permis de conclure que le défaut thymique n'est pas responsable de la plus faible proportion de cellules DN  $1G12^+$  dans la souris NOD, mais aussi que ces cellules sont résistantes à la sélection négative, puisque la présence de l'antigène dans les souris Dbl n'a pas d'influence sur leur proportion. Les cellules DN  $1G12^+$  sont donc générées par le thymus, et certains facteurs périphériques sont donc impliqués dans la modulation de la proportion de cette population lymphocytaire, indépendamment du défaut de sélection négative antérieurement documenté.

Tel que mentionné dans la section 3.4, plusieurs populations cellulaires ont un phénotype similaire à la population de cellules DN  $1G12^+$ , et il s'avérait nécessaire de vérifier si celle-ci a antérieurement été étudiée. Les marquages de surface et intracytoplasmique (figures 3 et 4), ainsi que l'étude de l'anergie (figure 5 a et b), ont permis de déterminer que les cellules DN  $1G12^+$  ne sont pas phénotypiquement semblables aux lymphocytes provenant de souris *lpr/lpr*, ni aux lymphocytes NKT, ni

aux lymphocytes aberrants  $\gamma\delta$ . Il a été mentionné que le TCR $\gamma\delta$ , dans cette dernière population, n'est pas nécessairement exprimé en surface, rendant l'essai du marquage de surface très peu utile [230]; des expériences de RT-PCR pourraient ainsi confirmer l'absence d'ARNm de ce TCR. Tout de même, d'autres observations ont permis de déterminer que les lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup> sont différents des lymphocytes aberrants  $\gamma\delta$ . Le phénotype des cellules DN 1G12<sup>+</sup> s'apparente plutôt aux lymphocytes DN T régulateurs ayant préalablement été associés à la tolérance face aux allogreffes et aux xénogreffes. Ces résultats ont permis de renforcer l'idée selon laquelle les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ont un rôle à jouer dans la régulation du développement du diabète auto-immun. De plus, ces expériences ont permis de conclure que le phénotype des cellules DN 1G12<sup>+</sup> dans les souris NOD.H2k et B10.Br est identique, impliquant que la même population est retrouvée dans les deux modèles. Ces cellules, phénotypiquement semblables, sont donc réduites en nombre, et possiblement en fonction, dans la souris NOD prédisposée au développement du diabète auto-immun. L'étude de la fonction des cellules DN 1G12<sup>+</sup> *in vitro* a donc été initiée suite à ces observations.

Le potentiel prolifératif des lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup> pouvant être en cause dans la proportion diminuée dans la souris NOD.H2k, l'expansion de cette population en conditions optimales a permis d'observer une première variation entre les cellules issues des souris prédisposées et résistantes (figure 5c). Les lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup> originaires de la souris résistante ont un taux d'expansion significativement supérieur lorsque comparé avec la souris prédisposée. La cause de cette variation est encore inconnue, mais pourrait expliquer la plus faible proportion de cellules DN 1G12<sup>+</sup> dans la

souris NOD.*H2k*, impliquant une régulation réduite et le développement du diabète auto-immun. Ces résultats étant issus d'expériences *in vitro*, il est nécessaire d'étudier la prolifération des cellules DN 1G12<sup>+</sup> *in vivo*. L'utilisation du bromo-déoxyuridine (BrdU), un agent s'intercalant dans l'ADN lors de la division cellulaire, est un outil très utile dans l'étude de la prolifération cellulaire, et permettra de déterminer le potentiel prolifératif des cellules DN 1G12<sup>+</sup> chez les souris, afin de confirmer une capacité diminuée chez la souris NOD.*H2k*. La diminution de la proportion des cellules DN 1G12<sup>+</sup> pourrait s'expliquer par une plus grande susceptibilité des cellules de la souris NOD.*H2k* à l'apoptose. Des marquages sur les molécules pro-apoptotiques et anti-apoptiques présentes dans les cellules DN 1G12<sup>+</sup> nous permettraient peut-être d'observer une régulation à la hausse des premières ou à la baisse des deuxièmes. Les cellules souches hématopoïétiques de la souris NOD.*H2k* pourraient aussi avoir une plus faible capacité de production de lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup>. Des expériences de chimères permettront de déterminer si la plus faible proportion de lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup> de la souris NOD.*H2k* est intrinsèque à ces cellules, ou encore causée par l'environnement dans lequel les cellules prolifèrent, c'est-à-dire un facteur extrinsèque aux cellules. Un nombre égal de cellules de moelle osseuse provenant des souris NOD.*H2k* et B10.Br est injecté dans une souris F1 (NOD.*H2k* x B10.Br) irradiée. Après la reconstitution du répertoire de la souris F1 injectée, la proportion de cellules DN 1G12<sup>+</sup> provenant de chaque souris pourra être évaluée. Des proportions de cellules DN 1G12<sup>+</sup> similaires aux résultats présentés en figure 1 démontreront un défaut intrinsèque aux cellules, tandis que des proportions similaires de lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup> NOD.*H2k* et B10.Br feront la preuve d'un défaut de prolifération extrinsèque aux cellules.

La fonction des cellules régulatrices peut impliquer la production de diverses molécules solubles, telles que des cytokines et des molécules impliquées dans la lyse cellulaire, ainsi que l'expression en surface de FasL, dont la liaison à son ligand Fas induit des signaux induisant l'apoptose. Puisque les lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup> sont présumés régulateurs, la production de perforine et de granzyme B a été évaluée (figure 6). Tel que mentionné à la section 3.5, l'implication de FasL dans la fonction des DN 1G12<sup>+</sup> n'a pas été évaluée, vu l'incapacité de détecter sa présence sur les cellules en utilisant les techniques de cytométrie; par contre, des expériences de RT-PCR permettraient de contrer cet inconvénient, et par le fait même comparer l'expression de FasL sur les cellules DN 1G12<sup>+</sup> provenant des souris B10.Br et NOD.H2k. Les résultats obtenus à la figure 6 illustrent la production de ces molécules par les cellules DN 1G12<sup>+</sup>, laissant présager que leur fonction implique la lyse des cellules cibles. Par contre, alors que nous nous attendions à ce que la fonction des cellules de la souris NOD.H2k prédisposée au diabète soit diminuée, visible par une production réduite de perforine et de granzyme B, les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ont une production similaire de perforine et légèrement accrue de granzyme B. Cette observation pourrait par contre être la conséquence d'un défaut d'exocytose des lysosomes contenant les molécules de granzyme et perforine, impliquant ainsi leur présence accrue à l'intérieur des cellules; un phénotype similaire a été étudié dans la souris *Ashen*, aux prises avec une mutation de la protéine Rab27 impliquée dans l'exocytose de granules cytotoxiques [236]. Un marquage relié à la fusion des vacuoles à la membrane cytoplasmique, en association avec le marquage pour le granzyme B et la perforine, permettrait d'évaluer la capacité de largage des molécules cytotoxiques par les cellules DN 1G12<sup>+</sup>. Le CD107a (LAMP-1),

une protéine se situant à l'intérieur des vésicules et dont l'expression est évaluable en surface suite à la fusion des membranes [237, 238], ainsi que Munc13-4 et Rab27a, des molécules utiles dans l'interaction des protéines SNARE permettant l'arrimage des vacuoles à la synapse immunologique [239-241], constituent d'excellents candidats afin de vérifier la capacité d'exocytose des cellules DN 1G12<sup>+</sup>. La fonction des cellules DN 1G12<sup>+</sup> pourrait donc effectivement être diminuée dans la souris prédisposée NOD.H2k.

Une diminution dans la fonction cytotoxique des lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup> de souris NOD.H2k aura pour conséquence une plus forte proportion des cellules cibles. Afin de déterminer la cible de l'action cytotoxique des cellules DN T, et par le fait même de comparer la fonction des cellules provenant des souris B10.Br et NOD.H2k, des essais de cytotoxicité ont été effectués (figure 7). Cette technique a permis d'identifier la cible des cellules DN T, c'est-à-dire les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, et de prouver la perte de fonction dans les cellules DN T provenant de la souris prédisposée au diabète. Cette perte de fonction empêcherait l'élimination des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> possiblement pathogènes, causant une proportion accrue de ces cellules pathogènes dans les îlots, et ainsi causer le diabète chez la souris NOD.H2k transgénique. L'implication de la production de granzyme et de perforine dans la lyse des cellules CD8<sup>+</sup> pourra être prouvée, dans d'éventuels essais de cytotoxicité, par l'ajout d'EGTA, capable de bloquer l'exocytose des vésicules cytotoxiques. Évidemment, certains facteurs doivent être pris en considération lors de l'analyse des essais de cytotoxicité présentés ici. Tout d'abord, ces essais n'ont été effectués qu'une ou deux fois, nécessitant donc leur répétition avant d'établir des conclusions valables. De plus, la technique utilisée, c'est-à-dire

l'enrichissement des populations par séparation magnétique, pourrait avoir laissé s'infiltrer dans les populations cibles des contaminants cellulaires, par exemple des lymphocytes B, qui pourraient fausser les résultats de cytotoxicité. Pour remédier à ces problèmes techniques, les essais de cytotoxicité devront être exécutés à nouveau, au moins trois fois, avec des populations lymphocytaires triées par cytométrie et donc la pureté est excellente. Des résultats similaires aux essais présentés à la figure 7 permettront de confirmer la capacité des cellules DN 1G12<sup>+</sup> à lyser leur cible, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Tout de même, les résultats obtenus *ex vivo* dans les îlots pancréatiques des souris (figure 8) appuient la diminution de fonction, chez les souris prédisposées au diabète, des lymphocytes DN T *in vitro*. La proportion accrue de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans les îlots, probablement causée par l'incapacité des cellules DN T de lyser leurs cibles, pourrait donc être en cause dans le développement du diabète chez la souris NOD.H2k Dbl. Évidemment, il s'avère important d'augmenter le nombre de marquages sur les îlots pancréatiques afin de confirmer le phénotype, mais la tendance à la hausse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> semble appuyer notre hypothèse.

Puisque certaines populations de lymphocytes T régulateurs contrôlent l'immunité par la sécrétion de cytokines, les lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup> ont été testés pour leur production de cytokines, en particulier l'IL-10 et le TGFβ. Alors que le TGFβ n'a pas été détecté, les cellules DN 1G12<sup>+</sup> activées en conditions optimales produisent de l'IL-10 (figure 9). Les résultats obtenus vont, eux aussi, à l'encontre de nos attentes, c'est-à-dire que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> de la souris NOD.H2k produisent une quantité significativement plus élevée de la cytokine régulatrice IL-10. Des travaux, réalisés sur



les cellules DN T régulatrices impliquées dans la tolérance face à l'allogreffe et la xéno greffe, ont démontré que ces cellules, lorsque mises en présence d'IL-10, voient leur fonction diminuer [242]. L'IL-10 produit par les lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup> pourrait donc avoir une action autocrine et causerait l'inhibition de la fonction, plus prononcée dans la souris NOD.H2k, visible par une augmentation de la proportion des lymphocytes CD8<sup>+</sup> dans les îlots de Langerhans. Le pouvoir inhibiteur de l'IL-10 sur les cellules DN 1G12<sup>+</sup> pourra être confirmé par l'ajout, en culture *in vitro*, d'anticorps bloquant l'éventuel effet autocrine de l'IL-10. À l'inverse, l'ajout, au milieu de culture de cellules provenant de la souris B10.Br, d'une concentration élevée d'IL-10 permettait aussi de vérifier une éventuelle inhibition de la fonction régulatrice des cellules DN 1G12<sup>+</sup>. De plus, la production de cytokines T<sub>H</sub>2 (eg. IL-4) par les cellules DN 1G12<sup>+</sup> devra être vérifié, étant donné l'effet inhibiteur de ces cytokines sur les réponses immunitaires T<sub>H</sub>1, telles que le diabète auto-immun; ces cytokines pourraient réguler le diabète chez la souris B10.Br. Dans le même ordre d'idée, les cellules DN 1G12<sup>+</sup> de la souris NOD prédisposée à l'auto-immunité pourraient produire une plus grande quantité de cytokines T<sub>H</sub>1 (eg. IFN $\gamma$ ), ayant une implication dans le développement du diabète.

Parallèlement, il a été démontré que la surexpression de l'IL-10 dans les îlots pancréatiques cause le développement du diabète auto-immun [243-245]. La forte production d'IL-10 par les lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup>, présents entre autres dans les îlots pancréatiques (figure 8), dans la souris NOD.H2k pourrait donc être un facteur contribuant à la forte incidence du diabète dans cette souche murine. Notre population de lymphocytes pourrait donc avoir une fonction régulatrice prévenant le développement

du diabète dans la souche résistante B10.Br, tandis que sa forte production d'IL-10 dans le contexte de prédisposition de la souris NOD inhiberait sa fonction régulatrice, et pourrait être en cause dans le développement de la maladie.

Le groupe ayant étudié les lymphocytes régulateurs DN T impliqués dans la régulation de l'allogreffe et de la xéno greffe, dans lequel le TCR transgénique reconnaît un antigène sur un CMH de classe I, a identifié la capacité de cette population lymphocytaire à éliminer les cellules T CD8<sup>+</sup> de façon antigène spécifique, c'est-à-dire éliminer les cellules CD8<sup>+</sup> portant le même TCR [86]. Selon leur modèle, suite à l'interaction de la cellule DN T avec un complexe peptide-CMH de classe I présenté par la CPA, un processus de trogocytose [246-249] permettrait à la cellule DN T d'acquérir le complexe CMH-peptide et de le présenter à sa surface. La trogocytose consiste au transfert rapide, dépendant d'un contact étroit entre cellules, de fragments de membrane cellulaire et des molécules y étant associées. Cette acquisition permet de « piéger » les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ayant la même spécificité antigénique et de les éliminer. Alors que cela n'a pas été vérifié dans le modèle transgénique utilisé au cours de nos travaux, les cellules DN 1G12<sup>+</sup> pourrait avoir la capacité d'éliminer les lymphocytes CD8<sup>+</sup>1G12<sup>+</sup> d'une façon similaire. Suite à l'interaction avec la CPA, la cellule DN 1G12<sup>+</sup> pourrait acquérir le complexe peptide-CMH de classe II par trogocytose, le présenter à sa surface, et ainsi se lier aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>1G12<sup>+</sup> et initier la lyse de ces cibles. Ce modèle impliquerait l'interaction d'un lymphocyte T CD8<sup>+</sup> avec une molécule de CMH de classe II; cette interaction semble illogique, mais tel qu'expliqué précédemment, la promiscuité du TCR transgénique permettrait l'interaction entre celui-ci et les molécules

de classe I et II. Évidemment, avant d'affirmer que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ont une action cytotoxique antigène spécifique, certaines expériences devront être effectuées. Parmi celles-ci, la présence de molécules de CMH de classe II sur les cellules DN 1G12<sup>+</sup> devra être vérifiée. Un marquage de surface des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du CMH a été effectué une fois, mais la technique utilisée ne nous a pas permis de confirmer la présence du CMH. Son optimisation permettra éventuellement de déterminer l'expression du CMH à la surface des cellules DN 1G12<sup>+</sup>. Par ailleurs, des essais de cytotoxicité, en utilisant comme cibles des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>1G12<sup>+</sup>, permettraient de déterminer la capacité des cellules DN 1G12<sup>+</sup> à éliminer leurs cibles de façon antigène spécifique *in vitro*. Afin de pouvoir affirmer que les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ont une action antigène spécifique, il sera aussi nécessaire de démontrer que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ayant une spécificité différente ne sont pas éliminés. La capacité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>1G12<sup>+</sup> à répondre au CMH de classe II couplé à l'antigène HEL devra elle aussi être étudiée.

Les cellules DN 1G12<sup>+</sup> constituent un intérêt thérapeutique, puisque leur nombre et leur fonction sont augmentés dans les souris résistantes au développement du diabète auto-immun. Des expériences *in vivo* permettront de confirmer le véritable impact de la présence des cellules DN 1G12<sup>+</sup>. Dans ce dessein, deux expériences permettront d'associer la présence augmentée de cellules DN 1G12<sup>+</sup> à la résistance au diabète. La première stratégie permettrait d'établir de façon indirecte l'influence des cellules DN 1G12<sup>+</sup>. Cette stratégie implique l'utilisation des souris B10.Br RAG<sup>-/-</sup> (dépourvues de lymphocytes T et B) ou des souris B10.Br irradiées afin d'éliminer les cellules du système immunitaire, et exprimant toutes le transgène HEL sous le promoteur de

l'insuline. Ces souris pourront être injectées avec des cellules de rate provenant de souris TCR, totales ou délestées de leurs cellules DN 1G12<sup>+</sup>, afin de vérifier si l'absence de cellules DN 1G12<sup>+</sup> résultera en une augmentation de l'incidence de diabète. Dans l'éventualité où les cellules DN 1G12<sup>+</sup> ont un véritable effet sur les lymphocytes auto-réactifs causant le diabète, les souris B10.Br dépourvues de cellules DN 1G12<sup>+</sup> perdraient la tolérance les rendant résistantes au diabète, verraient leurs îlots pancréatiques détruits par les réactions auto-immunes, et développeraient le diabète d'une façon similaire aux souris NOD.H2k prédisposées. La seconde stratégie proposée permettra d'évaluer directement l'effet régulateur des cellules DN 1G12<sup>+</sup>. Puisqu'il a été démontré que cette population peut être facilement mise en expansion *in vitro*, celle-ci pourrait être injectée dans les souris NOD.H2k Dbl afin d'augmenter leur proportion. Une diminution de l'incidence de diabète dans ce modèle démontrerait aussi l'implication des lymphocytes DN 1G12<sup>+</sup> dans la résistance à l'auto-immunité. Peu importe la stratégie utilisée, l'étude de la fonction *in vivo* permettra de confirmer l'action régulatrice de la population de cellules DN 1G12<sup>+</sup>, démontrant le potentiel thérapeutique de cette population.

Les résultats obtenus suite à l'étude des lymphocytes T DN 1G12<sup>+</sup> sont particulièrement intéressants, mais perdent de leur utilité si le phénotype observé est un artéfact causé par l'insertion de transgènes chez les souris. Afin de valider l'intérêt de travaux sur les lymphocytes régulateurs DN T dans le contexte du diabète auto-immun, la présence de cellules DN T a été vérifiée chez les souris B10.Br et NOD non transgéniques (figure 10). Une population de lymphocytes T semblable aux cellules DN

IG12<sup>+</sup> a pu être identifiée et s'avère elle aussi diminuée dans la souris NOD prédisposée à la maladie; son association à la résistance au diabète auto-immun s'avère donc bien réelle. La fonction de ces cellules non transgéniques devra être établie, de la même manière que le rôle des cellules DN IG12<sup>+</sup> a pu être déterminé. Suite à leur purification par cytométrie, les lymphocytes DN T pourront être mis en culture *in vitro* afin de vérifier, par exemple, leur production de cytokines et de molécules cytotoxiques, ainsi que leur capacité de contrôler la survie de certaines populations cellulaires. L'identification des chaînes composant leur TCR, ainsi que la spécificité de celui-ci, donnera aussi un indice sur leur raison d'être dans la souris non transgénique. Parallèlement, l'existence d'une population similaire a aussi été identifiée chez l'humain [91]. Il serait par le fait même très important de vérifier leur proportion dans les individus sains et dans les patients atteints par le diabète auto-immun, afin de vérifier si la différence de proportion est aussi visible chez ceux-ci. Cette population lymphocytaire pourrait en soi constituer une thérapie, dont l'accroissement du nombre dans les patients diabétiques pourrait permettre de limiter les dommages aux îlots pancréatiques causés par la réaction auto-immune. Évidemment, un tel type de thérapie aurait beaucoup plus d'impact si des outils permettaient de cibler les patients prédisposés au diabète, puisque son potentiel réside principalement dans la prévention de la destruction pancréatique, et non la restauration suite à la perte de fonction. En outre, les lymphocytes DN T régulateurs constituent peut-être un outil clinique dont l'importance sera dévoilée au cours des recherches à venir.

En conclusion, les travaux effectués ont permis d'identifier une population de lymphocytes T CD4-CD8- ayant un impact dans la résistance au développement du diabète auto-immun chez la souris. Cette population cellulaire détient un potentiel dans d'éventuelles thérapies ayant pour but la prévention de la destruction des îlots chez les individus pré-diabétiques, ainsi que dans les nouveaux cas de diabète auto-immun. L'étude de la signature moléculaire impliquée dans la résistance à la maladie permettra de déterminer les facteurs impliqués dans le bris de tolérance, tandis qu'à plus long terme, l'identification des marqueurs génétiques s'avèrera utile afin de développer des tests pré-diagnostiques.

## RÉFÉRENCES

1. Paul, W.E., *Fundamental immunology*. 5th ed. 2003, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. xxi, 1701 p., [10] p. of plates.
2. Abbas, A.K., *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. 2003, Philadelphia: Saunders.
3. Kuby, J., et al., *Immunologie : le cours de Janis Kuby : avec questions de révision*. Sciences sup. 2001, Paris: Dunod. xxvii, 660.
4. Ohga, S., et al., *Sequential appearance of gamma/delta- and alpha/beta-bearing T cells in the peritoneal cavity during an i.p. infection with Listeria monocytogenes*. Eur J Immunol, 1990. **20**(3): p. 533-8.
5. Takada, H., et al., *Peritoneal gamma delta T cells induced by Escherichia coli infection in mice. Correlation between Thy-1 phenotype and host minor lymphocyte-stimulating phenotype*. J Immunol, 1993. **151**(4): p. 2062-9.
6. Skeen, M.J. and H.K. Ziegler, *Induction of murine peritoneal gamma/delta T cells and their role in resistance to bacterial infection*. J Exp Med, 1993. **178**(3): p. 971-84.
7. Kronenberg, M., *Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 877-900.
8. Harrington, L.E., P.R. Mangan, and C.T. Weaver, *Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(3): p. 349-56.
9. Arstila, T.P., et al., *A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity*. Science, 1999. **286**(5441): p. 958-61.
10. Lohmann, T., R.D. Leslie, and M. Londei, *T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes*. J Autoimmun, 1996. **9**(3): p. 385-9.
11. Semana, G., et al., *T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects*. J Autoimmun, 1999. **12**(4): p. 259-67.
12. Kurts, C., et al., *Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 409-14.
13. Alferink, J., et al., *Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1338-41.
14. Zinkernagel, R.M., *Immunology taught by viruses*. Science, 1996. **271**(5246): p. 173-8.
15. Jenkins, M.K. and R.H. Schwartz, *Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo*. J Exp Med, 1987. **165**(2): p. 302-19.
16. Krummel, M.F. and J.P. Allison, *CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 459-65.
17. Walunas, T.L. and J.A. Bluestone, *CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo*. J Immunol, 1998. **160**(8): p. 3855-60.

18. Egen, J.G. and J.P. Allison, *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength*. *Immunity*, 2002. **16**(1): p. 23-35.
19. Darlington, P.J., et al., *Surface cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 partitions within lipid rafts and relocates to the immunological synapse under conditions of inhibition of T cell activation*. *J Exp Med*, 2002. **195**(10): p. 1337-47.
20. Chikuma, S., J.B. Imboden, and J.A. Bluestone, *Negative regulation of T cell receptor-lipid raft interaction by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. *J Exp Med*, 2003. **197**(1): p. 129-35.
21. Egen, J.G., M.S. Kuhns, and J.P. Allison, *CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(7): p. 611-8.
22. Okazaki, T., et al., *PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(24): p. 13866-71.
23. Watanabe, N., et al., *BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(7): p. 670-9.
24. Otsuki, N., et al., *Expression and function of the B and T lymphocyte attenuator (BTLA/CD272) on human T cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **344**(4): p. 1121-7.
25. Wong, P., et al., *Dynamic tuning of T cell reactivity by self-peptide-major histocompatibility complex ligands*. *J Exp Med*, 2001. **193**(10): p. 1179-87.
26. Smith, K., et al., *Sensory adaptation in naive peripheral CD4 T cells*. *J Exp Med*, 2001. **194**(9): p. 1253-61.
27. Krammer, P.H., *CD95's deadly mission in the immune system*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 789-95.
28. Krueger, A., et al., *The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis*. *Immunol Rev*, 2003. **193**: p. 58-69.
29. Kurts, C., et al., *Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo*. *J Exp Med*, 1996. **184**(3): p. 923-30.
30. Adler, A.J., et al., *CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells*. *J Exp Med*, 1998. **187**(10): p. 1555-64.
31. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(1): p. 351-8.
32. Powell, T.J., et al., *Rat bone marrow-derived dendritic cells, but not ex vivo dendritic cells, secrete nitric oxide and can inhibit T-cell proliferation*. *Immunology*, 2003. **109**(2): p. 197-208.
33. Huang, F.P., et al., *A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes*. *J Exp Med*, 2000. **191**(3): p. 435-44.
34. Dhodapkar, M.V., et al., *Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells*. *J Exp Med*, 2001. **193**(2): p. 233-8.



35. Jonuleit, H., et al., *Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1213-22.
36. von Boehmer, H., *Mechanisms of suppression by suppressor T cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 338-44.
37. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 589-601.
38. 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.
39. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
40. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
41. Gavin, M.A., et al., *Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation*. Nature, 2007. **445**(7129): p. 771-5.
42. Williams, L.M. and A.Y. Rudensky, *Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3*. Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 277-84.
43. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
44. Hsieh, C.S., et al., *Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 267-77.
45. 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.
46. Bacchetta, R., et al., *High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 493-502.
47. Van Parijs, L., et al., *Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor*. J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3738-45.
48. Sundstedt, A., et al., *Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells in vivo*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1240-8.
49. Green, E.A., et al., *CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10878-83.
50. Chen, M.L., et al., *Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(2): p. 419-24.

51. 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.
52. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
53. Fantini, M.C., et al., *Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7*. *J Immunol*, 2004. **172**(9): p. 5149-53.
54. Weiner, H.L., *Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells*. *Immunol Rev*, 2001. **182**: p. 207-14.
55. Faria, A.M. and H.L. Weiner, *Oral tolerance*. *Immunol Rev*, 2005. **206**: p. 232-59.
56. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. *Nature*, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
57. Vieira, P.L., et al., *IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2004. **172**(10): p. 5986-93.
58. Levings, M.K., et al., *IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells*. *J Immunol*, 2001. **166**(9): p. 5530-9.
59. Akdis, M., et al., *Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells*. *J Exp Med*, 2004. **199**(11): p. 1567-75.
60. Jutel, M., et al., *IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(5): p. 1205-14.
61. Mills, K.H., *Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?* *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(11): p. 841-55.
62. Jiang, H. and L. Chess, *The specific regulation of immune responses by CD8+ T cells restricted by the MHC class Ib molecule, Qa-1*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 185-216.
63. Noble, A., Z.S. Zhao, and H. Cantor, *Suppression of immune responses by CD8 cells. II. Qa-1 on activated B cells stimulates CD8 cell suppression of T helper 2 responses*. *J Immunol*, 1998. **160**(2): p. 566-71.
64. Hu, D., et al., *Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(5): p. 516-23.
65. Quintana, F.J., P. Carmi, and I.R. Cohen, *DNA vaccination with heat shock protein 60 inhibits cyclophosphamide-accelerated diabetes*. *J Immunol*, 2002. **169**(10): p. 6030-5.
66. Rees, M.A., et al., *In vivo induction of antigen-specific transplantation tolerance to Qa1a by exposure to alloantigen in the absence of T-cell help*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(7): p. 2765-9.
67. Huston, D.P., et al., *Regulation of primary cytotoxic T lymphocyte responses generated during mixed leukocyte culture with H-2d identical Qa-1-disparate cells*. *J Immunol*, 1986. **137**(6): p. 1776-81.

68. Huston, D.P. and G. Tavana, *Suppression of Ia-unrestricted primary anti-Qa-1 cytotoxic T lymphocyte responses by class II major histocompatibility complex-restricted cellular interactions*. J Immunol, 1987. **138**(9): p. 2753-9.
69. Gilliet, M. and Y.J. Liu, *Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2002. **195**(6): p. 695-704.
70. Rifa'i, M., et al., *Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis*. J Exp Med, 2004. **200**(9): p. 1123-34.
71. Endharti, A.T., et al., *Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7093-7.
72. Wei, S., et al., *Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5020-6.
73. Liu, Z., et al., *Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells*. Int Immunol, 1998. **10**(6): p. 775-83.
74. Jiang, S., et al., *Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro*. Hum Immunol, 1998. **59**(11): p. 690-9.
75. Ciubotariu, R., et al., *Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells*. J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5193-202.
76. Filaci, G., et al., *Nonantigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function*. Hum Immunol, 2004. **65**(2): p. 142-56.
77. Vlad, G., R. Cortesini, and N. Suciu-Foca, *License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 5907-14.
78. Chang, C.C., et al., *Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 237-43.
79. Manavalan, J.S., et al., *Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity*. Int Immunol, 2004. **16**(8): p. 1055-68.
80. Seo, N., et al., *Depletion of IL-10- and TGF-beta-producing regulatory gamma delta T cells by administering a daunomycin-conjugated specific monoclonal antibody in early tumor lesions augments the activity of CTLs and NK cells*. J Immunol, 1999. **163**(1): p. 242-9.
81. 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.
82. Miyamoto, K., S. Miyake, and T. Yamamura, *A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells*. Nature, 2001. **413**(6855): p. 531-4.
83. Zeng, D., et al., *Cutting edge: a role for CDI in the pathogenesis of lupus in NZB/NZW mice*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 5000-4.

84. Ford, M.S., et al., *Double-negative T regulatory cells can develop outside the thymus and do not mature from CD8+ T cell precursors*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 2803-9.
85. 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.
86. 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.
87. Ford, M.S., et al., *The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo*. J Exp Med, 2002. **196**(2): p. 261-7.
88. 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.
89. Lee, B.P., et al., *Expression profiling of murine double-negative regulatory T cells suggest mechanisms for prolonged cardiac allograft survival*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4535-44.
90. 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.
91. 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.
92. Young, K.J. and L. Zhang, *The nature and mechanisms of DN regulatory T-cell mediated suppression*. Hum Immunol, 2002. **63**(10): p. 926-34.
93. Sherwood, L., *Physiologie humaine*. 2000, Paris ; Bruxelles: De Boeck Université. xvii, 674.
94. Itoh, N., et al., *Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients*. J Clin Invest, 1993. **92**(5): p. 2313-22.
95. Hanninen, A., et al., *Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1992. **90**(5): p. 1901-10.
96. Gepts, W. and P.M. Lecompte, *The pancreatic islets in diabetes*. Am J Med, 1981. **70**(1): p. 105-15.
97. Foulis, A.K., M. McGill, and M.A. Farquharson, *Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man--macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells*. J Pathol, 1991. **165**(2): p. 97-103.
98. Hoglund, P., et al., *Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes*. J Exp Med, 1999. **189**(2): p. 331-9.
99. Hanninen, A., et al., *Islet beta-cell-specific T cells can use different homing mechanisms to infiltrate and destroy pancreatic islets*. Am J Pathol, 2007. **170**(1): p. 240-50.
100. 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.

101. Behrens, G.M., et al., *Helper requirements for generation of effector CTL to islet beta cell antigens*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5420-6.
102. Cantor, J. and K. Haskins, *Recruitment and activation of macrophages by pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes: evidence for involvement of CCR8 and CCL1*. J Immunol, 2007. **179**(9): p. 5760-7.
103. Yoon, J.W., H.S. Jun, and P. Santamaria, *Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells*. Autoimmunity, 1998. **27**(2): p. 109-22.
104. Pukel, C., H. Baquerizo, and A. Rabinovitch, *Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines. Synergistic interactions of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin 1*. Diabetes, 1988. **37**(1): p. 133-6.
105. Bendtzen, K., et al., *Cytotoxicity of human p17 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans*. Science, 1986. **232**(4757): p. 1545-7.
106. Appels, B., et al., *Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells*. J Immunol, 1989. **142**(11): p. 3803-8.
107. Pankewycz, O.G., J.X. Guan, and J.F. Benedict, *Cytokines as mediators of autoimmune diabetes and diabetic complications*. Endocr Rev, 1995. **16**(2): p. 164-76.
108. Greiner, D.L., A.A. Rossini, and J.P. Mordes, *Translating data from animal models into methods for preventing human autoimmune diabetes mellitus: caveat emptor and primum non nocere*. Clin Immunol, 2001. **100**(2): p. 134-43.
109. Frank, R.N., *Diabetic retinopathy*. N Engl J Med, 2004. **350**(1): p. 48-58.
110. Andersen, A.R., et al., *Diabetic nephropathy in Type 1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study*. Diabetologia, 1983. **25**(6): p. 496-501.
111. Dyck, P.J., et al., *Diabetic neuropathy*. Adv Exp Med Biol, 1985. **189**: p. 305-20.
112. Vazeou, A., et al., *Cardiovascular impairment in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes mellitus (T1DM)*. Eur J Pediatr, 2007.
113. Bottazzo, G.F., A. Florin-Christensen, and D. Doniach, *Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies*. Lancet, 1974. **2**(7892): p. 1279-83.
114. Palmer, J.P., et al., *Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment*. Science, 1983. **222**(4630): p. 1337-9.
115. 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.
116. Lan, M.S., et al., *IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6367-70.
117. Verge, C.F., et al., *Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop*. Diabetes, 1998. **47**(12): p. 1857-66.
118. Gale, E.A., et al., *European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomised controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes*. Lancet, 2004. **363**(9413): p. 925-31.

119. *Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus.* N Engl J Med, 2002. **346**(22): p. 1685-91.
120. Verge, C.F., et al., *Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies.* Diabetes, 1996. **45**(7): p. 926-33.
121. Nakayama, M., et al., *Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice.* Nature, 2005. **435**(7039): p. 220-3.
122. Kent, S.C., et al., *Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope.* Nature, 2005. **435**(7039): p. 224-8.
123. Arif, S., et al., *Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health.* J Clin Invest, 2004. **113**(3): p. 451-63.
124. Moriyama, H., et al., *Evidence for a primary islet autoantigen (preproinsulin I) for insulinitis and diabetes in the nonobese diabetic mouse.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10376-81.
125. Onkamo, P., et al., *Worldwide increase in incidence of Type 1 diabetes--the analysis of the data on published incidence trends.* Diabetologia, 1999. **42**(12): p. 1395-403.
126. Gale, E.A., *The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century.* Diabetes, 2002. **51**(12): p. 3353-61.
127. *Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999.* Diabet Med, 2006. **23**(8): p. 857-66.
128. Shamis, I., et al., *Ethnic differences in the incidence of childhood IDDM in Israel (1965-1993). Marked increase since 1985, especially in Yemenite Jews.* Diabetes Care, 1997. **20**(4): p. 504-8.
129. Green, A. and C.C. Patterson, *Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998.* Diabetologia, 2001. **44 Suppl 3**: p. B3-8.
130. 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.
131. Siemiatycki, J., et al., *The distribution of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus by age, sex, secular trend, seasonality, time clusters, and space-time clusters: evidence from Montreal, 1971-1983.* Am J Epidemiol, 1986. **124**(4): p. 545-60.
132. Nerup, J., et al., *HL-A antigens and diabetes mellitus.* Lancet, 1974. **2**(7885): p. 864-6.
133. Noble, J.A., et al., *The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families.* Am J Hum Genet, 1996. **59**(5): p. 1134-48.
134. Morton, N.E., et al., *Heterozygous expression of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) determinants in the HLA system.* Am J Hum Genet, 1983. **35**(2): p. 201-13.
135. Thomson, G., et al., *Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus.* Am J Hum Genet, 1988. **43**(6): p. 799-816.

136. Lambert, A.P., et al., *Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(8): p. 4037-43.
137. Cucca, F., et al., *A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins*. *Hum Mol Genet*, 2001. **10**(19): p. 2025-37.
138. Todd, J.A., J.I. Bell, and H.O. McDevitt, *HLA antigens and insulin-dependent diabetes*. *Nature*, 1988. **333**(6175): p. 710.
139. 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.
140. Ueda, H., et al., *Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease*. *Nature*, 2003. **423**(6939): p. 506-11.
141. Roach, J.C., et al., *Genetic mapping at 3-kilobase resolution reveals inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3 as a risk factor for type 1 diabetes in Sweden*. *Am J Hum Genet*, 2006. **79**(4): p. 614-27.
142. Bottini, N., et al., *A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes*. *Nat Genet*, 2004. **36**(4): p. 337-8.
143. Smyth, D., et al., *Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus*. *Diabetes*, 2004. **53**(11): p. 3020-3.
144. Asano, K., et al., *Molecular scanning of interleukin-21 gene and genetic susceptibility to type 1 diabetes*. *Hum Immunol*, 2007. **68**(5): p. 384-91.
145. 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.
146. 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.
147. 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.
148. Pugliese, A., et al., *Self-antigen-presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exist in both thymus and peripheral lymphoid organs*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(5): p. 555-64.
149. 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.
150. Hattori, M., et al., *The NOD mouse: recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex*. *Science*, 1986. **231**(4739): p. 733-5.
151. Prochazka, M., et al., *Three recessive loci required for insulin-dependent diabetes in nonobese diabetic mice*. *Science*, 1987. **237**(4812): p. 286-9.
152. Wicker, L.S., et al., *Genetic control of diabetes and insulinitis in the nonobese diabetic (NOD) mouse*. *J Exp Med*, 1987. **165**(6): p. 1639-54.
153. Livingstone, A., et al., *Genetic analysis of diabetes in the nonobese diabetic mouse. I. MHC and T cell receptor beta gene expression*. *J Immunol*, 1991. **146**(2): p. 529-34.

154. Miyazaki, T., et al., *Direct evidence for the contribution of the unique I-ANOD to the development of insulinitis in non-obese diabetic mice*. *Nature*, 1990. **345**(6277): p. 722-4.
155. Slattery, R.M., et al., *Prevention of diabetes in non-obese diabetic I-Ak transgenic mice*. *Nature*, 1990. **345**(6277): p. 724-6.
156. Wen, L., et al., *Human DQ8 can substitute for murine I-Ag7 in the selection of diabetogenic T cells restricted to I-Ag7*. *J Immunol*, 2002. **168**(7): p. 3635-40.
157. 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.
158. Todd, J.A., J.I. Bell, and H.O. McDevitt, *HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus*. *Nature*, 1987. **329**(6140): p. 599-604.
159. 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.
160. Latek, R.R., et al., *Structural basis of peptide binding and presentation by the type 1 diabetes-associated MHC class II molecule of NOD mice*. *Immunity*, 2000. **12**(6): p. 699-710.
161. Stratmann, T., et al., *The I-Ag7 MHC class II molecule linked to murine diabetes is a promiscuous peptide binder*. *J Immunol*, 2000. **165**(6): p. 3214-25.
162. 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.
163. 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.
164. Lyons, P.A., et al., *Congenic mapping of the type 1 diabetes locus, Idd3, to a 780-kb region of mouse chromosome 3: identification of a candidate segment of ancestral DNA by haplotype mapping*. *Genome Res*, 2000. **10**(4): p. 446-53.
165. Podolin, P.L., et al., *Differential glycosylation of interleukin 2, the molecular basis for the NOD Idd3 type 1 diabetes gene?* *Cytokine*, 2000. **12**(5): p. 477-82.
166. King, C., et al., *Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity*. *Cell*, 2004. **117**(2): p. 265-77.
167. 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.
168. Hyttinen, V., et al., *Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study*. *Diabetes*, 2003. **52**(4): p. 1052-5.
169. Kolb, H. and R.B. Elliott, *Increasing incidence of IDDM a consequence of improved hygiene?* *Diabetologia*, 1994. **37**(7): p. 729.
170. Bach, J.F., *The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(12): p. 911-20.



171. 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.
172. Wetzell, J.D., et al., *Reovirus delays diabetes onset but does not prevent insulinitis in nonobese diabetic mice.* J Virol, 2006. **80**(6): p. 3078-82.
173. Oldstone, M.B., *Prevention of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection.* Science, 1988. **239**(4839): p. 500-2.
174. Hermitte, L., et al., *Paradoxical lessening of autoimmune processes in non-obese diabetic mice after infection with the diabetogenic variant of encephalomyocarditis virus.* Eur J Immunol, 1990. **20**(6): p. 1297-303.
175. Wilberz, S., et al., *Persistent MHV (mouse hepatitis virus) infection reduces the incidence of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice.* Diabetologia, 1991. **34**(1): p. 2-5.
176. Takei, I., et al., *Suppression of development of diabetes in NOD mice by lactate dehydrogenase virus infection.* J Autoimmun, 1992. **5**(6): p. 665-73.
177. Feillet, H. and J.F. Bach, *On the mechanisms of the protective effect of infections on type 1 diabetes.* Clin Dev Immunol, 2004. **11**(3-4): p. 191-4.
178. Helmke, K., A. Otten, and W. Willems, *Islet cell antibodies in children with mumps infection.* Lancet, 1980. **2**(8187): p. 211-2.
179. Ginsberg-Fellner, F., et al., *Congenital rubella syndrome as a model for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: increased prevalence of islet cell surface antibodies.* Diabetologia, 1984. **27 Suppl**: p. 87-9.
180. Honeyman, M.C., et al., *Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes.* Diabetes, 2000. **49**(8): p. 1319-24.
181. Banatvala, J.E., et al., *Coxsackie B, mumps, rubella, and cytomegalovirus specific IgM responses in patients with juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus in Britain, Austria, and Australia.* Lancet, 1985. **1**(8443): p. 1409-12.
182. Cabrera-Rode, E., et al., *Type 1 diabetes islet associated antibodies in subjects infected by echovirus 16.* Diabetologia, 2003. **46**(10): p. 1348-53.
183. Munakata, Y., et al., *Rheumatoid arthritis, type 1 diabetes, and Graves' disease after acute parvovirus B19 infection.* Lancet, 2005. **366**(9487): p. 780.
184. Ivarsson, S.A., et al., *The prevalence of type 1 diabetes mellitus at follow-up of Swedish infants congenitally infected with cytomegalovirus.* Diabet Med, 1993. **10**(6): p. 521-3.
185. Roivainen, M., et al., *Mechanisms of coxsackievirus-induced damage to human pancreatic beta-cells.* J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(1): p. 432-40.
186. Surcel, H.M., et al., *Infection by multiple viruses and lymphocyte abnormalities at the diagnosis of diabetes.* Acta Paediatr Scand, 1988. **77**(3): p. 471-4.
187. Forrest, J.M., M.A. Menser, and J.A. Burgess, *High frequency of diabetes mellitus in young adults with congenital rubella.* Lancet, 1971. **2**(7720): p. 332-4.
188. Forrest, J.M., M.A. Menser, and J.D. Harley, *Diabetes mellitus and congenital rubella.* Pediatrics, 1969. **44**(3): p. 445-7.

189. Menser, M.A., J.M. Forrest, and R.D. Bransby, *Rubella infection and diabetes mellitus*. *Lancet*, 1978. **1**(8055): p. 57-60.
190. Dotta, F., et al., *Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(12): p. 5115-20.
191. Sipetic, S., et al., *Early infant diet and risk of type 1 diabetes mellitus in Belgrade children*. *Nutrition*, 2005. **21**(4): p. 474-9.
192. Vaarala, O., et al., *Cow's milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes*. *Diabetes*, 1999. **48**(7): p. 1389-94.
193. Norris, J.M., et al., *Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity*. *JAMA*, 2003. **290**(13): p. 1713-20.
194. Ziegler, A.G., et al., *Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies*. *JAMA*, 2003. **290**(13): p. 1721-8.
195. Virtanen, S.M., et al., *Age at introduction of new foods and advanced beta cell autoimmunity in young children with HLA-conferred susceptibility to type 1 diabetes*. *Diabetologia*, 2006. **49**(7): p. 1512-21.
196. Fronczak, C.M., et al., *In utero dietary exposures and risk of islet autoimmunity in children*. *Diabetes Care*, 2003. **26**(12): p. 3237-42.
197. Hyponen, E., et al., *Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study*. *Lancet*, 2001. **358**(9292): p. 1500-3.
198. Makino, S., et al., *Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice*. *Jikken Dobutsu*, 1980. **29**(1): p. 1-13.
199. 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.
200. 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.
201. 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.
202. Kishimoto, H. and J. Sprent, *A defect in central tolerance in NOD mice*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(11): p. 1025-31.
203. Koarada, S., et al., *Increased nonobese diabetic Th1:Th2 (IFN-gamma:IL-4) ratio is CD4+ T cell intrinsic and independent of APC genetic background*. *J Immunol*, 2002. **169**(11): p. 6580-7.
204. Arreaza, G., et al., *Deficient activation and resistance to activation-induced apoptosis of CD8+ T cells is associated with defective peripheral tolerance in nonobese diabetic mice*. *Clin Immunol*, 2003. **107**(2): p. 103-15.
205. Salomon, B., et al., *B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes*. *Immunity*, 2000. **12**(4): p. 431-40.
206. Colucci, F., et al., *Apoptosis resistance of nonobese diabetic peripheral lymphocytes linked to the Idd5 diabetes susceptibility region*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(16): p. 8670-4.
207. Shi, F.D., et al., *Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the NOD mouse*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(12): p. 6777-82.

208. Dahlen, E., G. Hedlund, and K. Dawe, *Low CD86 expression in the nonobese diabetic mouse results in the impairment of both T cell activation and CTLA-4 up-regulation*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2444-56.
209. DiLorenzo, T.P., et al., *Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for all but the end stages of diabetes development in nonobese diabetic mice and use a prevalent T cell receptor alpha chain gene rearrangement*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12538-43.
210. Verdaguer, J., et al., *Spontaneous autoimmune diabetes in monoclonal T cell nonobese diabetic mice*. J Exp Med, 1997. **186**(10): p. 1663-76.
211. Amrani, A., et al., *Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T-cell population*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 739-42.
212. Lieberman, S.M., et al., *Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8384-8.
213. Trudeau, J.D., et al., *Prediction of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by quantification of autoreactive T cells in peripheral blood*. J Clin Invest, 2003. **111**(2): p. 217-23.
214. Nagata, M. and J.W. Yoon, *Studies on autoimmunity for T-cell-mediated beta-cell destruction. Distinct difference in beta-cell destruction between CD4+ and CD8+ T-cell clones derived from lymphocytes infiltrating the islets of NOD mice*. Diabetes, 1992. **41**(8): p. 998-1008.
215. Schmidt, D., et al., *A mechanism for the major histocompatibility complex-linked resistance to autoimmunity*. J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 1059-75.
216. Katz, J.D., et al., *Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis*. Cell, 1993. **74**(6): p. 1089-100.
217. 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.
218. 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.
219. Kurrer, M.O., et al., *Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(1): p. 213-8.
220. Gonzalez, A., et al., *Damage control, rather than unresponsiveness, effected by protective DX5+ T cells in autoimmune diabetes*. Nat Immunol, 2001. **2**(12): p. 1117-25.
221. Rasooly, L., C.L. Burek, and N.R. Rose, *Iodine-induced autoimmune thyroiditis in NOD-H-2h4 mice*. Clin Immunol Immunopathol, 1996. **81**(3): p. 287-92.
222. Podolin, P.L., et al., *I-E+ nonobese diabetic mice develop insulinitis and diabetes*. J Exp Med, 1993. **178**(3): p. 793-803.
223. 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.
224. 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.

225. Allen, P.M., et al., *Identification of the T-cell and Ia contact residues of a T-cell antigenic epitope*. *Nature*, 1987. **327**(6124): p. 713-5.
226. 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.
227. Aifantis, I., et al., *The E delta enhancer controls the generation of CD4- CD8-alphabetaTCR-expressing T cells that can give rise to different lineages of alphabeta T cells*. *J Exp Med*, 2006. **203**(6): p. 1543-50.
228. Budd, R.C., et al., *T cell lineages in the thymus of lpr/lpr mice. Evidence for parallel pathways of normal and abnormal T cell development*. *J Immunol*, 1987. **139**(7): p. 2200-10.
229. Kawano, T., et al., *CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides*. *Science*, 1997. **278**(5343): p. 1626-9.
230. Terrence, K., et al., *Premature expression of T cell receptor (TCR)alphabeta suppresses TCRgammadelta gene rearrangement but permits development of gammadelta lineage T cells*. *J Exp Med*, 2000. **192**(4): p. 537-48.
231. 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.
232. Fritsch, M. and F. Ivars, *Gammadelta T-cell precursor-derived CD4- CD8-alphabeta T cells retain gammadelta cell function*. *Scand J Immunol*, 1998. **48**(1): p. 8-14.
233. Fritsch, M., et al., *A TCR alpha chain transgene induces maturation of CD4-CD8- alpha beta+ T cells from gamma delta T cell precursors*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(3): p. 828-37.
234. Ge, Q., et al., *Development of CD4+ T cells expressing a nominally MHC class I-restricted T cell receptor by two different mechanisms*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(6): p. 1822-7.
235. Arsov, I. and S. Vukmanovic, *Dual MHC class I and class II restriction of a single T cell receptor: distinct modes of tolerance induction by two classes of autoantigens*. *J Immunol*, 1999. **162**(4): p. 2008-15.
236. Haddad, E.K., et al., *Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice*. *J Cell Biol*, 2001. **152**(4): p. 835-42.
237. Betts, M.R., et al., *Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation*. *J Immunol Methods*, 2003. **281**(1-2): p. 65-78.
238. Alter, G., J.M. Malenfant, and M. Altfeld, *CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity*. *J Immunol Methods*, 2004. **294**(1-2): p. 15-22.
239. Neeft, M., et al., *Munc13-4 is an effector of rab27a and controls secretion of lysosomes in hematopoietic cells*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(2): p. 731-41.
240. Stinchcombe, J.C., et al., *Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes*. *J Cell Biol*, 2001. **152**(4): p. 825-34.
241. Menager, M.M., et al., *Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(3): p. 257-67.
242. Zhang, Z.X., W.L. Stanford, and L. Zhang, *Ly-6A is critical for the function of double negative regulatory T cells*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(6): p. 1584-92.

243. Wogensen, L., X. Huang, and N. Sarvetnick, *Leukocyte extravasation into the pancreatic tissue in transgenic mice expressing interleukin 10 in the islets of Langerhans*. J Exp Med, 1993. **178**(1): p. 175-85.
244. Wogensen, L., M.S. Lee, and N. Sarvetnick, *Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of beta cells in nonobese diabetic mice*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1379-84.
245. Moritani, M., 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**(12): p. 1927-36.
246. Caumartin, J., et al., *Trogoctosis-based generation of suppressive NK cells*. EMBO J, 2007. **26**(5): p. 1423-33.
247. Hudrisier, D., et al., *Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3645-9.
248. Hwang, I., et al., *T cells can use either T cell receptor or CD28 receptors to absorb and internalize cell surface molecules derived from antigen-presenting cells*. J Exp Med, 2000. **191**(7): p. 1137-48.
249. Patel, D.M., et al., *Class II MHC/peptide complexes are released from APC and are acquired by T cell responders during specific antigen recognition*. J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5201-10.

**ANNEXE I*****Anticorps utilisés pour les marquages de surface et intracytoplasmiques***

Antigène	Nom du clone	Compagnie	Isotype	Fluorochrome
<b>CD1d</b>	tetramère	Yi-Guang		PE
<b>CD3ε</b>	145-2C11	Biologend	Armenian Hamster IgG	biotine
	145-2C11	Biologend	Armenian Hamster IgG	FITC
<b>CD4</b>	GK1.5	maison	Rat IgG2 b, k	biotine
	GK1.5	Biologend	Rat IgG2 b, k	PE
	RM4-5	BD	Rat (DA) IgG2a, k	PerCP
	GK1.5	Biologeng	Rat IgG2 b, k	APC
<b>CD5</b>	53.6-72	maison		FITC
<b>CD8α</b>	53-6.7	Biologend	Rat IgG2a, k	biotine
	53-6.7	Biologend	Rat IgG2a, k	FITC
	53-6.7	Biologend	Rat IgG2a, k	PE
	53-6.7	BD	Rat (LOUWS/M) IgG2a, k	PerCP
<b>CD24</b>	M1/69	Biologend	Rat IgG2b, k	biotine
<b>CD25</b>	PC61 5.3	Caltag	Rat IgG1	PE
<b>CD45R</b>	RA3 6B2	maison	Rat IgG2a, k	biotine
	RA3-6B2	BD	Rat IgG2a, k	PerCP
	RA3-6B2	maison	Rat IgG2a, k	FITC
<b>CD49b</b>	DX5	Biologend	Rat IgM, k	biotine
	DX5	Biologend	Rat IgM, k	PE
<b>CD62L</b>	MEL-14	maison	Rat IgG2a, k	FITC
<b>CD103</b>	M290	BD	Rat (LOU/C) IgG2a, k	FITC
<b>CD122</b>	5H4	Biologend	Rat IgG2a, k	PE
<b>FoxP3</b>	FJK-16s	eBioscience	Rat IgG2a, k	FITC
<b>Granzyme B</b>	16G6	eBioscience	Rat IgG2b, k	PE
<b>IgG1</b>	X56	BD	rat IgG1, k	APC
<b>IL-10</b>	JES5-16E3	Biologend	Rat IgG2b, k	PE
<b>Perforine</b>	eBioOMAK-D	eBioscience	Rat, IgG 2a, k	FITC
<b>TCRβ</b>	H57-597	Cedarlane	Armenian hamster IgG2b	APC
<b>TCRδ</b>		Biologend		FITC
<b>Streptavidine</b>		Cerdarlane		PE-Cy7
		BD		PerCP
		Biologend		APC
		Biologend		PE