



**HAL**  
open science

# Vaccination orale par la préproinsuline couplée au Fc (PPI-Fc) dans la prévention du diabète de type 1

Noémie Corcos

► **To cite this version:**

Noémie Corcos. Vaccination orale par la préproinsuline couplée au Fc (PPI-Fc) dans la prévention du diabète de type 1. Immunologie. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP5088 . tel-04122047

**HAL Id: tel-04122047**

**<https://theses.hal.science/tel-04122047>**

Submitted on 8 Jun 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Université de Paris

**École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC) (ED562)**

*Laboratoire UMR\_S1016 CNRS 8104 Institut Cochin*

*Équipe « Tolérance, Biomarqueurs et Thérapies du diabète de type 1 »*

## **THESE DE DOCTORAT D'IMMUNOLOGIE**

### **Vaccination orale par la préproinsuline couplée au Fc (PPI-Fc) dans la prévention du diabète de type 1**

Par Noémie Corcos

Dirigée par le Pr Roberto MALLONE

Présentée et soutenue publiquement le 9 octobre 2020

Devant un jury composé de :

Pr Bertrand BELLIER, Professeur

*Rapporteur*

Pr Philippe BLANCOU, Professeur

*Rapporteur*

Pr Sophie CANDON, PU-PH

*Examinatrice*

Dr Magali IRLA, CR

*Examinatrice*

Dr Sylvaine YOU, CR

*Invitée*

Pr Roberto MALLONE, PU-PH

*Directeur de thèse*



## **Titre**

Vaccination orale par la préproinsuline couplée au Fc (PPI-Fc) dans la prévention du diabète de type 1

## **Résumé**

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune résultant de la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas par des lymphocytes T (LT) auto-réactifs. L'échappement de ces LT à la sélection thymique constitue la première étape dans la progression auto-immune. La sélection thymique étant très active pendant la vie néonatale, l'introduction précoce et non invasive de l'antigène initiateur préproinsuline (PPI) dans le thymus pourrait renforcer cette sélection et ainsi prévenir le DT1. La voie physiologique du récepteur Fc néonatal (FcRn) permet le transfert des anticorps maternels à l'enfant pendant l'allaitement. Nous avons donc fusionné la PPI au fragment Fc des anticorps (PPI-Fc), lui permettant de traverser la barrière intestinale via le FcRn, et d'accéder à une distribution systémique. Les objectifs de ce travail de thèse entaient donc (1) de valider le transfert systémique de la PPI-Fc après administration par voie orale chez des souris nouveau-nées, (2) d'évaluer son potentiel thérapeutique ainsi que (3) de caractériser les modifications cellulaires résultant de notre traitement. Nos résultats montrent que la PPI-Fc est transférée à travers l'épithélium intestinal de manière dépendante du Fc et du FcRn, est captée par des cellules présentatrices d'antigène de la lamina propria, et est retrouvée dans les ganglions mésentériques, la rate, et le thymus. En revanche, notre traitement ne parvient pas à prévenir le développement du DT1 que ce soit dans un modèle de souris NOD transgéniques dont les LT reconnaissent la PPI, ou dans un modèle polyclonal et spontané NOD.*Ins2*<sup>-/-</sup> développant le DT1 de manière accélérée. Aucune modification phénotypique ou fonctionnelle n'a été détectée à la suite du traitement parmi les différentes populations de cellules immunitaires. En conclusion, l'administration orale de la PPI-Fc ne suffit pas à induire une protection vis-à-vis du DT1. L'utilisation d'une protéine de fusion Fc couvrant plusieurs épitopes de la cellule  $\beta$  est envisagée pour élargir la spécificité de la tolérance.

## **Mots-clés**

Diabète de type 1, tolérance immunitaire, vaccination, prévention, immunothérapies

---

## **Title**

Oral vaccination with Fc-coupled preproinsulin for Type 1 Diabetes prevention

## **Abstract**

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease that results from the destruction of pancreatic  $\beta$  cells by autoreactive T cells. The escape of such T cells from thymic selection is the first step of autoimmune progression. Thymic selection is very active during the neonatal period. We hypothesized that a non-invasive introduction of the initiating antigen preproinsulin (PPI) into the thymus during neonatal life may reinforce this process and thus prevent T1D. Our strategy exploits the neonatal Fc receptor (FcRn), which physiologically delivers maternal antibodies to the child during breastfeeding. We have generated a fusion protein comprising PPI and an IgG Fc fragment (PPI-Fc). PPI-Fc can exploit the FcRn pathway to cross the intestinal barrier and achieve a systemic distribution, including in the thymus. The aims of my thesis project were (1) to validate the systemic transfer of PPI-Fc after oral administration to newborn mice, (2) to assess its therapeutic potential and (3) to characterize the immune cell modifications induced by our treatment. Our results showed that PPI-Fc is transferred through the intestinal epithelium in a Fc and FcRn-dependent manner, is taken up by antigen presenting cells and reaches the mesenteric lymph nodes, the spleen and the thymus. However, PPI-Fc fails to prevent T1D development in both a transgenic NOD mouse model, in which all T cells recognize PPI and a spontaneous polyclonal NOD.*Ins2*<sup>-/-</sup> model that develop accelerated T1D. Moreover, no phenotypical or functional modifications were observed on immune cells after treatment. In conclusion, PPI-Fc oral administration is not enough to induce protection of T1D. An Fc-fused polypeptide covering several  $\beta$ -cell epitopes is considered in order to widen tolerance specificity.

## **Keywords**

Type 1 Diabetes, immune tolerance, vaccination, prevention, immunotherapies

# Remerciements

Les remerciements ont toujours été la partie que je préférais lire et c'est avec beaucoup d'émotion que je rédige les miens aujourd'hui. Même si beaucoup pourraient penser que la thèse est un travail très personnel et solitaire, je n'aurais pas pu mener à bien un tel projet sans l'aide, le soutien et la présence de mon entourage. Et rares sont ceux qui ont eu la chance d'avoir un environnement comme le mien. Et parce que ce travail de thèse a finalement été une incroyable aventure humaine, je veux prendre le temps d'exprimer toute ma gratitude envers ceux qui ont tant contribué à mon quotidien durant ces 5 dernières années.

Je voudrais tout d'abord remercier Bertrand Bellier et Philippe Blancou qui ont accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. Votre lecture approfondie, vos retours détaillés et conseils avisés m'auront permis de l'améliorer. Je remercie également Magali Irla et Sophie Candon d'avoir accepté de participer à mon jury en tant qu'examinatrices. Je suis certaine que la discussion qui suivra la soutenance sera pertinente et enrichissante pour la poursuite de ces travaux.

A Roberto et Sylvaine. Merci pour votre confiance, pour votre soutien et pour votre implication. Merci d'avoir toujours laissé votre porte ouverte. Il a été très important pour moi d'avoir eu la possibilité de discuter, échanger et partager avec vous à ce point. J'ai énormément appris, avancé, évolué et c'est en partie grâce à la confiance que vous avez eue en moi tout au long de ces années.

Boban, t'es évidemment le premier de l'équipe que je veux remercier. Tu as été le pilier sur lequel j'ai pu m'appuyer dès mon arrivée dans ce labo et sache que tu m'as grave manqué pendant ces deux dernières années. Merci pour ta bonne humeur, ton humour et ton franc parler ! Merci pour ta pédagogie, pour tes conseils, ton investissement. Tu t'es toujours rendu disponible et tu as toujours été là, tant sur le plan professionnel que personnel, à chaque fois que j'en ai eu besoin.

Cassandra,

J'aimerais pouvoir travailler avec toi toute ma vie. Je n'aurais pas pu rêver mieux que toi comme collègue sur ce projet. Tu as été d'une aide tellement précieuse et je mesure la chance que j'ai eu de tomber sur quelqu'un d'aussi doué, consciencieux et sérieux que toi. Toutes les manip avec toi, même les plus longues, et mon dieu qu'on en a eu, ont été un plaisir à vivre car rien n'est plus agréable que de travailler avec toi. Je te remercie du fond du cœur pour tout ça. Mais au-delà de la collègue, tu sais à quel point je te porte dans mon cœur. Au premier abord, il semblerait que tout nous oppose mais en réalité on se complète et on est juste ultra compatibles ! Au bout de ces quelques années, on a fini par se connaître par cœur et on n'a même plus besoin de se parler tellement on est connectées. On finit nos phrases, on fait les mêmes blagues... C'est pratiquement la dernière étape de ton échelle non ?

Ma Gigi,

La perle rare. L'amie dont tout le monde rêve et dont tout le monde a besoin. La bonté incarnée. Le plus grand cœur que j'ai jamais connu. Je pense que tout le monde sera d'accord avec moi vu la fréquence de leur visite dans notre bureau : une Gigi c'est indispensable. Merci pour ton soutien sans faille, merci pour ta générosité, merci pour tout le temps que tu as pris pour moi. J'espère que tu sais à quel point tu m'as été indispensable pendant ces 5 années et à quel point je veux que tu le restes pour toutes les années à venir.

À Claire et MEA, merci à vous pour tout votre soutien, pour nos discussions, nos échanges, nos partages. Claire, mon Jiminy Cricket, mon disque dur externe, merci pour ta sincérité et ta sensibilité. MEA merci pour ta folie (bien cachée au départ mais quand on la découvre on ne peut plus s'en passer), pour toutes les explications d'expression françaises que tu nous as offertes, mais aussi pour ta bienveillance et ta générosité. Notre trio a vécu bien plus que la vie de labo ensemble, vous êtes dans mon cœur et dans ma vie pour longtemps.

Fatou, on sait toutes les deux que tu es arrivée trop tard dans cette équipe. Je n'aurais profité de ta joie de vivre, de ta bonne humeur et de ton rire pendant qu'une seule année mais je te remercie pour ta gaité et ta spontanéité.

Je veux évidemment remercier tous les autres membres et ex-membres de ce DreamLab que j'ai eu la chance de côtoyer pendant plusieurs mois ou années : Mahmoud, Federica, Abdoulaye, Barbara, Javier, Lucas, Alexia, Zhicheng, Vanesa, Virginie, Ana Inès, Marie Claude, Stefano, Daniil, Aurore, Priscilla. Merci pour tous ces moments, nos discussions, nos petit dej pré-lab meeting, nos super repas à la cantine, nos verres à l'Harmony. Merci d'avoir joué le jeu lors de tous mes délires de secret story, de laser game et de team building.

A tous, merci d'avoir participé à cette incroyable ambiance de travail, si rare. À cet esprit d'équipe, à cet espace d'échange tellement enrichissant. J'ai eu une chance inouïe de pouvoir évoluer dans un tel environnement, entourée de personnes si bienveillantes et j'espère que vous aurez apprécié travailler avec moi autant que j'ai aimé travailler avec vous.

Je veux également remercier tous ceux que j'ai pu croiser à Cassini pendant toutes ces années. Merci pour les nombreuses fois où vous m'avez apporté votre aide, où vous m'avez dépanné d'un anticorps ou deux, où on a pu discuter entre deux manip dans les escaliers ou dans notre bureau parce que vous veniez voir Gigi !

Merci aussi à Florence Niedergang et Catherine Postic qui ont pris du temps pour échanger avec moi et me donner de précieux conseils.

Merci aux membres des différentes plateformes de l'institut Cochin pour leur aide pour la bonne réalisation de mes manip : Gilles Renault et Isabelle Lagoutte sur la PIV, Pierre Bourdoncle à IMAG'IC, Marcio et Rémi à la PRHTEC.

Merci à toutes mes petites super héroïnes qui font tant avancer la science.

Enfin je voudrais évidemment remercier très fort mes amis et mes proches. Merci à tous ceux avec qui j'ai échangé, partagé, à qui j'ai raconté mes péripéties, qui m'ont écouté et conseillé.

Romain, on a commencé nos thèses ensemble, on va les finir ensemble. On a partagé toutes nos galères, nos ressentis, nos résultats, nos manip. Merci pour ton soutien, ton écoute, nos week-ends chez vous et nos parties de 7 wonders.

Maroun, merci pour ton amitié, ton oreille attentive, ton empathie. Et bien sûr, merci pour la motivation et le Nike Training Club ! Loin des yeux, près du cœur, never never give up.

Maman, Papa, Simon, merci de tant croire en moi et de me pousser toujours plus loin. C'est votre soutien et votre amour qui, depuis toujours, me font avancer.

Je finirai par toi mon amour. Je n'aurais pas pu vivre cette expérience de la même façon sans ta présence. Merci d'avoir toujours été là dans les moments heureux ou difficiles, merci de tous les jours me rendre la vie plus belle et plus facile à vivre.

## Table des matières

<b>Remerciements .....</b>	<b>1</b>
<b>Table des figures et tableaux.....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>10</b>
<b>I. Le diabète de type 1 .....</b>	<b>11</b>
I.1 Généralités .....	11
I.2 Histoire naturelle .....	13
I.3 Étiologie .....	15
I.3.1 Facteurs génétiques.....	15
a. Gènes HLA .....	15
b. Gène de l'insuline .....	17
c. Autres gènes de susceptibilité.....	18
I.3.2 Facteurs environnementaux.....	19
a. Les entérovirus .....	19
b. Le microbiote et la théorie de l'hygiène.....	20
I.3.3 Auto-anticorps.....	21
I.4 Immunopathogénèse .....	22
I.5 Traitement du diabète de type 1 .....	24
a. Thérapies anti-inflammatoires .....	24
b. Thérapies immuno-modulatrices.....	25
c. Thérapies cellulaires.....	27
d. Thérapies spécifiques d'antigène.....	27
<b>II. La tolérance immunitaire .....</b>	<b>32</b>
II.1 La tolérance centrale.....	32
II.1.1 La sélection thymique .....	32
a. Les mécanismes de la sélection thymique .....	32
b. La sélection thymique des Tregs .....	35
c. Les cellules dendritiques thymiques.....	38
II.1.2 Sélection clonale et DT1.....	40
a. Un défaut de la sélection thymique à l'origine du DT1 ?.....	40
b. Une remise en question de ce postulat .....	41
c. Un échappement thymique universel.....	43
d. Cibler le thymus pour restaurer la tolérance centrale dans le DT1.....	44
II.2 La tolérance périphérique.....	45



II.2.1 Mécanismes de tolérance périphérique .....	46
a. L'ignorance (A) .....	48
b. L'anergie et la délétion clonale (B).....	48
c. La régulation par les Tregs (C).....	49
d. L'épuisement (D) .....	54
e. L'apoptose (E).....	54
II.2.2 Les défauts de tolérance périphérique dans le DT1 .....	55
a. Défaut des Tregs .....	55
b. Défaut des LT effecteurs.....	57
c. Défaut des APCs.....	58
d. Défaut de la cellule $\beta$ .....	59
e. Tableau récapitulatif.....	61
II.3 Immunité intestinale, tolérance orale et période néonatale.....	62
II.3.1 La <i>lamina propria</i> et les mécanismes de tolérance intestinale.....	62
a. Les phagocytes mononucléaires.....	64
b. Les Tregs .....	67
c. Tolérance intestinale et DT1.....	68
<b>III. Peut-on prévenir le diabète de type 1 ?.....</b>	<b>70</b>
III.1 Les essais de prévention .....	70
III.1.1 La preuve de concept dans les modèles murins .....	70
III.1.2 Les essais cliniques de prévention .....	71
a. Administration de l'antigène .....	71
b. Immunomodulateurs .....	73
III.2 Optimiser les immunothérapies antigène-spécifiques .....	76
III.3 La tolérance périnatale .....	77
III.3.1 Importance de la période périnatale dans la tolérance centrale.....	78
III.3.2 Le récepteur Fc néonatal (FcRn).....	79
III.4 Notre stratégie .....	80
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....</b>	<b>82</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>83</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>117</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>126</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>169</b>
<b>ACTIVITES SCIENTIFIQUES ANNEXES .....</b>	<b>203</b>

# Table des figures et tableaux

<b>Figure 1.</b> Carte de l'incidence du DT1 dans le monde.....	11
<b>Figure 2.</b> Maturation de l'insuline.....	12
<b>Figure 3.</b> Histoire naturelle du DT1.....	14
<b>Figure 4.</b> Loci de susceptibilité au DT1 et répartition des allèles HLA de classe II entre patients diabétiques et individus sains.....	16
<b>Figure 5.</b> Les autoanticorps dans le DT1.....	21
<b>Figure 6.</b> Schéma de l'immunopathogénèse du DT1.....	22
<b>Figure 7.</b> Expression du HLA de classe I et infiltration immunitaire au sein des ilots.....	23
<b>Figure 8.</b> Mode d'action des stratégies d'immunothérapies d'intervention sur les mécanismes d'auto-immunité dans le DT1.....	26
<b>Figure 9.</b> Les mécanismes de la sélection thymique.....	33
<b>Figure 10.</b> Différenciation des Tregs thymiques.....	36
<b>Figure 11.</b> Les différentes APCs du thymus.....	39
<b>Figure 12.</b> L'histoire naturelle d'un LT naïf et les différents mécanismes de tolérance périphérique.....	47
<b>Figure 13.</b> Représentation des différents mécanismes de régulation des Tregs.....	52
<b>Figure 14.</b> Organisation de la muqueuse intestinale et induction de tolérance.....	63
<b>Figure 15.</b> La tolérance orale par le FcRn.....	80
<b>Tableau 1.</b> Principales études cliniques d'immunothérapies d'intervention.....	30
<b>Tableau 2.</b> Les principaux défauts de tolérance périphérique dans le DT1.....	61
<b>Tableau 3.</b> Cellules dendritiques et macrophages dans la <i>lamina propria</i> .....	65
<b>Tableau 4.</b> Principales études cliniques d'immunothérapies de prévention pour le DT1.....	75
<b>Figure Additionnelle 1.</b> Résultats préliminaires de l'incidence de diabète chez la souris NOD.G9C8 traitée par PPI-Fc orale.....	121
<b>Figure Additionnelle 2.</b> Séquence peptidique de PoPe-Fc.....	123

# Liste des abréviations

<b>AhR</b> : aryl hydrocarbon receptor	<b>GALT</b> : Tissu lymphoïde associé à l'intestin
<b>AICD</b> : Activated-Induced Cell Death	<b>GP</b> : Glycoprotéine
<b>Aire</b> : Autoimmune Regulator	<b>GRAIL</b> : Gene Related to Anergy In Lymphocytes
<b>AKT</b> : Protein kinase B	<b>GWAS</b> : Études d'association pangénomique
<b>APC</b> : Cellules Présentatrices d'Antigène	<b>HA</b> : Hémagglutinine
<b>APECED</b> : Polyendocrinopathie auto-immune de type 1	<b>HbA1c</b> : Hémoglobine glyquée
<b>ATG</b> : Anti-Thymocyte Globulin	<b>HLA</b> : Antigène Leucocytaire Humain
<b>Bcl-2</b> : B-cell lymphoma 2	<b>IA-2</b> : Islet-cell Autoantibody
<b>Bim</b> : Bcl-2-like protein	<b>IAA</b> : Insulin Autoantibody
<b>CCL</b> : C-C Chemokine Ligand	<b>ICOS</b> : Inducible T-cell Costimulatory
<b>CCR</b> : C-C Chemokine Receptor	<b>IDO</b> : Indoleamine 2,3-dioxygenase
<b>CD</b> : Cluster of Differentiation	<b>IFN</b> : Interferon
<b>CMH</b> : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	<b>Ig</b> : Immunoglobuline
<b>cTECs</b> : Cellules Épithéliales Thymiques corticales	<b>IGRP</b> : Islet-specific Glucose-6-phosphatase catalytic subunit-Related Protein
<b>CTLA-4</b> : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4	<b>IL</b> : Interleukin
<b>CVB</b> : CoxsackieVirus B	<b>IL2RA</b> : Interleukin 2 Receptor Alpha
<b>CX3CR1</b> : fractalkine receptor	<b>IPEX</b> : Syndrome d'Immunodérégulation, de Polyendocrinopathie et d'Entéropathie lié au chromosome X
<b>CXCL</b> : C-X-C motif Chemokine Ligand	<b>ITE</b> : 2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester
<b>DC</b> : Cellule Dendritique	<b>LAG-3</b> : Lymphocyte-Activation Gene 3
<b>DT1</b> : Diabète de Type 1	<b>LB</b> : Lymphocyte B
<b>DTH</b> : Réponse d'Hypersensibilité Retardée	<b>LCMV</b> : Virus de la Chorioméningite Lymphocytaire
<b>EAE</b> : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale	<b>LT</b> : Lymphocyte T
<b>Egr</b> : Early growth response	<b>LP</b> : Lamina Propria
<b>FcRn</b> : Récepteur néonatal aux Fc	<b>MBP</b> : Protéine Basique de la Myéline
<b>Foxp3</b> : Forkhead box P3	
<b>FR4</b> : Folate Receptor 4	
<b>GAD</b> : Glutamate Decarboxylase	

**MLN** : Ganglions Lymphatiques  
Mésentériques  
**MP** : Phagocytes Mononucléaires  
**mTECs** : Cellules Épithéliales  
Thymiques médullaires  
**NK** : Natural Killer  
**NOD** : Non Obese Diabetic  
**OR** : Odds Ratio  
**OVA** : Ovalbumine  
**PBMC** : Cellules Mononuclées du Sang  
Périphérique  
**pCMH** : Complexe peptide/CMH  
**PD-1** : Programmed cell Death 1  
**pDC** : Cellule Dendritique  
plasmacytoïde  
**PI** : Proinsuline  
**PI3K** : Phosphoinositide 3-Kinase  
**PLN** : Ganglions Lymphatiques  
Pancréatiques  
**PP** : Plaques de Peyer  
**PPI** : Préproinsuline  
**PTPN22** : Protein Tyrosine  
Phosphatase Non receptor type 22  
**RA** : Acide Rétinoïque  
**SCID** : Severe Combined Immuno-  
Deficiency  
**SIRPalpha** : Signal Regulatory Protein  
**SOPF** : Specific and Opportunistic  
Pathogen Free  
**STAT** : Signal Transducer and  
Activator of Transcription  
**TCF1** : Transcription factor T-cell  
Factor 1  
**TCR** : Récepteur des Cellules T  
**Teff** : Lymphocyte T effecteur  
**TGF-β** : Tumor Growth Factor β  
**Th** : Lymphocytes T helper

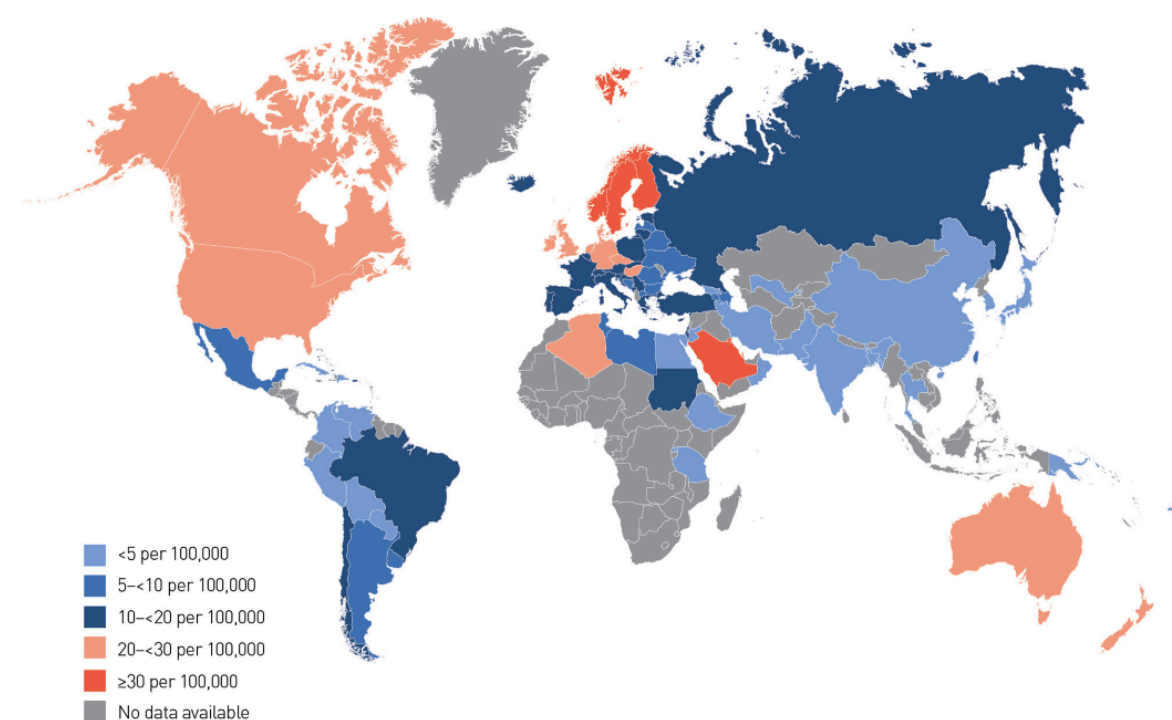
**TIM3** : T-cell Immunoglobulin Mucin-3  
**TMR** : Tétramère  
**TNF-α** : Tumor Necrosis Factor α  
**Tr1** : Type 1 regulatory T cell  
**TRA** : Antigène Spécifique des Tissus  
**Treg** : Lymphocyte T régulateur  
**UPR** : Unfolded Protein Response  
**VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion  
Molecule-1**  
**VLA-4 : Very Late Antigen-4**  
**VNTR** : Motif de Répétition en Tandem  
Polymorphe  
**XCL** : X-C motif Chemokine Ligand  
**XCR** : X-C motif Chemokine Receptor  
**ZnT8** : Zinc-Transporter 8

# INTRODUCTION

# I. Le diabète de type 1

## I.1 Généralités

Le diabète touche plus de 460 millions de personnes à travers le monde (1). Le diabète de type 1 (DT1) représente environ 10% de ces cas. Il s'agit d'un véritable problème de santé publique dont le nombre de cas ne cesse d'augmenter, à un rythme d'environ 3% par an en France.

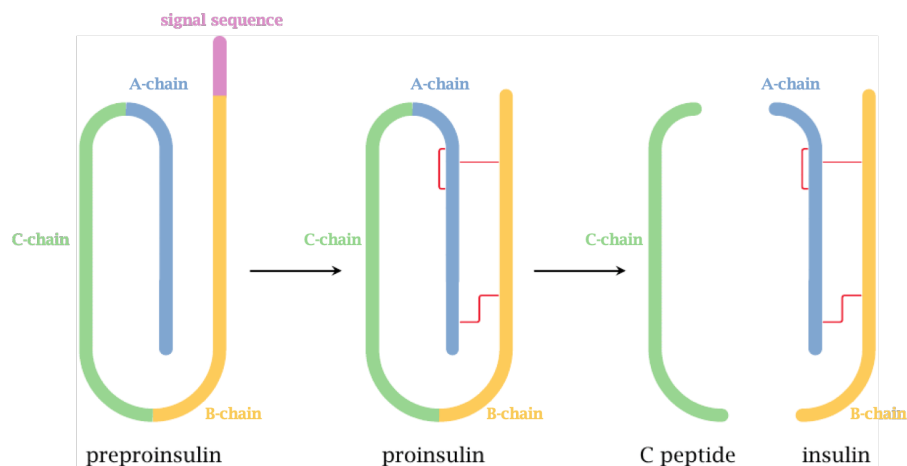


**Figure 1. Carte de l'incidence du DT1 dans le monde** (Patterson et al. Diabetes Res Clin Pr 2019).

Le DT1 se développe très tôt, le plus souvent chez les enfants et adolescents (le pic d'incidence est observé entre 10 et 14 ans), mais il peut survenir à tout âge. Il y a autant d'adultes que d'enfants diabétiques de type 1, même si l'auto-immunité sous-jacente est probablement moins agressive chez l'adulte (2). L'incidence est très variable selon les zones géographiques, on observe notamment un gradient Nord/Sud (**Figure 1**), avec des chiffres allant de 0,6 nouveaux cas pour 100 000 personnes par an en Chine, jusqu'à 60 pour 100 000 en Finlande (International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium: 2019. Disponible sur : <https://www.diabetesatlas.org>).

Cependant, à l'échelle mondiale, l'incidence est en constante augmentation, le nombre de nouveaux cas par an ayant doublé depuis 25 ans. Les mécanismes derrière ces différences géographiques et cette augmentation globale de l'incidence sont largement attribués à des influences environnementales qui restent mal précisées.

Le DT1 résulte d'une carence en insuline, normalement produite par les cellules  $\beta$  situées dans les îlots de Langerhans du pancréas. Le plus souvent, le diagnostic a lieu devant des symptômes de polydipsie et polyurie (le duo classique de symptômes associés à l'apparition du diabète en général) et de perte de poids, qui reflète une insulino-pénie et est quant à lui plutôt associée au DT1 (3, 4). Le diagnostic repose sur une mesure de glycémie qui doit être supérieure à 7 mmol/L (126 mg/dL) si effectuée à jeun, ou supérieure à 11,1 mmol/L (200 mg/dL) hors jeun. Il est aussi possible de diagnostiquer la maladie si des résultats anormaux sont obtenus suite à un test de tolérance au glucose par voie orale. En 2009, l'*American Diabetes Association* a modifié ses directives pour le diagnostic du diabète afin d'inclure l'hémoglobine glyquée (HbA1c), correspondant à une forme de l'hémoglobine ayant fixé le glucose circulant et qui permet d'obtenir une valeur moyenne des concentrations de glucose dans le sang sur 3 mois. La valeur seuil est fixée à 6,5%. (4).



**Figure 2. Maturation de l'insuline.** Le précurseur à l'insuline, la préproinsuline, est composée des chaînes A, B et C et d'une séquence signal. Un premier clivage permet l'élimination de la séquence signal, donnant ainsi la proinsuline. Le clivage du peptide C permet la génération de l'insuline fonctionnelle. Tiré de : <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/Hormones.html#hormonesInsulinwatcut.com>

Un dosage du taux de peptide C est également pertinent pour évaluer la gravité de la pathologie. En effet, le peptide C est issu du clivage de la proinsuline

(PI) en insuline et est libéré en même temps que cette dernière (**Figure 2**). Il reflète donc la capacité des cellules  $\beta$  du patient à produire et sécréter de l'insuline. Une valeur de peptide C faible correspond donc à un manque d'insuline et par conséquent à un besoin d'apport en insuline exogène.

Cependant, le diagnostic intervient de manière très tardive par rapport à l'évolution de la maladie, qui débute plusieurs mois à plusieurs années auparavant. Cette longue phase pré-symptomatique et silencieuse est marquée par le développement progressif d'une auto-immunité anti-cellule  $\beta$ , qui peut être révélée par le dosage des auto-anticorps dirigés contre l'insuline (IAA, pour *insulin autoantibodies*), la décarboxylase de l'acide glutamique (GAD65), la *insulinoma-associated antigen 2* (IA-2) et le transporteur 8 du zinc (ZnT8).

## I.2 Histoire naturelle

L'histoire naturelle du DT1 a été modélisée en 1986 par George Eisenbarth (5) et, bien qu'adapté depuis (6), ce modèle est encore largement utilisé de nos jours (**Figure 3**). Il décrit l'évolution de la fonction insulino-sécrétrice des cellules  $\beta$  en fonction du temps, suivant une séquence d'événements commençant par une prédisposition génétique (stade 0, (A)) suivie d'événements extérieurs (environnementaux) qui vont précipiter le processus auto-immun spécifique aux îlots (B). Que cette réponse immunitaire soit induite par un déclencheur particulier ou qu'elle soit due à une succession d'événements stochastiques reste encore aujourd'hui un sujet de spéculation et de controverse. La phase suivante est une phase asymptomatique d'auto-immunité infra-clinique (C) qui se caractérise par la présence d'au moins deux auto-anticorps anti-îlots, associée à une glycémie normale (stade 1) puis altérée sans pour autant être encore symptomatique (stade 2). Il s'agit d'une phase critique, marquée par l'activation de différents mécanismes d'auto-immunité conduisant à la destruction croissante des cellules  $\beta$  par des lymphocytes T (LT) auto-réactifs. Lorsque le patient présente les signes cliniques associés à une hyperglycémie franche (polyuro-polydipsie et éventuellement perte de poids, discutés plus haut), le diabète est déclaré (stade 3, (D)) et on assiste à une progression vers une perte complète des cellules  $\beta$  (E), dont le timing est extrêmement variable, qui est plus rapide chez l'enfant que chez l'adulte (7).



Ce modèle, très utile, schématise la pathogénèse du DT1 de manière simplifiée mais linéaire alors qu'il est nécessaire de tenir compte de la complexité de plus en plus apparente de cette maladie. En effet, à chacun des stades, il existe

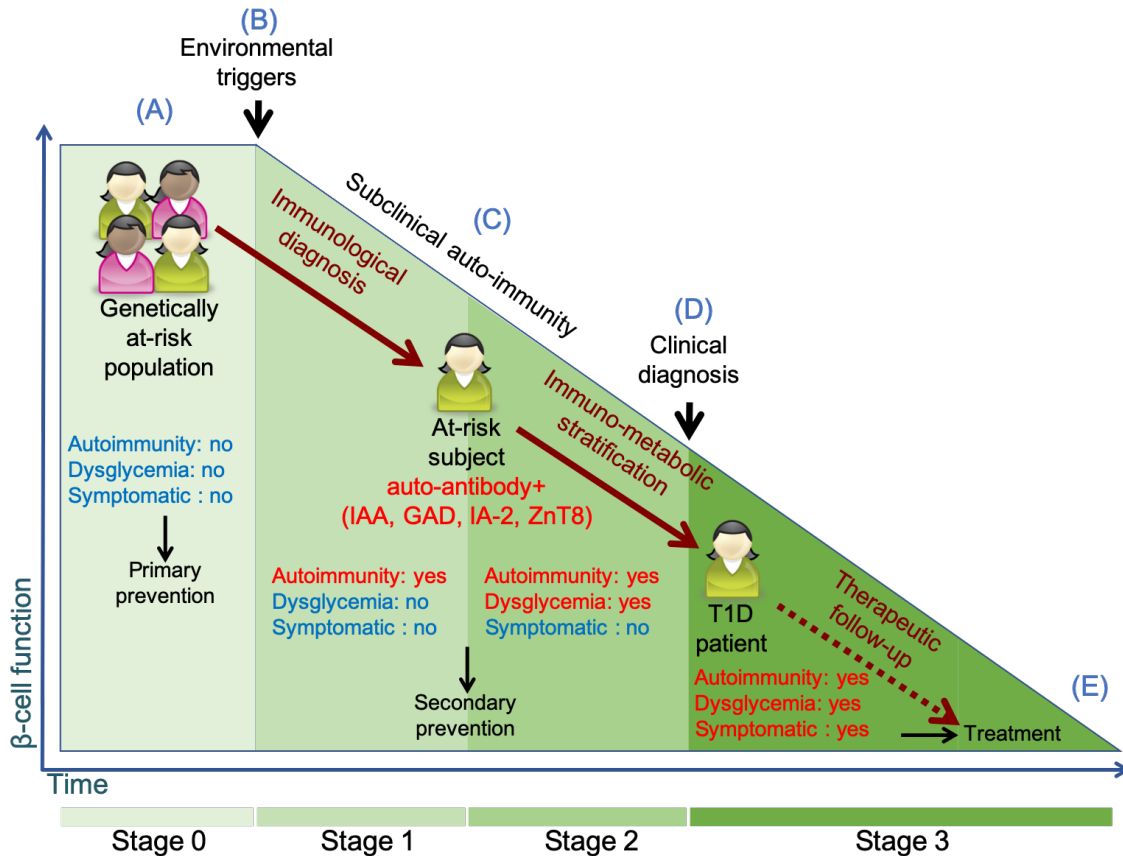


Figure 3. Histoire naturelle du DT1.

une hétérogénéité qui n'est pas complètement comprise aujourd'hui. Tout d'abord, la progression vers le déclenchement du processus auto-immun (de (A) vers (B)) est hétérogène et est affectée par des caractéristiques génétiques mais aussi immunitaires, environnementales et démographiques (âge, indice de masse corporelle) (3, 8). D'autre part, il existe entre les individus une grande variation de la masse et de la fonction initiales des cellules  $\beta$ . Des défauts dans l'un ou les deux pourraient être induits ou programmés au cours du développement et ainsi donner des issues différentes en fonction de chacun (3). Par ailleurs, le déclin de la fonction des cellules  $\beta$  pourrait ne pas refléter correctement le déclin de leur masse car aucune méthode d'imagerie pour la mesure de la masse des cellules  $\beta$  n'a été établie. Enfin, tous les individus présentant des signes d'auto-immunité, notamment les individus avec un seul auto-anticorps, ne progresseront pas vers un diabète manifeste, pour des raisons qui restent mal comprises (9).

Les recherches sur l'histoire naturelle du DT1 qui visent à classifier et stratifier les patients ou individus à risque sont critiques afin de comprendre les mécanismes pathologiques sous-jacents. En effet, le suivi d'enfants à risque dans l'étude DAISY a permis d'optimiser la prise en charge de ces patients en passant de 44 à 3% d'hospitalisations au diagnostic. Ces hospitalisations étaient notamment liées à l'acidocétose, une complication aigüe pouvant également accélérer le déclin de la fonction  $\beta$ -cellulaire résiduelle (10, 11). De plus, une insulinothérapie intensifiée juste après le diagnostic du DT1 peut permettre de limiter la progression de la maladie (12), maintenir une insulino-sécrétion résiduelle (13) et, surtout, réduire la morbi-mortalité associée (14). Ces différentes observations suggèrent que la prise en charge et le traitement de patients très précocement améliorent les résultats à long terme.

Afin de concevoir des essais cliniques plus efficaces en termes de durée, coût et rapport risques-bénéfices, il faut pouvoir prédire la progression de la maladie selon des critères précis. L'affinement des différents stades de l'histoire naturelle de la maladie et de la stratification pronostique des patients est donc un élément clé pour optimiser le bénéfice clinique (6).

## I.3 Étiologie

### I.3.1 Facteurs génétiques

Aujourd'hui, une seule étude a recensé une forme monogénique de DT1 (15). En dehors de cette forme très rare, le DT1 est défini comme une maladie polygénique. Grâce à des études d'association pangénomiques (GWAS) effectuées sur des cohortes de patients diabétiques et de sujets sains, plus de 50 loci ont été identifiés comme étant des loci de susceptibilité pour le DT1 (loci IDDM, pour « *insulin-dependent diabetes mellitus* ») (16) (**Figure 4**).

#### a. Gènes HLA

Le locus de l'antigène leucocytaire humain (HLA chez l'homme ; aussi appelé complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) chez l'homme et la souris) sur le chromosome 6p21 représente plus de 50% du risque génétique attribuable (17). Il s'agit notamment des haplotypes de classe II HLA-DR et HLA-DQ,

responsables de la présentation de l'antigène par les lymphocytes B (LB), les cellules dendritiques (DCs) et les macrophages aux LT CD4<sup>+</sup>.

En fonction des allèles, on peut établir une hiérarchie dans la susceptibilité, allant de la protection à un risque élevé. L'haplotype DR2-DQ6 (DRB1\*15:01/DQA1\*01:02-DQB1\*06:02), retrouvé dans 20% de la population générale mais seulement chez 1% des patients, confère une protection dominante contre le DT1 (18). À l'autre l'extrémité de ce spectre se trouvent des individus avec l'haplotype hétérozygote DR3/DQ2 et DR4/DQ8 (DR3 est DRB1\*03, DQ2 est DQB1\*02:01, DR4 est DRB1\*04, DQ8 est DQB1\*03:02 ; DR3 et DR4 étant en déséquilibre de liaison génétique avec DQ2 et DQ8, respectivement) (18). Si les haplotypes DR3/DQ2 et DR4/DQ8 isolés confèrent un risque moindre, ils ont un effet particulièrement fort en association (**Figure 4**).

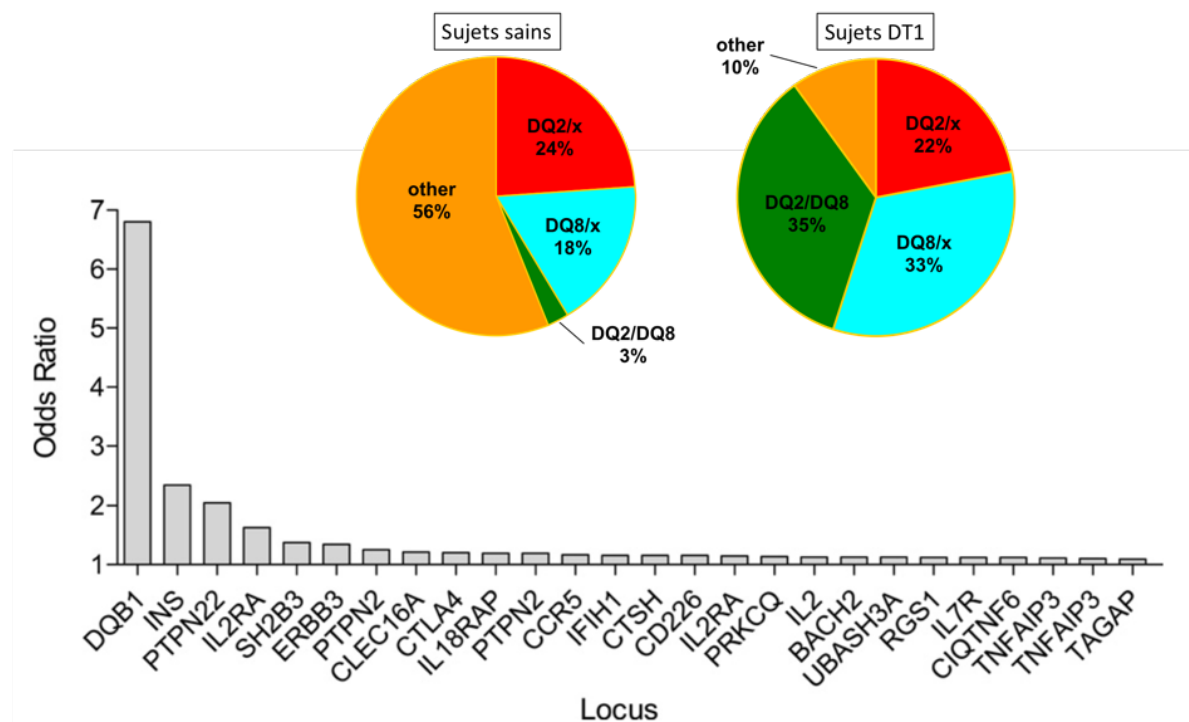


Figure 4. Loci de susceptibilité au DT1 et répartition des allèles HLA de classe II entre patients diabétiques et individus sains. Adapté de Brezar et al Endoc Rev 2011.

Dans les études génétiques, l'*odds ratio* (OR) est la mesure statistique utilisée pour calculer si un polymorphisme nucléotidique (SNP, *single-nucleotide polymorphism*) donné est associé à la maladie. Un OR de 1 implique que l'événement est également probable dans les groupes de patients et de contrôles. Les OR des allèles prédisposant à des troubles complexes sont généralement modestes, souvent de l'ordre de 1,2 à 1,3, et même la région HLA a une valeur

prédictive de seulement 6,8 (19). A titre comparatif, l'allèle HLA-DBQ1\*06:02 (protecteur pour le DT1) est associé à un OR de 251 dans la narcolepsie (20).

Une association tout aussi cohérente, quoique sensiblement moins importante, a été trouvée pour les allèles de classe I (21). Différentes études ont démontré qu'après avoir pris en compte l'influence dominante des gènes de classe II, une partie de l'association résiduelle dans la région HLA peut être attribuée aux gènes HLA-B et HLA-A. Plus particulièrement, la présence de l'allèle HLA-B\*39 est un facteur de risque important et est associée à un plus jeune âge au diagnostic (22). En 2013, Mbunwe et al ont montré que les allèles HLA-A\*24 et HLA-B\*18 sont associés à un risque accru chez les individus positifs pour les auto-anticorps et apparentés à des patients DT1 (23).

Il est toutefois important de noter que la majorité des individus possédant un allèle HLA à risque ne développera jamais de DT1. La valeur prédictive du HLA est donc relativement faible, et il est nécessaire de trouver d'autres biomarqueurs de risque pour évaluer avec précision la probabilité d'un individu de développer un DT1 symptomatique (6).

## b. Gène de l'insuline

Une deuxième prédisposition génétique, bien qu'ayant un impact moindre, est attribuée au locus du gène de l'insuline. Une cartographie détaillée a montré que la sensibilité résidait dans le motif de répétition en tandem polymorphe (VNTR, *variable number of tandem repeats*) dans la région promotrice du gène de l'insuline (24, 25). L'ampleur du risque est corrélée avec le nombre de ces répétitions en tandem, les individus présentant un VNTR de type I (avec des répétitions plus courtes) homozygotes étant considérés comme ayant le risque le plus élevé de développer le DT1, tandis que les individus avec des VNTR de type III (répétitions plus longues) sont protégés. Les VNTR régulant les niveaux d'expression d'insuline dans le thymus (26, 27), l'hypothèse prédominante est que la taille de ces VNTR affecte la liaison du facteur de transcription AIRE (*Auto-Immune REgulator*) à sa région promotrice. Par conséquent, le VNTR de type I induira une transcription plus faible de l'insuline dans le thymus, conduisant à une tolérance réduite et à un risque accru de DT1. Inversement, les LT réactifs à l'insuline sont éliminés plus efficacement par sélection négative dans le thymus d'individus porteurs de la variante allélique protectrice VNTR de type III (28).

### c. Autres gènes de susceptibilité

De nombreux autres loci de prédisposition ont été décrits de façon très exhaustive par les études GWAS, mais aucun ne correspond à la forte association trouvée avec la région HLA. Parmi eux se trouvent beaucoup de gènes de l'immunité. Les plus fortes contributions proviennent en particulier de *PTPN22* (29), *IL2RA* (30) et *CTLA4* (31), qui contribuent d'ailleurs à la susceptibilité pour d'autres maladies auto-immunes (19).

*PTPN22* code pour la phosphatase LYP (*lymphoid tyrosine phosphatase*), un régulateur important de la signalisation du récepteur des LT (TCR, *T-cell receptor*) qui agit en déphosphorylant des molécules clés de la voie d'activation des LT (32). Si les mécanismes de susceptibilité ne sont pas encore connus, on pourrait imaginer que la perte de fonction de cette protéine provoquerait une activation plus importante des LT auto-réactifs. Au contraire, un gain de fonction pourrait limiter la stimulation du TCR dans le thymus ou à la périphérie et favoriser l'échappement des LT de la sélection négative ou leur activation à la périphérie (cf. partie II.1) (33).

*IL2RA* code pour la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2, aussi appelée CD25 (30, 34, 35). L'expression de CD25 est induite à la surface des LT après activation, mais elle est constitutive sur les lymphocytes T régulateurs (Tregs). Ces derniers dépendent de l'IL-2 pour leur survie et leur croissance, et une variation allélique du gène *IL2RA* pourrait donc impacter la fonction des Tregs chez les individus DT1 (36).

Enfin, le gène *CTLA4* (31, 37) code pour la protéine homonyme CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-Associated protein 4*) qui régule les réponses immunitaires, et son absence dans des modèles de souris *Ctla4*<sup>-/-</sup> induit un syndrome lymphoprolifératif particulièrement sévère et létal (38). Bien que les mécanismes associés aux polymorphismes de *CTLA4* dans le DT1 ne soient pas élucidés, ces données suggèrent une perturbation des mécanismes de tolérance périphériques (cf. partie II.2).

Les variations génétiques influencent donc le déclenchement et la progression de la maladie, mais elles ne peuvent pas tout expliquer. En effet, la concordance pour un DT1 chez des jumeaux monozygotes n'atteint que 65 à 70% dans l'étude disposant du suivi le plus long (39), avec des taux plus haut si le DT1 est apparu très tôt (40). Les facteurs environnementaux jouent donc le rôle plus important.

## I.3.2 Facteurs environnementaux

Contrairement aux progrès rapides dans la recherche de gènes de susceptibilité, l'identification et la validation des facteurs environnementaux associés au déclenchement ou à la prédisposition du DT1 restent encore un très grand défi, poursuivi notamment par l'étude TEDDY (*The Environmental Determinants of Diabetes in the Young*) (41). Un grand nombre de ces facteurs a été évoqué, allant de l'environnement intra-utérin, aux virus, au microbiote ainsi qu'aux antibiotiques et au régime alimentaire (42-44), mais un lien de causalité n'a jamais été clairement établi. Une prévention par élimination des déclencheurs environnementaux est donc difficile à réaliser, d'autant plus que le diagnostic intervient après une longue période asymptomatique. Il est alors possible que les événements incitatifs ne laissent aucune trace moléculaire détectable au moment de la découverte clinique du DT1. Enfin, l'initiation de l'auto-immunité pourrait impliquer l'action concomitante ou séquentielle de plusieurs facteurs environnementaux fragilisant la cellule  $\beta$ . Ces éléments extérieurs seraient interprétés par l'organisme comme des signaux de dangers, déclenchant ou précipitant le DT1.

### a. Les entérovirus

Un des éléments le plus associé au développement du DT1 sont les infections virales (45). En effet, de nombreuses données incriminent la famille des entérovirus, et plus particulièrement les coxsackievirus B (CVB) en tant que cause précipitante du DT1 (46). Ce virus, capable d'infecter les cellules  $\beta$ , serait responsable, du moins en partie, de l'activation du système immunitaire contre les cellules  $\beta$ . En effet, ils peuvent induire une réponse interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) qui induit une surexpression des molécules HLA de classe I par les cellules  $\beta$ , deux caractéristiques retrouvées dans les mécanismes de pathogénèse du DT1 (47-50). Cela rendrait les cellules  $\beta$  plus visibles par le système immunitaire et ce, dans un contexte inflammatoire. Deux hypothèses sont actuellement discutées sur ce processus. La première serait qu'à l'issue de l'infection des cellules  $\beta$  par le CVB, ces dernières seraient lysées, relarguant ainsi massivement des antigènes  $\beta$  dans un environnement inflammatoire, menant à l'activation du système immunitaire. La seconde serait une présentation d'antigènes viraux à la surface des cellules  $\beta$ ,

via le HLA de classe I, déclenchant ainsi leur destruction par les cellules immunitaires. Une recherche est en cours visant à identifier ces peptides CVB et les LT CD8<sup>+</sup> les reconnaissant, ainsi qu'à déterminer si un mimétisme moléculaire avec un peptide issu d'une protéine du soi pourrait expliquer la destruction anormale des cellules  $\beta$  saines (51-53). Le lancement d'essais cliniques de vaccination par le CVB pour prévenir le DT1 souligne l'intérêt porté à cette piste de recherche (54).

## **b. Le microbiote et la théorie de l'hygiène**

La composition bactérienne de l'intestin est reconnue depuis longtemps comme une variable importante affectant le développement du DT1. Des études dans le modèle de souris *non obese diabetic* (NOD, qui développe spontanément un DT1) ont montré que l'incidence du diabète augmente dans des colonies de souris élevées en conditions spécifiques sans pathogènes (SOPF) ou lors de l'administration d'antibiotiques, et que les altérations du microbiome intestinal peuvent modifier de manière significative l'incidence du DT1 (55-57). À l'inverse, l'administration de probiotiques pendant plusieurs semaines à partir du sevrage peut réduire l'auto-immunité anti-îlot voire prévenir l'apparition du DT1 chez la NOD (58). Ces observations pourraient potentiellement expliquer le gradient d'incidence Nord/Sud : les pays ayant des pratiques sanitaires plus strictes montrent une incidence plus élevée de DT1.

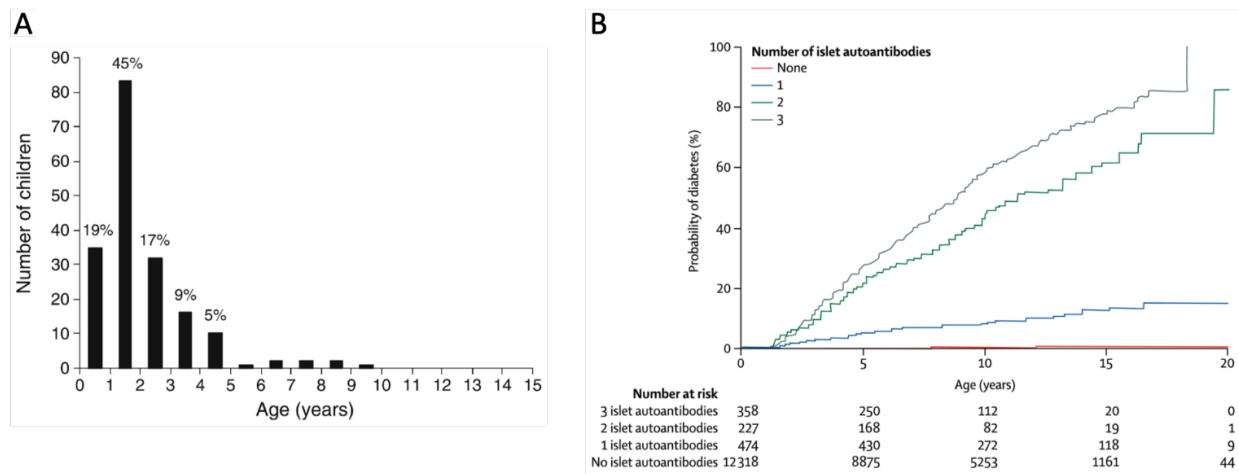
De plus, une étude intéressante de Kostic et al révèle une altération du microbiote chez les enfants à risque, intervenant après la séroconversion mais avant l'apparition du DT1 (59).

Enfin, la paroi intestinale ne semble pas avoir la même capacité à former une barrière efficace séparant les bactéries luminales et le système immunitaire dans les modèles murins et chez les patients DT1 par rapport aux sujets témoins (60, 61). On pense que ce phénotype appelé «*leaky gut*» permettrait le passage de bactéries ou d'antigènes bactériens à travers la barrière intestinale, induisant des réponses Th1 et Th17. Cet environnement cytokinique inflammatoire pourrait contribuer à l'activation des LT auto-réactifs de la LP, qui migreraient ensuite jusqu'au pancréas pour détruire les cellules  $\beta$ . (60, 62).

### I.3.3 Auto-anticorps

Plus de 90% des personnes nouvellement diagnostiquées diabétiques de type 1 présentent un ou plusieurs auto-anticorps ciblant des antigènes de la cellule  $\beta$  (IAA, GAD65, IA-2, ZnT8) (63). A ce jour, aucun rôle pathogène de ces auto-anticorps n'a été démontré. En particulier, le transfert maternel des auto-anticorps au fœtus n'augmente pas le risque de DT1 chez la progéniture et semble même avoir un certain effet protecteur (64). D'autre part, aucun des auto-antigènes connus n'est exprimé à la surface des cellules  $\beta$  et aucun effet direct des auto-anticorps sur la fonction des cellules  $\beta$  n'a été observé.

Ces auto-anticorps sont plutôt des marqueurs de la réponse auto-immune anti-cellule  $\beta$  et constituent les meilleurs éléments de diagnostic étiologique et de prédiction du DT1 (6). Des études sur des cohortes d'individus présentant un risque génétique élevé de DT1 et suivis dès la naissance ont montré que la première séroconversion pour l'un de ces auto-anticorps intervenait très tôt, avant l'âge de 2 ans (65) (**Figure 5A**). Ainsi, ils sont présents de plusieurs mois à plusieurs années avant l'apparition des symptômes d'hyperglycémie. De plus, le nombre d'auto-anticorps est le paramètre plus important pour la prédiction de l'évolution de la maladie dès le plus jeune âge : plus ce nombre est élevé, plus le risque de développer un DT1 croît (**Figure 5B**) (3).



**Figure 5. Les autoanticorps dans le DT1.** A : Age des enfants ayant développé un DT1 par la suite, à la séroconversion (Parikka et al Diabetologia 2012) B : Risque du développement du DT1 en fonction du nombre d'autoanticorps anti-ilots (DiMeglio et al The Lancet 2018).

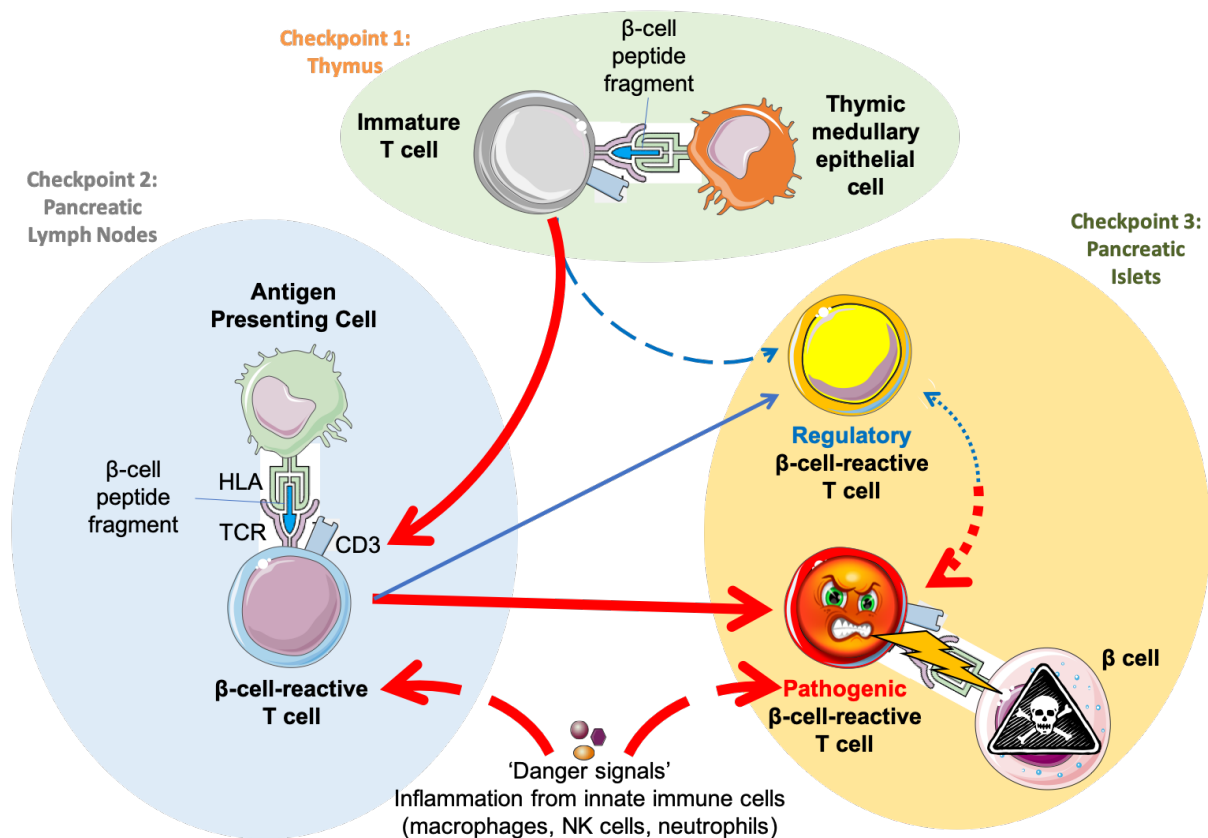
Les auto-anticorps sont donc utilisés pour identifier les individus pouvant présenter un risque accru de développer la maladie, en dépistant les personnes



apparentées ou la population générale. Ils ne sont cependant pas parfaits et marquent déjà une étape avancée du processus auto-immun. Ainsi, des efforts de recherche sont engagés pour identifier de nouveaux marqueurs prédictifs de l'initiation des mécanismes d'auto-immunité, avec l'idée que d'autres anomalies immunologiques, notamment au niveau des LT, précèdent probablement la présence des auto-anticorps pancréatiques (28, 66).

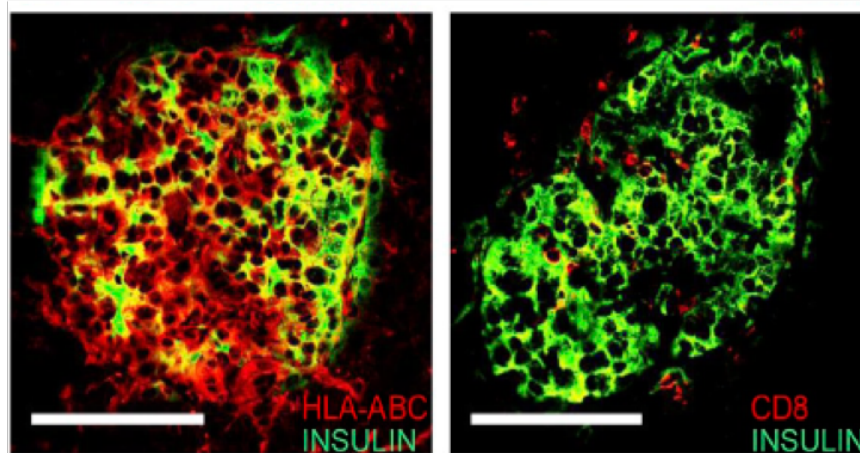
## I.4 Immunopathogénèse

Le processus auto-immun (**Figure 6**) débute par un échappement du thymus des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> auto-réactifs dû à un défaut de sélection négative (cf partie



**Figure 6. Schéma de l'immunopathogénèse du DT1.** Dans le thymus, la sélection clonale mène à la délétion de clones auto-réactifs ou la génération de Tregs. Cependant, certains clones peuvent échapper à cette sélection, et ce phénomène représente la première étape de la l'immunopathogénèse du DT1. Une fois en périphérie, ces LT peuvent migrer dans les PLN et reconnaître leur antigène spécifique présenté par une APC. Cette rencontre peut mener à la différenciation en Tregs mais si elle a lieu dans un contexte inflammatoire, les LT peuvent s'activer, et adopter un profil pathogène. Ils migreront alors jusqu'au îlots du pancréas où ils procéderont à la destruction des cellules β.

II.1.2). Lorsque ces cellules se retrouvent en périphérie, elles vont rencontrer des cellules présentatrices d'antigènes (APC) présentant des peptides issus de protéines des cellules  $\beta$  et ayant migré du pancréas vers les ganglions lymphatiques pancréatiques (PLN). Effectuée dans des conditions inflammatoires, cette interaction conduit à l'activation des LT  $CD4^+$  et  $CD8^+$  auto-réactifs. Cette inflammation est portée par des signaux de danger et la production de cytokines et d'espèces réactives de l'oxygène par des cellules immunitaires innées présentes au sein du pancréas ou des PLN (macrophages, cellules « *natural killer* » (NK), neutrophiles),



**Figure 7. Expression du HLA de classe I et infiltration immunitaire au sein des îlots.** Coupe d'îlots pancréatiques marqué par fluorescence avec un anticorps anti-insuline (vert) et, en rouge, un anticorps anti HLA-ABC (gauche) ou anti-CD8 (à droite) (Coppieters et al J Exp Med 2012).

Si différentes catégories de cellules sont impliquées dans la pathogénèse du DT1, la population des LT  $CD8^+$  est directement responsable de la destruction des cellules  $\beta$ . Une des caractéristiques principales du DT1 est d'ailleurs l'observation d'un infiltrat immunitaire (insulite) dominé par les LT  $CD8^+$  au sein des îlots pancréatiques, accompagné par une surexpression des molécules du HLA de classe I par les cellules  $\beta$  (47, 48) (**Figure 7**). Ces deux éléments vont permettre un dialogue entre ces deux cellules : le TCR des LT  $CD8^+$  va reconnaître spécifiquement des peptides présentés par les molécules du HLA de classe I à la surface des cellules  $\beta$ . C'est cette interaction qui aboutit à la destruction des cellules  $\beta$  par les LT  $CD8^+$ .

Les LT  $CD4^+$  activées dans les PLN stimulent également les LB à produire des auto-anticorps contre les protéines des cellules  $\beta$ . Les Tregs s'avèrent

incapables de contrôler efficacement les réponses auto-immunes, et sont par ailleurs absents dans les infiltrats pancréatiques chez l'homme ou dans les pancréas des individus non diabétiques (67).

## I.5 Traitement du diabète de type 1

Lors du diagnostic du DT1, on estime que près de 70 à 80% des cellules  $\beta$  du pancréas n'assurent plus leur fonction, et le patient n'est plus en mesure de produire suffisamment d'insuline pour couvrir les besoins de l'organisme (8). Le traitement principal consiste donc en des injections d'insuline exogène, plusieurs fois par jour. Contraignant et essentiellement palliatif, il est nécessaire tout au long de la vie pour réguler correctement la glycémie. Il n'empêche cependant pas la survenue de complications secondaires sur le long terme (néphropathie, maladies cardiovasculaires, neuropathies, rétinopathie), dues à des glycémies qui restent, chez la majorité des patients, contrôlées de manière imparfaite. Ainsi, différentes stratégies thérapeutiques, visant les acteurs immunitaires impliqués dans le DT1, ont été testées dans le but de guérir de la maladie. Elles sont présentées brièvement ci-dessous et sont résumées dans le **Tableau 1** et la **Figure 8**.

### a. Thérapies anti-inflammatoires

L'environnement inflammatoire étant une composante clé dans la réponse auto-immune du DT1, une première stratégie repose sur le ciblage des cytokines pro-inflammatoires produites notamment par les cellules du système immunitaire inné qui infiltrent les îlots et qui contribuent à activer les LT et à perturber le fonctionnement et la survie de la cellule  $\beta$ . En particulier, des anticorps monoclonaux bloquant le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  ont été testés chez des patients nouvellement diagnostiqués, mais n'ont pas donné de bénéfices cliniques significatifs (68, 69). Ces essais ont toutefois permis de mesurer la sécurité de ces monothérapies, qui s'est révélée rassurante. Ces agents pourraient se révéler utiles en combinaison avec d'autres approches, ciblant les LT notamment.

## b. Thérapies immuno-modulatrices

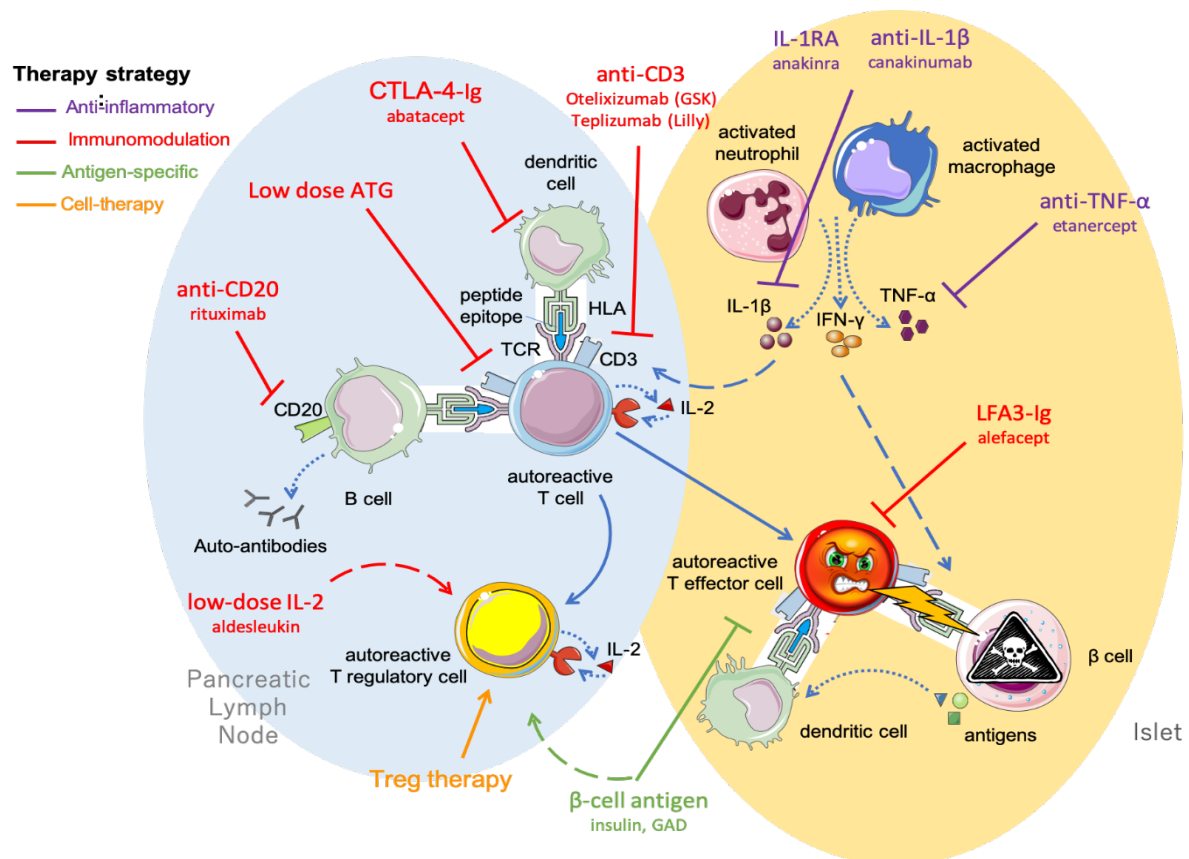
D'autres stratégies d'immuno-intervention consistent à cibler les acteurs immunitaires de l'auto-immunité anti-îlots, en particulier les LT responsables de la destruction des cellule  $\beta$  .

L'anticorps monoclonal anti-CD3 a fait l'objet de plusieurs essais dans le domaine, avec l'utilisation de deux molécules : l'otelixizumab de GSK et le teplizumab de Lilly/Provention Bio. Ces anticorps agissent par différents mécanismes, modulant l'expression du complexe TCR/CD3 à la surface des LT les rendant incapables de lier l'antigène à court terme, induisant une déplétion préférentielle des LT effecteurs (Teffs) tout en préservant les Tregs Foxp3<sup>+</sup>. Les essais cliniques de phase I/II utilisant l'un ou l'autre de ces anti-CD3 ont montré des résultats très encourageants : préservation du peptide C, besoins en insuline réduits à des doses modestes (70-72). Il est important de noter que ces effets sont moindres chez les patients ayant une fonction  $\beta$  résiduelle de départ trop faible, témoignant de l'importance d'une intervention précoce. Un autre problème dans les essais avec l'otelixizumab fut l'observation chez certains patients d'une réactivation du virus Epstein-Barr (EBV). Même s'il a ensuite régressé spontanément, le risque lié à ce virus (notamment de cancer) a demandé l'utilisation de plus faibles doses d'anticorps dans des essais de phase 3 DEFEND-1 et DEFEND-2, qui ont tous les deux été interrompus n'ayant pas atteint l'objectif principal (préservation de la sécrétion de l'insuline) (73, 74).

L'essai de phase III utilisant le teplizumab chez des patients DT1 de découverte récente (6 semaines) a cependant confirmé la capacité des anticorps anti-CD3 à préserver une fonction résiduelle des cellules  $\beta$  par rapport au groupe placebo (75).

Une autre approche de ciblage des LT concerne l'utilisation de l'ATG (*anti-thymocyte globulin* ; Sanofi) à faible dose. L'ATG est un sérum purifié de lapin, contenant des IgG cytotoxiques dirigés contre les LT humains. Différents essais cliniques ont été effectués et ont montré des effets encourageants en termes de ralentissement partiel de la perte de la fonction  $\beta$  et de réduction de l'HbA1c (76). Les LT CD4<sup>+</sup> sont les principales cibles, les Tregs étant cependant moins affectés que les LT CD4<sup>+</sup> conventionnels. Le traitement par faible dose ATG s'apparente donc à celui par anti-CD3, même si le profil de tolérance est moins bon car lié à l'apparition d'un syndrome inflammatoire de courte durée associé à l'administration d'un sérum animal (*serum sickness syndrome*). Un essai clinique

de phase III conduit par le réseau européen INNODIA est actuellement en cours ([www.innodia.eu](http://www.innodia.eu)).



**Figure 8. Mode d'action des stratégies d'immunothérapies d'intervention sur les mécanismes d'auto-immunité dans le DT1.** 4 grandes catégories de stratégies sont employées : les thérapies anti-inflammatoires (violet) dont les cibles sont les cytokines pro-inflammatoires, les thérapies immunomodulatrices (rouge) qui ciblent les Teffs ou les APCs, les thérapies qui visent à restaurer la tolérance en employant des antigènes du DT1 (vert) et les thérapies cellulaires (orange).

Enfin, une autre approche est explorée, visant non pas à éliminer les LT pathogènes, mais à favoriser les Tregs pour réinstaurer une tolérance immunitaire forte. Ces derniers nécessitent la présence d'IL-2 pour survivre et proliférer. D'ailleurs, l'expression du récepteur à l'IL-2 de haute affinité (CD25) et une sensibilité accrue de la voie de signalisation STAT5 les y rend particulièrement sensibles. Une faible dose d'IL-2 va donc cibler préférentiellement les Tregs et induire leur prolifération et activation. Des premiers essais de recherche de la dose optimale, de phase I/II, ont montré des résultats encourageants en termes d'augmentation de la fréquence des Tregs circulants (77, 78). Un essai européen de phase III (DIAB-IL2 ; [www.diabil-2.eu](http://www.diabil-2.eu)) est en cours pour définir les bénéfices sur la préservation du peptide C. Ce traitement ayant déjà fait ses preuves dans

les vascularites associées au virus de l'hépatite C (79), cela renforce le rationnel pour son utilisation dans le DT1.

Si les LT restent les cibles privilégiées de l'immunothérapie, des essais cliniques ont également visé les LB. En effet, si les autoanticorps n'ont pas de rôle pathogène, les LB ont en revanche une fonction importante de présentation des antigènes  $\beta$  (80, 81). L'utilisation du rituximab (anticorps anti-CD20), qui présente l'avantage d'avoir un long historique en hématologie et dont on connaît le profil de sécurité, a donc été testée chez les patients DT1. Le traitement d'enfants et d'adultes nouvellement diagnostiqués a donné des résultats encourageants en termes de retard du déclin du peptide C, de meilleur contrôle glycémique (HbA1c) et de réduction de besoins en insuline, sans effets secondaires significatifs (82). Un essai clinique combinant le rituximab et l'abatacept (CTLA4-Ig) est actuellement en cours. En effet, ce dernier a également donné des résultats prometteurs en monothérapie (83), tout comme le LFA-3-Ig (Alefcept) (84).

### c. Thérapies cellulaires

Les Tregs sont des acteurs essentiels de la tolérance immunitaire et particulièrement critiques dans le contrôle du DT1 (cf partie II.2.2). Des stratégies de thérapie cellulaire se sont donc focalisées sur ces cellules, en réintroduisant des Tregs chez un patient après leur isolement et expansion. Cette approche a montré un bon profil de tolérance chez les enfants et les adultes (85-87), mais son efficacité reste à démontrer. L'expansion de Tregs étant réalisée sur un répertoire polyclonal, de meilleurs résultats pourraient être attendus avec des Tregs spécifiques des antigènes d'îlots. Les efforts actuels pour identifier les TCR auto-réactifs (88) ainsi que les nombreux épitopes du DT1 (89) pourraient mener vers la génération de Tregs redirigés, présentant la spécificité anti-îlots souhaitée (90, 91).

### d. Thérapies spécifiques d'antigène

Les stratégies thérapeutiques utilisant les antigènes  $\beta$  suscitent un vif intérêt car elles permettraient d'induire une tolérance très sélective en évitant tout effet systémique associé aux thérapies immunomodulatrices (telles que celles utilisant les anticorps anti-CD3 ou l'ATG). Le principe de base repose sur la stimulation d'un processus physiologique de tolérance en apportant aux LT un

antigène en absence de signaux inflammatoires, ce qui favoriserait alors une inhibition de l'activation des Teffs, ainsi qu'une stimulation de la différenciation en Tregs, spécifiques de l'antigène introduit. Les différents essais cliniques chez l'homme utilisant l'insuline par voie orale (92, 93) ou intranasale (94) ainsi que ceux utilisant un épitope altéré B9-23 (95) ou un peptide de la proinsuline (96) ont été jusqu'à présent des échecs. Également, l'utilisation de GAD65, un autre autoantigène majeur du DT1, délivré par voie sous-cutanée n'a pas abouti à des résultats probants (97, 98), même si ce dernier a été administré, de façon plutôt contre-intuitive, en association à de l'alum utilisé comme adjuvant. Bien que ces essais aient montré une efficacité faible voire nulle, ils ont souligné l'absence de toxicité des thérapies spécifiques d'antigènes. Le manque d'efficacité peut être associé à une intervention trop tardive, à un moment où la réponse auto-immune est dirigée contre une multitude d'épitopes. L'introduction d'un seul de ces épitopes ne serait donc pas suffisante. Un essai clinique de phase I utilisant un mélange de peptides issus d'autoantigènes  $\beta$  est en cours (MultiPepT1De).

Dans ce même esprit, des nanoparticules recouvertes de complexes CMH I ou II présentant des épitopes du DT1 ont été injectées chez des souris NOD diabétiques. Cette étude a démontré que ces nanoparticules pouvaient générer des LB régulateurs ainsi que des Tregs spécifiques des antigènes présentés, et que ces modifications cellulaires étaient accompagnées d'une rémission de la maladie chez ces animaux, avec une efficacité similaire dans d'autres modèles d'auto-immunité (99). La tenue d'un essai clinique basé sur ces nanoparticules est à l'étude dans le DT1 (Novartis/Parvus).

Jusqu'à aujourd'hui, et malgré les nombreux essais cliniques réalisés sur des individus diabétiques, aucun d'entre eux n'a donné de résultats pleinement satisfaisants. Si nous avons pu observer des effets partiels comme une stabilisation du peptide C ou une diminution de l'HbA1c, ces effets n'ont pas perduré et aucun patient n'a pu être guéri du DT1. Il s'impose donc de se questionner sur les raisons de ces échecs. Tout d'abord, l'ensemble de ces études interviennent sur des patients déjà diabétiques. Une grande quantité de cellules  $\beta$  sont déjà détruites et la réponse auto-immune est à ce moment-là très avancée et concerne une multitude d'épitopes et de cellules pathogènes activées. En effet, si elle commence bien par une phase où un antigène déclencheur, très probablement l'insuline, stimule un nombre limité de LT, la destruction des cellules  $\beta$  qui s'en suit mène au relargage d'autres antigènes et à l'activation d'un

nombre croissant de LT - un phénomène connu sous le nom « *d'antigen spreading* ». Cela rend la réaction auto-immune difficile à contrôler, dans un environnement de plus en plus inflammatoire. Il faudrait donc intervenir plus tôt, dès les premiers signes d'auto-immunité. Ensuite, il faut revenir aux mécanismes qui sont la cause de la maladie et qui se déclenchent en réalité bien avant l'apparition des premiers symptômes. En effet, pour que les premières cellules  $\beta$  soient détruites, une perte de tolérance vis-à-vis du Soi doit avoir lieu. Il est donc nécessaire de comprendre pourquoi la tolérance est rompue dans le DT1 et à quels niveaux.



	Molécule thérapeutique	Type d'étude	Population	Modalité de traitement	Efficacité	Référence
Thérapies immuno-modulatrices	ATG	R, DA, CP Phase II 11 centres USA	89 patients 12-45 ans DT1 <100 jours	6,5 mg/kg/j 4 jours IV	Augmentation du peptide C et diminution de l'HbA1C à 1 an	(76)
	Anti CD3 Otelixizumab	R, DA, CP Phase II 5 centres UE	80 patients 12-39 ans DT1 <4 sem	IV 48 mg 6j	Préservation de la fonction $\beta$ et réduction des besoins en insuline à 2 ans mais réactivation EBV.	(70, 100)
		R, DA, CP Phase III UE, USA, Canada	281 patients 12-45 ans DT1 <90 jours	IV faible dose 3,1mg 8j	Pas d'efficacité à 1 an → interrompue	(73, 74)
	Anti-CD3 Teplizumab	R, DA, CP Phase II USA, Canada	42 patients 8-30 ans DT1 < 6 sem	34mg IV pdt 12 ou 14j	Préservation du peptide C à 5 ans. Diminution des besoins en insuline et amélioration de l'HbA1c à 2 ans, perdus à 5 ans.	(72, 101)
		R, DA, CP Phase III 83 centres USA, UE, Inde, Israel	513 patients 8-35 ans DT1 < 12 sem	IV pleine dose (34mg) 2x14j ou faible dose (17mg) 2x14j ou pleine dose 2x6j	Préservation du peptide C mais pas d'amélioration de l'HbA1C ou des besoins en insuline.	(75, 102)
	CTLA4-Ig Abatacept	R, DA, CP Phase II	112 patients 6 à 36 ans DT1 <3 mois	27 perfusions pendant 2 ans	Préservation du peptide C à 12 mois mais déclin de la fonction $\beta$ parallèle au groupe placebo à 24 mois.	(83)
	LFA3-Ig Alefcept	R,DA,CP Phase II 14 site	49 patients 12-35 ans DT1 < 100 j	15mg/sem IM x12 sem à M0 et M6	Augmentation du ratio Tregs/Teffs en périphérie et déclin ralenti du peptide C mais pas de diminution des besoins en insuline ni d'amélioration de l'HbA1C	(84)
	Anti-CD20 Rituximab	R, DA, CP Phase II USA,UE, Canada	87 8-40 ans DT1 <3 mois	Anti-CD20 IV Rituximab 4 jours	Retard de 8,2 mois sur la diminution du peptide C mais fonction $\beta$ similaire au groupe placebo à 2 ans.	(82)
	IL-2	R, DA, CP Phase I/II 1 site (Paris)	24 adultes 18-35 ans DT1 < 5 ans	0,33-1-3 MUI x5j en SC	Augmentation significative de la fréquence des Tregs, de façon dose dépendante. Meilleure préservation de la fonction $\beta$ chez un sous-groupe de patients forts répondeurs.	(77, 78, 103)

**Tableau 1. Principales études cliniques d'immunothérapies d'intervention**

CP : contre placebo ; DA : double-aveugle ; DT1 : Diabète de type 1 ; EBV : Epstein Barr Virus ; IV : intraveineuse ; R : randomisé ; SC : sous-cutané ; Tregs : cellules T régulatrices ; Teffs : cellules T effectrices

	Molécule thérapeutique	Type d'étude	Population	Modalité de traitement	Efficacité	Référence
Thérapies anti-inflammatoires	Anti-Il1b Anakinra Canakinumab	2 essais ; R, CP 26 sites UE, USA, Canada	69 patients x2 18-35 ans DT1 < 12 sem	Canakinumab SC 1/mois x12mois ou Anakinra SC/j x9 mois	Le Canakinumab et l'Anakinra n'ont pas d'effet sur la préservation du peptide C à 1 an.	(69)
	Anti TNF $\alpha$ Etanercept	R,DA,CP Phase I/II	18 patients 3-18 ans DT1 < 4 sem	25mg SC x2/semx24sem	Diminution de l'HbA1C accompagnée d'une augmentation du peptide C après 2 ans de traitement.	(68)
Thérapies cellulaires	Tregs	Phase I 1 site Pologne	12 enfants 5-18 ans DT1 < 2 mois	Treg autologues expandues ex- vivo et réinjectées : 30.10 <sup>6</sup> /kg 1-2 fois	Augmentation du peptide C et diminution des besoins en insuline après la perfusion de Treg.	(86)
		Phase I 2 sites ; USA	14 adultes DT1 < 3 mois	Treg autologues 0,05-26.10 <sup>8</sup> /kg x1	Un sous-groupe de Treg transfusés survit à 1 an. Le peptide C et l'HbA1c sont maintenus à 1 an	(87)
Thérapies antigènes spécifiques	Insuline	R, DA, CP Phase I ; France	131 patients 7-40 ans DT1 < 2 sem	2,5 mg ou 7,5 mg/j x1 an Voie orale	Pas d'effet	(92)
		R, DA, CP Phase I ; USA	187 patients 5-60 ans DT1 < 2ans	1 ou 10 mg/j x6 à 36 mois Voie orale	Très légère amélioration du peptide C mais pas d'effet clinique	(93)
		R, DA, CP Phase I ; Australie	52 adultes 38-55 ans	40 unités/j x10j + 40unités 2x/sem x12 mois Voie intranasale	Pas d'effet sur le peptide C ou l'HbA1C	(94)
	Insuline Peptide B9-23 altéré	R, DA, CP ; Phase II ; 22 centres UE, Canada, Afrique	188 patients 10-35 ans DT1 < 6mois	1, 0,5 ou 0,1mg/mois x24 mois Voie sous-cutanée	Pas d'effet	(95)
	Proinsuline Peptide C19-A3	R, DA, CP Phase I	27 patients 18-40 ans DT1 < 3 mois	10ug toutes les 2 ou 4 semaines x 6mois Voie intradermale	Stabilisation peptide C et du besoin en insuline	(96)
	GAD 65	R, DA, CP Phase I 63 sites UE	320 patients 10-20 ans DT1 < 3mois	20ug J0, J30 J90 et J270 Voie sous-cutanée	Pas d'effet	(97)
		R, DA, CP Phase I 15 sites USA Canada	145 patients 3-45 ans DT1 < 3 mois	20ug tous les 2 mois x2 ou 3 Voie sous-cutanée	Pas d'effet	(98)

**Tableau 1 (suite). Principales études cliniques d'immunothérapies d'intervention**

CP : contre placebo ; DA : double-aveugle ; DT1 : Diabète de type 1 ; EBV : Epstein Barr Virus ; IV : intraveineuse ; R : randomisé ; SC : sous-cutané ; Tregs : cellules T régulatrices ; Teffs : cellules T effectrices

## II. La tolérance immunitaire

### II.1 La tolérance centrale

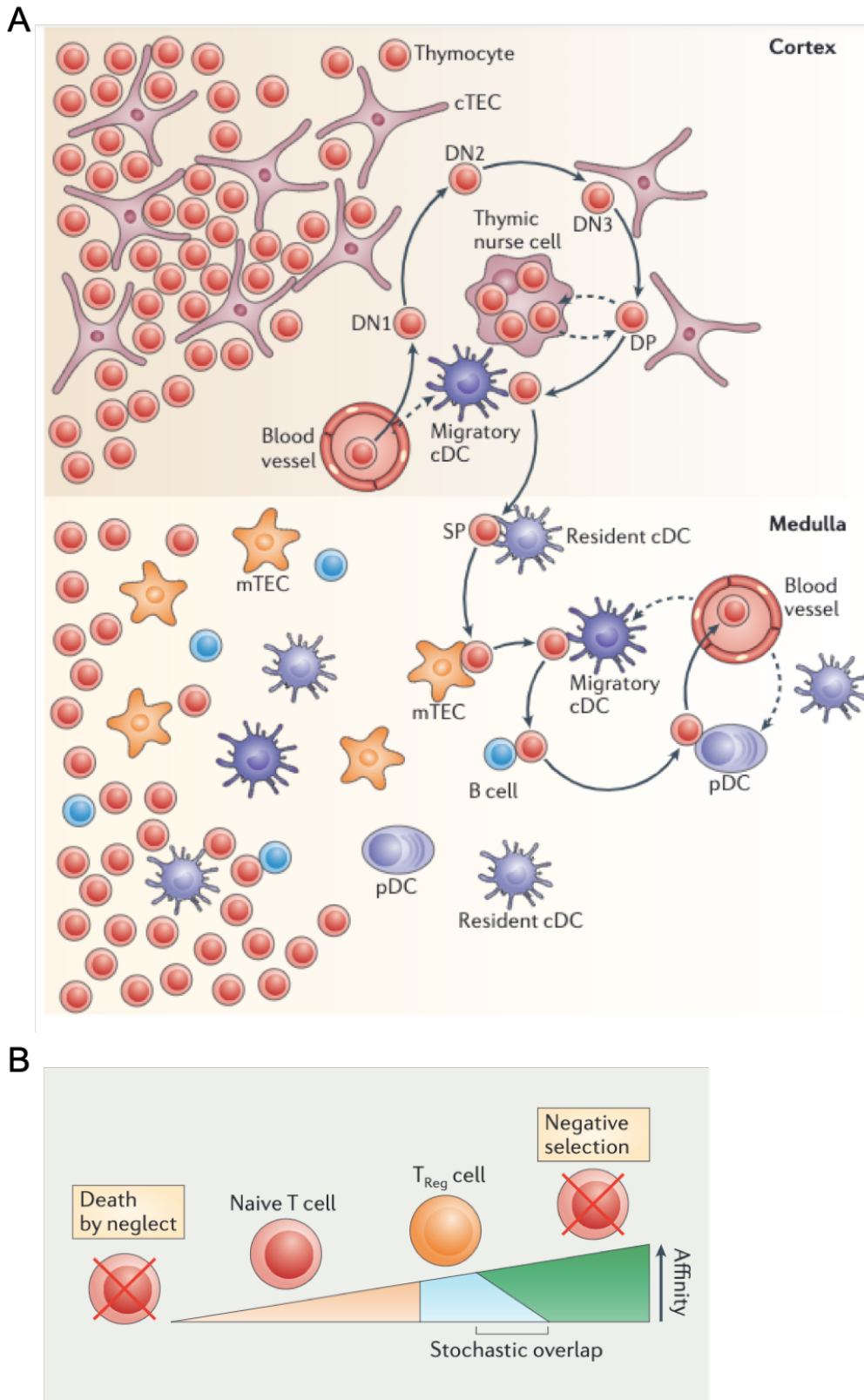
#### II.1.1 La sélection thymique

##### a. Les mécanismes de la sélection thymique

Au cours de leur développement, les LT passent par un processus éducatif dans le thymus composé de deux étapes séquentielles, qui a pour but de sélectionner les LT capables de nous défendre face à une agression extérieure, sans réagir contre notre propre organisme.

Une première étape de sélection positive se déroule dans la région du thymus appelée cortex. Elle intervient au stade de maturation « double-positif » (DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) des thymocytes et vise à sélectionner les cellules capables de reconnaître un complexe peptide du Soi/CMH (pCMH), c'est-à-dire de former un lien fonctionnel entre ce complexe et le TCR. La seconde étape de sélection négative, se déroulant dans la médulla thymique et intervenant au stade « simple positif » (SP, CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>) des thymocytes, vise, quant à elle, à supprimer les cellules capables de réagir, c'est-à-dire de s'activer, lors de la rencontre avec des antigènes du Soi (**Figure 9A**).

Le sort final de ces LT en développement, c'est-à-dire s'ils passeront ces étapes et atteindront ou non la périphérie, dépend de plusieurs paramètres. Lors de la sélection positive, les thymocytes immatures vont rencontrer les cellules épithéliales thymiques corticales (cTECs). Ces dernières présentent à leur surface, via les molécules de CMH, un spectre unique de peptides, issu de la dégradation des protéines par un protéasome spécifique, le thymoprotéasome, que les cTECs sont les seules à exprimer (104). Les LT ne reconnaissant aucun des complexes pCMH qu'ils rencontrent, ne reçoivent pas de signal de survie via leur TCR et meurent par « négligence ». Ce destin concerne plus de 90% des thymocytes (105, 106) qui n'atteignent donc pas la deuxième étape de sélection négative. Au cours de cette deuxième étape, également appelée délétion clonale, ce sont les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTECs), mais aussi différents types de DCs thymiques, qui vont jouer un rôle dans la sélection des LT. Les mTECs sont capables de présenter à leur surface des peptides issus des protéines du soi, dont des antigènes spécifiques de tissus (TRA, *tissue-restricted*



**Figure 9. Les mécanismes de la sélection thymique.** **A.** Les différentes étapes de maturation des thymocytes et leur éducation dans les différentes régions du thymus (cortex et médulla) avant leur sortie en périphérie. Les thymocytes interagissent avec différentes cellules épithéliales ou myéloïdes. Ces interactions déterminent le sort des LT. **B.** Le modèle de sélection des thymocytes par affinité, dans lequel les thymocytes les plus affins pour un pCMH vont être éliminés par la sélection négative, tandis que les thymocytes de faible affinité vont être épargnés. Les LT ayant une affinité intermédiaire seront différenciés en Tregs tandis que ceux ne reconnaissant aucun pCMH meurent par négligence. (L. Klein et al, Nature Reviews 2014)

*antigens*), en grande partie grâce à l'action du facteur de transcription Aire qu'elles sont les seules à exprimer (107). Plus récemment, Fefz2, un autre facteur de transcription, a été associé à l'expression de TRA dans les mTECs, distincts de ceux régulés par Aire (108). Les LT vont donc être soumis à la présentation de ces différents peptides. Ils seront alors sélectionnés en fonction de l'affinité de leur TCR pour le complexe pCMH (**Figure 9B**). Les clones de faible affinité seront libérés à la périphérie tandis que les clones de haute affinité seront éliminés par apoptose. En effet, plus un clone présente une forte signalisation TCR, correspondant à un TCR de forte affinité, plus il exprime la caspase 3 sous sa forme clivée, un marqueur de l'apoptose (109). Les LT ayant une affinité intermédiaire pour le pCMH se différencient quant à eux en Tregs thymiques (tTregs) exprimant le facteur de transcription Foxp3 (forkhead box P3) (110, 111). Il a par ailleurs été montré que les LT CD4<sup>+</sup> réactifs aux TRA étaient le plus souvent différenciés en tTreg plutôt que éliminés (112, 113).

Outre l'affinité du TCR, la force du signal reçu par les LT dépend d'autres facteurs. Tout d'abord, l'affinité et la stabilité d'un peptide donné pour le CMH détermine les chances pour un LT de rencontrer et d'interagir de manière stable avec le complexe pCMH (113). En d'autres termes, un peptide avec une affinité et/ou stabilité plus forte a plus de chances d'être présenté à la surface des mTEC et des DCs thymiques, et donc d'être rencontré par les LT. Un deuxième élément important est la disponibilité du complexe pCMH, qui résulte à la fois du niveau d'expression de l'antigène dans le thymus et du nombre de cellules qui peuvent le présenter à un moment donné (114, 115). Cette disponibilité est élevée dans le cas des antigènes ubiquitaires (par exemple, l'ubiquitine C ou la  $\beta$ -actine) qui sont fortement exprimés dans les mTECs et qui favorisent la suppression d'une majorité de clones auto-réactifs. Au contraire, elle est plus modeste pour les antigènes dits indépendants de Aire, qui ne sont pas ou peu exprimés dans le thymus mais plutôt dans certains types de cellules ou à un moment précis (par exemple le facteur de transcription Foxd1 qui n'est exprimé que pendant le développement des reins et des yeux) (116, 117). Ces antigènes favorisent l'échappement des LT de la sélection négative et cela se traduit par un vaste répertoire de LT périphériques constitués de clones de faible et de haute affinité. Cependant, ces clones ne poseront vraisemblablement pas de problème majeur car la rencontre avec leur antigène à la périphérie est peu probable. On suppose donc que cette « ignorance » leur permettra de garder un phénotype naïf et tolérant. Au milieu de ces deux extrêmes, le répertoire des LT spécifiques des

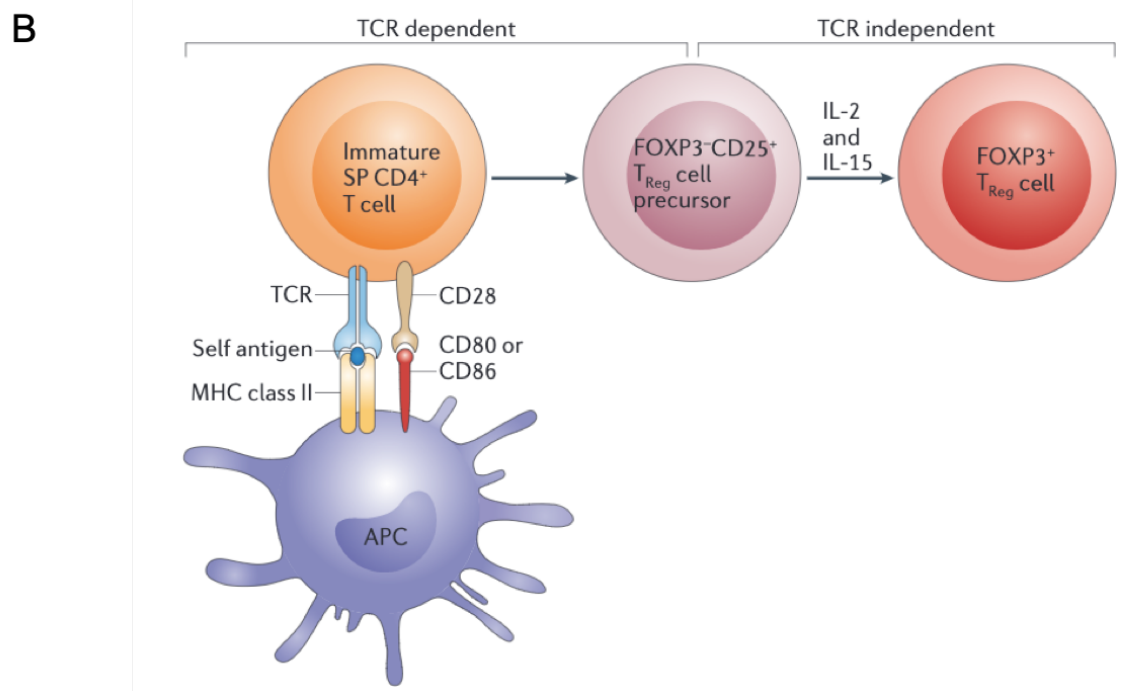
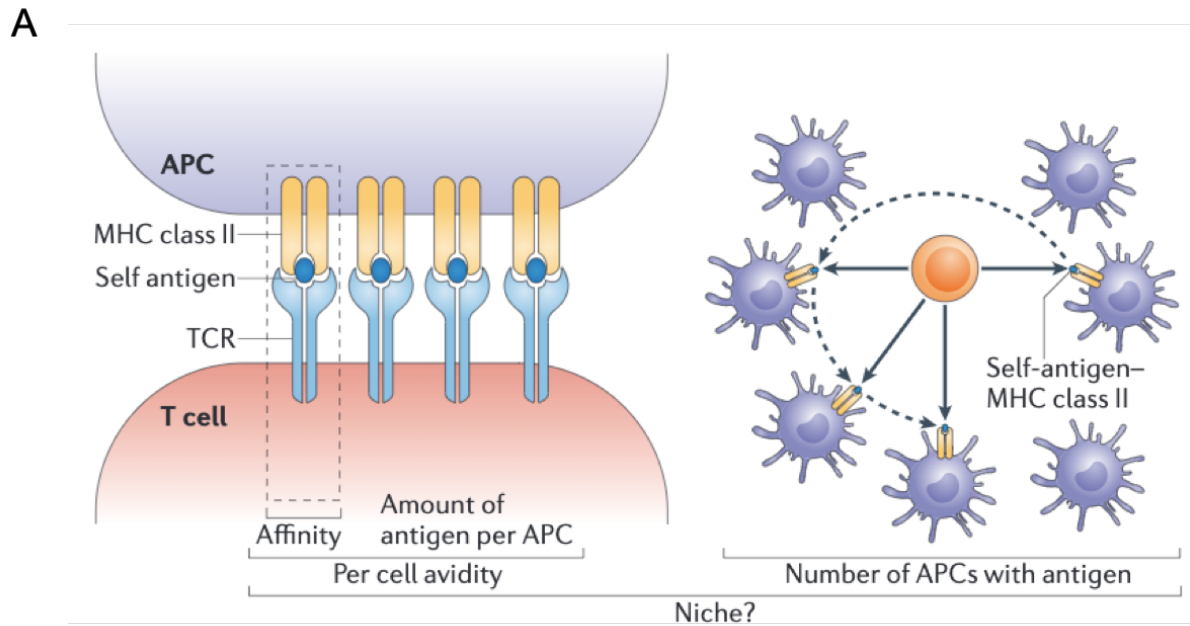
TRA, qui sont rarement exprimés dans le thymus (à hauteur de 1 à 3% des mTECs) (118), est caractérisé par un processus de délétion incomplète. Étant donné que la disponibilité de complexes pCMH est réduite, seuls les clones de haute affinité seraient éliminés par délétion clonale, tandis que les clones de faible affinité échapperaient à la sélection thymique (119). Ces derniers sont en effet surreprésentés dans le répertoire des LT auto-immuns, et pourraient jouer un rôle clé dans l'auto-immunité (120).

## b. La sélection thymique des Tregs

Les Tregs sont les cellules régulatrices de la réponse immunitaire. Au cours de la dernière décennie, il est devenu clair que les Tregs, qui constituent environ 5 à 10% des LT CD4<sup>+</sup> périphériques, sont nécessaires au maintien de l'homéostasie immunitaire (121). Elles sont principalement caractérisées par une haute expression du marqueur CD25 (122) ainsi que par l'expression du facteur de transcription Foxp3, requis pour le développement et la fonction des Tregs (110, 123). Les individus porteurs d'une mutation dans le gène Foxp3 développent le syndrome d'immunodérégulation, de polyendocrinopathie et d'entéropathie lié au chromosome X (IPEX), une maladie auto-immune multi-organes sévère nécessitant une greffe de moelle osseuse dans la petite enfance (124). De même, les souris scurfy, qui sont invalidées pour le gène *Foxp3*, développent un syndrome auto-immun létal (125). Ces cellules sont nécessaires tout au long de la vie ; la délétion expérimentale des cellules CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> chez des souris adultes en bonne santé entraîne une très forte auto-immunité ainsi que la mort en quelques semaines (126).

La première suggestion de la génération des Tregs dans le thymus est issue des expériences de thymectomie néonatale chez la souris, dans laquelle l'ablation du thymus au jour 3 après la naissance, mais pas au jour 7, entraîne le développement spontané d'un certain nombre de pathologies auto-immunes (127). Cette observation est devenue l'un des fondements principaux dans le domaine des Tregs, car elle a démontré que les tTregs qui migrent vers la périphérie à partir du jour 3 sont essentiels pour la tolérance au soi (128-130).

Comme mentionné plus haut, il est généralement admis que les tTregs sont différenciés à partir des clones ayant une affinité intermédiaire pour les antigènes. Cependant, si différentes études ont analysé de façon quantitative la force du signal TCR requis pour la sélection négative (131, 132), ce n'est pas si



**Figure 10. Différenciation des Tregs thymiques.** A. L'affinité du TCR pour le pCMH, le nombre d'interactions TCR/pCMH par cellule (avidité) ainsi que le nombre d'APC présentant l'antigène sont les 3 facteurs déterminants dans la différenciation des tTregs. B. La différenciation des tTregs est présentée comme un modèle en 2 étapes. L'interaction TCR/pCMH va permettre au thymocyte en développement d'acquies un phénotype particulier de précurseur. C'est seulement à la suite de signaux cytokiniques que la cellule va véritablement se différencier en tTreg. (Hsieh et al, Nature Reviews 2012)

clair pour la génération des Tregs, et il est en fait difficile de les intégrer dans un modèle simplement basé sur un seuil d'affinité. Le développement des Tregs peut en effet dépendre de plusieurs niveaux d'interaction TCR-antigène (**Figure 10A**). Le premier serait effectivement la force de l'interaction (à savoir, l'affinité) d'un

TCR pour un complexe pCMH présenté par une APC thymique. Le second serait l'avidité de l'interaction LT-APC, qui est déterminée par le nombre de ligands pCMH à la surface de l'APC. Troisièmement, la taille de la « niche » des Tregs spécifiques d'antigène - qui est déterminée par le nombre total d'APC présentant un auto-antigène donné et exprimant les molécules de co-stimulation appropriées - affecterait la probabilité de rencontre LT-APC et déterminerait ainsi le nombre de Tregs pouvant se différencier à un instant donné. Enfin, il est possible que le nombre de rencontres entre un LT et une ou plusieurs APC puisse affecter le sort de ces LT. En particulier, des expériences de microscopie bi-photonique suggèrent que la sélection négative implique plusieurs rencontres LT-APC successives (133, 134).

En 2011, une étude a porté sur la relation entre le développement des Tregs et l'affinité et l'avidité du TCR (135). Pour ce faire, plusieurs lignées de souris double transgéniques ont été utilisées. Toutes exprimaient un TCR spécifique d'antigènes issus de la protéine HA (hémagglutinine) du virus de la grippe. En revanche, certaines exprimaient un peptide reconnu avec une forte affinité par ce TCR, d'autres un peptide reconnu avec une faible affinité, l'expression de ces peptides étant contrôlée soit par un promoteur ubiquitaire, soit par le promoteur de la  $\beta$ -globine. De façon intéressante, le peptide antigénique reconnu avec une faible affinité par le TCR transgénique ne parvenaient pas à induire une différenciation en tTregs, même lorsque cet antigène était exprimé à un niveau suffisant pour conduire à une sélection négative (promoteur ubiquitaire). Le peptide antigénique reconnu avec une forte affinité était, quant à lui, capable aussi bien de générer des tTregs que de promouvoir la sélection négative. Ainsi, de manière concordante avec une étude sur l'induction de Tregs à la périphérie (136), l'avidité du TCR ne peut pas toujours compenser l'affinité pour générer des interactions d'une force nécessaire à l'induction de la sélection des Tregs thymiques.

Outre l'interaction TCR-pCMH, la différenciation des thymocytes en Tregs dépend de facteurs additionnels comme la présence de signaux cytokiniques ou de co-stimulation. Ainsi, la molécule CD28 joue un rôle important dans la génération des tTregs puisqu'une diminution d'environ 80% de la fréquence des tTregs est observée chez les souris déficientes pour CD28 (137, 138). Dans un modèle de souris NOD.CD28<sup>-/-</sup>, ce déficit en tTregs conduit au développement d'un diabète fulgurant (139). Certains travaux suggèrent que le rôle du CD28 ne serait



pas directement lié au renforcement de l'interaction TCR-pCMH, qui permettrait d'atteindre le seuil requis pour initier la différenciation des tTregs. Au lieu de cela, la co-stimulation par le CD28 serait critique dans la progression du développement des tTregs en cours de différenciation, et dans la promotion de leur survie, évitant donc leur sélection négative (140, 141).

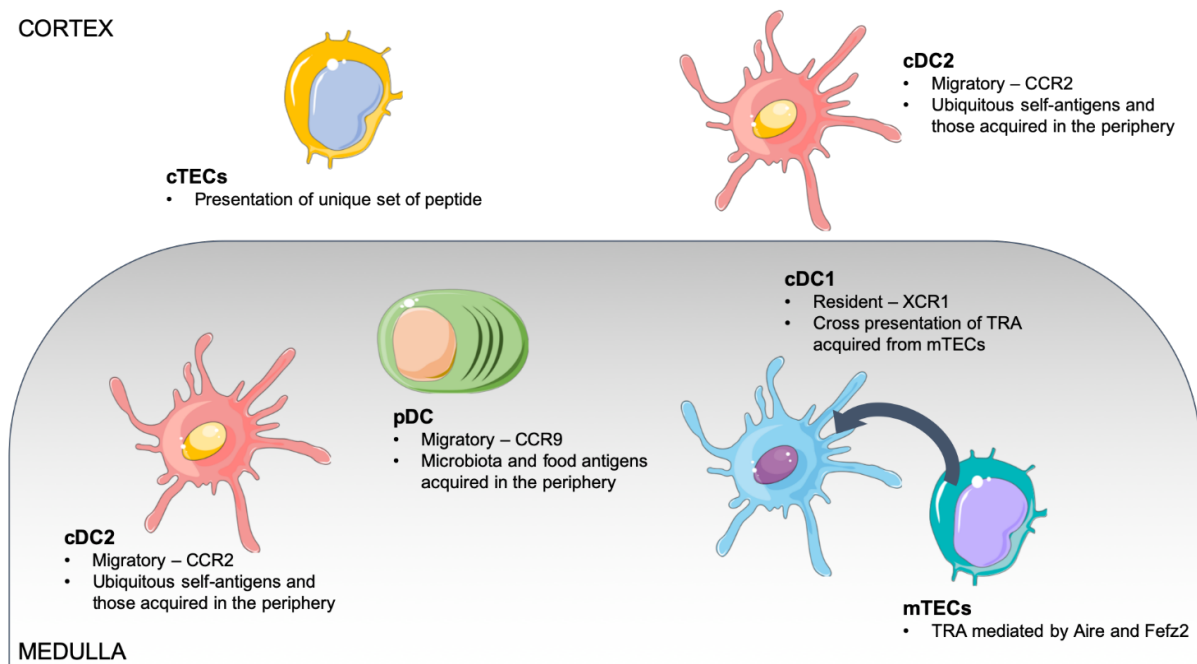
Par ailleurs, les expériences de thymectomie néonatale suggèrent que la différenciation des tTregs est retardée par rapport à la maturation des LT conventionnels (128). Il est intéressant de noter qu'une population de cellules Foxp3-CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> précède temporairement le développement des tTregs Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (129). Le modèle proposé est que les tTregs soient en fait générés selon un processus en 2 étapes (**Figure 10B**) : lorsque les thymocytes reconnaissent les complexes pCMH de classe II en présence de molécules de co-stimulation (CD80 ou CD86) et avec une affinité/avidité suffisamment élevée pour la sélection des tTregs, certaines de ces cellules seront sélectionnées comme précurseurs Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Le signal TCR conduirait à l'activation de plusieurs voies de signalisation, entraînant la permissivité de ces précurseurs pour l'induction de l'expression de Foxp3 par des signaux cytokiniques, en particulier par l'IL-2, ou dans une moindre mesure l'IL-15.

### c. Les cellules dendritiques thymiques

Dans le thymus, les cellules épithéliales ne sont pas les seules à présenter les antigènes aux LT. En particuliers les DCs jouent un rôle clé dans l'éducation des thymocytes. On distingue 3 types de DCs dans le thymus (142) : des DCs plasmacytoïdes (pDC) et deux populations de DC conventionnelles (cDCs). Ces dernières sont définies en fonction de l'expression des marqueurs CD8 et *signal regulatory protein* (SIRP) $\alpha$  : les cDC1 sont CD8<sup>hi</sup>SIRP $\alpha$ <sup>lo</sup> et représentent 70% des cDC, tandis que les cDC2 sont CD8<sup>lo</sup>SIRP $\alpha$ <sup>hi</sup> et représentent les 30% restants (143, 144). Ces populations de DCs sont particulièrement bien équipées pour l'apprêtement et la présentation d'antigènes distincts, en fonction de leur spécialisation fonctionnelle et de leur capacité à répondre à différents signaux migratoires (**Figure 11**)

Les cDC1, que l'on appellera également DC résidentes, se développent à partir d'un précurseur intra-thymique, vraisemblablement un précurseur commun aux LTs et aux DCs (145, 146). Elles expriment le récepteur XCR1, leur permettant de s'accumuler dans la médulla grâce à l'expression du ligand XCL1

par les mTECs. Cette co-localisation va permettre le transfert des TRA dérivés des mTECs vers les cDC1 pour la présentation croisée (147, 148).



**Figure 11. Les différentes APCs du thymus.** Il existe deux types d'APC thymiques : les cellules épithéliales thymiques (TECs) et les cellules dendritiques (DCs). Les TECs corticales (cTECs) sont impliquées dans la sélection positive et présentent à leur surface un spectre particulier de peptides. Les TECs médullaires (mTECs) sont impliquées dans la sélection négative et peuvent présenter à leur surface des peptides d'antigènes spécifiques des tissus (TRA). Les cDC1 peuvent présenter des antigènes issus des mTECs, tandis que les cDC2 et les pDCs présentent des antigènes acquis en périphérie et dans l'intestin, respectivement. Elles sont présentes dans la médulla mais les cDC2 peuvent également être retrouvées dans le cortex. Adapté de Breed et al Seminars in Cell & Developmental Biology 2018.

Contrairement aux cDC1, les cDC2 (ou DCs migratoires) proviennent de la périphérie et sont capable d'acquérir des antigènes circulants et/ou de transporter des auto-antigènes dans le thymus (142, 149). Leur migration vers le thymus est dictée par leur expression de CCR2, dont le ligand CCL2 est constitutivement exprimé dans le thymus par les cellules endothéliales et dans une moindre mesure par les mTECs et les cTECs (150). On retrouve donc des cDC2 dans la médulla mais aussi dans des régions du cortex (151).

Cette capacité migratoire est aussi partagée par les pDCs, mais est, dans ce cas, plutôt dépendante du CCR9. Compte tenu de la faible capacité de présentation antigénique des pDCs (152), un rôle dans la tolérance centrale était considéré comme peu probable. Cependant, il pourrait être nécessaire de réviser ce point. En effet, une étude de Hadeiba et al. a montré par transfert adoptif de pDCs chargées en peptide issu de l'ovalbumine (OVA) que ces dernières étaient capables de migrer jusqu'au thymus et de favoriser la suppression des

thymocytes OT-II spécifiques de l'OVA. Cet effet était perdu si le transfert était effectué avec des pDCs déficientes en CCR9 (153). De façon intéressante, le CCR9 est également essentiel pour la migration des pDCs vers l'intestin dans des conditions homéostatiques et inflammatoires (154). On pourrait ainsi imaginer un rôle des pDCs dans l'induction de tolérance aux antigènes commensaux ou alimentaires transportés jusqu'au thymus (155), mais cette hypothèse n'a pas été testée à ce jour.

Le rôle des DCs thymiques ne serait pas redondant avec celui des mTECs car les antigènes présentés par ces deux populations d'APCs thymiques seraient différents. En particulier, les DCs exprimeraient un certain groupe d'antigènes qui mèneraient à la délétion des thymocytes plutôt qu'à l'induction de Tregs ou à des mécanismes d'ignorance (119). Une étude dans laquelle la présentation des antigènes est restreinte soit aux mTECs soit aux DCs, a suggéré que ces dernières, et non les mTECs, seraient les principales responsables de la délétion clonale (156).

Les DCs thymiques peuvent tout de même agir sur la différenciation des tTregs. En effet, elles (et pas seulement les thymocytes) fourniraient une source locale importante d'IL-2, nécessaire au développement des tTregs (157). Par conséquent, les différentes populations d'APCs dans le thymus peuvent coopérer pour conduire à la différenciation des thymocytes en tTregs.

## II.1.2 Sélection clonale et DT1

### a. Un défaut de la sélection thymique à l'origine du DT1 ?

À la lumière de cette littérature, la première étape postulée de la pathogenèse du DT1 correspondrait donc à l'échappement des LT auto-immuns, réactifs aux antigènes des cellules  $\beta$ , de la sélection négative et à leur migration subséquente vers la périphérie. En effet, de nombreuses études ont suggéré un rôle critique d'une délétion clonale thymique défectueuse dans le DT1 et trois sources de données sont fréquemment mentionnées pour soutenir cette idée.

Premièrement, les patients atteints de polyendocrinopathie auto-immune de type 1 (*Autoimmune polyendocrinopathy, candidiasis, ectodermal dystrophy* ; APECED), qui sont porteurs de mutations germinales altérant l'expression du facteur de transcription AIRE, développent plusieurs maladies auto-immunes, y compris le DT1, et ces caractéristiques sont retrouvées chez les souris *Aire*<sup>-/-</sup> (107).

En effet, il est à noter que l'insuline est exprimée dans le thymus sous le contrôle de AIRE (107). Deuxièmement, il a été démontré que les polymorphismes VNTR de classe I, explicités plus haut (cf. partie I.3.1) prédisposant au DT1, entraînent une diminution de l'expression de l'insuline dans le thymus, ce qui peut favoriser l'échappement des LT réactifs à l'insuline (26, 27, 158, 159). Il a d'ailleurs été longtemps suggéré que la fréquence des LT réactifs aux antigènes des cellules  $\beta$  était augmentée chez les patients DT1 comparé aux donneurs sains (160). Troisièmement, une altération de l'expression de l'insuline dans le thymus par la suppression du gène *Insuline2* (*Ins2*, qui correspond à l'isoforme de l'insuline exprimée dans le thymus) entraîne un diabète accéléré chez les souris NOD (161, 162).

Cependant, ces observations doivent être interprétées avec prudence. Tout d'abord, le DT1 n'est pas la maladie auto-immune la plus fréquente chez les patients APECED, car elle n'est observée que chez 10 à 20% d'entre eux (163–165). De plus, plusieurs études ont mis en évidence la présence d'auto-anticorps anti-cytokines chez les patients APECED, et il a été montré que les anticorps dirigés contre l'IFN- $\alpha$  semblaient avoir un effet protecteur sur le développement du DT1 (166). Notons également que le développement du diabète auto-immun n'est pas accéléré de manière significative chez les souris NOD.*Aire*<sup>-/-</sup> (167). Ensuite, les allèles de susceptibilité du promoteur de l'insuline VNTR homozygotes sont présents chez environ 55% de la population caucasienne (24), mais très peu développeront un DT1. Enfin, le phénotype spectaculaire observé chez les souris NOD.*Ins2*<sup>-/-</sup> reflète les conséquences d'une manipulation génétique extrême n'ayant pas d'équivalent dans la vraie vie.

## **b. Une remise en question de ce postulat**

Par ailleurs, ce postulat est également contesté par des études récentes chez l'homme, qui ont remis en cause le rôle physiologique global de la tolérance centrale. En effet, notre équipe a récemment montré que les LT CD8<sup>+</sup> circulants spécifiques de multiples antigènes de la cellule  $\beta$  se retrouvent à une fréquence similaire chez les patients DT1 et les donneurs sains (89, 168). Ces observations, qui ont depuis été confirmées par d'autres (169), suggèrent que les clones réactifs aux épitopes d'îlots ne sont pas efficacement supprimés dans le thymus, indépendamment du statut de l'individu, qu'il soit malade ou sain.

Ainsi, le paradigme d'une délétion clonale incomplète dans le thymus semble être une caractéristique universelle du système immunitaire humain, dans une bien plus grande mesure que précédemment estimée, et impliquant plus d'antigènes que prévu. Par exemple, nous savons que les antigènes des îlots préproinsuline (PPI), IA-2 et IGRP sont exprimés dans le thymus (170), alors que GAD65 et ZnT8 ne le sont pas. Cependant, les LT CD8<sup>+</sup> reconnaissant ces antigènes sont trouvés à une fréquence similaire dans le sang, ce qui suggère que l'expression thymique de l'antigène n'influence pas significativement le résultat de la sélection négative. À l'appui de cette idée, la comparaison des LT CD8<sup>+</sup> reconnaissant les épitopes d'îlots restreints à la molécule de HLA-A2 entre des donneurs HLA-A2<sup>+</sup> (portant ainsi la restriction HLA nécessaire pour la sélection négative) et leurs homologues HLA-A2 négatifs (qui ne portent pas de telle restriction) a révélé des fréquences similaires pour les deux (168). Si la délétion clonale impactait la génération des LT CD8<sup>+</sup> auto-réactifs de manière critique, nous nous serions attendus à ce que leur fréquence soit plus élevée chez les donneurs HLA-A2<sup>-</sup>, car ils ne subiraient aucune délétion thymique. Ce n'est toutefois par le cas.

De la même façon que pour les LT CD8<sup>+</sup>, la fréquence des Tregs chez les patients atteints de DT1 ne diffèrent pas de celle retrouvée chez les individus sains, témoignant d'une sélection thymique des Tregs semblable (36, 171-173).

Par ailleurs, au fur et à mesure que nous engrangeons des connaissances sur les mTECs, nous savons qu'elles sont en fait peu nombreuses dans le thymus, et qu'elles présentent un spectre d'antigènes restreint et qui change avec le temps (115, 118, 174). Ainsi, les chances pour un clone T de rencontrer son antigène est faible, ce qui peut expliquer l'échappement de ces clones à la périphérie.

Enfin, il convient de noter que ce que nous parvenons à observer est peut-être très différent de ce qu'il se passe en réalité. En effet, il est techniquement difficile aujourd'hui d'évaluer directement l'affinité du TCR pour un complexe pCMH *ex-vivo* au niveau de la cellule individuelle. La lecture la plus utilisée repose sur le marquage des clones de LT par tétramère (TMR), l'intensité de fluorescence étant corrélée avec l'affinité du TCR. Cette lecture introduit cependant un biais, car la détection basée sur les TMR tend à favoriser les clones d'affinité plus élevée, un biais qui peut être augmenté par l'utilisation concomitante du dasatinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase, empêchant l'internalisation du TCR pour stabiliser et améliorer le marquage TMR (175). Des études récentes suggèrent d'ailleurs la présence d'une fraction importante de LT CD8<sup>+</sup> reconnaissant un

épitope donné qui ne sont pas détectés par les TMR, mais bel et bien réactifs à l'épitope lors d'expériences fonctionnelles (176).

Il est donc possible que nous ne détectons que les quelques clones de haute affinité qui ont échappé à la sélection négative mais que les clones de faible affinité restent indétectables par les stratégies de lecture par TMR à ce jour. Étant donné que le seuil nécessaire à l'activation d'un LT est inférieur au seuil nécessaire pour la liaison stable d'un TMR (177, 178), nous ne pouvons pas exclure que ces clones indétectables par TMR soient responsables du DT1.

### c. Un échappement thymique universel

Ainsi, il existerait un échappement universel des mécanismes thymiques de tolérance et le premier point de contrôle postulé du DT1 serait universellement franchi. Le thymus serait « défectueux » chez tout le monde, et pas seulement chez les individus DT1. Étant donné que tous les mécanismes de sélection thymique sont basés sur la présentation de peptides du Soi, il faut s'attendre à ce que chaque lymphocyte possède un certain degré d'auto-réactivité. Cependant, il semblerait que cette auto-réactivité soit le prix à payer pour générer un système immunitaire compétent (179).

Tout d'abord, nous avons vu plus haut que l'auto-réactivité était nécessaire pour générer des Tregs qui nous sont indispensables pour préserver notre « Soi » en limitant les réactions auto-immunes. Les caractéristiques et fonctions des Tregs seront explicitées dans la partie suivante sur la tolérance périphérique (cf. partie II.2.1.c).

Ensuite, un LT est effectivement capable de reconnaître certains peptides du Soi mais il est également très efficace dans la réactivité croisée qui lui permet de reconnaître des antigènes microbiens étrangers. Si la théorie de sélection clonale, très généralement acceptée pendant de nombreuses années (180, 181), a proposé que chaque LT était spécifique d'un seul antigène et que la reconnaissance de ligands alternatifs était peu probable, cette idée est désormais largement dépassée (182–185). En particulier, D. Mason a proposé dès 1998, un modèle de poly-réactivité des LT. En se basant sur une simple estimation mathématique partant du principe que le système immunitaire devrait être en mesure de reconnaître plus de  $10^{15}$  peptides différents, il est absurde d'imaginer que  $10^{15}$  LT monoclonaux (qui pèseraient plus de 500kg !) formeraient le pool de LT naïfs circulants. En réalité, il est admis que  $10^{12}$  LT sont en circulation chez

l'homme, et qu'il y aurait moins de  $10^8$  TCR distincts dans le pool de LT naïfs humains (186). Un seul LT serait donc capable de reconnaître plus d'un million de peptides différents (185). Depuis, un bon nombre d'études a validé cette hypothèse (187-189). Un exemple est le TCR 1E6 - qui a été isolé à partir d'un patient atteint de DT1 et qui reconnaît le peptide PPI<sub>15-24</sub> présenté dans le contexte du HLA-A\*02:01 (190) - décrit comme ayant une réactivité croisée majeure. En effet, les LT exprimant ce TCR 1E6 seraient potentiellement capables de répondre à 1,3 million de peptides, au moins aussi fortement qu'ils répondent au peptide PPI<sub>15-24</sub> (187, 191). Certains de ces peptides seraient même plus de 100 fois plus puissants que PPI<sub>15-24</sub> pour activer les LT, alors qu'ils diffèrent de PPI<sub>15-24</sub> sur sept des dix positions d'acides aminés. Si ces chiffres semblent extrêmes et qu'ils peuvent être surestimés, ils démontrent néanmoins le caractère poly-réactif des LT à la sortie du thymus. L'auto-réactivité est donc une condition nécessaire à la réactivité croisée et plusieurs études ont suggéré qu'une délétion thymique trop importante des LT réactifs au Soi créerait des « trous » dans le répertoire et ainsi générerait des défauts dans la défense contre le non-Soi (192-195).

Enfin, l'auto-réactivité est nécessaire pour l'expansion homéostatique des LT. En effet, lorsque nous rencontrons des antigènes du non-Soi, les lymphocytes sont activés et prolifèrent pour monter une réponse immunitaire robuste. Cependant, un LT donné ne rencontre ces antigènes étrangers qu'à certains moments de la vie, mais doit survivre entre ces rencontres. Pour ce faire, il doit pouvoir bénéficier de cytokines (IL-2, IL-15, IL-7) mais aussi de signaux « toniques » (c.-à-d. fréquents et de faible intensité) induit via le TCR par des rencontres antigéniques. En l'absence d'infection, les seuls antigènes disponibles pour déclencher ce processus de survie - qui est appelé expansion homéostatique - sont les auto-antigènes. Certaines études suggèrent que les LT naïfs maintiennent une faible réponse vis-à-vis des ligands pCMH du Soi et que ces interactions sont nécessaires pour préserver une activation basale du TCR et l'homéostasie des LT (196, 197). Ainsi, l'auto-réactivité serait également un moyen d'être protégé vis-à-vis du non-Soi.

#### **d. Cibler le thymus pour restaurer la tolérance centrale dans le DT1**

Compte tenu de nos connaissances actuelles sur le thymus et les mécanismes qui lui sont propres, cet organe pourrait-il constituer une cible thérapeutique

dans le DT1 ? Le projet de cette thèse se base sur l'idée qu'une introduction précoce d'un auto-antigène spécifique du DT1, en particulier la PPI, dans le thymus pourrait rétablir une tolérance centrale vis-à-vis de cet antigène en « forçant » la sélection thymique et ainsi limiter l'échappement des LT auto-réactifs conventionnels, possiblement en augmentant en parallèle la sélection des Tregs auto-réactifs, et par conséquent prévenir l'apparition du DT1.

Plusieurs éléments nous suggèrent que la tolérance des LT et même la prévention du DT1 peuvent être atteintes lorsque l'on introduit un auto-antigène dans le thymus. Les premières preuves de concept sont retrouvées dans des études pionnières, qui ont montré que la transplantation d'îlots pancréatiques dans le thymus peut abroger l'insulite et le diabète chez les rats *Bio-Breeding* (BB) (198) et les souris NOD (199, 200). Un peu plus tard, un modèle de surexpression de l'insuline dans le thymus de souris NOD a montré une protection des souris vis-à-vis du diabète (201). En 2006, Marodon et al. ont induit une réduction significative de l'incidence du diabète chez les souris NOD injectées directement dans le thymus avec un vecteur lentiviral exprimant la PPI. Cette protection était associée à la fois à une diminution des thymocytes spécifiques de PPI grâce à la délétion clonale et à l'augmentation des Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (202).

Par conséquent, cibler le thymus en y introduisant des auto-antigènes d'intérêt pourrait permettre de stimuler les mécanismes de sélection négative par suppression clonale et/ou génération de tTregs, et ainsi de restaurer une tolérance centrale efficace.

## II.2 La tolérance périphérique

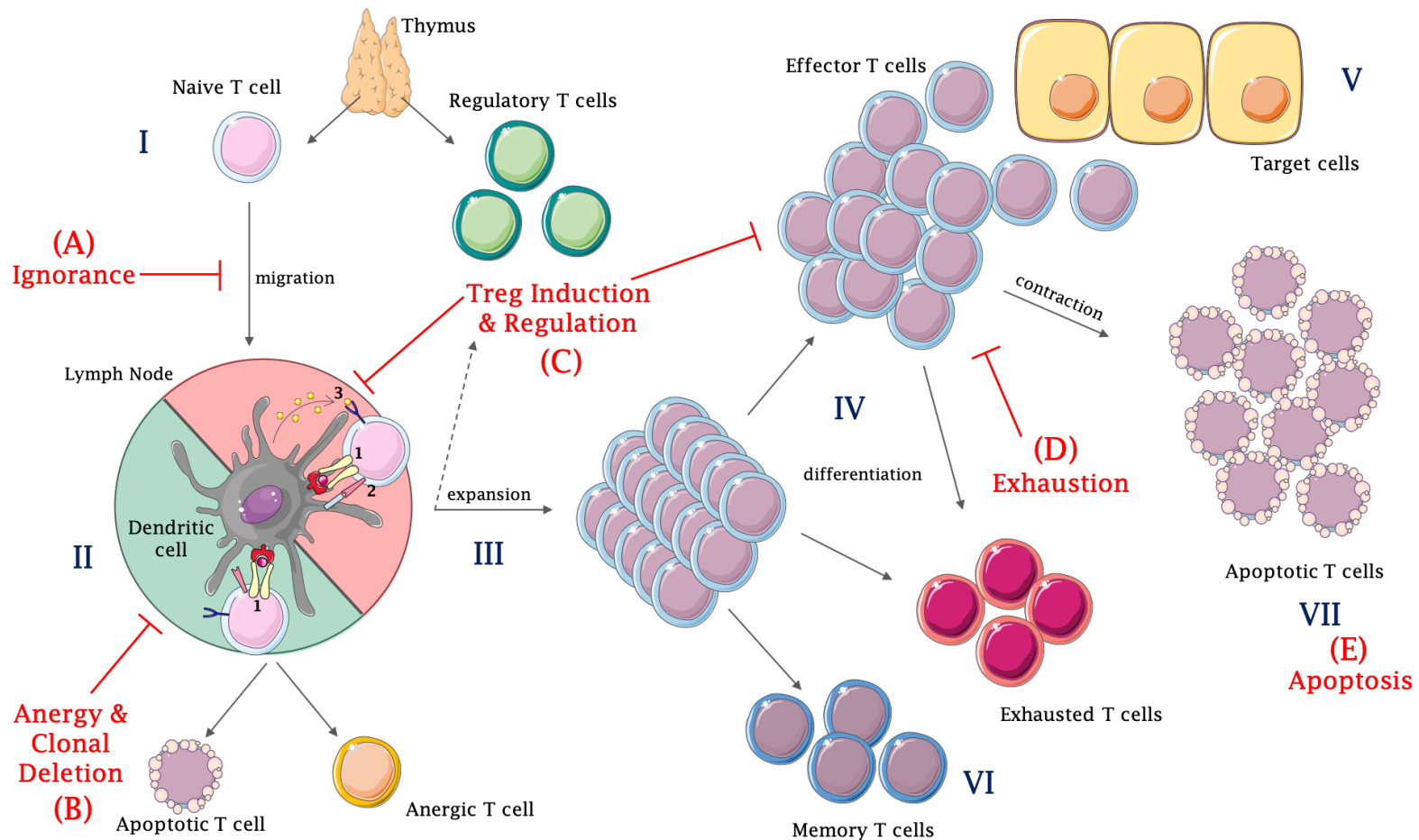
Suite à l'échappement des clones auto-réactifs du thymus comme vu dans la partie précédente, des processus de surveillance et de régulation de ces LT sont mis en place en périphérie, dans les organes lymphoïdes secondaires, pour éviter leur activation aberrante pouvant mener à des pathologies auto-immunes. La tolérance périphérique correspond à l'ensemble des mécanismes qui permettent la régulation de la réponse immunitaire et le maintien de l'homéostasie immunitaire.



## II.2.1 Mécanismes de tolérance périphérique

Pour comprendre les mécanismes de tolérance périphérique, il est nécessaire de rappeler le processus d'activation des LT en cas d'infection ou d'agression extérieure (**Figure 12**). Schématiquement, les LT qui sortent du thymus ont un phénotype dit « naïf », c'est-à-dire qu'elles n'ont encore jamais rencontré leur(s) antigène(s) spécifique(s) (I). Ils parcourent la circulation et migrent vers les ganglions lymphatiques à la recherche de ce dernier (II). Le processus d'activation des LT nécessite 3 signaux séquentiels. Le premier est la reconnaissance par leur TCR d'un peptide présenté par une APC dans le contexte de leur molécule de CMH (1). Le second signal, dit de co-stimulation, fait suite à l'interaction de la molécule CD28 sur les LT avec les molécules CD80/CD86 présentes à la surface des APC matures (2), dans un contexte inflammatoire. Enfin, le troisième signal reçu est cytokinique (3) et permet au LT de passer le seuil d'activation et de proliférer (III). Suite à cette prolifération, les LT vont se différencier en Teffs (IV), capables de rejoindre les tissus non lymphoïdes et d'agir sur les cellules cibles (V). Une petite fraction se différencie en LT mémoires (VI). La fin de la réponse immunitaire se traduit par une phase de contraction, correspondant à la mort par apoptose des cellules effectrices (VII).

Si ce processus est nécessaire pour combattre les pathogènes et réagir contre une agression extérieure, il est toutefois délétère si la réponse concerne un auto-antigène. Pour contrôler et limiter la réponse immunitaire, il existe un ensemble de mécanismes intervenant à chacune des étapes de ce processus, un continuum allant de la surveillance à la résolution de la réponse immunitaire. Certains mécanismes ont pour rôle d'éviter le déclenchement de la réponse tandis que d'autres interviennent après l'activation des LT (**Figure 12, A-E**).



**Figure 12. L'histoire naturelle d'un LT naïf et les différents mécanismes de tolérance périphérique.** A l'issue de la sélection centrale dans le thymus, le LT naïf se retrouve en périphérie (I) et migre jusqu'aux ganglions lymphatiques (II). Lorsqu'il rencontre son antigène, présenté par une APC, notamment une DC, dans un contexte inflammatoire, le LT reçoit un signal d'activation et peut proliférer (III). Il va ensuite se différencier en LT effecteur (IV), migrant jusqu'au site d'inflammation pour agir sur les cellules cibles (V). Une fraction de LT se différencie en LT mémoires (VI). A la fin de la réponse immunitaire, les LT effecteurs subissent une phase de contraction correspondant à la mort par apoptose (VII). Ces étapes peuvent être régulées par un ensemble de mécanismes de tolérance périphérique. L'ignorance (A) correspond à l'absence de rencontre entre un LT et son antigène, car il ne peut pas accéder au tissu d'intérêt. Si le LT rencontre son antigène en l'absence de signal de co-stimulation, le LT sera alors différencié en cellule anergique ou éliminé par apoptose (B). En présence de signal de co-inhibition il peut également se différencier en pTreg (C). Les tTregs et pTregs peuvent alors agir sur les LT effecteurs en réduisant leur fonction effectrice, ou bien sur les APC en inhibant leur maturation et leur activation. En cas d'exposition chronique à un antigène, les LT peuvent également devenir épuisés, réduisant ainsi leur activité effectrice (D). Enfin, les mécanismes d'apoptose interviennent à l'issue de la réponse immune, évitant la persistance de LT effecteurs potentiellement dangereux (E).

### **a. L'ignorance (A)**

L'ignorance est le premier mécanisme de tolérance immunitaire. Elle correspond à l'absence de rencontre entre un LT et son antigène (203). Cela est dû à la barrière anatomique qu'il existe entre un LT naïf et les tissus non lymphoïdes, au sein desquels la probabilité d'entrer en contact avec une cellule exprimant une forte densité d'antigènes du soi est plus élevée. Dans le cas des LT auto-réactifs aux antigènes des cellules  $\beta$ , elles sont physiologiquement exclues du pancréas, ignorant ainsi leurs antigènes. L'étude pionnière qui a montré ce phénomène d'ignorance a utilisé des souris transgéniques exprimant la glycoprotéine virale de la chorioméningite lymphocytaire (GP-LCMV) sous le contrôle du promoteur de l'insuline du rat (RIP). Dans ces animaux, exprimant également un TCR de très haute affinité pour la GP-LCMV, les LT CD8<sup>+</sup> ne provoquaient pas la destruction auto-immune des îlots pancréatiques, ignorant la présence de complexes GP-CMH dans le tissu pancréatique (204). D'ailleurs, le modèle de souris G9C8.NOD que j'utilise dans mon projet de thèse, transgénique pour le TCR reconnaissant le peptide B<sub>15-23</sub> de la PPI et présenté par le CMH de classe I, ne développe pas spontanément de DT1. L'absence d'infiltrat lymphocytaire dans les îlots de ces animaux suggère que cette protection est due à un mécanisme d'ignorance.

### **b. L'anergie et la délétion clonale (B)**

Si le LT naïf parvient toutefois à rencontrer son antigène dans les ganglions lymphatiques, mais que cette rencontre a lieu dans un environnement non-inflammatoire, d'autres mécanismes de tolérance interviennent. En effet, l'APC présentant l'antigène est alors dans un état que l'on peut qualifier de « quiescent » ou « immature », c'est-à-dire non activé. Elle exprime de faibles niveaux de molécules de co-stimulation (CD80/86), de CMH et de cytokines. Le LT ne reçoit donc pas les 3 signaux nécessaires à son activation complète, et est alors soit éliminé par délétion clonale, soit mis dans un état d'insensibilité appelé anergie (205). Le destin des LT vers l'une ou l'autre de ces issues est déterminé par différents facteurs comme l'affinité du TCR pour le complexe pCMH, la densité d'antigène à la surface de l'APC ainsi que la durée d'exposition à l'antigène (206, 207). En effet, des stimulations consécutives avec de faibles doses d'antigène seraient très efficaces pour favoriser la délétion. En revanche, une exposition à une forte dose d'antigène permet la survie des LT CD8<sup>+</sup> mais va les rendre

anergiques (208). Cet état est caractérisé par une incapacité à répondre à des signaux TCR ainsi que par une réduction de l'expression de l'IL-2 (209) et semble être contrôlé par les facteurs de transcription Egr (*Early Growth Response*) 2 et 3 et par l'ubiquitine ligase E3 GRAIL (*Gene Related to Anergy In Lymphocytes*) (210, 211). La molécule PD-1 joue également un rôle prépondérant dans l'établissement de l'anergie en limitant la production autocrine d'IL-2 à la fois des LT CD4<sup>+</sup> et des LT CD8<sup>+</sup> (212, 213). Enfin, les cellules anergiques sont caractérisées par la co-expression des marqueurs FR4 (*Folate Receptor 4*) et de l'ecto-enzyme CD73 (214).

Dans le cas de l'auto-immunité, l'anergie peut être un outil puissant pour éviter l'activation des LT. En effet, même si des auto-antigènes peuvent être présentés dans les ganglions drainants, l'absence de « pré-activation » des APC prévient l'activation des clones auto-réactifs et les rend « résistants » à des stimulations ultérieures. Une importante population de LT CD4<sup>+</sup> anti-insuline anergiques a d'ailleurs été identifiée dans les ganglions pancréatiques de la souris NOD. Cette population diminue avec le temps et est absente du pancréas. De façon intéressante, ces LT anti-insuline resteraient naïfs dans un modèle C57BL/6 non auto-immun, suggérant que, contrairement à la NOD, ils ne rencontrent pas l'antigène. L'anergie serait donc un mécanisme mis en place dans le DT1 pour limiter la réponse auto-immune après la rencontre d'un LT avec l'auto-antigène  $\beta$ , mais une fraction de LT parvient néanmoins à s'activer, se différencier en Tregs et à déclencher la maladie (215).

### c. La régulation par les Tregs (C)

#### **Induction des pTregs**

Les Tregs sont les cellules centrales de la régulation de la réponse immunitaire et en particulier pour le contrôle de l'auto-immunité (216). Si les tTregs proviennent du thymus et sont différenciées pendant la sélection clonale (cf partie II.1.1), d'autres populations T régulatrices peuvent être induites en périphérie (pTregs), suite à la rencontre d'un LT naïf avec son antigène présenté par une APC. Différents éléments sont impliqués dans cette différenciation.

Tout d'abord, cela dépend du statut d'activation de la DC que le LT rencontre. En effet, son profil cytokinique (correspondant au signal 3 de la Figure 11) va orienter la différenciation du LT. Dans le cas d'une infection par un organisme pathogène, la DC va s'activer et subir un processus de maturation lui permettant

d'exprimer des cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-6, IL-1 $\beta$ ) qui vont mener à la différenciation des LT naïfs en Teffs (217, 218). En revanche, la DC peut plutôt présenter un phénotype dit « tolérogène » avec un profil cytokinique anti-inflammatoire (TGF- $\beta$ , IL-10), menant ainsi à la différenciation du LT CD4<sup>+</sup> naïfs en pTregs (219, 220). Ces DCs tolérogènes sont particulièrement nombreuses aux niveaux des muqueuses et de la peau (221). L'intestin, en particulier, contient un grand nombre de ces cellules et est un lieu privilégié pour l'induction de tolérance (222). Ces mécanismes seront détaillés dans la partie II.2.3 sur l'immunité intestinale.

Ensuite, un autre élément important à la différenciation des pTregs est la présence du récepteur inhibiteur CTLA-4. Ce dernier, qui n'est pas nécessaire pour le développement des tTregs, est requis pour la conversion d'un LT naïf en pTregs par le TGF- $\beta$ , en induisant l'expression de Foxp3<sup>+</sup> et l'acquisition de fonctions suppressives (223, 224). Au contraire, CD28, son homologue co-stimulateur qui est indispensable pour le développement des tTregs, inhibe la différenciation induite par TGF- $\beta$  des pTregs *in vitro* (225-227).

Enfin, comme dans le thymus, l'induction de pTregs dépend également de la force du signal TCR. En effet, plusieurs études ont démontré que l'induction de Foxp3 était plus efficace dans des conditions d'activation sous-optimales, suggérant qu'une plus faible signalisation du TCR favoriserait la conversion en pTregs (228-230). De plus, utilisant des cellules TCR transgéniques 5C.C7 stimulées par leur peptide ligand naturel MCC (Moth Cytochrome C), en présence d'un faible agoniste (102S) ou d'un super-agoniste (K5), Gottschalk et al. ont constaté que plus l'affinité du TCR pour le pCMH était importante, plus la dose de peptide requise à la conversion des LT naïfs en pTregs était faible (136). Il existait en fait, pour chaque peptide, une dose optimale pour la conversion en pTregs qui, si elle était dépassée, induisait plutôt la prolifération du LT naïf, non converti. De façon intéressante, l'ajout de TGF- $\beta$  permettait de dépasser cette dose et de préserver la différenciation en pTregs, un résultat cohérent avec de précédentes études démontrant la nécessité du TGF- $\beta$  dans la conversion des LT recevant une stimulation TCR trop élevée (220, 223, 231). Si ces résultats *in vitro* suggèrent une relation simple entre l'affinité et la dose, les expériences *in vivo* complexifient la situation. Dans l'étude de Gottschalk et al., si les 3 peptides administrés chez la souris transgénique 5C.C7 étaient capables de promouvoir rapidement une conversion en pTregs à une fréquence similaire, la population induite par la stimulation par le faible agoniste 102S était perdue sur la durée.

Ces résultats suggèrent l'existence de deux phases influençant le nombre de pTregs. Lors de l'induction initiale, la dose d'antigène pourrait compenser l'affinité pour atteindre une stimulation TCR optimale. En revanche, lors de la deuxième phase, le maintien ou l'élimination de cette population serait déterminé uniquement par des critères d'affinité. Par conséquent, une faible densité d'un ligand pCMH de haute affinité pour le TCR serait optimale pour atteindre la quantité et la qualité de stimulation nécessaires pour induire une population persistante de pTregs *in vivo*.

Dans le cas des auto-antigènes, cela signifierait que de faibles concentrations de complexes auto-pCMH spécifiques pourraient contribuer à l'induction de pTregs, même si l'interaction TCR-pCMH est d'une affinité élevée. Si les complexes auto-pCMH sont exprimés plus abondamment, la suppression des LT apparentés serait le mécanisme de tolérance le plus probable, quelle que soit la force du ligand et l'étendue de l'induction de Foxp3.

### **Mode d'action des Tregs**

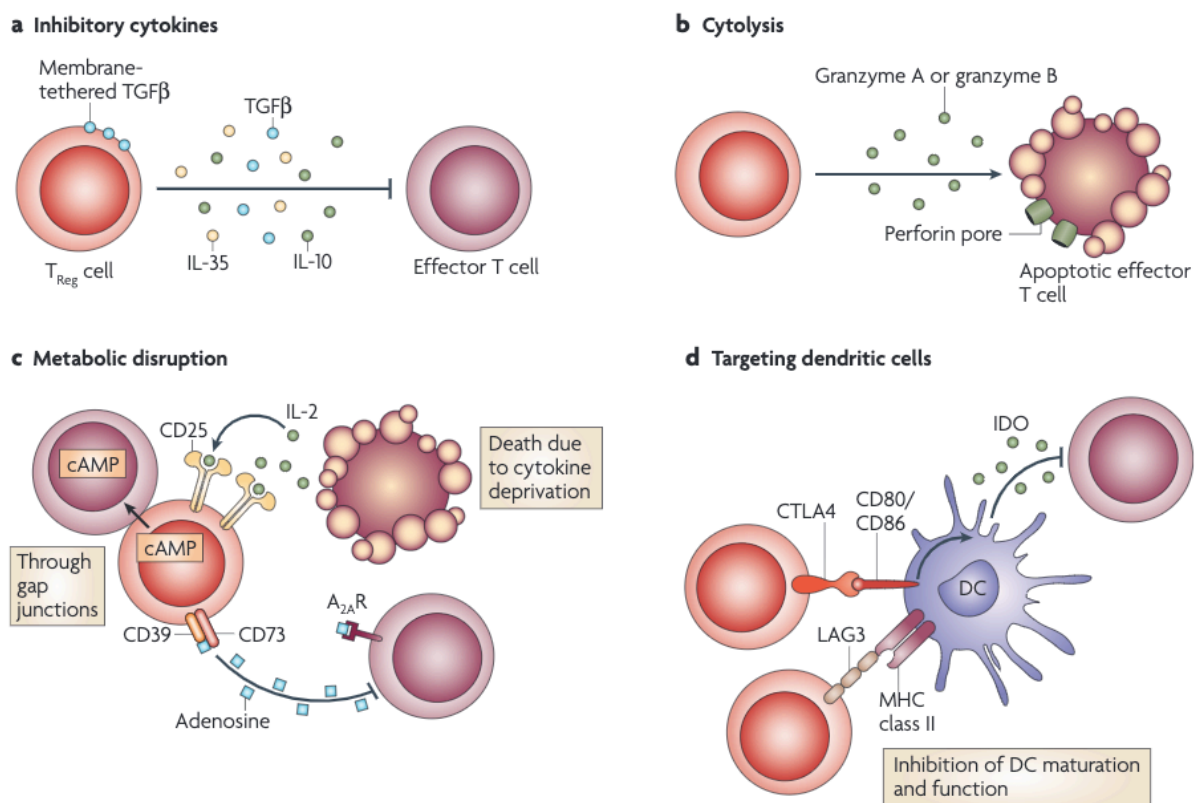
Qu'ils proviennent du thymus ou soient induits en périphérie, les Tregs interviennent à différentes étapes de la réponse immunitaire, et la régulent par différents mécanismes (**Figure 13**). Ils seront brièvement décrits ici.

- **Suppression par sécrétion de cytokines**

Tout d'abord, les Tregs peuvent moduler la réponse immunitaire en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires et notamment l'IL-10 et le TGF- $\beta$ . L'IL-10 est un facteur anti-inflammatoire et immunosuppresseur majeur, indispensable pour le contrôle homéostatique de l'infection et de l'inflammation, notamment au niveau des muqueuses (232). Le TGF- $\beta$  qui bloque la prolifération et la différenciation, participe directement à la suppression des Teffs (233, 234). Dans un modèle de DT1 inducible, un retard dans le déclenchement de la maladie était associé à un infiltrat pancréatique important de Tregs, exprimant fortement le TGF- $\beta$  membranaire, essentiel pour contrôler les LT CD8<sup>+</sup> auto-réactifs (ce contrôle étant perdu sur des LT exprimant la forme mutée dominante négative du récepteur au TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ RII-DN) (235). Également, dans des expériences de co-transfert adoptif chez des receveurs immunodéficients NOD.SCID, la neutralisation du TGF- $\beta$  lève la protection exercée par les Tregs et favorise l'activation des Teffs et ainsi le développement du DT1 (236).

- **Suppression par perturbation d'autres médiateurs solubles**

Les Tregs peuvent supprimer les fonctions des Teffs en perturbant leur environnement métabolique, et différents mécanismes ont été décrits. Tout d'abord, grâce à la forte expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2, CD25, à la surface des Tregs, ces derniers peuvent priver les Teffs de leur signal de survie en consommant la majorité de l'IL-2 locale. Cela conduit par conséquent à une apoptose des Teffs (237-239). Également, les Tregs peuvent inhiber la prolifération des Teffs et leur synthèse d'IL-2 en transférant directement la molécule inhibitrice AMP cyclique à travers les jonctions serrées des Teffs (240). Enfin, les Tregs expriment des niveaux élevés d'ecto-enzymes, CD39 et CD73 à leur surface. CD39 est responsable de la dégradation de l'ATP ou de l'ADP en AMP, tandis que CD73 permet la production d'adénosine à partir d'AMP extracellulaire.



**Figure 13. Représentation des différents mécanismes de régulation des Tregs.** a. La suppression par cytokines inhibitrices fait intervenir l'IL-10, l'IL-35 et le TGF $\beta$ . b. La cytolysse est un mécanisme de destruction dépendant des granzymes (A ou B) et de la perforine. c. La perturbation métabolique des Teffs passe par la privation d'IL-2 par la forte expression du CD25, l'inhibition par l'AMP cyclique (AMPC) via les jonctions serrées ou par l'adénosine via les ecto-enzymes CD39/CD73. d. La modulation de la maturation et/ou de la fonction des DCs passe par la suppression du CMH de classe II par LAG3 ainsi que par l'induction de IDO par la liaison CTLA-4-CD80/CD86.

L'adénosine ainsi produite peut se lier aux récepteurs A2A sur les Teffs et inhiber leur prolifération et leur activité (241).

- **Suppression par cytolyse**

Bien que la cytolyse par sécrétion de granzyme soit largement attribuée aux LT CD8<sup>+</sup> effecteurs, les Tregs activés sont également capables d'induire la mort de leur cible par ce même mécanisme. Les Tregs humains agiraient par l'intermédiaire du granzyme A et de la perforine suite à l'adhésion du CD18 (242). Les Tregs murins expriment quant à eux le granzyme B (243, 244), qui serait responsable de leur capacité cytolytique (245).

- **Suppression par modulation des APC**

Enfin, les Tregs peuvent réguler indirectement l'activité des Teffs en bloquant la maturation ou les capacités de présentation d'antigènes des DCs (246-248). Par exemple, le CTLA-4 exprimé de manière constitutive par les Tregs (249) peut se lier aux CD80/CD86 exprimé par les APC, à la place du CD28 des Teffs. Cette liaison déclenche la production de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les APC, qui induit l'expression de métabolites pro-apoptotiques à partir du catabolisme du tryptophane, conduisant à la suppression de l'activité des Teffs (250, 251). Enfin, les Tregs expriment également la protéine LAG-3 (*lymphocyte-activation gene 3*), qui se lie aux molécules du CMH de classe II sur les DCs immatures, bloquant ainsi leur maturation et limitant les réponses immunitaires par les LT (252, 253).

## **Tregs et DT1**

Les études GWAS ont identifié le locus du gène *IL2RA* (i.e. CD25) comme un locus de susceptibilité dans le DT1 (cf. partie I.3.1). On peut donc naturellement s'attendre à une implication importante des Tregs dans le contrôle du DT1. Cette hypothèse a effectivement été validée à plusieurs reprises dans différents modèles expérimentaux. Par exemple, chez la souris NOD, la déplétion des Tregs par un traitement anti-CD25 (à 2-3 semaines d'âge) ou dans des lignées déficientes en Foxp3, induit un développement accéléré du DT1 (254-256). De la même façon, le modèle de souris NOD.CD28<sup>-/-</sup> présente un diabète fulgurant dû au déficit en tTregs observés chez ces animaux (139). Dans un modèle NOD.*IL-2*<sup>+/-</sup> hémizygote (qui ne possède donc qu'un seul allèle *IL-2* fonctionnel), l'incidence du DT1 est augmentée. A l'inverse, le traitement de souris NOD par une faible dose d'*IL-2*, qui



induit la survie des Tregs, permet non seulement la protection de ces animaux vis-à-vis du diabète mais aussi la rémission des souris traitées après l'apparition de la maladie (257, 258).

#### d. L'épuisement (D)

Dans le contexte d'une inflammation chronique, l'épuisement serait le mécanisme physiologique de tolérance. Il est principalement décrit pour les LT CD8<sup>+</sup> qui, sous l'effet de l'exposition chronique à l'antigène, perdent leurs fonctions effectrices. Les LT "épuisés" proviennent donc de cellules qui ont subi une activation initiale productive, ce qui distingue l'épuisement du mécanisme d'anergie (259). En revanche, il semblerait que les LT épuisés ne proviendraient pas de Teffs totalement différenciés (260, 261). Ils seraient en fait issus de cellules précurseurs ayant conservé leur capacité à persister, c'est-à-dire capables de survivre au stade de contraction de la réponse immunitaire (260).

La population de LT CD8<sup>+</sup> épuisés est donc hétérogène, composée de précurseurs (PD-1<sup>hi</sup> TIM3<sup>low</sup> TCF1<sup>+</sup>) qui se divisent pour donner des cellules épuisées différenciées (PD-1<sup>hi</sup> TIM3<sup>hi</sup> TCF1<sup>-</sup>) (259). Comme les infections chroniques, les maladies auto-immunes sont caractérisées par l'exposition continue à l'auto-antigène. Récemment, une étude de Wiedeman et al. a comparé les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques des îlots présents dans le sang circulant de patients diabétiques présentant une évolution rapide ou lente de la maladie. Par cytométrie de masse, ils ont pu étudier de nombreux marqueurs sur les LT CD8<sup>+</sup> reconnaissant des TMR chargés avec des peptides d'îlots. Alors que les LT CD8<sup>+</sup> des patients à progression rapide avaient un phénotype majoritairement mémoire, ceux issus des patients à progression lente exprimaient des marqueurs d'épuisement. Ces derniers présentaient également une production limitée de cytokines ainsi qu'une capacité proliférative réduite (169). Il semblerait donc que l'épuisement soit un mécanisme impliqué dans le contrôle de la progression du DT1.

#### e. L'apoptose (E)

La dernière étape de la réponse immunitaire vis-à-vis d'un pathogène est l'apoptose des Teffs qui permet la contraction de cette réponse et donc son contrôle. Cette mort cellulaire programmée peut être induite par deux principales voies de signalisation. La première est appelée la mort cellulaire induite par

activation (AICD, *Activated-Induced Cell Death*) et est dépendant de la voie Fas/Fas Ligand (262). L'expression de Fas par le LT est induite par la stimulation répétée du LT par engagement de son TCR (263). Fas et son ligand FasL peuvent être exprimés par le même LT, et dans ce cas la mort cellulaire est dite « autonome », ou par deux LT différents voire par des cellules cibles exprimant FasL, nécessitant un contact pour induire l'apoptose (264). Le second mécanisme implique la voie d'apoptose mitochondriale dépendante de Bim (265). Elle serait activée par le déclin du niveau de cytokines qui intervient après l'élimination du pathogène (266).

Lors d'une réponse immunitaire à une infection chronique, ces deux voies participent de façon synergique à la mort des LT activés (267). Ce phénomène évite donc l'accumulation des Tregs qui ne sont plus utiles et potentiellement dangereux, pouvant déclencher une auto-immunité.

## II.2.2 Les défauts de tolérance périphérique dans le DT1

### a. Défaut des Tregs

Comme nous venons de le voir, les Tregs sont très impliqués dans le contrôle du DT1 et ce dernier peut être accéléré quand un défaut expérimental est induit (255, 256, 268). De nombreuses études se sont penchées sur l'hypothèse d'un défaut numérique et/ou fonctionnel des Tregs chez les sujets diabétiques. Elles aboutissent au consensus que le nombre de Tregs retrouvés dans le sang des individus atteints de DT1 est similaire à celui des individus sains (36, 171-173). Le défaut serait-il donc fonctionnel ? À l'appui de ce concept, une grande variété de différences intrinsèques au sein de la population de Tregs a été soulignée chez les personnes atteintes de DT1, dont la plupart pourraient suggérer une moins grande activité ou stabilité des Tregs Foxp3<sup>+</sup>. Ces altérations incluent : des niveaux accrus d'apoptose (269, 270), des défauts dans la signalisation du récepteur à l'IL-2, y compris une phosphorylation diminuée de STAT5, qui peut entraîner une altération de la stabilité de l'expression de Foxp3 (271, 272), et une augmentation de la proportion de Tregs qui produisent des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IFN- $\gamma$  et IL-17 (273, 274). A ces observations s'ajoutent l'identification de nombreux loci de sensibilité au DT1, identifiés par des études GWAS, mentionnés en partie I, qui peuvent influencer la fonction des Tregs (par exemple *IL2RA*, *IL2*, *PTPN2*, *CTLA4* et *IL10*) (275).

Des études examinant la fonction des Tregs par des tests d'inhibition de prolifération chez des individus à risque, positifs pour les auto-anticorps, suggèrent que les défauts Treg sont antérieurs à la maladie clinique, soutenant un rôle causal de la dysfonction des Tregs (269, 276).

D'après les études décrites ci-dessus, nous pourrions conclure qu'un défaut fonctionnel des Tregs contribue à la pathogenèse du DT1. Or, à ce jour, la majorité des études examinant la fonction des Tregs Foxp3<sup>+</sup> chez l'homme (principalement par des tests d'inhibition de la prolifération ou de production de cytokines) ont révélé une grande similarité entre les individus diabétiques et sains. Les réponses sont globalement hétérogènes et seule une petite partie des individus atteints de DT1 affiche clairement le phénotype immun associé à une mauvaise fonction, le reste ayant des réponses du même ordre que les contrôles sains.

Cependant, il convient de noter que les études effectuées chez l'homme sont majoritairement restreintes à l'analyse des PBMCs, cellules du sang circulant qui ne reflètent pas forcément ce qu'il se passe dans les organes atteints. C'est ce que souligne l'étude de Tang et al. qui, chez la souris NOD, montre une diminution progressive du ratio Tregs/Teffs dans les îlots pancréatiques, concomitante à une réduction de l'expression de CD25 et de Bcl-2 par les Tregs intra-îlots (257). Ceci résulterait d'une production locale défectueuse d'IL-2, induisant une apoptose accrue des Tregs. Ainsi, le dysfonctionnement des Tregs (non observé dans la rate ou les ganglions pancréatiques) serait restreint au tissu cible enflammé et serait une conséquence de l'inflammation et une cause de la rupture de tolérance et du développement du diabète chez la souris NOD. Notons que ces études ont été à la base du traitement par l'IL-2 faible dose pour augmenter *in vivo* la survie et le nombre de Tregs, et qui a permis de prévenir et de supprimer le diabète chez la souris NOD. Ce traitement est actuellement en cours d'essai chez l'homme (77).

Chez l'homme, bien que l'insulite soit moins massive et invasive par rapport à celle caractéristique des souris NOD, les Tregs Foxp3<sup>+</sup> sont rarement retrouvés dans les îlots pancréatiques de patients diabétiques comme dans ceux des individus non-diabétiques (67). Ceci pose l'hypothèse d'un défaut de migration des Tregs vers le pancréas. Dans ce sens, une réduction de l'expression de CCR2, dont le ligand est la chimiokine CCL2 produite par les cellules  $\beta$ , a été rapportée sur les Tregs des ganglions pancréatiques de patients diabétiques (277). De manière intéressante, ces derniers présenteraient des fonctions suppressives altérées associées à une production d'IL-17 (278). Ainsi, les ganglions drainants

seraient le lieu où s'exerce la régulation de la réponse immunitaire chez l'homme, et dont l'efficacité serait amoindrie chez les patients DT1. Ce point mérite toutefois confirmation.

## b. Défaut des LT effecteurs

Si des défauts fonctionnels des Tregs peuvent être en jeu chez les sujets diabétiques, ils restent très partiels et ne sont pas les principaux coupables de la rupture de tolérance vis-à-vis des antigènes de la cellule  $\beta$  et de l'activation incontrôlée des LT auto-réactifs. En effet, un certain nombre d'études chez l'homme et la souris soulignent une résistance des Teffs à la régulation immunitaire associée au développement du DT1.

Ce mécanisme a été mis en évidence *in vitro* dans les tests classiques d'inhibition de la prolifération où les Teffs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) de patients DT1 étaient plus réfractaires que les Teffs de sujets sains aux effets suppresseurs des Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, que ceux-ci proviennent de donneurs sains ou diabétiques) (279, 280). Par comparaison, ce défaut n'a pas été observé pour les patients présentant un diabète de type 2 (280). De manière intéressante, les études chez la souris NOD ou dans le modèle transgénique DO11xRIP-mOVA (exprimant un TCR transgénique anti-OVA et son antigène cible dans les cellules  $\beta$ ) suggèrent que cette résistance des Teffs augmente avec le temps et la progression de la maladie. En l'occurrence, *in vivo*, la capacité des Teffs de souris jeunes (6 semaines d'âge : infiltrat immunitaire modeste) à induire le DT1 est parfaitement contrôlée par les Tregs, contrairement à celle des Teffs issus de souris diabétiques (236, 281). Cette perte de sensibilité avec l'âge est observée non seulement vis-à-vis des Tregs mais également d'autres facteurs immunomodulateurs, tels que la cytokine TGF- $\beta$  (236, 282). Fait important, ces observations ne sont pas restreintes au DT1 mais s'appliquent également à nombre de pathologies auto-immunes, telles que la sclérose en plaque, l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé et les maladies inflammatoires de l'intestin (283).

Quels sont les mécanismes qui induisent et régissent cet état réfractaire ? Le contexte environnemental de plus en plus inflammatoire participerait activement à l'acquisition du défaut de sensibilité à la régulation. Il serait induit par la transduction de signaux moléculaires convergeant vers une activation soutenue de la voie PI3K/AKT (283), qui favorise la prolifération et la survie

cellulaire, augmente le métabolisme glucidique et la production de cytokines pro-inflammatoires. Dans ce contexte, l'IL-21 a été mise en cause dans le modèle DO11xRIP-mOVA (281), mais pas confirmée chez la souris NOD (284). D'autres études soulignent le rôle des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  dans l'hyper-activation d'AKT. Dans ce sens, les LT de patients diabétiques expriment de plus forts niveaux de la forme phosphorylée des médiateurs STAT1 et STAT3 induite par l'IL-6, par rapport aux LT de donneurs sains, et l'ajout d'un inhibiteur de STAT3 dans les co-cultures Tregs/Teffs lève la résistance des Teffs aux Tregs (285, 286).

Si les analyses ex-vivo des LT auto-réactifs ne montrent pas de différence phénotypique claire entre les individus diabétiques et sains dans le sang (89, 168) (cf partie II.1.2), elles n'excluent pas une aptitude accrue à s'activer suite à la rencontre avec leur antigène et à résister à l'apoptose, ce qui pourrait déterminer leur sensibilité aux mécanismes suppresseurs (287).

La résistance à la régulation impliquerait donc un défaut intrinsèque des Teffs de sujets diabétiques en particulier, et auto-immuns en général, s'acquérant avec le temps sous l'influence d'un environnement de plus en plus inflammatoire, exacerbant ainsi à son tour le développement et la sévérité de la maladie.

### c. Défaut des APCs

Le défaut de régulation des réponses auto-réactives chez le sujet diabétique implique une présentation des antigènes de la cellule  $\beta$  altérée, déviée vers un profil immunogène (288).

Les macrophages et DCs sont naturellement présents dans le pancréas et autour des îlots pancréatiques. Lors de l'apoptose physiologique de la cellule  $\beta$  (289, 290), une des fonctions premières des macrophages est l'élimination des débris cellulaires par le processus d'efferocytose marquée par la production de facteurs pro-résolutifs essentiels pour l'homéostasie tissulaire (291, 292). Plusieurs études suggèrent que les macrophages de souris NOD présentent un profil M1 et des capacités phagocytiques réduites, conduisant à un défaut de clairance des corps apoptotiques et par conséquent à un relargage d'auto-antigènes pancréatiques dans un environnement inflammatoire (293-295). Par RNAseq sur cellule individuelle, le groupe d'E. Unanue a d'ailleurs récemment démontré l'existence de plusieurs sous-populations macrophagiques dans les îlots, avec un déclin progressif des macrophages résolutifs au profit de macrophages inflammatoires (296).

Cette même étude a également mis en évidence dans les îlots, des DCs conventionnelles cDC1 (CD103<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup>) et cDC2 (SIRP $\alpha$ <sup>+</sup>), toutes deux pouvant s'activer en réponse à l'environnement inflammatoire (296). Ceci peut être relié aux différents travaux suggérant une perte de fonctions régulatrices exercées par divers sous-types de DCs du pancréas chez la souris NOD, contribuant à un contrôle déficient des LT auto-réactifs (297-299). De manière similaire, on note un défaut des DCs du sang périphérique et de la *lamina propria* de patients DT1 à induire des Tregs Foxp3<sup>+</sup>, détaillé un peu plus bas dans la partie II.3 (300, 301). Les mécanismes sous-jacents à ces fonctions tolérogènes diminuées restent à élucider, même si des altérations dans l'expression d'IDO, de la galectine-1 ou de la vitamine D ont été rapportées ((302-304).

Enfin, les allèles HLA de classe II DQ2/8 et DR3/4 chez l'homme et I-A<sup>g7</sup> chez la souris prédisposent au DT1 (cf partie I.3.1). Les DCs issues de la rate ou dérivées de la moelle osseuse de souris NOD présentent des niveaux anormalement bas de CMH II en comparaison à souches non auto-immunes mais les conséquences précises de cette diminution restent non explorées (305-307). De plus, les DCs CD8<sup>+</sup> montrent des capacités de cross-présentation diminuées aux LT CD8<sup>+</sup> auto-réactifs (308). En revanche, ces observations n'ont pas été rapportées chez l'homme, avec notamment une expression normale ou augmentée d'HLA-DR (309-312). La question d'une présentation antigénique altérée chez les sujets diabétiques et de son impact sur le développement ou le contrôle des réponses T auto-réactives reste à mieux définir.

#### d. Défaut de la cellule $\beta$

Si le développement du DT1 résulte de réponses lymphocytaires non contrôlées, le défaut ne proviendrait pas exclusivement de la composante immunitaire mais également de la cellule  $\beta$  elle-même qui engage un dialogue avec les LT (Mallone & Eizirik, Diabetologia 2020, sous presse). Comme souligné plus haut, les LT CD8<sup>+</sup> reconnaissant les antigènes  $\beta$  circulent à des fréquences similaires chez les sujets diabétiques et chez les sujets sains, et présentent un phénotype largement naïf (89, 168). En revanche, ces cellules infiltrent uniquement le pancréas de patients diabétiques et expriment alors un phénotype effecteur/mémoire. Ces données suggèrent que chez le patient diabétique, les cellules  $\beta$  sont capables d'attirer et d'activer les LT auto-immuns, augmentant ainsi leur visibilité et vulnérabilité. Ainsi, plusieurs arguments vont dans le sens

d'un rôle actif de la cellule  $\beta$  dans l'initiation du DT1, notamment par sa sensibilité à l'inflammation et au stress du réticulum endoplasmique.

En présence de cytokines inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), la cellule  $\beta$  accroît très significativement l'expression des molécules HLA-I, ainsi que la quantité et le nombre d'épitopes présentés par ces molécules, la rendant ainsi beaucoup plus visible aux LT auto-immuns (48, 89, 313). Elle produit également la chimiokine CXCL10 attirant les Teffs (313).

La cellule  $\beta$  est également sensible au stress du réticulum endoplasmique, associé à la nécessité de s'adapter à l'environnement glycémique et produire de fortes quantités d'insuline et d'autres protéines des granules, entraînant des erreurs de synthèse et l'activation de la voie UPR (*unfolded protein response*). Si, en conditions physiologiques, cette réponse UPR permet l'élimination des protéines défectueuses, en conditions inflammatoires induites notamment par l'IFN- $\alpha$ , trop stimulée, elle induit des dysfonctions et l'apoptose de la cellule  $\beta$  (314, 315). La dégradation augmentée des protéines défectueuses peut ainsi conduire à une exposition accrue des peptides présentés par les molécules HLA-I, et notamment de néo-épitopes issus de processus post-traductionnels (316) pouvant activer les LT pathogéniques.

Enfin, les cellules  $\beta$  sécrètent leurs hormones et protéines directement dans le sang, sous forme libre, sous forme de peptides ou encapsulées dans des granules ou des microvésicules, qui peuvent être captés par des APCs en dehors du pancréas (317). Elles peuvent ainsi communiquer avec le système immunitaire, le sensibiliser à distance et attirer les lymphocytes sur place.

## e. Tableau récapitulatif

Type cellulaire	Défaut	Association avec le DT1	Espèce	Références
Défaut des Tregs	Nombre	Pas de défaut de nombre dans le sang	H	(36, 171-173)
		Diminution du ratio Tregs/Teffs dans les îlots pancréatiques	S	(257)
	Fonction	Niveaux accrus d'apoptose	H + S	(257, 269, 270)
		Instabilité de l'expression de Foxp3 par défaut de signalisation IL-2	H	(271, 272)
		Production de cytokines pro-inflammatoires	H	(273, 274, 278)
		Défaut de migration dans les îlots	H	(277)
Défaut des Teffs	Nombre	Pas de différence de nombre dans le sang	H	(89, 168, 169)
	Résistance à la régulation	Résistance à la régulation par les Tregs et autres facteurs	H + S	(236, 279-281)
		Activation aberrante de la voie PI3K/AKT	H + S	(283, 285, 286)
Défaut des APCs	Fonction	Défaut de clairance des corps apoptotiques	S	(293-295)
		Profil inflammatoire des APCs des îlots	S	(296)
		Perte de fonction régulatrice des DCs dans le pancréas, le sang et la lamina propria	H + S	(297-301)
	Phénotype	Diminution expression CMH II	S	(305-307)
Défaut de la cellule $\beta$	Visibilité au système immunitaire	Augmentation de l'expression de molécules de CMH I en présence de cytokines pro-inflammatoires	H	(48, 89, 313)
		Production de chimiokines attirant les Teffs	H	(313)
		Présentation de néo-épitopes en conditions inflammatoires	H	(89, 316)
	Sensibilité au stress du RE	Apoptose de la cellule $\beta$ en conditions inflammatoires	H + S	(314, 315)

**Tableau 2. Les principaux défauts de tolérance périphérique dans le DT1**



## II.3 Immunité intestinale, tolérance orale et période néonatale

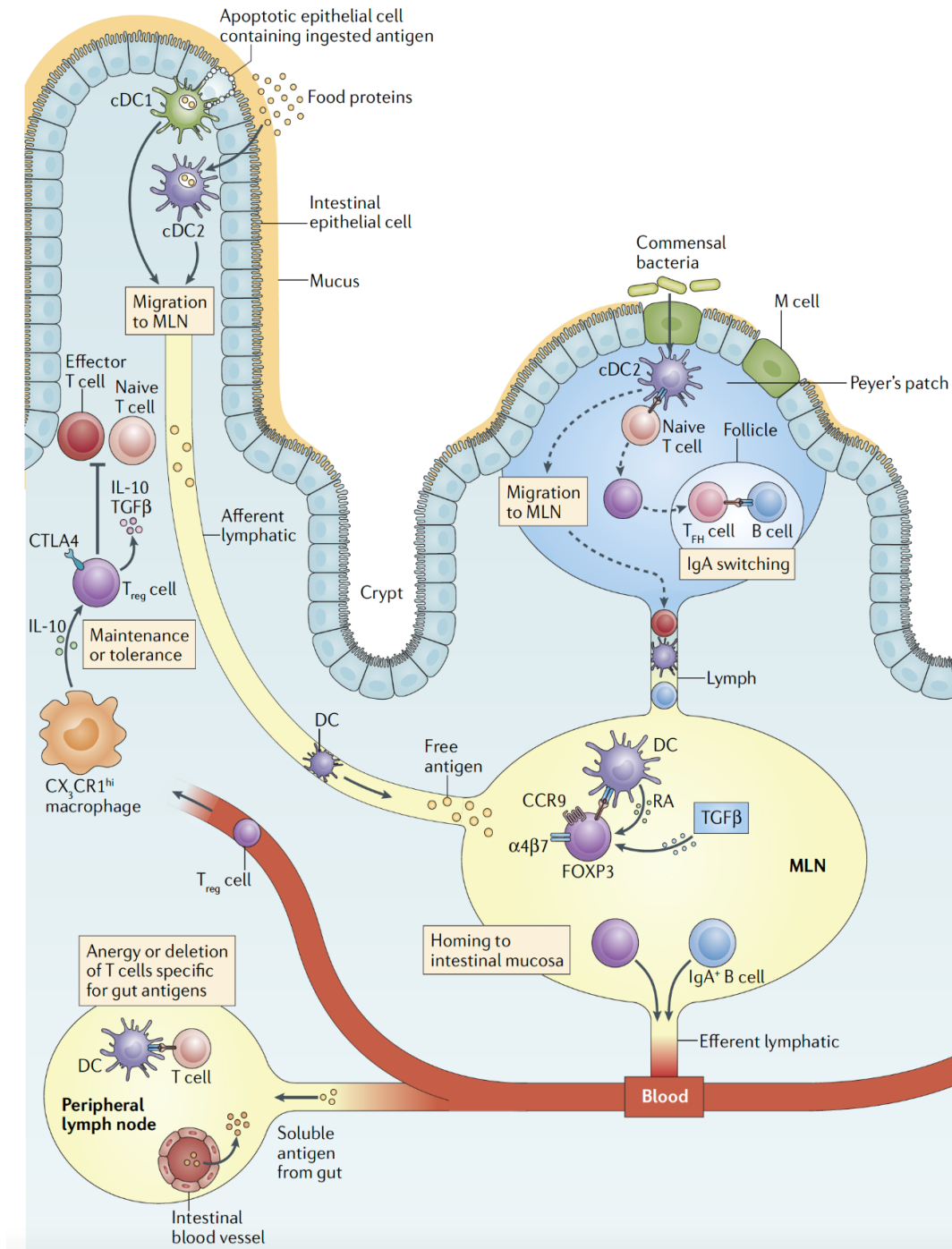
Par son exposition aux éléments extérieurs, son contact perpétuel avec les bactéries commensales et les antigènes apportés par la nourriture, l'intestin est un site privilégié de tolérance et les cellules immunitaires qui l'habitent sont très spécialisées dans ce sens. Un grand pan de la tolérance intestinale correspond à la tolérance vis-à-vis de la flore bactérienne et du microbiote, qui tapissent l'intestin et envers lesquels les réponses doivent être parfaitement contrôlées.

Je n'aborderai pas ici le rôle du microbiote qui ne concerne pas mes travaux de recherche, mais je détaillerai les mécanismes et populations immunitaires impliquées dans l'homéostasie et la tolérance intestinale. En effet, mon projet de vaccination exploite la voie orale d'administration d'antigènes pour la prévention du DT1. Non-invasive et particulièrement tolérogène, elle offre une perspective favorable à l'induction de tolérance vis-à-vis de notre protéine thérapeutique.

### II.3.1 La *lamina propria* et les mécanismes de tolérance intestinale

La muqueuse intestinale contient un grand nombre de cellules immunitaires, réparties dans différentes régions, qui forment le tissu lymphoïde associé à l'intestin, le GALT (*gut-associated lymphoid tissue*). Schématiquement, le GALT comprend : la *lamina propria* (LP), qui se situe sous la couche de cellules épithéliales sur toute la longueur de l'intestin ; les plaques de Peyer (PP), qui sont des structures de cellules organisées disséminées le long de l'intestin ; et les ganglions mésentériques (MLN), lieu d'induction de réponses immunitaires, drainant les deux premiers sites (**Figure 14**)

Si les PP sont cruciales pour l'induction de réponses immunitaires contre les pathogènes, il semblerait qu'elles ne soient pas indispensables dans le cadre de la tolérance orale (318-320). En revanche, la LP est un point central dans les mécanismes d'induction de tolérance car elle abrite de nombreuses cellules immunitaires possédant un phénotype tolérogène particulier.



**Figure 14. Organisation de la muqueuse intestinale et induction de tolérance.** Lors de l'exposition à un antigène oral provenant de l'alimentation ou de la flore commensale, ce dernier va être transféré à travers la barrière intestinale via différents mécanismes et se retrouver dans la lamina propria ou au sein des plaques de Peyer. Des DCs vont ensuite capter cet antigène et l'apporter jusqu'aux MLN. Sous l'action conjointe de l'acide rétinoïque (RA) et du TGF-β, les DCs vont induire la génération de pTregs spécifiques, ainsi que l'expression de marqueur de « homing » (CCR9 et α4β7) à leur surface. Les pTregs vont alors pouvoir retourner dans la lamina propria et exercer leur rôle régulateur. (Mowat Nat Rev Immunol 2018)

## a. Les phagocytes mononucléaires.

Le terme de « phagocytes mononucléaires » (MP, *mononuclear phagocytes*) regroupe les principales APCs de la LP, notamment les DCs et les macrophages qui ont souvent été confondus du fait de leur phénotype très semblable. En effet, tous deux expriment des niveaux élevés de CD11c, CD11b et CMH de classe II dans l'intestin. La distinction de ces populations nécessite par conséquent l'utilisation de marqueurs additionnels, tels que le CD64 (FcγRI) ou encore le F4/80 spécifiques des macrophages (321–323).

Les capacités tolérogènes des MP intestinaux ont été mises en évidence notamment par l'étude de Chirido et al. montrant que les cellules CD11c<sup>+</sup>CMH-II<sup>+</sup>, isolées à partir de la LP de souris nourries avec de l'OVA et transférées dans des souris hôtes n'ayant jamais été exposée à cet antigène, pouvaient induire une tolérance vis-à-vis de l'OVA, se traduisant par une réduction de la réponse d'hypersensibilité retardée (DTH, *delayed-type hypersensitivity*) *in vivo* (324). D'autres études ont depuis détaillé l'implication des différentes populations de MP dans la tolérance orale et ont mis en évidence plusieurs sous-populations de DCs et de macrophages jouant chacune un rôle dans ce mécanisme.

- **Les DCs**

Les DCs sont indispensables pour l'induction de la tolérance orale. Elles sont capables de transporter les antigènes captés dans la LP jusqu'aux ganglions mésentériques (MLN). Le principal mécanisme qui leur est alloué repose sur leur expression d'acide rétinoïque (RA) qui, par une action conjointe avec le TGF-β, permet la génération de pTregs au sein des MLN (325). L'expression du RA par les DCs permet également l'induction de l'expression des molécules CCR9, récepteur de la chimiokine CCL25, et de l'intégrine α4β7 sur les LT, dont les pTregs (326). Ces deux molécules sont des marqueurs de « homing », permettant aux LT de retourner dans l'intestin après activation. Ce mécanisme est essentiel, la tolérance orale étant perdue dans des souris déficientes pour l'une ou l'autre de ces deux molécules (327).

Il existe plusieurs sous-populations de DCs dans la LP. Elles expriment toutes le CD11c et le CMH-II, mais sont distinguables par l'expression différentielle de CD103, correspondant à l'intégrine αE. Les DCs CD103<sup>+</sup> sont considérées comme les acteurs majeurs de la tolérance intestinale, car intrinsèquement tolérogènes (328–330). Elles peuvent être CD11b<sup>+</sup> ou CD11b<sup>-</sup>, et

ces deux sous-populations n'ont pas totalement le même rôle ou les mêmes caractéristiques. En effet, une étude récente suggère que la population de DCs CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, plutôt que les CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, serait impliquée dans la tolérance orale aux antigènes solubles, en particulier dans l'intestin grêle (331). Dans cette étude, une co-culture de LT OT-II, reconnaissant un peptide issu de l'OVA, avec les différentes populations de DCs intestinales, en présence du peptide d'OVA, a montré que l'induction de Foxp3 ainsi que de CCR9 et  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 était plus importante dans les LT activés par les DCs CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> que les autres (331).

Une population de DCs CD103<sup>-</sup> existe également dans la LP et la fraction CD11b<sup>+</sup> de ces cellules serait quant à elle impliquée dans la tolérance aux antigènes solubles dans le colon (332). Elles sont également capables de produire du RA mais sont moins efficaces pour l'induction de Tregs *in vitro* (333).

Une autre classification des DCs intestinales repose sur l'utilisation des marqueurs XCR1 et SIRP $\alpha$  qui cependant recoupe, et finalement complète celle basée sur CD103 et CD11b (**Tableau 3**).

Cell type	Phenotype		Function in intestinal tolerance/homeostasis
	Common	Subset specific	
DCs	CD11c <sup>high</sup> MHCII <sup>+</sup>  CD64 <sup>-</sup> F4/80 <sup>-</sup> Ly6C <sup>-</sup> CD3 <sup>-</sup> B220 <sup>-</sup> NK1.1 <sup>-</sup>	XCR1 <sup>+</sup>  CD103 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> CX3CR1 <sup>-</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CCR7-dependent migration to intestine draining lymph nodes</li> <li>• Presentation of soluble protein antigens</li> </ul>
		SIRP $\alpha$ <sup>+</sup>  CD103 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CX3CR1 <sup>low</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Predominant in Treg induction in the small intestine</li> <li>• Can activate TGF<math>\beta</math></li> </ul>
		  CD103 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> CX3CR1 <sup>int</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Less efficient at promoting tolerance</li> <li>• Involved in tolerance to soluble antigens in the colon</li> </ul>
Macrophages	CD11b <sup>+</sup> CD64 <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup>  Ly6G <sup>-</sup> SiglecF <sup>-</sup> CD3 <sup>-</sup> B220 <sup>-</sup> NK1.1 <sup>-</sup>	CX3CR1 <sup>low</sup>	Ly6C <sup>high</sup> MHCII <sup>-</sup> CD11c <sup>-</sup> « P1 »
			Ly6C <sup>high-int</sup> MHCII <sup>+</sup> CD11c <sup>+/-</sup> « P2 »
			Ly6C <sup>-</sup> MHCII <sup>+</sup> CD11c <sup>+/-</sup> « P3 »
			Ly6C <sup>-</sup> MHCII <sup>high</sup> CD11c <sup>low-high</sup> « P4 »
		CX3CR1 <sup>high</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Functional plasticity</li> <li>• Production of pro-inflammatory mediators in response to TLR ligands</li> <li>• Scavenging, destruction of apoptotic cells, microbes</li> <li>• IL-10 production</li> <li>• Local maintenance of Tregs</li> </ul>

**Tableau 3. Cellules dendritiques et macrophages dans la lamina propria.** Adapté de Joeris et al Mucosal Immunology 2017.

- **Les macrophages**

Les macrophages de la LP possèdent un phénotype particulier comparé aux macrophages résidents d'autres tissus de l'organisme (334–336). Ils nécessitent une constante reconstitution à partir de monocytes circulants, qui se différencient à leur arrivée dans la muqueuse jusqu'à obtenir leur phénotype mature : CX3CR1<sup>high</sup>Ly6C<sup>CMHII</sup><sup>high</sup> (323, 335). Les autres populations retrouvées dans la LP correspondraient aux différentes étapes de différenciation (**Tableau 3**).

Comme les DCs, les macrophages intestinaux favorisent naturellement les réponses tolérogènes. En effet, ils présentent une forme d'anergie qui les empêche de répondre aux stimuli qui devraient normalement les activer (337). Cela leur permet de phagocyter efficacement sans générer une inflammation qui compromettrait l'homéostasie intestinale. Contrairement aux DCs, les macrophages de la LP ne peuvent pas migrer jusqu'aux MLN ni activer les LT (321, 336, 338). En revanche, ils sécrètent des cytokines anti-inflammatoires, telles l'IL-10 et le TGF- $\beta$  pouvant contribuer aux réponses T régulatrices *in situ*. Ainsi, une étude a montré que l'IL-10 produite par les macrophages intestinaux était impliquée dans l'expansion dans la LP de Tregs spécifiques à l'antigène administré par voie orale. L'absence de production d'IL-10 observée chez des souris Cx3cr1<sup>-/-</sup> ne permet pas l'induction de tolérance orale (339).

Bien que l'intestin présente une certaine perméabilité aux petites molécules, notamment pour le passage des nutriments, une question centrale dans le processus de tolérance orale est comment les APCs peuvent acquérir les antigènes de la lumière intestinale. A ce jour, plusieurs mécanismes sont proposés.

Les cellules M présentes dans les PP sont depuis longtemps reconnues comme point d'entrée pour le transport des microorganismes mais une population rare de cellules M a aussi été décrite en dehors de cette structure, capable de transférer de petites particules dans la LP (340). Les cellules caliciformes (*goblet cells*) ont également été décrites comme impliquées dans le passage d'antigènes de la lumière intestinale à la *lamina propria* (341). Cette étude utilisant la microscopie photonique intra-vitale, montre un transfert préférentiel aux DCs tolérogènes CD103<sup>+</sup>, suggérant que ce mécanisme pourrait être impliqué dans la tolérance intestinale. Cette même technique de microscopie photonique a également permis de mettre en évidence la capacité des DCs CD103<sup>+</sup> à étendre

leurs dendrites à travers la barrière épithéliale pour capturer directement les antigènes luminaux (342–344). Enfin, une étude propose que les macrophages CX3CR1<sup>high</sup> seraient les principaux responsables de la capture de protéines lumineuses et seraient capables de transférer ces antigènes aux DCs CD103<sup>+</sup> par l'intermédiaire des jonctions communicantes via les connexines CX43. La délétion de ces dernières dans les APCs résulte en l'incapacité des DCs CD103<sup>+</sup> à récupérer l'antigène, le présenter, conduire à la génération de pTregs et par conséquent, à induire une tolérance orale (345).

## b. Les Tregs

Comme évoqué plus haut, la tolérance orale passe par l'induction de pTregs par les DCs dans les MLN. Cela se fait par l'intermédiaire du TGF- $\beta$  et l'action concomitante du RA va promouvoir ce processus de conversion de précurseurs naïfs en LT CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (328). Il ne s'agit pas ici d'une expansion de tTregs qui auraient migré depuis le thymus (346). Il existe également d'autres types de LT régulateur qui peuvent être générés dans l'intestin : les Tr1 (*Type 1 Regulatory T cells*) et les Th3. Ces cellules ont la particularité de ne pas exprimer Foxp3 (du moins de manière forte et stable), et sont différenciées en réponse des signaux IL-10 et TGF- $\beta$ , respectivement.

### Les Tr1

Ces cellules peuvent être induites à partir de LT conventionnels naïfs stimulés par leur antigène, en présence d'IL-10. Chez l'homme, si les tTregs exercent des fonctions immunitaires régulatrices dans tout le corps et contribuent à l'homéostasie, les Tr1 vont plutôt réguler les microenvironnements immunitaires locaux où existent des antigènes spécifiques des tissus (347). Ils sont caractérisés par une forte expression d'IL-10 et, dans une moindre mesure, de TGF- $\beta$  (mais ne produisent ni IL-2 ni IL-4), ainsi que par l'expression de marqueurs de surface CD49b et LAG3, critiques pour leur rôle immunosuppresseur (348). Les Tr1 exercent aussi leurs fonctions régulatrices en inhibant les APCs via les différentes molécules de co-inhibition (CTLA-4, PD-1 et ICOS) ou en induisant leur mort par relargage de granzyme B (349).

## Les Th3

Les cellules Th3 ont été initialement identifiées chez la souris après induction d'une tolérance orale à la MBP (*Myelin Basic Protein*) dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (350). Dans cette étude, la majorité des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques de la MBP sécrète du TGF- $\beta$  et prévient l'induction de l'EAE *in vivo*. Cette suppression est abrogée suite à l'injection d'anticorps anti-TGF- $\beta$  (350).

Les Th3 sont générées à partir de LT naïfs en présence de TGF- $\beta$  et elles agissent également par l'intermédiaire de cette cytokine. Elles sont d'ailleurs caractérisées par l'expression de LAP (*latency-associated peptide*) à leur surface, qui correspond à la forme latente du TGF- $\beta$ . Une fois activée par signalisation TCR dans l'intestin, elles sécrètent du TGF- $\beta$  qui agit pour maintenir les tTregs, inhiber les réponses Th1 et Th2, et favoriser la génération de pTregs Foxp3<sup>+</sup> (351).

### c. Tolérance intestinale et DT1

L'existence d'un axe immunologique entre le tractus gastro-intestinal et les tissus pancréatiques est proposé (352), selon lequel les LT intestinaux peuvent migrer de la muqueuse intestinale jusqu'aux PLN. Ceci est suggéré par l'expression des marqueurs de « homing » intestinal,  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 et CCR9, à la surface des LT auto-réactifs chez les patients DT1 (353) et des LT infiltrant les îlots chez la souris NOD (354, 355). Des défauts dans les mécanismes de tolérance intestinale ou dans la composition cellulaire de la LP pourraient donc avoir un impact sur le développement du DT1.

Ainsi, la souris NOD adulte présenterait une diminution des DCs CD103<sup>+</sup> dans les MLN ainsi que des Tregs dans la LP de l'intestin grêle et ce, avant l'apparition de la maladie (62, 356). A noter que ces défauts semblent progresser avec l'insulite car ils sont retrouvés de façon plus importante chez la NOD pré-diabétique que chez la NOD de 4 à 6 semaines d'âge (356).

Chez l'homme, peu d'études ont rapporté une quelconque altération ou déséquilibre de tolérance intestinale dans le DT1. Il a d'ailleurs plutôt été montré qu'il n'existait pas de différence de fréquence des différentes populations immunitaires (LT CD4<sup>+</sup>, LT CD8<sup>+</sup>, cellules NK...) entre les individus DT1 et sains (301). Cependant, il semblerait que la population de Tregs soit l'exception. En effet, contrairement à ce qui est observé dans le sang circulant des patients DT1, les Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> de la LP seraient moins nombreux chez les patients

DT1 que chez les donneurs sains (301, 357). Des expériences complémentaires ont suggéré que ce défaut serait dû à une capacité réduite des DCs CD103<sup>+</sup> de la LP des patients DT1 à induire une génération *de novo* de pTregs ou leur expansion (301). Les Tr1 ont été décrits comme étant réduits dans le sang des patients diabétiques de type 1 par rapport aux individus sains (358) mais la LP n'a pas été analysée.

D'autres éléments suggèrent quant à eux un profil plutôt pro-inflammatoire de la LP des patients DT1, marqué par une augmentation de l'expression de CMH II par l'épithélium, une augmentation de cellules exprimant l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  dans la LP (359), ainsi qu'une densité plus importante de cellules positives pour les cytokines IL-4 et l'IL-1 $\beta$  (360).

La tolérance intestinale pourrait donc être une cible intéressante dans le DT1, mais nécessite la mise au point d'approches permettant d'améliorer et d'exploiter les mécanismes régulateurs qui la sous-tendent. Elle est déjà très exploitée dans le domaine de l'allergie, mais suscite aussi un intérêt dans différentes maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques et la polyarthrite rhumatoïde par l'introduction d'auto-antigènes par voie orale (361).

Forte de ses multiples acteurs cellulaires tolérogènes, la voie orale est une voie puissante pour induire des mécanismes de tolérance qui peuvent avoir des répercussions dans l'organisme entier (351). La capacité migratoire de certaines de ces cellules permet le transport des informations vers d'autres organes. C'est donc une voie qui permet d'agir de manière locale mais également systémique.

De façon intéressante et importante pour notre projet, le thymus serait également impliqué dans l'induction de tolérance par voie orale (362). Dans un modèle d'EAE, les souris de 6 semaines subissaient, ou non, une thymectomie avant d'être traitées avec la MBP par voie orale et immunisées le jour suivant pour déclencher la maladie. Les auteurs ont remarqué que la tolérance n'était pas induite chez les souris ayant subi une thymectomie, mais qu'elle était restaurée si les souris étaient transférées avec des thymocytes provenant de souris naïve. Selon leurs expériences, le thymus serait un lieu important de génération de Tregs suite à l'administration orale d'un antigène (362).

Enfin, la voie orale est une voie privilégiée pour les traitements qui visent des populations pédiatriques. Le DT1 étant une maladie touchant particulièrement les plus jeunes, il est pertinent d'exploiter cette stratégie non invasive. Une synthèse



plus détaillée des expériences de tolérance orale chez la souris NOD et des essais cliniques existants sera présentée dans la partie suivante (cf. partie III.1).

## III. Peut-on prévenir le diabète de type 1 ?

Nous avons vu que différents mécanismes de tolérance pouvaient être impactés dans le DT1, coïncidant avec une réponse auto-immune qui se diversifie, s'amplifie avec le temps, et cible de plus en plus d'épitopes. Quand le DT1 se déclare (stade 3, cf. partie I.2 **Figure 3**), il ne s'agit là que de la manifestation clinique d'une auto-immunité déjà très engagée, qui devient donc plus difficile à contrôler. Ceci explique le succès limité voire l'échec des thérapies d'intervention, discutées dans la partie I. Les nouvelles approches thérapeutiques du DT1 doivent donc s'inscrire dans une logique de prévention plutôt que de traitement, considérant que le patient n'est pas malade au moment où l'hyperglycémie survient, mais bien avant, dès les premiers signes d'auto-immunité anti-cellule  $\beta$  (apparition des auto-anticorps). En effet, une nouvelle vision de la prévention du DT1 est en train de s'imposer, selon laquelle il ne s'agit de prévenir l'hyperglycémie, mais l'auto-immunité elle-même.

### III.1 Les essais de prévention

#### III.1.1 La preuve de concept dans les modèles murins

Les premiers essais précliniques de prévention chez la NOD remontent aux années 90 où une vague d'études a montré une très bonne efficacité des thérapies spécifiques de l'antigène, en particulier l'insuline (363-366). Selon la voie d'administration utilisée (sous-cutanée, intranasale ou orale), différents mécanismes de tolérance impliqués dans la protection des souris vis-à-vis du DT1 ont été mis en évidence. On retrouve en particulier :

- Une déviation de la réponse immunitaire de Th1 vers Th2, caractérisée par un changement dans le profil cytokinique (diminution de l'IFN- $\gamma$  et augmentation de l'IL-4) (364, 365) ou vers Th3 correspondant à une expression accrue de TGF- $\beta$  (367).
- Une génération d'une population de Tregs (368). Bergerot et al. ont d'ailleurs proposé que les Tregs induits par l'administration orale d'insuline seraient

spécifiques de l'insuline et rivaliseraient avec les LT diabétogènes pour les ressources en cytokines (cf. régulation par les Tregs, partie II.2.1), empêchant ainsi leur expansion et leur migration vers le pancréas (369).

- Une capacité à transférer la protection vis-à-vis du DT1 après co-transfert de splénocytes provenant de souris diabétiques et de splénocytes de souris traitées à l'insuline, indépendamment de la voie d'administration utilisée (364–367). Cette protection serait due à l'action des Tregs qui empêcheraient l'apparition du DT1 chez les hôtes. En effet, le transfert des LT CD8<sup>+</sup>, sans les LT CD4<sup>+</sup>, déclenche bien le DT1 (368).

Il est à noter que ces stratégies de prévention reposent sur un traitement répété et prolongé dans le temps, qui débute chez l'animal jeune et souvent sur plusieurs semaines, voire de manière continue (366).

### III.1.2 Les essais cliniques de prévention

#### a. Administration de l'antigène

Suite aux expériences concluantes et encourageantes observées chez la souris, plusieurs essais cliniques ont tenté de retrouver cette protection chez l'homme grâce à un traitement préventif par insuline (**Tableau 4**).

Un des premiers de ces essais cliniques de prévention correspond à l'étude DPT-1 (*Diabetes Prevention Trial - Type 1 Diabetes*) (370). Dans cette étude, des individus présentant un haut risque de développer le DT1 ont été recrutés parmi les apparentés de patients diabétiques de type 1. Selon des critères génétiques (typage HLA), immunologiques (positivité pour les auto-anticorps) et métaboliques (test oral de tolérance au glucose), une stratification du risque a été établie et les individus séparés en deux cohortes : risque à 5 ans supérieur à 50% d'une part, risque entre 25 et 50% d'autre part.

La première cohorte était traitée par voie parentérale (injections sous-cutanées de 0,125U/kg d'insuline - ou placebo - deux fois par jour + infusion intraveineuse durant 4 jours une fois par an - suivi médian de 3,7 ans), mais n'a montré aucune prévention ni effet positif sur le métabolisme. Bien que décevants, ces résultats ne sont pas si surprenants si on les compare avec les études précliniques chez la NOD de laquelle ils découlent (371). En effet, les souris étaient traitées avec 0,5U d'insuline par animal correspondant à une dose de

25U/kg soit 200 fois supérieure à celle utilisée dans l'étude DPT-1 (0,125U/kg). Ces différences de doses viennent de la différence de résistance à l'insuline entre les deux espèces, l'homme étant plus sensible à l'hypoglycémie que le modèle murin. D'ailleurs, un travail effectué par le laboratoire a montré que l'utilisation des conditions de doses humaines chez la souris NOD ne permettait pas de les protéger du développement du DT1 (372).

La seconde cohorte (risque de DT1 entre 25 et 50% à 5 ans) a quant à elle été traitée par voie orale avec 7,5mg par jour d'insuline ou un placebo (suivi médian de 4,3 ans). Ici encore, aucune différence n'a été observée entre les deux groupes en termes de développement du DT1. Cependant, une analyse a posteriori a mis en évidence qu'un groupe de participants ayant des taux d'IAA élevés à l'inclusion (>80nU/mL) montrait un léger effet bénéfique du traitement (proportion de ces patients développant le DT1 de 6,2% par an dans le groupe insuline contre 10,4% dans le groupe placebo). La conclusion générale de cette étude penche donc vers une inefficacité de l'insuline par voie orale, même si cette suggestion d'un certain bénéfice a mené vers un nouvel essai clinique focalisé sur les sujets à risque IAA+ (373). Malheureusement, ce dernier n'a pas abouti à un quelconque retard ou prévention de l'apparition du DT1.

Dans une autre étude, le traitement avec 1U/kg par jour d'insuline par voie nasale d'enfants suivis depuis la naissance ainsi que de leurs frères et sœurs, positifs pour les auto-anticorps n'a pas non plus donné de résultat satisfaisant en termes de prévention du DT1 (374). D'autres antigènes ont également été testés en prévention et c'est le cas de GAD65 qui a été administré avec un adjuvant (alum) par voie sous-cutanée (20ug à 4 mois d'intervalle) chez des individus positifs pour les auto-anticorps. Malheureusement, ces essais n'ont pas été plus concluants (375)

Ces essais ont pu montrer un profil de sécurité acceptable mais malheureusement aucun n'a montré une quelconque efficacité. Mais alors pourquoi ces stratégies, dont certaines avaient fait leur preuve chez la souris (363, 365, 366), n'ont pas fonctionné chez l'homme ?

Tout d'abord il est important de souligner que, bien que la NOD soit le modèle animal le plus proche de la physiopathologie du DT1, il n'est pas totalement identique au processus auto-immun humain (376). D'autre part, la NOD étant une lignée consanguine, tous les animaux sont génétiquement identiques, éliminant donc la variabilité génétique. Ils sont par ailleurs élevés dans un environnement contrôlé, éliminant ainsi la variabilité environnementale.

On pourrait donc assimiler une colonie de NOD à un seul individu diabétique et non à un groupe hétérogène de patients.

Enfin, même si on peut observer la présence d'auto-anticorps et de LT anti-insuline, il n'existe pas vraiment de preuves que l'insuline soit l'antigène initiateur chez l'homme, contrairement à ce qui a été montré chez la NOD (377). Même en partant de ce principe, les différents essais cliniques que nous venons d'aborder interviennent alors que le processus auto-immun est déjà avancé. Les participants de ces études étant déjà positifs pour différents auto-anticorps, la réponse auto-immune concerne donc plusieurs épitopes autres que l'insuline, et elle est activement engagée et marquée par un défaut de régulation des T<sub>H</sub>1 pathogènes (cf partie II.2.2). Il s'agit donc d'un timing de traitement qui diffère des essais chez la NOD, et qui est critique dans l'efficacité thérapeutique. En effet, les effets bénéfiques de prévention sont observés quand on initie les traitements chez des animaux très jeunes (avant l'apparition d'une insulite dans le pancréas) mais ces effets sont perdus si traités plus tardivement (378).

L'étude PrePOINT se veut donc intervenir encore plus précocement. Il ne s'agit plus de prévention secondaire mais de prévention primaire, puisque l'on cible les enfants génétiquement à risque mais négatifs pour les auto-anticorps. C'est ici tout l'intérêt et le mérite de cette étude pilote, où une forte dose d'insuline est administrée par voie orale 1 fois par jour, à 25 enfants entre 2 et 7 ans. Les auteurs ont pu observer une réponse T régulatrices vis-à-vis de l'insuline suite au traitement, compatible avec l'induction d'une tolérance immunitaire (379). Il n'y a pas eu d'effet indésirable, notamment ces fortes doses d'insuline administrées par voie orale n'induisaient pas d'hypoglycémie, et n'accéléraient pas non plus le développement du DT1, mettant en évidence la sécurité d'un tel essai clinique. Des études complémentaires recrutant un nombre plus important de participants et sur un suivi plus long sont en cours pour évaluer l'efficacité réelle de ce traitement (étude GPPAD-POINT).

## **b. Immunomodulateurs**

Si les stratégies de prévention chez l'homme sont essentiellement basées sur l'utilisation d'antigènes spécifiques du DT1 et se sont beaucoup focalisées sur l'administration d'insuline, ce ne sont pas celles ayant obtenu le plus de succès. En effet, la première étude ayant montré une efficacité certaine dans la prévention du DT1 est l'étude récente du *TrialNet Study Group* utilisant l'anticorps anti-CD3

Teplizumab (380). Dans cette étude, les participants étaient apparentés à des individus diabétiques, présentaient une prédisposition génétique, une positivité pour les auto-anticorps ainsi que des signes de dysglycémie (stade 2 de la maladie, cf partie I.2, **Figure 3**). Les participants étaient injectés par voie intraveineuse avec le Teplizumab pendant 14 jours et suivis sur 5 ans. Alors que plus de 70% des individus traités avec le placebo avaient développé le DT1, ce fut le cas de seulement 43% des participants du groupe Teplizumab (380). Du point de vue mécanistique, les patients sous anti-CD3 ne montraient pas de différence dans la fréquence des Tregs circulants mais une augmentation de la proportion de LT CD8<sup>+</sup>KLRG1<sup>+</sup>TIGIT<sup>+</sup> par rapport au groupe placebo, suggérant un phénotype épuisé/anergique. Une population lymphocytaire similaire a également été observée dans les études chez les patients présentant un DT1 de découverte récente (381).

Ces résultats sont très encourageants et il s'agit d'un premier succès, à ce jour le seul, dans les essais de prévention du DT1, ciblant une étape préclinique avancée. Un suivi plus long est cependant nécessaire. De plus, ces résultats ne témoignent pas d'une réelle protection des individus vis-à-vis du DT1 mais plutôt d'un retard d'apparition de la maladie qui atteint tout de même une moyenne de 2 ans, ce qui reste remarquable. La question de l'application du traitement par anticorps anti-CD3 en prévention primaire se pose mais ne pourrait peut-être pas apporter d'effet bénéfique puisque les études précliniques chez la souris NOD ont suggéré que les LT auto-réactifs doivent déjà se trouver dans un certain état d'activation pour que l'anti-CD3 soit efficace (382, 383). Ainsi, ce traitement doit intervenir à des stades où la réponse auto-immune est déjà initiée, ce qui encourage a priori la poursuite des essais de prévention secondaire, donc plus tardifs, dans le DT1.

Par ailleurs, le Teplizumab est un agent immuno-modulateur qui touche de manière plus drastique et systémique les populations lymphocytaires T ; l'effet n'est pas spécifique de l'antigène. Quelques effets secondaires indésirables ont été observés en prévention (lymphopénie, éruption cutanée) (380), et l'expérience de cette stratégie en intervention (cf partie I.5) nous suggère que ces derniers peuvent être plus préoccupants (réactivation EBV). Par conséquent, l'utilisation de ce type d'agent thérapeutique pose des questions de sécurité et d'évaluation du rapport bénéfice/risque, d'autant plus que la prévention requiert de traiter des jeunes enfants.

	Molécule thérapeutique	Nom et type d'étude	Population	Conditions d'inclusion	Modalité de traitement	Efficacité	Référence
<b>Thérapies antigènes spécifiques</b>	Insuline	The Diabetes Prevention Trial (DPT-1) R, DA, CP 91 sites USA, Canada	2x372 patients apparentés 7-17 ans	ICA+ IAA+ FPIR>10 <sup>ème</sup> percentile OGT normal Stratification des risques à 5 ans: >50% := cohorte 1 25-50% = cohorte 2	Cohorte 1 : 0,25 U/kg/j par voie sous-cutanée + iv 4j par an Cohorte 2 : 7,5mg/j Par voie orale	Cohorte 1 : Pas de prévention ou de délai Cohorte 2 : Petit effet chez les patients IAA>80nU/mL	(370, 384)
		TrialNet Oral Insulin R, DA, CP 87 sites EU, Canada, USA, Australie	389 patients apparentés 5-13 ans	ICA>2 FPIR>10 <sup>ème</sup> percentile OGT normal	7,5mg/j Par voie orale	Pas de prévention ou de délai	(373)
		DIPP R,DA, CP 3 sites Finlande	224 enfants à risque 2-8 ans	HLA-DQB1+ ICA>2	1 IU/kg /j Par voie intranasale	Pas de prévention ou de délai	(374)
		PrePOINT R, DA, CP 4 sites UE, USA	25 enfants apparentés à fort risque 2-7 ans	HLA DR4DQB1*0302 + ou DR4-DQB1*030 + ou HLA identique au frère ou sœur diabétique ICA- IAA-	Dose croissante 2,5mg ; 7,5mg ; 22,5mg ; 67,5mg Par voie orale	Trop tôt pour évaluer la prévention Signe d'apparition de Treg spécifiques de l'insuline et de la proinsuline Pas de réponse pro-inflammatoire dominante	(379)
	GAD65	DiaPREV-IT Study Group R,DA, CP 1 site Suède	50 patients 4-18 ans	GADA+ ICA>1	GAD65+Alum 2x20ug Par voie sous-cutanée	Pas de prévention ou de délai	(375)
	<b>Thérapies immuno-modulatrices</b>	Anti-CD3 Teplizumab	R, DA, CP	76 apparentés 11-22 ans	ICA>2 OGT dysglycémique	Traitement sur 2 semaines Dose croissante 51 à 826ug/m <sup>2</sup> surface Par voie intraveineuse	Retard de l'apparition du DT1 de 2 ans A 5 ans de suivi : 43% de la cohorte Teplizumab contre 72% des placebo ont développé le DT1.

**Tableau 4. Principales études cliniques d'immunothérapies de prévention pour le DT1**

CP : contre placebo ; DA : double aveugle ; FPIR : First-phase Insulin Response ; GADA : GAD Autoantibody ; IAA : insulins autoantibodies ; ICA: Islet cell antibodies ; IU : Insulin Unit ; OGT : Oral glucose tolerance test ; R : randomisé ; Tregs : LT régulateurs

## III.2 Optimiser les immunothérapies antigène-spécifiques

Il existe donc toujours un besoin d'aller vers des traitements plus spécifiques et donc plus sûrs, comme le sont les thérapies spécifiques de l'antigène. De nombreuses études précliniques cherchent donc à optimiser l'administration de ces antigènes, en travaillant sur des stratégies d'encapsulation ou de formulation pour permettre une meilleure capture ou une meilleure présentation.

Par exemple, une méthode attractive pour la délivrance de produits thérapeutiques est l'utilisation de nanoparticules et plusieurs études utilisant cette stratégie ont démontré leur efficacité chez la souris NOD. En effet, une étude de Philips et al. a tout d'abord rapporté une protection des souris NOD traitées avec des microsphères chargées avec des oligonucléotides anti-sens pour CD40, CD80 et CD86 (385). Le traitement induisait une diminution de l'expression de ces molécules de co-stimulation à la surface des DCs, associée à une augmentation de la fréquence des Tregs. De façon intéressante, si une injection intrapéritonéale unique chez des souris âgées de 5 à 8 semaines permettait de retarder l'apparition de la maladie, des injections répétées une fois par semaine pendant 8 semaines permettaient la prévention du DT1.

Par la suite, ces méthodes de formulation ont été appliquées aux antigènes d'intérêt. Ainsi, des souris NOD de 8 semaines d'âge ont été traitées par des injections intrapéritonéales de nanoparticules contenant la proinsuline accompagnée de l'ITE (pour 2-(1H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester), ligand du récepteur AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) et connu pour son activité tolérogène (386). Cette association administrée aux animaux à partir de 8 semaines d'âge une fois par semaine pendant 1 mois a permis une protection des souris vis-à-vis du DT1, associée à l'induction d'un phénotype tolérogène des DCs. Ces dernières présentaient notamment une expression réduite du CMH II, de CD40 et CD80, ainsi que des cytokines IL-12 et IL-6, mais une augmentation de l'expression d'IL-10. Ces DCs mises en culture avec des LT diabétogènes étaient moins efficaces pour l'activation des Teffs mais stimulaient la différenciation en Tregs (387). Dans le même registre, des nanoparticules couplées à des complexes CMH/peptides auto-réactifs protègent également du DT1 lorsqu'elles sont

administrées par voie intraveineuse chez la souris NOD de 4 semaines toutes les 2 ou 3 semaines pendant 8 mois (388). Ces nanoparticules induisent entre autres la différenciation de LT CD4<sup>+</sup> effecteurs en cellules Tr1 productrices d'IL-10 (99). Une stratégie d'encapsulation dans des liposomes contenant un épitope de la chromogranine A accompagné de calcitriol (vitamine D3) n'a en revanche pas donné de résultats satisfaisants en termes de protection, malgré la capacité de ces liposomes administrés par voie sous-cutanée à induire la prolifération des Tregs spécifiques d'antigène (389).

Enfin, une équipe a évalué l'effet préventif d'un vaccin à l'ADN en comparant l'efficacité d'injections intramusculaires de plasmides codant soit pour 4 protéines de la cellule  $\beta$  (PI, IGRP, GAD65, Chromogranine A) soit pour une succession d'épitopes du DT1 issus de ces différentes protéines. Le traitement consistait en une injection par semaine pendant 8 semaines de souris pré-diabétiques (10 semaines d'âge). Ils ont observé une protection efficace chez ces différents groupes d'animaux mais, bien que des preuves d'induction de Tregs aient été mises en évidence, elle était malheureusement abolie à l'arrêt du traitement (390). Une stratégie similaire de vaccination par plasmide codant pour la PI a été utilisée dans un essai clinique d'intervention chez des patients DT1 nouvellement diagnostiqués, avec des résultats encourageants en termes de réduction des réponses CD8<sup>+</sup> auto-immunes spécifiques d'îlots (391). Cette stratégie n'a pas pour l'instant été appliquée dans des essais de prévention chez l'homme.

### III.3 La tolérance périnatale

Les stratégies évoquées ci-dessus offrent des pistes prometteuses et les résultats chez la souris NOD apportent la preuve de concept de leur efficacité à prévenir le DT1, ce qui mérite considération pour un transfert à la clinique. Cependant, les échecs des essais de prévention utilisant les antigènes cibles, observés jusqu'à ce jour chez l'homme, couplés au fait que les auto-anticorps, et donc l'auto-réactivité anti-cellule  $\beta$ , apparaissent majoritairement pendant les deux premières années de vie (cf. partie I.3.3) suggèrent très fortement que l'optimisation de la formulation du ou des antigènes devrait être accompagnée d'une intervention la plus précoce possible pour maximiser les chances de réussite (378).



L'idée serait alors de réinitialiser le système immunitaire avant tout déclenchement de la cascade auto-immune, et la période périnatale représente dans ce contexte un élément crucial à prendre en considération.

En effet, c'est bien avant l'âge adulte que se dessinent tous les mécanismes de tolérance qui vont être opérationnels tout au long de la vie. Ainsi, les expériences princeps montrant que l'introduction d'un antigène durant la vie néonatale induit une tolérance à long terme vis-à-vis de cet antigène (392) ont valu le prix Nobel de Médecine à ses auteurs en 1960. Dans le domaine de l'allergie, ces phénomènes ont été récemment redécouverts, l'introduction précoce d'un allergène alimentaire pouvant prévenir les réactions allergiques (393).

### III.3.1 Importance de la période périnatale dans la tolérance centrale

Tout d'abord, c'est durant la vie néonatale que les mécanismes de tolérance centrale sont les plus actifs. Ainsi, Guerau-de-Arellano et al. ont indiqué que l'expression de AIRE par les mTECs pendant la vie embryonnaire et jusqu'à 21 jours après la naissance, mais pas pendant la vie adulte, était essentielle pour bloquer l'auto-immunité systémique retrouvée chez les souris NOD.*Aire*<sup>-/-</sup> (394).

L'expression conditionnelle de la PI dans les APCs de souris NOD, dont celles du thymus, depuis la naissance jusqu'au sevrage induit une protection vis-à-vis du DT1. En revanche si l'expression est limitée à la durée de la gestation, aucune protection n'est observée. Ces observations sont également retrouvées en cas de transfert de splénocytes dans des souris NOD.SCID. Ces dernières ne développent pas de DT1 après transfert de cellules provenant de souris exprimant la PI jusqu'au sevrage (395).

Par ailleurs, dans une étude de He et al., des souris NOD.SCID, transplantées avec un thymus de souris NOD, ne développent un DT1 que si le thymus provient de donneurs âgés de 10 jours ou moins. Au contraire, la greffe d'un thymus de souris NOD âgées de plus de 10 jours n'induit pas la maladie (396). L'effet protecteur est dû à une diminution de la fréquence de LT diabétogènes chez ces animaux, ce qui suggère que les LT auto-réactifs anti-îlots sont produits par le thymus très précocement après la naissance, dans une fenêtre de 10 jours. Il semblerait donc que chez la NOD existe un défaut de sélection thymique durant

la période périnatale mais que la surexpression de l'antigène dans les APCs peut rétablir ces mécanismes de tolérance et protéger du DT1 (395, 396).

Enfin, les tTregs générés pendant la période néonatale diffèrent de ceux générés à l'âge adulte en termes de transcriptome et de profil d'activation. Ils sont capables de persister à l'âge adulte et sont critiques dans la tolérance au Soi (130).

### III.3.2 Le récepteur Fc néonatal (FcRn)

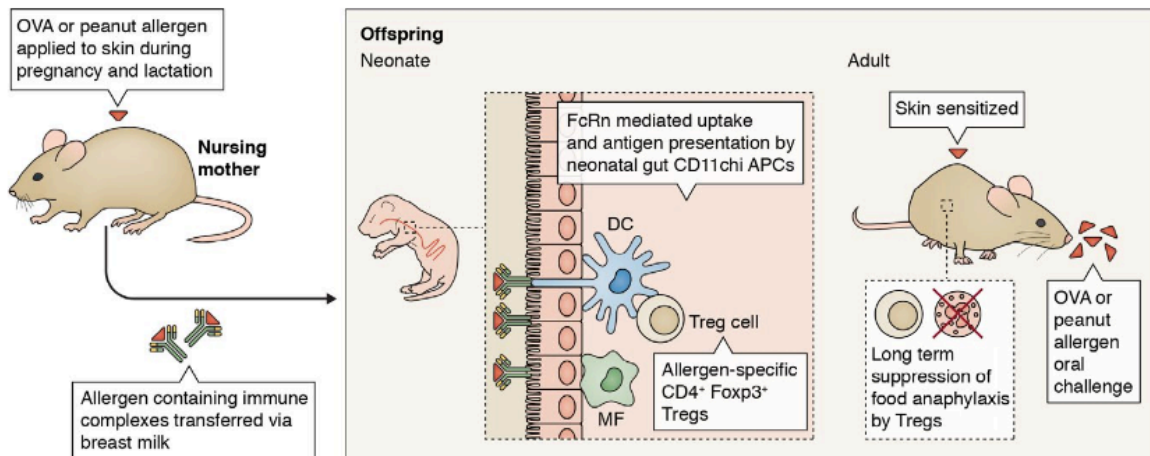
La période néonatale est également marquée par l'expression du récepteur Fc néonatal (FcRn). Ce dernier est exprimé à la surface des syncytiotrophoblastes du placenta et des entérocytes de l'intestin et constitue la voie physiologique du transfert des IgG maternels à l'enfant pendant la grossesse et l'allaitement. Ce mécanisme confère une immunité passive au nouveau-né grâce aux passages de complexes immuns IgG-antigène à travers les barrières fœto-maternelles (397, 398).

Si l'expression intestinale du FcRn est limitée aux 15 premiers jours de vie chez la souris (nos observations et (399)), il est également exprimé à l'âge adulte chez l'homme (400). Une étude utilisant un modèle de souris transgénique pour le FcRn humain, montre qu'un complexe immunitaire IgG-antigène peut passer la barrière épithéliale via le FcRn, être capté par les DCs de la LP et transporté jusqu'aux MLN où les DCs activent les LT spécifiques de cet antigène (401).

Le FcRn est également exprimé par les cellules endothéliales qui sont capables d'internaliser les IgG du sang et de les relarguer prolongeant ainsi leur durée de vie dans le sérum (402, 403). De façon intéressante, il est aussi exprimé par les APCs qui peuvent internaliser les IgG sans les dégrader (404-406).

De manière importante et pertinente pour notre projet, une étude très exhaustive de Ohsaki et al. a mis en évidence le rôle central du FcRn dans la tolérance orale (**Figure 15**) (407). Pour cela, les auteurs ont induit une allergie alimentaire à l'OVA par sensibilisation cutanée chez des souris femelles avant, pendant et après gestation. Ils ont ensuite testé la réponse de la descendance de ces femelles à la suite d'une exposition orale à l'OVA. Les petits de femelles allergiques étaient tolérants à l'allergène alimentaire tandis que ceux issus de femelles non allergiques développaient des signes d'anaphylaxie systémique. Cette tolérance provenait de la génération de Tregs Foxp3<sup>+</sup> induits dans les MLN suite au transfert de complexes immuns IgG-OVA lors de l'allaitement des petits,

plutôt que via un transfert transplacentaire. La supplémentation du lait maternel avec ces complexes immuns, suffisait pour retrouver une protection. L'implication du FcRn dans ces mécanismes a été démontrée par l'utilisation de souris présentant une déficience en FcRn restreinte aux DCs, et dans lesquels la prise en charge des complexes IgG-OVA, l'induction des Tregs, la tolérance vis-à-vis de l'OVA et la prévention de la réponse allergique étaient perdues (407).



**Figure 15. La tolérance orale par le FcRn.** Dans une étude de Ohsaki et al, l'importance du FcRn dans la tolérance fœto-maternelle a été démontré dans un modèle d'allergie. Les petits d'une souris sensibilisée avec un allergène développent une tolérance vis-à-vis de ce dernier qui dure jusqu'à l'âge adulte. Les auteurs ont montré que les complexes immuns allergène/anticorps présents dans le lait maternel passaient à travers la barrière intestinale, étaient captés par les DCs via le FcRn et induisaient la génération de Tregs spécifiques. (Ohsaki et al J Exp Med 2018 ; Lambrecht J Exp Med 2018)

En lien avec ce point, les auto-anticorps du DT1 semblent conférer une protection quand ils sont transmis de la mère à l'enfant, peut-être car, de la même façon que dans ce modèle d'allergie, les auto-antigènes pourraient être transférés à l'enfant et induire une tolérance (64, 408, 409)

### III.4 Notre stratégie

Compte-tenu de tous ces éléments, le laboratoire a élaboré une stratégie de vaccination visant à bloquer le développement du DT1, en ciblant le point de rupture de tolérance le plus précoce, c'est-à-dire le thymus, pour rétablir les mécanismes de tolérance centrale vis-à-vis de l'antigène initiateur du DT1, la PPI (410). Dans ce sens, une stratégie de vaccination maternelle a tout d'abord été mise au point. Dans des travaux publiés en 2015, notre équipe a utilisé une

protéine de fusion comprenant la PPI couplée au fragment Fc des anticorps (PPI-Fc) et a évalué si une injection intraveineuse de PPI-Fc chez des souris gestantes pouvait instaurer une tolérance vis-à-vis de cet antigène dans la descendance et ainsi prévenir le développement du DT1 (411). Le laboratoire a démontré l'efficacité de cette approche en utilisant la souris NOD G9C8 transgénique pour un TCR $\alpha\beta$  reconnaissant le peptide B<sub>15-23</sub> de la PPI, et chez laquelle le DT1 est induit par immunisation avec le peptide PPI-B<sub>15-23</sub> et la CpG (412). La protection des petits issus de la mère traitée par PPI-Fc était associée à une perte de fonction cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup> diabétogènes ainsi qu'à une augmentation de la fréquence en Tregs dérivés du thymus. Des études mécanistiques ont démontré que la PPI-Fc était transférée à travers la barrière placentaire en exploitant la voie du FcRn exprimé à la surface du placenta et qu'elle était ensuite captée par des DCs migratoires et amenée jusqu'au thymus des fœtus (411). Une stratégie similaire a également montré son efficacité pour prévenir les réponses immunitaires vis-à-vis du facteur VIII de la coagulation chez des souris invalidées pour l'expression du facteur VIII, modèle de l'hémophilie A humaine (413)

Ainsi, en couplant la PPI au Fc, qui permet à la fois l'exploitation de la voie du FcRn mais aussi une meilleure stabilité et une demi-vie prolongée de notre protéine d'intérêt (414), la prévention du DT1 était assurée après seulement une seule injection.

Cependant, le transfert d'une telle stratégie chez l'homme n'est pas envisageable. En effet, il n'y a pas de stratégie de diagnostic prénatal du DT1. Il s'agirait donc de traiter des femmes enceintes pour prévenir une maladie chez le nouveau-né qui, dans la grande majorité des cas, ne se développera pas. Le rapport bénéfice/risque n'est donc pas favorable, d'autant plus au vu du caractère invasif d'une injection intraveineuse.

Le FcRn étant également fortement exprimé à la surface de la barrière épithéliale intestinale (cf. partie III.3.2), cela suggère la possibilité de l'utilisation d'un traitement par voie orale directement chez les nouveau-nés. Cette stratégie, qui constitue le cadre de mon projet de thèse, s'appuie sur les deux éléments critiques pour l'induction de tolérance que sont l'immunité intestinale et la période périnatale. En administrant aux premiers jours de vie la PPI-Fc par voie orale, notre objectif est d'utiliser la voie du FcRn pour forcer le transfert à travers la barrière épithéliale, puis la présentation de l'antigène par les APC intestinales afin d'induire des réponses régulatrices locales et possiblement jusqu'au thymus.

# OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Les travaux du laboratoire suggèrent qu'une vaccination très précoce, durant la vie périnatale, peut permettre une protection vis-à-vis du DT1. Dans une volonté de développer une stratégie vaccinale transférable chez l'homme, mon projet de thèse repose sur l'exploitation de la voie orale pour une vaccination néonatale. Bien qu'un transfert passif puisse avoir lieu, notre hypothèse est que la PPI-Fc serait capable de traverser la barrière intestinale de manière bien plus efficace via le FcRn exprimé sur les cellules épithéliales pour se retrouver dans la *lamina propria*. La multitude de DCs tolérogènes présentes dans ce tissu serait alors en mesure de capter la PPI-Fc et de l'apporter au thymus pour restaurer la tolérance vis-à-vis de la PPI. De plus, le tissu intestinal étant un haut lieu de tolérance périphérique, des mécanismes régulateurs locaux peuvent également être ciblés et possiblement amplifiés par cette stratégie de vaccination orale.

Lors de ma thèse, je me suis intéressée à explorer cette stratégie de vaccination orale en utilisant 2 modèles murins complémentaires.

Tout d'abord, la lignée de souris NOD G9C8 transgénique pour le TCR, dont les LT CD8<sup>+</sup> reconnaissent le peptide PPI-B<sub>15-23</sub> présenté par le CMH de Classe I K<sup>d</sup>, et qui développent un DT1 après immunisation peptidique (412). Ce modèle possédant un répertoire T monoclonal nous a permis de suivre plus facilement les modifications immunologiques induites par le traitement et les mécanismes thérapeutiques pour nous aider à répondre à plusieurs questions :

- Quelle est la bio-distribution de la PPI-Fc dans les différents organes après administration orale ? Migre-t-elle dans le thymus ?
- La PPI-Fc par voie orale protège-t-elle du DT1 ?
- Peut-on définir des mécanismes responsables d'une induction de tolérance, en analysant les sous-populations T de différents organes ?

Ensuite, une lignée de souris NOD invalidée pour le gène de l'insuline 2 (NOD.*Ins2*<sup>-/-</sup>) possédant un répertoire T polyclonal et qui développe un diabète auto-immun spontané accéléré (entre 6 et 18 semaines d'âge) dû à l'absence d'expression de la PPI dans le thymus (étant donné que *Ins2* correspond à l'isoforme majoritairement exprimé dans cet organe). Ce modèle nous a permis d'évaluer si le ciblage de la seule PPI permettait de compenser le défaut génétique d'expression d'insuline dans le thymus et d'inhiber toute la cascade auto-immune et protéger du DT1.

# RESULTATS

**Oral Fc-coupled preproinsulin achieves systemic and thymic delivery  
through the neonatal Fc receptor and partially delays autoimmune diabetes**

**Noémie Corcos<sup>1</sup>, Slobodan Culina<sup>1</sup>, Cassandra Lavaud<sup>1</sup>, Sylvaine You<sup>1\*</sup>, Roberto Mallone<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>Université de Paris, Institut Cochin, CNRS, INSERM, Paris, France.

<sup>2</sup>Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpitaux Universitaires de Paris Centre-Université de Paris, Cochin Hospital, Service de Diabétologie et Immunologie Clinique, 75014 Paris, France.

**\* Correspondence:**

Sylvaine You and Roberto Mallone (co-senior authors)

sylvaine.you@inserm.fr; roberto.mallone@inserm.fr

**Running title: Systemic delivery of oral Fc-coupled preproinsulin**

**Keywords:** autoimmunity, immune tolerance, neonatal Fc receptor, preproinsulin, T cells, thymus, type 1 diabetes, vaccination.

**Figures:** 6

**Supplementary material:** Supplementary Methods, 4 Tables, and 5 Figures.

### Abstract

Tolerogenic vaccinations using beta-cell antigens are attractive for type 1 diabetes prevention, but clinical trials have been disappointing. This is probably due to the late timing of intervention, when multiple auto-antibodies are already present. We therefore devised a strategy to introduce the initiating antigen preproinsulin (PPI) during neonatal life, when autoimmunity is still silent and central tolerance mechanisms, which remain therapeutically unexploited, are more active. This strategy employs an oral administration of PPI-Fc, i.e. PPI fused with an IgG Fc to bind the intestinal neonatal Fc receptor (FcRn) that physiologically delivers maternal antibodies to the offspring during breastfeeding. Neonatal oral PPI-Fc vaccination did not prevent diabetes development in PPI T-cell receptor-transgenic G9C8.NOD mice. However, PPI-Fc was efficiently transferred through the intestinal epithelium in an Fc- and FcRn-dependent manner, was taken up by antigen presenting cells, and reached the spleen and thymus. Although not statistically significant, neonatal oral PPI-Fc vaccination delayed diabetes onset in polyclonal *Ins2*<sup>-/-</sup>.NOD mice that spontaneously develop accelerated diabetes. Thus, this strategy shows promise in terms of systemic and thymic antigen delivery *via* the intestinal FcRn pathway, but the current PPI-Fc formulation/regimen requires further improvements to achieve diabetes prevention.



## 1 Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease mediated by autoreactive T cells that recognize antigens of the insulin-producing pancreatic  $\beta$  cells, leading to their destruction (Carré et al., 2020; James et al., 2020; Mallone and Eizirik, 2020). A major problem in T1D management is its late diagnosis, which typically occurs after a variable period of subclinical, silent autoimmunity, once a significant proportion of  $\beta$  cells have been destroyed. Hence, T1D prevention and treatment should target the underlying autoimmune mechanisms rather than its metabolic consequences, as done today with insulin replacement therapies. However, immunotherapies aimed at blunting  $\beta$ -cell autoimmunity require an excellent safety profile, since T1D mostly affects children and young adults and is not life-threatening in the short term.

$\beta$ -cell antigen-specific therapies are therefore attractive in light of their selectivity and safety (Culina et al., 2011). Such therapies are administered in the form of vaccines comprising  $\beta$ -cell antigens and formulated to achieve immune tolerance. Clinical trials exploiting these strategies have however been disappointing. Several attempts have focused on tolerogenic vaccination with insulin (Brezar et al., 2011; Brezar et al., 2012), since this is the initiating antigen in the NOD mouse (Nakayama et al., 2005; Krishnamurthy et al., 2006) and, likely, also in humans (Brezar et al., 2011). A trial employing intranasal insulin administration to halt autoimmune  $\beta$ -cell destruction in new-onset T1D patients with slowly evolving disease did not result in significant  $\beta$ -cell preservation, despite evidence that insulin-specific immune tolerance was successfully induced (Furlanos et al., 2011). These results suggest that earlier interventions may be needed, before significant  $\beta$ -cell loss and prior to autoimmune progression and antigen spreading.

The safety issue is even more critical for prevention trials using insulin vaccination (Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes Study, 2002), because they target at-risk subjects who are not yet diabetic. Also in this case, trials have been unsuccessful to date. Such trials enrolled at-risk subjects based on their positivity for multiple auto-antibodies (aAbs), which witness an ongoing autoimmune reaction that already involves several antigens (Mallone and Roep, 2013). Recent studies further suggest that  $\beta$ -cell autoimmunity initiates very early, possibly already during fetal life, as the median age at aAb seroconversion was only 9-18 months in large prospective cohorts of genetically at-risk children (Parikka et al., 2012; Ziegler et al., 2012). In this context, the PRE-POINT trial (Bonifacio et al., 2015) targeted at-risk children carrying a high HLA-associated genetic risk of disease but with no signs of active autoimmunity (i.e. aAb<sup>-</sup>) using a daily oral insulin vaccine. This study documented safety and T-cell modifications compatible with tolerance induction.

The perinatal period may offer better opportunities for T1D prevention not only in terms of timing, but also because it is characterized by immune responses to administered antigens that are biased towards tolerogenic outcomes. Indeed, antigen introduction during fetal and neonatal life results in antigen-specific immune tolerance persisting during adulthood (Billingham et al., 1953; Mold et al., 2008). A key role in this process is played by thymic central tolerance (Klein et al., 2014), in which developing T cells are challenged with ectopically expressed self-antigens such as preproinsulin (PPI). Their recognition leads to elimination of autoreactive T effector cells (Teffs) and to positive selection of T regulatory cells (Tregs). This process is very active during the perinatal period and leads to the definition of immunological self that later imprints peripheral immune responses (Guerau-de-Arellano et al., 2009). The ‘immune self-image’ shaping the adult peripheral T-cell repertoire in the thymus is however incomplete, because the self-antigen repertoire is only partially expressed (Villasenor et al., 2008; Klein et al., 2014), and “prunes” but does not eliminate self-reactive T cells (Davis, 2015; Yu et al., 2015; Culina et al., 2018).

Thus, incomplete central tolerance mechanisms posited as the first checkpoint in T1D progression may be rather universal, as islet-reactive CD8<sup>+</sup> T cells are detected at similar frequencies in T1D and healthy donors (Culina et al., 2018;Gonzalez-Duque et al., 2018;Azoury et al., 2020). Thymic escape of PPI-reactive T cells seems to play a key role in T1D progression. First, the NOD mouse model of T1D develops accelerated diabetes when PPI expression is abolished in the thymus *via* *Ins2* knock-out (Thebault-Baumont et al., 2003;Faideau et al., 2006). Second, human *INS* polymorphic variants predispose to T1D by decreasing PPI expression in the thymus (Pugliese et al., 1997). However, this knowledge has not translated into therapeutic strategies aimed at boosting central tolerance *ab initio*. All the tolerogenic vaccination approaches explored to date using the subcutaneous, intranasal or oral route targeted peripheral tolerance mechanisms (Culina et al., 2011). PPI introduction in the thymus during the perinatal period could instead boost the T-cell selection process and intervene on the very first step in autoimmune progression. Previous reports suggest that it is possible to ‘upgrade’ central tolerance by administering antigens either intra-thymically (Gerling et al., 1992;Marodon et al., 2006) or in the periphery (Yu et al., 2008). In the latter case, a key role is played by migratory dendritic cells (DCs) that ferry these antigens to the thymus (Bonasio et al., 2006;Proietto et al., 2008;Baba et al., 2009;Atibalentja et al., 2011;Hadeiba et al., 2012). The key issue is to translate this concept into a therapeutically viable strategy, i.e. using a non-invasive administration route applicable during the perinatal period.

We therefore investigated a strategy that exploits the neonatal Fc receptor (FcRn) pathway that physiologically delivers maternal IgG to the offspring - through the placenta during fetal life and through the gut during lactation (Roopenian and Akilesh, 2007). To this end, we modified PPI by fusing it to the Fc portion of an IgG1, thus allowing it to interact with the FcRn and cross these epithelial barriers. We previously validated the transplacental route of transfer, documenting that Fc-fused antigens intravenously administered to pregnant mice reach the fetal thymus in an FcRn-dependent manner and promote the generation of antigen-specific Tregs and tolerance (Gupta et al., 2015). When applied to T1D mouse models, PPI-Fc transplacental transfer protected the offspring from diabetes development later in life (Culina et al., 2015). However, a less invasive administration route is desirable for clinical translation. In this respect, the high FcRn expression in the gut epithelium may allow us to exploit the oral route directly in newborns. We therefore asked whether PPI-Fc orally administered during the neonatal period can be transferred through the intestinal epithelium and reach the thymus in order to induce tolerance and protect from diabetes development.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Recombinant proteins and peptides

PPI-Fc and PPI constructs were previously described (Culina et al., 2015). An OVA-Fc construct covering the OVA<sub>243-350</sub> sequence was further developed (**Supplementary Figure 1**). It comprises the OVA<sub>257-264</sub> and OVA<sub>323-339</sub> epitopes recognized by K<sup>b</sup>-restricted OT-I and I-A<sup>d</sup>-restricted OT-II T-cell receptor (TCR)-transgenic T cells, respectively. Recombinant proteins were produced using a Baculovirus expression system and purified on protein G columns (for PPI-Fc and OVA-Fc) and nickel columns (for PPI). Peptides OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL), OVA<sub>323-339</sub> (ISQAVHAAHAEINEAGR) and PPI<sub>B15-23</sub> (LYLVCCGERG) were chemically synthesized at 85% purity (Chinapeptides). Herceptin (Trastuzumab anti-HER2/neu monoclonal antibody; Genentech) was used as IgG1 control. Trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> was generated using the F(ab')<sub>2</sub> Preparation Kit (Pierce #44988, ThermoFisher).

### 2.2 Mice and oral treatment

PPI<sub>B15-23</sub> TCR-transgenic G9C $\alpha^{-/-}$ .NOD (G9C8.NOD) (Wong et al., 2009) and *Ins2<sup>-/-</sup>*.NOD mice (Thebault-Baumont et al., 2003) were kindly provided by F.S. Wong (University of Cardiff, UK) and C. Boitard (Cochin Institute, Paris, France), respectively. *Fcgrt<sup>-/-</sup>*.C57BL/6 (FcRn<sup>-/-</sup>.B6) mice were from the Jackson Laboratory. All mice were housed in specific pathogen-free conditions. The study was approved by the French Ministry of Research (#4873-2015113018321568).

G9C8.NOD and *Ins2<sup>-/-</sup>*.NOD mice were force-fed at day 1, days 1, 4 and 8 or days 1, 4, 7 and 10 of life with 50  $\mu$ g PPI-Fc or equimolar amounts of control proteins (Fc-devoid PPI, OVA-Fc, Herceptin IgG1) or PBS. For diabetes induction, 4-week-old G9C8.NOD mice were primed with 50  $\mu$ g PPI<sub>B15-23</sub> peptide and 100  $\mu$ g CpG (Eurogentec), followed by a second identical immunization 15 days later. Diabetes development was monitored by glycosuria and confirmed by glycemia when positive.

### 2.3 Tissue preparation

Protocols are described in Supplementary Methods.

### 2.4 SDS-PAGE and Western blot

Pellets were lysed in Radio Immuno Precipitation Assay buffer [150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 mM Tris, pH 8.0] and supernatants retrieved after centrifugation at 16,000g at 4°C for 15 min. Total protein lysates (5  $\mu$ g/each; Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher) were resolved on a 12% SDS-polyacrylamide gels (SDS-PAGE), transferred to polyvinylidene fluoride membranes and blocked overnight at 4°C in 5% milk/Tris-buffered saline-Tween (TBS-T; 20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20). Membranes were then washed thrice in TBS-T and probed with primary antibodies: goat anti-mouse FcRn (RRID:AB\_10972971; 1/1,000) and mouse anti-heat shock protein 70 (RRID:AB\_627761; 1/1,000) overnight at 4°C, then washed thrice in TBS-T. Membranes were subsequently incubated for 30 min at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (RRID:AB\_2728714; 1/3,000) or rabbit anti-goat IgG (RRID:AB\_562588; 1/5,000), and washed thrice in TBS-T. Bound IgG was detected with the ECL Prime Western Blotting System (GE Healthcare).

### 2.5 Immunofluorescence, confocal microscopy and enzyme-linked immunosorbent assays

PPI-Fc and PPI proteins were conjugated with Alexa Fluor (AF)680 using a SAI VI Rapid Antibody/Protein labeling kit (Invitrogen) and orally administered to 1-day-old G9C8.NOD or FcRn<sup>-/-</sup>.B6 mice. Fluorescence (whole body and isolated digestive tract and thymus) was detected using Photon Imager RT (Biospacelab) at a 690-nm excitation and 700-nm emission wavelengths, with 50–100 ms exposures. After imaging, organs (digestive tract and thymus) were included in O.C.T. Compound Orange (TissueTek, Sakura) and frozen at -80°C. Sections (7  $\mu$ m) were air-dried, fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde solution and permeabilized with 0.5% Triton X-100 solution. After blocking with 10% goat serum, sections were stained with the following antibodies: rat anti-EpCAM (RRID:AB\_1089027; 1/750), rabbit anti-Cytokeratin 5 (RRID:AB\_10979451; 1/750), hamster anti-CD11c (RRID:AB\_467115; 1/1,000), and mouse anti-insulin (RRID:AB\_260137; 1/1,000). For secondary detection, sections were incubated with Cy5-labeled goat anti-rat (RRID:AB\_2338264) or anti-rabbit IgG (RRID:AB\_2338013), an AF488-labeled goat anti-hamster IgG (RRID:AB\_2338997) or an AF594-labeled goat anti-mouse IgG antibody (RRID:AB\_2338883). Images were acquired with a Leica DMI6000 confocal microscope and analyzed with the Image J software.

At sacrifice, blood was collected from the same mice. Standard curves were obtained by sequential dilutions of PPI-Fc protein. PPI-Fc was captured on plates coated with an anti-insulin antibody

(RRID:AB\_2126540; 1/600) and detected with a peroxidase-labeled goat anti-human Fc antibody (RRID:AB\_2687484; 1/4,000).

### 2.6 Protein uptake

Two-day-old G9C8.NOD mice were force-fed with 50 µg of AF647-labeled PPI-Fc (or IgG1) or PPI (or IgG1 F(ab')<sub>2</sub>). Spleen, thymus and *lamina propria* (LP) were harvested 4, 8 or 24 h later.

### 2.7 Flow cytometry

Detection of AF647-labeled proteins was analyzed in LP, spleen and thymus preparations using an antigen-presenting cell (APC) panel (**Supplementary Table 1**). Thymic EpCAM<sup>+</sup> cells were analyzed using a thymic epithelial cell (TEC) panel (**Supplementary Table 2**).

Spleen, mesenteric (MLNs) and pancreatic lymph nodes (PLNs) were harvested from 4-week-old G9C8.NOD mice orally treated on day 1 of life with PPI-Fc, PPI, OVA-Fc or PBS. Single-cell suspensions were surface-stained with anti-mouse antibodies (T-cell panel, **Supplementary Table 3**), washed in PBS, fixed/permeabilized with Foxp3 Fix/Perm Buffer (BioLegend) and stained for Foxp3.

Cells were acquired on a 16-color BD LSRII Fortessa and analyzed with FlowJo (v10.6.0).

### 2.8 Antigen recall assays

Splenocytes were incubated with increasing concentrations of PPI<sub>B15-23</sub> peptide along with an APC-coupled anti-CD107a antibody to assess the cytotoxic activity. Brefeldin-A (20 µg/ml) and monensin (4 µM) were added after 1 h. Cells were further incubated for 5 h before extracellular staining. Cells were then washed in PBS, fixed/permeabilized with the BD Cytofix/Cytoperm buffer, washed twice in PBS 0.1% saponin and stained for interferon (IFN)-γ and tumor necrosis factor (TNF)-α in PBS/0.1% saponin. This recall antibody panel is listed in **Supplementary Table 4**.

### 2.9 Statistical analysis

All statistical tests were two-tailed and performed using GraphPad Prism 7, as detailed in the legends of each figure. P values <0.05 were considered significant.

## 3 Results

### 3.1 Oral PPI-Fc does not prevent diabetes in PPI TCR-transgenic G9C8.NOD mice

We previously demonstrated that intravenous vaccination of pregnant G9C8.NOD mice with a single 50-µg dose of PPI-Fc protected the offspring from subsequent diabetes development (Culina et al., 2015). We therefore tested whether a similar protection was afforded by oral PPI-Fc vaccination directly in newborn mice. To this end, we treated 1-day-old G9C8.NOD mice with a single 50-µg dose of PPI-Fc as before. We then activated the TCR-transgenic T cells of these mice by prime-boost immunization with PPI<sub>B15-23</sub> peptide and CpG at 4 and 6 weeks of age to induce diabetes (Wong et al., 2009;Culina et al., 2015). As controls, equimolar amounts of recombinant OVA-Fc (i.e., irrelevant protein with preserved FcRn binding), PPI (i.e., cognate antigen with no FcRn binding), or PBS vehicle were orally administered. This oral PPI-Fc treatment did not prevent nor delayed diabetes onset

(**Figure 1A**). Similar results were obtained by force-feeding newborn mice with a three-dose 50- $\mu$ g regimen at day 1, 4 and 8 of life (data not shown).

We verified whether, despite lack of protection, PPI-Fc treatment was able to induce tolerogenic T-cell modifications in the spleen, MLNs and PLNs at 4 weeks of age (i.e. before PP<sub>B15-23</sub> peptide immunization). No difference in CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> T-cell or CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg fractions (**Figure 1B-D**) or absolute numbers (**Supplementary Figure 2**) was observed among treatment groups. Functional analysis of diabetogenic CD8<sup>+</sup> T cells by *in vitro* peptide recall showed no impairment in the upregulation of activation (CD69) and cytotoxicity (CD107a) markers or in the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) (**Figure 1E**).

Collectively, these results show that neonatal oral PPI-Fc vaccination does not prevent diabetes nor it modulates T-cell responses in PPI TCR-transgenic G9C8.NOD mice.

### 3.2 Oral PPI-Fc crosses the gut epithelium in an FcRn-dependent manner and is taken up by LP DCs and macrophages

Given the absence of any measurable tolerogenic effect, we went on to verify whether orally administered PPI-Fc was able to cross the intestinal epithelium. We first assessed FcRn expression by Western blot in gut epithelial cells of PPI TCR-transgenic G9C8.NOD mice at different ages. FcRn expression was readily detectable at day 1 of life, significantly increased at day 5, 10 and 15, but completely disappeared at day 20 (**Figure 2A**). It remained undetectable in the gut of adult (4-13-week-old) mice, as in 1-day-old FcRn<sup>-/-</sup>.B6 control mice.

We then force-fed G9C8.NOD newborns (WT) with fluorescent PPI-Fc and analyzed trans-epithelial transfer. *Ex-vivo* gut imaging revealed an intense PPI-Fc signal in both WT and FcRn<sup>-/-</sup>.B6 mice 4 h post-administration, which was maintained over time in WT mice but significantly decreased in FcRn<sup>-/-</sup>.B6 mice already at 24 h, and was barely detectable at 48 h (**Figure 2B**). Confocal microscopy confirmed retention of PPI-Fc signal (counter-stained with an anti-insulin antibody) below the epithelial layer of the small intestine villi (EpCAM<sup>+</sup>, red; **Figure 2C**). Interestingly, PPI-Fc colocalized with the CD11c (green) of APCs, and was observed in WT mice but not in FcRn<sup>-/-</sup>.B6 mice.

To better identify the cells responsible for PPI-Fc uptake in newborn mice, we used an antibody panel defining APC sub-populations (**Supplementary Figure 3**). We first compared the uptake of PPI-Fc and Fc-devoid PPI in LP APCs at 4 and 8 h after force feeding (**Figure 2D**). Two subsets of CD11c<sup>hi</sup> conventional DCs (cDCs) were initially identified, namely CD103<sup>+</sup> and CD103<sup>-</sup>. F4/80<sup>+</sup> macrophages comprised a CX3CR1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> subset and a CX3CR1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> subset (CX3CR1<sup>+</sup> and CX3CR1<sup>-</sup> from hereon, respectively). Fluorescent PPI-Fc was detected at both time points in CD103<sup>+</sup> and CD103<sup>-</sup> cDCs and, to a larger extent, in macrophages, especially in the CX3CR1<sup>-</sup> subset. The PPI-Fc signal did not increase between 4 and 8 h, and the 4 h time point was retained for further studies. PPI uptake was instead non-significant in all APC populations.

Additional staining for the signal regulatory protein (SIRP) $\alpha$  marker highlighted that the CD103<sup>-</sup> cDC subset can be positively defined by SIRP $\alpha$  expression, and we therefore further refer to this CD103<sup>-</sup> subset as SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> cDCs (**Figure 3A**). Moreover, CX3CR1<sup>-</sup> macrophages could be subdivided into SIRP $\alpha$ <sup>lo</sup> and SIRP $\alpha$ <sup>hi</sup>. To characterize the 4-hour protein uptake of these refined APC subsets, we used fluorescently-labeled IgG1 and its F(ab')<sub>2</sub> form as a proxy for PPI-Fc and PPI, respectively. We thus confirmed that the IgG1 uptake by LP CD103<sup>+</sup> and SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> cDCs was not significantly different (**Figure 2E**, left), as observed for PPI-Fc. More importantly, the SIRP $\alpha$ <sup>hi</sup> subset accounted for the dominant uptake by CX3CR1<sup>-</sup> macrophages (**Figure 2E**, right). Similar to PPI, no significant uptake

of F(ab')<sub>2</sub> was observed. As the 4-h uptake of IgG1 and F(ab')<sub>2</sub> was similarly distributed when compared to that of PPI-Fc and PPI, these proteins were subsequently used to phenotype the APC subsets responsible for the uptake in other organs. Finally, we asked whether this uptake was stable over a longer 24-h time course (**Figure 2F**). While there was a trend toward increased uptake in DCs, the fluorescent signal remained stable and higher in macrophages. In contrast, F(ab')<sub>2</sub> uptake remained marginal.

Collectively, these results show that orally administered PPI-Fc crosses the intestinal epithelium in an Fc-FcRn-dependent fashion. It is subsequently taken up by LP CD11c<sup>+</sup> APCs, both CD103<sup>+</sup> and SIRPα<sup>+</sup> cDCs and macrophages (mostly CX3CR1<sup>-</sup>SIRPα<sup>hi</sup>), and this uptake is not observed for Fc-devoid PPI.

### 3.3 Oral PPI-Fc reaches the spleen mainly in soluble form and is taken up locally by SIRPα<sup>+</sup> cDCs and macrophages

Having defined that oral PPI-Fc crosses the gut epithelium and is taken up locally by cDCs and macrophages, we asked whether systemic bioavailability was achieved. To this end, the uptake by splenic APCs was assessed 4 h after gavage. These APCs comprised CD11c<sup>hi</sup> cDCs, which were less represented than in the LP but could be similarly subdivided into CD103<sup>+</sup>SIRPα<sup>-</sup> (CD103<sup>+</sup>) and SIRPα<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> (SIRPα<sup>+</sup>) (**Figure 3B**; see **Supplementary Figure 4** for the detailed gating strategy). Although all F4/80<sup>+</sup> macrophages were here CD11b<sup>+</sup>, CX3CR1<sup>+</sup> and CX3CR1<sup>-</sup> subpopulations were distinguished. The proportion of CX3CR1<sup>-</sup> macrophages was higher in the spleen, and could be further subdivided into SIRPα<sup>lo</sup> and SIRPα<sup>hi</sup> as in the LP. Contrary to what observed in the LP, IgG1 fluorescence in cDCs was mostly detected in the SIRPα<sup>+</sup> rather than in the CD103<sup>+</sup> subset (**Figure 4A**). Also in the spleen, CX3CR1<sup>+</sup> and CX3CR1<sup>-</sup>SIRPα<sup>hi</sup> macrophages accounted for most of the uptake (**Figure 4B**), while F(ab')<sub>2</sub> uptake was negligible in all cases. At 24 h, IgG1 fluorescence decreased in CD103<sup>+</sup> cDCs, and it drastically declined in SIRPα<sup>+</sup> cDCs and in CX3CR1<sup>+</sup> and CX3CR1<sup>-</sup>SIRPα<sup>hi</sup> macrophages (**Figure 4C**).

Since macrophages are non-migratory APCs and CD103<sup>+</sup> cDCs (which displayed lower uptake than SIRPα<sup>+</sup> cDCs and macrophages) are the main subset described as migrating from the gut (Schulz et al., 2009), these observations suggest that most Fc-coupled proteins may travel from the LP to the spleen in soluble form to be taken up locally. We therefore verified whether orally administered PPI-Fc could be detected in the serum of treated mice. Four hours after gavage, serum PPI-Fc was present at a concentration of 2.2 μg/ml in WT G9C8.NOD mice (**Figure 4D**). Serum PPI-Fc concentrations in FcRn<sup>-/-</sup>.B6 mice were instead significantly (0.6 μg/ml), but not absent, suggesting that some passive transfer independent of the FcRn pathway may occur. In line with the kinetics of uptake by non-migratory splenic APCs, PPI-Fc concentration dropped at 24 and 48 h, indicating that the distant uptake of soluble PPI-Fc outside the LP is most efficient within the first hours after oral treatment.

Collectively, these results show that orally administered PPI-Fc reaches the spleen mainly in soluble form and possibly, to a lesser degree, *via* CD103<sup>+</sup> cDCs migrating from the gut. It is subsequently taken up locally by SIRPα<sup>+</sup> cDCs and macrophages.

### 3.4 Oral PPI-Fc reaches the thymus mainly through ferrying by migratory SIRPα<sup>hi</sup> cDCs

We next investigating whether orally administered PPI-Fc can reach the thymus, as shown for the transplacental route (Culina et al., 2015). In the thymus (**Supplementary Figure 5A**), CD11c<sup>hi</sup> cDCs can be divided into a SIRPα<sup>lo</sup> and a SIRPα<sup>hi</sup> subset, corresponding to resident and migratory thymic cDCs, respectively (Donskoy and Goldschneider, 2003; Li et al., 2009; Culina et al., 2015). Fluorescent

signal was preferentially detected in migratory SIRP $\alpha^{\text{hi}}$  cDCs and was limited to IgG1 (70% AF647-IgG1 $^+$  cells vs 10% for F(ab') $_2$ ) (**Figure 5A**), suggesting that ferrying by cDCs is the predominant, although not exclusive, mechanism of Fc-protein delivery to the thymus.

We further analyzed the uptake by medullary (m)TECs (CD45 $^-$ EpCAM $^+$ UEA-1 $^+$ ) and cortical (c)TECs (CD45 $^-$ EpCAM $^+$ Ly51 $^+$ ) (**Supplementary Figure 5B**). Their uptake was much more modest yet detectable, and again limited to IgG1 (**Figure 5B**). As mTECs and cTECs are non-migratory, their IgG1 uptake suggests that Fc-coupled proteins gain access to the thymus also in soluble form, in line with the low-level signal detected in resident SIRP $\alpha^{\text{lo}}$  cDCs.

Finally, we verified by imaging whether such ferrying also takes place with PPI-Fc. Newborn G9C8.NOD mice analyzed 72 h after gavage displayed fluorescent PPI-Fc but not PPI signal both at the whole-body level and in isolated thymi (**Figure 5C**). Confocal microscopy on thymic tissue sections (**Figure 5D**) confirmed the presence of PPI-Fc fluorescence (white) associated with CD11c $^+$  APC (green) in WT G9C8.NOD mice, but not in their FcRn $^{-/-}$ .B6 counterparts.

Collectively, these results show that orally administered Fc-coupled proteins, but not Fc-devoid proteins, reach the thymus mostly through ferrying by migratory SIRP $\alpha^{\text{hi}}$  cDCs and, to a lesser extent, in soluble form.

### 3.5 Oral PPI-Fc partially delays diabetes onset in polyclonal *Ins2* $^{-/-}$ .NOD mice

Having defined that oral PPI-Fc crosses the gut epithelium, achieves systemic bioavailability in both soluble and APC-associated form and reaches the thymus, we reasoned that the lack of diabetes protection in G9C8.NOD mice may reflect the aggressive nature of this TCR-transgenic model. We therefore repeated these experiments in *Ins2* $^{-/-}$ .NOD mice. This model is informative because it develops spontaneous diabetes and harbors a natural polyclonal T-cell repertoire. It thus provides a more physiological setting, in which oral PPI-Fc treatment should impact only the PPI-reactive T-cell fraction present in the natural repertoire. Moreover, *Ins2* knock-out leads to absent PPI expression in the thymus and lack of thymic deletion of PPI-reactive T cells, thus accelerating diabetes development (Thebault-Baumont et al., 2003;Faideau et al., 2006). Oral PPI-Fc treatment may thus compensate this thymic defect and impact the overall autoimmune cascade downstream of PPI. We applied the same single-dose 50- $\mu\text{g}$  regimen as before in 1-day-old *Ins2* $^{-/-}$ .NOD mice. Also in this case, no diabetes protection was observed (**Figure 6A**). To verify whether this was due to suboptimal dosing, we attempted a more intensive regimen. Based on the kinetics of intestinal FcRn expression (Figure 2A), repeated 50- $\mu\text{g}$  doses were administered at day 1, 4, 7 and 10 of life, in order to cover the time window displaying the highest intestinal FcRn expression. Again, no significant protection was obtained, but diabetes development was delayed by approximately 10 weeks in 33% of PPI-Fc-treated mice compared to control groups (**Figure 6B**).

Collectively, these data show that oral PPI-Fc, administered either in a single-dose or multiple-dose regimen, does not significantly prevent diabetes development in polyclonal *Ins2* $^{-/-}$ .NOD mice, albeit a partial delay is observed with the multiple dose regimen.

## 4 Discussion

Most T1D preventative vaccination trials employed insulin in its native form, without modifications. When administered through the oral route (Chaillous et al., 2000;Bonifacio et al., 2015), this

formulation holds several limitations. First, insulin is rapidly degraded in the acidic gastric environment under the action of several digestive enzymes, thus requiring the administration of high doses, e.g. 2.5-67.5 mg in the recent PRE-POINT trial (Bonifacio et al., 2015). The little fraction that reaches the intestinal tract does not efficiently cross the epithelial barrier, thus resulting in minimal absorption, estimated at ~1-2% (Bonifacio et al., 2015). Second, the use of insulin rather than its PPI precursor excludes several epitopes derived from the C peptide and, more importantly, the signal sequence (James et al., 2020). Our formulation employs an IgG1 Fc fragment, which is fused to PPI rather than insulin, thus providing a more comprehensive epitope coverage. Of further note, the affinity of proinsulin and PPI for the insulin receptor is much lower than that of insulin itself (Brezar et al., 2011), thus minimizing undesirable metabolic side effects upon systemic absorption, e.g. hypoglycemia. Although some gastric degradation likely takes place also for PPI-Fc, antibodies are less sensitive to such degradation (Lueangsakulthai et al., 2020), and the Fc moiety may increase PPI-Fc stability. Indeed, administration of a single 50- $\mu$ g dose was sufficient to achieve intestinal and systemic bioavailability. Moreover, the Fc moiety can hijack the FcRn, which is highly expressed by intestinal epithelial cells, thus allowing PPI-Fc to cross the intestinal barrier. It is also likely that the Fc moiety may subsequently increase systemic half-life through the buffering effect of endothelial cells, which also uptake Fc-fused proteins via the FcRn (thus protecting them from degradation) and slowly release them back into the circulation (thus prolonging their bioavailability) (Ward et al., 2003). This buffering mechanism provides a rationale for several Fc-fused therapeutics (Czajkowsky et al., 2012).

Our observations show that the PPI-Fc formulation strategy is efficient in terms of antigen delivery in newborn mice, since the intestinal transfer is Fc- and FcRn-dependent, while such transfer and subsequent uptake by APCs is much less efficient for Fc-devoid PPI. Moreover, the expression of FcRn and other FcRs by APCs can facilitate PPI-Fc uptake by these cells. Indeed, PPI-Fc was mainly taken up by LP macrophages, which are known to express FcRs, including FcRn, at high levels (Roopenian and Akilesh, 2007;Guilliams et al., 2014). Moreover, they might be more efficient than DCs to phagocytose PPI-Fc-loaded intestinal epithelial cells as part of their physiological apoptotic turnover (Cummings et al., 2016;Blander, 2018;Mowat, 2018). In macrophages, this uptake was high in both the CX3CR1<sup>+</sup> and CX3CR1<sup>-</sup> subset. In CX3CR1<sup>-</sup> macrophages, uptake was superior in the SIRP $\alpha$ <sup>hi</sup> than in the SIRP $\alpha$ <sup>lo</sup> fraction. The functional differences between these two as yet undescribed subsets are unknown. PPI-Fc was also detected in LP cDCs, namely the CD103<sup>+</sup>SIRP $\alpha$ <sup>-</sup> and CD103<sup>-</sup>SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> subsets. This uptake could be mediated by the FcRs that they also express, while other studies have shown that CD103<sup>+</sup> cDCs are able to extend their dendrites through the epithelial gut layer to directly sample luminal antigens (Chieppa et al., 2006;Farache et al., 2013). Transfer of antigens from macrophages to neighboring DCs through gap junctions may also occur (Mazzini et al., 2014). Albeit their uptake of Fc-coupled proteins was lower, these cDCs have migratory properties that are absent in macrophages, and may thus provide a ferrying system for PPI-Fc to reach different organs. Indeed, 70% of thymic SIRP $\alpha$ <sup>hi</sup> cDCs was also loaded with Fc-coupled proteins. This cDC subset is described as migratory, i.e. reaching the thymus from the periphery, in contrast to SIRP $\alpha$ <sup>lo</sup> cDCs that are described as thymic-resident (Donskoy and Goldschneider, 2003;Li et al., 2009). It is thus likely that Fc-coupled proteins are ferried to the thymus by these migratory cDCs loaded in the periphery.

Although important, PPI-Fc ferrying by SIRP $\alpha$ <sup>hi</sup> cDCs is not the only pathway allowing PPI-Fc to move across different body compartments, and several lines of evidence suggest that diffusion in soluble form is another mechanism at play. Indeed, spleen macrophages displayed the same uptake profile as in the LP, namely a higher uptake in the CX3CR1<sup>+</sup> and the CX3CR1<sup>-</sup>SIRP $\alpha$ <sup>hi</sup> subsets compared to CX3CR1<sup>-</sup>SIRP $\alpha$ <sup>lo</sup> macrophages, which were virtually negative. Since the current consensus is that macrophages, including those of the LP, are non-migratory (Pabst and Bernhardt,



2010), this observation suggests that, following entry into the LP, PPI-Fc also circulates in soluble form and reaches the spleen, where it is taken up by resident macrophages. It should however be noted that mice were treated at 5 days of life, at a stage when the immune system is still under development and different tissues are being colonized by immune cells. The APC populations described herein could thus correspond to precursors or APCs at early differentiation stages that might still be endowed with migratory properties. In particular, CX3CR1 expression can mark the engagement of myeloid progenitors toward the monocyte/macrophage/DC lineage and is expressed by a common splenic macrophage/DC precursor (Auffray et al., 2009). A splenic monocyte population expressing CD11b and CX3CR1 has also been described (Auffray et al., 2009), possibly corresponding to the CX3CR1<sup>+</sup> subset described herein, which was also CD11b<sup>+</sup>. Nonetheless, PPI-Fc was detected in the serum, thus providing direct evidence for its circulation in soluble form. In line with this interpretation, a sizable fraction of TECs (both mTECs and cTECs) also took up Fc-coupled proteins, likely mediated by the FcRn that they express (St-Pierre et al., 2013). Although the transfer of peptide-MHC complexes from mTECs to DCs is described (Breed et al., 2018), no transfer in the opposite direction has been reported, arguing for a local uptake in soluble form.

It is during the perinatal period that diabetogenic T cells escape negative selection (He et al., 2013), thus providing a critical time window for diabetes prevention. We previously demonstrated that a single intravenous administration of PPI-Fc to pregnant mice protects their progeny from diabetes (Culina et al., 2015). Despite a promising profile in terms of systemic antigen availability, the oral administration of this same protein to newborn mice did not achieve the same protection, nor did it modulate T-cell responses. Although the lack of modulatory effects may be due to transient modifications not persisting at the time points analyzed, the lack of therapeutic benefit is open to several explanations.

First, it may reflect an issue of timing, dosing or treatment duration. In our materno-fetal transfer model, the progeny was exposed to PPI-Fc even before birth, and PPI-Fc remained detectable for longer time, i.e. up to 7 days of life upon administration 2 days before birth (Culina et al., 2015). Serum PPI-Fc levels were lower (0.75 µg/ml vs. 2.2 µg/ml after oral administration), but remained stable during the first 48 h, while they rapidly decreased already at 24 h upon oral administration. The therapeutic and T-cell modulatory effects observed with the transplacental route and missed here could thus rely on the longer exposure to Fc proteins. Higher doses or repeated administrations may thus be needed to achieve diabetes prevention through the oral route. Indeed, the early peak and rapid decline of serum PPI-Fc concentration observed after oral administration may be less suited to induce tolerance compared with the lower but steadier serum concentration achieved after transplacental transfer. Alternatively, enteric-coated formulations may reduce degradation during the gastrointestinal transit. Treatment by *Lactococcus lactis* strains transgenically modified to release PPI-Fc, alone or in combination with modulatory cytokines such as IL-10 (Mallone and Culina, 2014), is another attractive option, as it would obviate the need for PPI-Fc production, minimize gastrointestinal degradation, and achieve a more tolerogenic effect through prolonged delivery of small antigen amounts (Mallone and Culina, 2014). Importantly the intestinal expression of FcRn is limited to the first 15 days of life in the mouse, but persists indefinitely in the human (Israel et al., 1997), thus widening the time window available for intervention. The availability of mouse strains with a human FcRn transgene under the control of its natural promoters (Yoshida et al., 2004) will be useful to explore prolonged treatment regimens, and to more closely mimic the interaction with the human FcRn ultimately targeted for clinical trials.

Second, the limitations of the G9C8.NOD model should be considered. Diabetes is induced by peptide immunization, thus resulting in a very aggressive autoimmune disease. Despite spontaneous diabetes onset, also the *Ins2*<sup>-/-</sup>.NOD model is rather aggressive compared with WT NOD mice, as diabetes

development is greatly accelerated (between 6 and 18 weeks of age). Although non-significant, a partial delay was observed after repeated oral PPI-Fc administration in *Ins2<sup>-/-</sup>*.NOD newborn mice, suggesting that this strategy may be effective in WT NOD mice.

Third, the use of multiple antigens rather than PPI alone may be required to achieve a more comprehensive tolerogenic effect. This may be obtained by developing polypeptide Fc-fused constructs incorporating multiple epitopes targeted by autoimmune T cells. Oral combination treatments with other agents such as vitamin D3 (calcitriol) (Bergot et al., 2020) or low-dose IL-2, e.g. IL-2-Fc muteins (Khoryati et al., 2020) that could be orally administered to exploit the same FcRn pathway, may also be considered.

In conclusion, the efficacy of oral PPI-Fc treatment in terms of systemic and thymic antigen delivery via the intestinal FcRn pathway warrants further investigations to develop antigen formulations and/or regimens that can translate into diabetes prevention.

### 5 Author contributions

Conceptualization, S.Y., R.M.; Methodology, N.C., S.C., S.Y., R.M.; Investigation, N.C., S.C., C.L., S.Y., R.M.; Data Curation, N.C., S.C., S.Y., R.M.; Writing, N.C., S.Y., R.M.; Visualization, N.C., S.Y., R.M.; Supervision, S.Y., R.M.; Funding Acquisition, R.M. R.M. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

### 6 Funding

This work was performed within the *Département Hospitalo-Universitaire* (DHU) AuthoRS and supported by a PhD fellowship of the Ile-de-France CORDDIM and by grants from the JDRF (2-SRA-2016-203-S-B), the *Fondation Francophone pour la Recherche sur le Diabète*, the EFSD/JDRF/Lilly European Programme in Type 1 Diabetes Research 2015, the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR-15-CE17-0018-01), Inserm-Transfert Proof of Concept 2016, the *Fondation pour la Recherche Médicale* (EQU20193007831), the *Association pour la Recherche sur le Diabète*; and the Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking under grant agreements 115797 and 945268 (INNODIA and INNODIA HARVEST), which receive support from the EU Horizon 2020 program, the European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations, JDRF, and the Leona M. and Harry B. Helmsley Charitable Trust.

### 7 Acknowledgments

We thank the CyBio, HistIM, PIV and Imag'IC platforms of the Cochin Institute, for assistance with flow cytometry, histology, *in vivo* imaging and confocal microscopy, respectively; F.S. Wong (Cardiff University, UK) for providing G9C8.NOD mice; C. Boitard (Cochin Institute, Paris, France) for providing *Ins2<sup>-/-</sup>*.NOD mice; and the Recombinant Protein Platform at the Pasteur Institute (Paris) for producing PPI and control proteins.

### 8 Duality of interest disclosure

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

## 9 Prior presentation

Parts of this study were presented at the congresses of the Immunology of Diabetes Society (IDS, London, October 25-29, 2018), and the Federation of Clinical Immunology Society (FOCIS, Boston, June 18-21, 2019).

## 10 References

- Atibalentja, D.F., Murphy, K.M., and Unanue, E.R. (2011). Functional redundancy between thymic CD8alpha+ and Sirpalpha+ conventional dendritic cells in presentation of blood-derived lysozyme by MHC class II proteins. *J. Immunol.* 186, 1421-1431.
- Auffray, C., Fogg, D.K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., Leemput, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., Molina, T., Charo, I., Hume, D.A., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2009). CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med* 206, 595-606.
- Azoury, M.E., Tarayrah, M., Afonso, G., Pais, A., Colli, M.L., Maillard, C., Lavaud, C., Alexandre-Heymann, L., Gonzalez-Duque, S., Verdier, Y., Vinh, J., Pinto, S., Buus, S., Dubois-Laforgue, D., Larger, E., Beressi, J.P., Bruno, G., Eizirik, D.L., You, S., and Mallone, R. (2020). Peptides Derived From Insulin Granule Proteins are Targeted by CD8(+) T Cells Across MHC Class I Restrictions in Humans and NOD Mice. *Diabetes*.
- Baba, T., Nakamoto, Y., and Mukaida, N. (2009). Crucial contribution of thymic Sirp alpha+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J. Immunol.* 183, 3053-3063.
- Bergot, A.S., Buckle, I., Cikaluru, S., Naranjo, J.L., Wright, C.M., Zheng, G., Talekar, M., Hamilton-Williams, E.E., and Thomas, R. (2020). Regulatory T Cells Induced by Single-Peptide Liposome Immunotherapy Suppress Islet-Specific T Cell Responses to Multiple Antigens and Protect from Autoimmune Diabetes. *J Immunol* 204, 1787-1797.
- Billingham, R.E., Brent, L., and Medawar, P.B. (1953). Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172, 603-606.
- Blander, J.M. (2018). On cell death in the intestinal epithelium and its impact on gut homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol* 34, 413-419.
- Bonasio, R., Scimone, M.L., Schaerli, P., Grabie, N., Lichtman, A.H., and Von Andrian, U.H. (2006). Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat. Immunol.* 7, 1092-1100.
- Bonifacio, E., Ziegler, A.G., Klingensmith, G., Schober, E., Bingley, P.J., Rottenkolber, M., Theil, A., Eugster, A., Puff, R., Peplow, C., Buettner, F., Lange, K., Hasford, J., Achenbach, P., and Group, P.-P.S. (2015). Effects of high-dose oral insulin on immune responses in children at high risk for type 1 diabetes: the Pre-POINT randomized clinical trial. *JAMA* 313, 1541-1549.
- Breed, E.R., Lee, S.T., and Hogquist, K.A. (2018). Directing T cell fate: How thymic antigen presenting cells coordinate thymocyte selection. *Semin Cell Dev Biol* 84, 2-10.
- Brezar, V., Carel, J.C., Boitard, C., and Mallone, R. (2011). Beyond the hormone: insulin as an autoimmune target in type 1 diabetes. *Endocr. Rev.* 32, 623-669.

- Brezar, V., Culina, S., Gagnerault, M.C., and Mallone, R. (2012). Short-term subcutaneous insulin treatment delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Eur. J. Immunol.* 42, 1553-1561.
- Carré, A., Richardson, S.J., Larger, E., and Mallone, R. (2020). Presumption of guilt for T cells in type 1 diabetes: lead culprits or partners in crime depending on age of onset? *Diabetologia* in press.
- Chaillous, L., Lefevre, H., Thivolet, C., Boitard, C., Lahlou, N., Atlan-Gepner, C., Bouhanick, B., Mogenet, A., Nicolino, M., Carel, J.C., Lecomte, P., Marechaud, R., Bougneres, P., Charbonnel, B., and Sai, P. (2000). Oral insulin administration and residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: a multicentre randomised controlled trial. Diabete Insuline Orale group. *Lancet* 356, 545-549.
- Chiappa, M., Rescigno, M., Huang, A.Y., and Germain, R.N. (2006). Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J Exp Med* 203, 2841-2852.
- Culina, S., Boitard, C., and Mallone, R. (2011). Antigen-based immune therapeutics for type 1 diabetes: magic bullets or ordinary blanks? *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 286248.
- Culina, S., Gupta, N., Boisgard, R., Afonso, G., Gagnerault, M.C., Dimitrov, J., Osterbye, T., Justesen, S., Luce, S., Attias, M., Kyewski, B., Buus, S., Wong, F.S., Lacroix-Desmazes, S., and Mallone, R. (2015). Materno-fetal transfer of preproinsulin through the neonatal Fc receptor protects from autoimmune diabetes. *Diabetes* 64, 3532-3542.
- Culina, S., Lalanne, A.I., Afonso, G., Cerosaletti, K., Pinto, S., Sebastiani, G., Kuranda, K., Nigi, L., Eugster, A., Osterbye, T., Maugein, A., McLaren, J.E., Ladell, K., Larger, E., Beressi, J.P., Lissina, A., Appay, V., Davidson, H.W., Buus, S., Price, D.A., Kuhn, M., Bonifacio, E., Battaglia, M., Caillat-Zucman, S., Dotta, F., Scharfmann, R., Kyewski, B., Mallone, R., and Immadiab Study, G. (2018). Islet-reactive CD8+ T cell frequencies in the pancreas, but not in blood, distinguish type 1 diabetic patients from healthy donors. *Sci Immunol* 3, eaao4013.
- Cummings, R.J., Barbet, G., Bongers, G., Hartmann, B.M., Gettler, K., Muniz, L., Furtado, G.C., Cho, J., Lira, S.A., and Blander, J.M. (2016). Different tissue phagocytes sample apoptotic cells to direct distinct homeostasis programs. *Nature* 539, 565-569.
- Czajkowsky, D.M., Hu, J., Shao, Z., and Pleass, R.J. (2012). Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives. *EMBO Mol. Med.* 4, 1015-1028.
- Davis, M.M. (2015). Not-So-Negative Selection. *Immunity* 43, 833-835.
- Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes Study, G. (2002). Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 346, 1685-1691.
- Donskoy, E., and Goldschneider, I. (2003). Two developmentally distinct populations of dendritic cells inhabit the adult mouse thymus: demonstration by differential importation of hematogenous precursors under steady state conditions. *J Immunol* 170, 3514-3521.
- Faideau, B., Lotton, C., Lucas, B., Tardivel, I., Elliott, J.F., Boitard, C., and Carel, J.C. (2006). Tolerance to proinsulin-2 is due to radioresistant thymic cells. *J. Immunol.* 177, 53-60.
- Farache, J., Koren, I., Milo, I., Gurevich, I., Kim, K.W., Zigmond, E., Furtado, G.C., Lira, S.A., and Shakhar, G. (2013). Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity* 38, 581-595.
- Fourlanos, S., Perry, C., Gellert, S.A., Martinuzzi, E., Mallone, R., Butler, J., Colman, P.G., and Harrison, L.C. (2011). Evidence that nasal insulin induces immune tolerance to insulin in adults with autoimmune diabetes. *Diabetes* 60, 1237-1245.

- Gerling, I.C., Serreze, D.V., Christianson, S.W., and Leiter, E.H. (1992). Intrathymic islet cell transplantation reduces beta-cell autoimmunity and prevents diabetes in NOD/Lt mice. *Diabetes* 41, 1672-1676.
- Gonzalez-Duque, S., Azoury, M.E., Colli, M.L., Afonso, G., Turatsinze, J.V., Nigi, L., Lalanne, A.I., Sebastiani, G., Carre, A., Pinto, S., Culina, S., Corcos, N., Bugliani, M., Marchetti, P., Armanet, M., Diedisheim, M., Kyewski, B., Steinmetz, L.M., Buus, S., You, S., Dubois-Laforgue, D., Larger, E., Beressi, J.P., Bruno, G., Dotta, F., Scharfmann, R., Eizirik, D.L., Verdier, Y., Vinh, J., and Mallone, R. (2018). Conventional and Neo-antigenic Peptides Presented by beta Cells Are Targeted by Circulating Naive CD8+ T Cells in Type 1 Diabetic and Healthy Donors. *Cell Metab* 28, 946-960 e946.
- Guerau-De-Arellano, M., Martinic, M., Benoist, C., and Mathis, D. (2009). Neonatal tolerance revisited: a perinatal window for Aire control of autoimmunity. *J. Exp. Med.* 206, 1245-1252.
- Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2014). The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol* 14, 94-108.
- Gupta, N., Culina, S., Meslier, Y., Dimitrov, J., Arnoult, C., Delignat, S., Gangadharan, B., Lecerf, M., Justesen, S., Gouilleux-Gruart, V., Salomon, B.L., Scott, D.W., Kaveri, S.V., Mallone, R., and Lacroix-Desmazes, S. (2015). Regulation of immune responses to antigens and protein therapeutics by transplacental induction of central and peripheral T-cell tolerance. *Sci. Transl. Med.* 7, 275ra221.
- Hadeiba, H., Lahl, K., Edalati, A., Oderup, C., Habtezion, A., Pachynski, R., Nguyen, L., Ghodsi, A., Adler, S., and Butcher, E.C. (2012). Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity* 36, 438-450.
- He, Q., Morillon, Y.M., 2nd, Spidale, N.A., Kroger, C.J., Liu, B., Sartor, R.B., Wang, B., and Tisch, R. (2013). Thymic development of autoreactive T cells in NOD mice is regulated in an age-dependent manner. *J Immunol* 191, 5858-5866.
- Israel, E.J., Taylor, S., Wu, Z., Mizoguchi, E., Blumberg, R.S., Bhan, A., and Simister, N.E. (1997). Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology* 92, 69-74.
- James, E.A., Mallone, R., Kent, S.C., and Dilorenzo, T.P. (2020). T-Cell Epitopes and Neo-epitopes in Type 1 Diabetes: A Comprehensive Update and Reappraisal. *Diabetes* 69, 1311-1335.
- Khoryati, L., Pham, M.N., Sherve, M., Kumari, S., Cook, K., Pearson, J., Bogdani, M., Campbell, D.J., and Gavin, M.A. (2020). An IL-2 mutein engineered to promote expansion of regulatory T cells arrests ongoing autoimmunity in mice. *Sci Immunol* 5.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* 14, 377-391.
- Krishnamurthy, B., Dudek, N.L., Mckenzie, M.D., Purcell, A.W., Brooks, A.G., Gellert, S., Colman, P.G., Harrison, L.C., Lew, A.M., Thomas, H.E., and Kay, T.W. (2006). Responses against islet antigens in NOD mice are prevented by tolerance to proinsulin but not IGRP. *J. Clin. Invest.* 116, 3258-3265.
- Li, J., Park, J., Foss, D., and Goldschneider, I. (2009). Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J Exp Med* 206, 607-622.

- Lueangsakulthai, J., Sah, B.N.P., Scottoline, B.P., and Dallas, D.C. (2020). Survival of Recombinant Monoclonal Antibodies (IgG, IgA and sIgA) Versus Naturally-Occurring Antibodies (IgG and sIgA/IgA) in an Ex Vivo Infant Digestion Model. *Nutrients* 12.
- Mallone, R., and Culina, S. (2014). Of bugs and men: antigen-fortified *Lactococcus lactis* for type 1 diabetes immunotherapy. *Diabetes* 63, 2603-2605.
- Mallone, R., and Eizirik, D.L. (2020). Presumption of innocence for beta cells: why are they vulnerable autoimmune targets in type 1 diabetes? *Diabetologia* 63, 1999-2006.
- Mallone, R., and Roep, B.O. (2013). Biomarkers for immune intervention trials in type 1 diabetes. *Clin. Immunol.* 149, 286-296.
- Marodon, G., Fisson, S., Levacher, B., Fabre, M., Salomon, B.L., and Klatzmann, D. (2006). Induction of antigen-specific tolerance by intrathymic injection of lentiviral vectors. *Blood* 108, 2972-2978.
- Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., and Rescigno, M. (2014). Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1(+) macrophages to CD103(+) dendritic cells. *Immunity* 40, 248-261.
- Mold, J.E., Michaelsson, J., Burt, T.D., Muench, M.O., Beckerman, K.P., Busch, M.P., Lee, T.H., Nixon, D.F., and Mccune, J.M. (2008). Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* 322, 1562-1565.
- Mowat, A.M. (2018). To respond or not to respond - a personal perspective of intestinal tolerance. *Nat Rev Immunol* 18, 405-415.
- Nakayama, M., Abiru, N., Moriyama, H., Babaya, N., Liu, E., Miao, D., Yu, L., Wegmann, D.R., Hutton, J.C., Elliott, J.F., and Eisenbarth, G.S. (2005). Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 435, 220-223.
- Pabst, O., and Bernhardt, G. (2010). The puzzle of intestinal lamina propria dendritic cells and macrophages. *Eur J Immunol* 40, 2107-2111.
- Parikka, V., Nanto-Salonen, K., Saarinen, M., Simell, T., Ilonen, J., Hyoty, H., Veijola, R., Knip, M., and Simell, O. (2012). Early seroconversion and rapidly increasing autoantibody concentrations predict prepubertal manifestation of type 1 diabetes in children at genetic risk. *Diabetologia* 55, 1926-1936.
- Proietto, A.I., Van, D.S., Zhou, P., Rizzitelli, A., D'amico, A., Steptoe, R.J., Naik, S.H., Lahoud, M.H., Liu, Y., Zheng, P., Shortman, K., and Wu, L. (2008). Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 19869-19874.
- Pugliese, A., Zeller, M., Fernandez, A., Jr., Zalcberg, L.J., Bartlett, R.J., Ricordi, C., Pietropaolo, M., Eisenbarth, G.S., Bennett, S.T., and Patel, D.D. (1997). 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.* 15, 293-297.
- Roopenian, D.C., and Akilesh, S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 715-725.
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W., and Pabst, O. (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med* 206, 3101-3114.

- St-Pierre, C., Brochu, S., Vanegas, J.R., Dumont-Lagace, M., Lemieux, S., and Perreault, C. (2013). Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Sci Rep* 3, 1860.
- Thebault-Baumont, K., Dubois-Laforgue, D., Krief, P., Briand, J.P., Halbout, P., Vallon-Geoffroy, K., Morin, J., Laloux, V., Lehuen, A., Carel, J.C., Jami, J., Muller, S., and Boitard, C. (2003). Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J. Clin. Invest.* 111, 851-857.
- Villasenor, J., Besse, W., Benoist, C., and Mathis, D. (2008). Ectopic expression of peripheral-tissue antigens in the thymic epithelium: probabilistic, monoallelic, misinitiated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15854-15859.
- Ward, E.S., Zhou, J., Ghetie, V., and Ober, R.J. (2003). Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *Int Immunol* 15, 187-195.
- Wong, F.S., Siew, L.K., Scott, G., Thomas, I.J., Chapman, S., Viret, C., and Wen, L. (2009). Activation of insulin-reactive CD8 T cells for development of autoimmune diabetes. *Diabetes* 58, 1156-1164.
- Yoshida, M., Claypool, S.M., Wagner, J.S., Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Roopenian, D.C., Lencer, W.I., and Blumberg, R.S. (2004). Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity* 20, 769-783.
- Yu, P., Haymaker, C.L., Divekar, R.D., Ellis, J.S., Hardaway, J., Jain, R., Tartar, D.M., Hoeman, C.M., Cascio, J.A., Ostermeier, A., and Zaghoulani, H. (2008). Fetal exposure to high-avidity TCR ligand enhances expansion of peripheral T regulatory cells. *J. Immunol.* 181, 73-80.
- Yu, W., Jiang, N., Ebert, P.J., Kidd, B.A., Muller, S., Lund, P.J., Juang, J., Adachi, K., Tse, T., Birnbaum, M.E., Newell, E.W., Wilson, D.M., Grotenbreg, G.M., Valitutti, S., Quake, S.R., and Davis, M.M. (2015). Clonal deletion prunes but does not eliminate self-specific alphabeta CD8(+) T lymphocytes. *Immunity* 42, 929-941.
- Ziegler, A.G., Bonifacio, E., and Group, B.-B.S. (2012). Age-related islet autoantibody incidence in offspring of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 55, 1937-1943.

## 11 Figure Legends

**Figure 1. Oral PPI-Fc does not prevent diabetes in TCR-transgenic G9C8.NOD mice.** (A) Diabetes incidence in G9C8.NOD mice force-fed at day 1 with 50  $\mu$ g PPI-Fc (red) or equimolar amounts of PPI (blue), OVA-Fc (green) or PBS (black). Diabetes was induced by prime-boost immunization with PI<sub>B15-23</sub> peptide and CpG at 4 and 6 weeks of age. (B-E) Proportion of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells out of total TCR<sup>+</sup> cells (top panels) and of Foxp3<sup>-</sup> and Foxp3<sup>+</sup> T cells out of total CD4<sup>+</sup> T cells (bottom panels) in the spleen (B), PLNs (C) and MLNs (D) of 4-week-old PPI-Fc- or control-treated G9C8.NOD mice. (E) Splenocytes from 4-week-old PPI-Fc- or control-treated G9C8.NOD mice were stimulated *in vitro* with increasing concentrations of PI<sub>B15-23</sub> peptide for 5 h and assessed for surface CD69 and CD107a expression and production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Results are from 4-5 separate experiments with 7-9 mice/group; bars indicate mean $\pm$ SEM values.

**Figure 2. Oral PPI-Fc crosses the gut epithelium in an FcRn-dependent manner and is taken up by LP DCs and macrophages.** (A) Age-dependent FcRn expression in the gut epithelium. Intestinal epithelial cells were isolated from the whole digestive tract of 1-day-old to 13-week-old G9C8.NOD mice and 1-day-old FcRn<sup>-/-</sup>.B6 mice and probed for FcRn, and Hsp70 as loading control. (B) One-day-old wild-type G9C8.NOD (WT) or FcRn<sup>-/-</sup>.B6 mice were force-fed with 50  $\mu$ g of AF680-labeled PPI-Fc. *Ex-vivo* imaging of the intestines of WT and FcRn<sup>-/-</sup> mice (n=2/each) 4, 24 or 48 h after PPI-Fc force-feeding. (C) Confocal images of the same intestines recovered from WT and FcRn<sup>-/-</sup>.B6 mice at 24 h (20X and 40X magnifications). Sections were stained for insulin (white), CD11c (green) and EpCAM (red), with nuclei counterstained with DAPI (blue). (D) Five-day-old G9C8.NOD mice were force-fed with 50  $\mu$ g AF647-labeled PPI-Fc (green bars), PPI (grey), or PBS (black). LP cells were isolated 4 or 8 h after gavage, and protein uptake (AF647 median fluorescence) was analyzed in CD103<sup>+</sup> and CD103<sup>-</sup> cDCs and CX3CR1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> and CX3CR1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> macrophages (M $\Phi$ ). (E) Five-day-old G9C8.NOD mice were force-fed with 50  $\mu$ g AF647-labeled IgG1 (green), F(ab')<sub>2</sub> (grey), or PBS (black). Four hours later, protein uptake was analyzed in the LP for the indicated APC subsets: CD103<sup>+</sup> and SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> cDCs (left) and CX3XR1<sup>+</sup>, CX3CR1<sup>-</sup>SIRP $\alpha$ <sup>lo</sup> and CX3CR1<sup>-</sup>SIRP $\alpha$ <sup>hi</sup> macrophages (M $\Phi$ , right). (F) Comparison of the AF647 median fluorescence at 4 and 24 h in the same APC subsets. Results in (D-F) are expressed as mean $\pm$ SEM from 3 mice per group. \* $P$  $\leq$ 0.03, \*\* $P$  $\leq$ 0.007, \*\*\* $P$  $\leq$ 0.0002 by 2-way ANOVA.

**Figure 3. APC subsets in the neonatal LP and spleen.** Cells were gated on live CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>B220<sup>-</sup> events (see Supplementary Figures 3-4 for details). (A) In the LP, CD11c<sup>hi</sup> cDCs (top left panel) are divided into a CD103<sup>+</sup> and a SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> subset (top right); F4/80<sup>+</sup> macrophages are divided into a CX3CR1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> (indicated as CX3CR1<sup>+</sup>) and a CX3CR1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> (indicated as CX3CR1<sup>-</sup>) subset (bottom left). The latter comprises a SIRP $\alpha$ <sup>lo</sup> and SIRP $\alpha$ <sup>hi</sup> subpopulation (bottom right). (B) In the spleen, CD11c<sup>hi</sup> cDCs are similarly composed of CD103<sup>+</sup> and SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> subpopulations. F4/80<sup>+</sup> macrophages are all CD11b<sup>+</sup> and either CX3CR1<sup>+</sup> or CX3CR1<sup>-</sup>. The latter comprise a SIRP $\alpha$ <sup>lo</sup> and SIRP $\alpha$ <sup>hi</sup> subpopulation.

**Figure 4. Oral PPI-Fc reaches the spleen mainly in soluble form and is taken up locally by SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> cDCs and macrophages.** (A-B) Five-day-old G9C8.NOD mice were force-fed with 50  $\mu$ g AF647-labeled IgG1 (green), F(ab')<sub>2</sub> (grey), or PBS (black). Four hours later, protein uptake (AF647 median fluorescence) was analyzed in the spleen for the indicated APC subsets: CD103<sup>+</sup> and SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> cDCs (A) and CX3XR1<sup>+</sup>, CX3XR1<sup>-</sup>SIRP $\alpha$ <sup>lo</sup> and CX3XR1<sup>-</sup>SIRP $\alpha$ <sup>hi</sup> macrophages (B). (C) Comparison of the AF647 median fluorescence at 4 and 24 h in the same APC subsets. (D) One-day-old wild-type G9C8.NOD (WT) or FcRn<sup>-/-</sup>.B6 mice were force-fed with 50  $\mu$ g of PPI-Fc (or PBS in WT mice), serum was collected after 4, 24 and 48 h and PPI-Fc concentrations measured by enzyme-linked

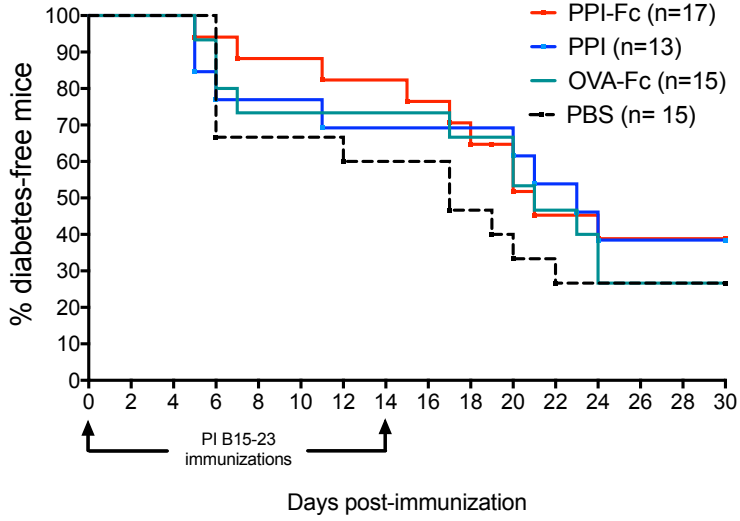


immunosorbent assays. Results are expressed as mean $\pm$ SEM from 3 mice per group (6/group in D). \* $P\leq 0.03$ , \*\* $P\leq 0.006$ , \*\*\* $P\leq 0.0003$  by 2-way ANOVA.

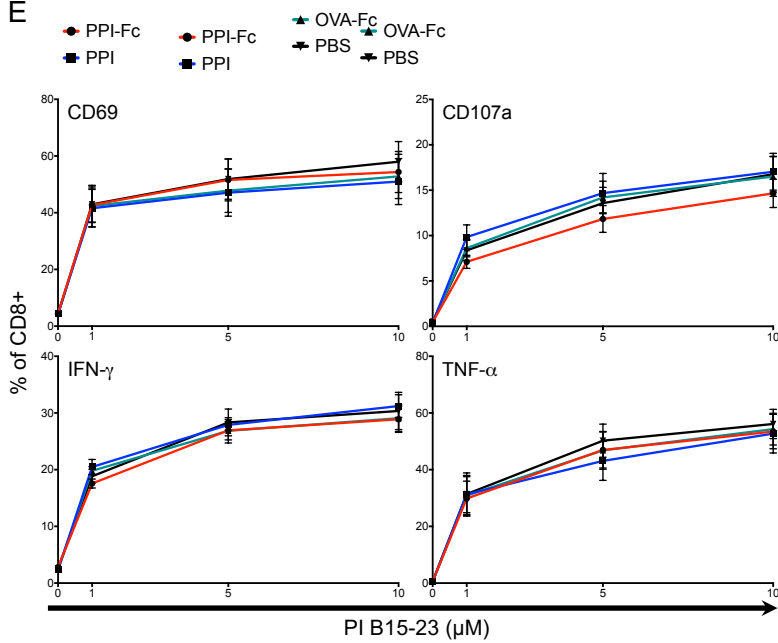
**Figure 5. Oral PPI-Fc reaches the thymus mainly through ferrying by migratory SIRP $\alpha^{\text{hi}}$  cDCs.** (A-B) Five-day-old G9C8.NOD mice were force-fed with 50  $\mu\text{g}$  AF647-labeled IgG1 (green), F(ab')<sub>2</sub> (grey), or PBS (black). Thymi from 3 mice/group were pooled and cells were magnetically enriched for CD11c<sup>+</sup> DCs (A) and EpCAM<sup>+</sup> TECs (B) before flow cytometry (see Supplementary Figure 5 for details). Protein uptake (AF647 median fluorescence and percentage of AF647<sup>+</sup> cells) was analyzed in the indicated DC and TEC subsets. (C) *Ex-vivo* imaging of the whole body (top) and thymus (bottom) of 1-day-old G9C8.NOD mice 72 h after oral administration of 50  $\mu\text{g}$  AF680-labeled PPI-Fc or PPI (day 4 of life). (D) Confocal images of thymic sections recovered from WT G9C8.NOD and FcRn<sup>-/-</sup>.B6 mice 24 h after oral administration of fluorescent PPI-Fc. Sections were stained for insulin (white), CD11c (green) and cytokeratin 5 (CK5, red), with nuclei counterstained with DAPI (blue).

**Figure 6. Oral PPI-Fc partially delays diabetes onset in polyclonal *Ins2*<sup>-/-</sup>.NOD mice.** Diabetes incidence in *Ins2*<sup>-/-</sup>.NOD mice after oral administration of 50  $\mu\text{g}$  PPI-Fc (red) or equimolar amounts of PPI (blue), OVA-Fc (green), IgG1 (purple) or PBS (black) at day 1 (A) or day 1, 4, 7 and 10 of life (B).

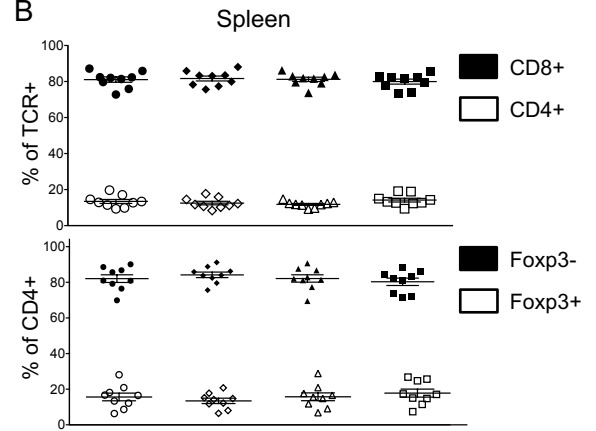
A



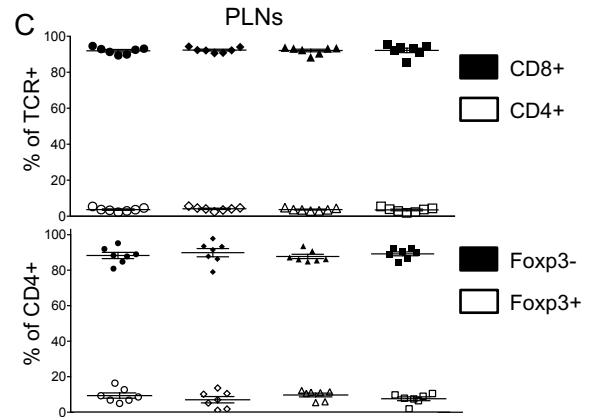
E



B



C



D

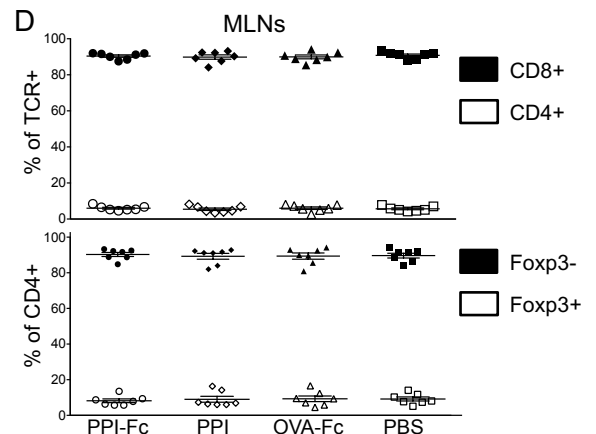
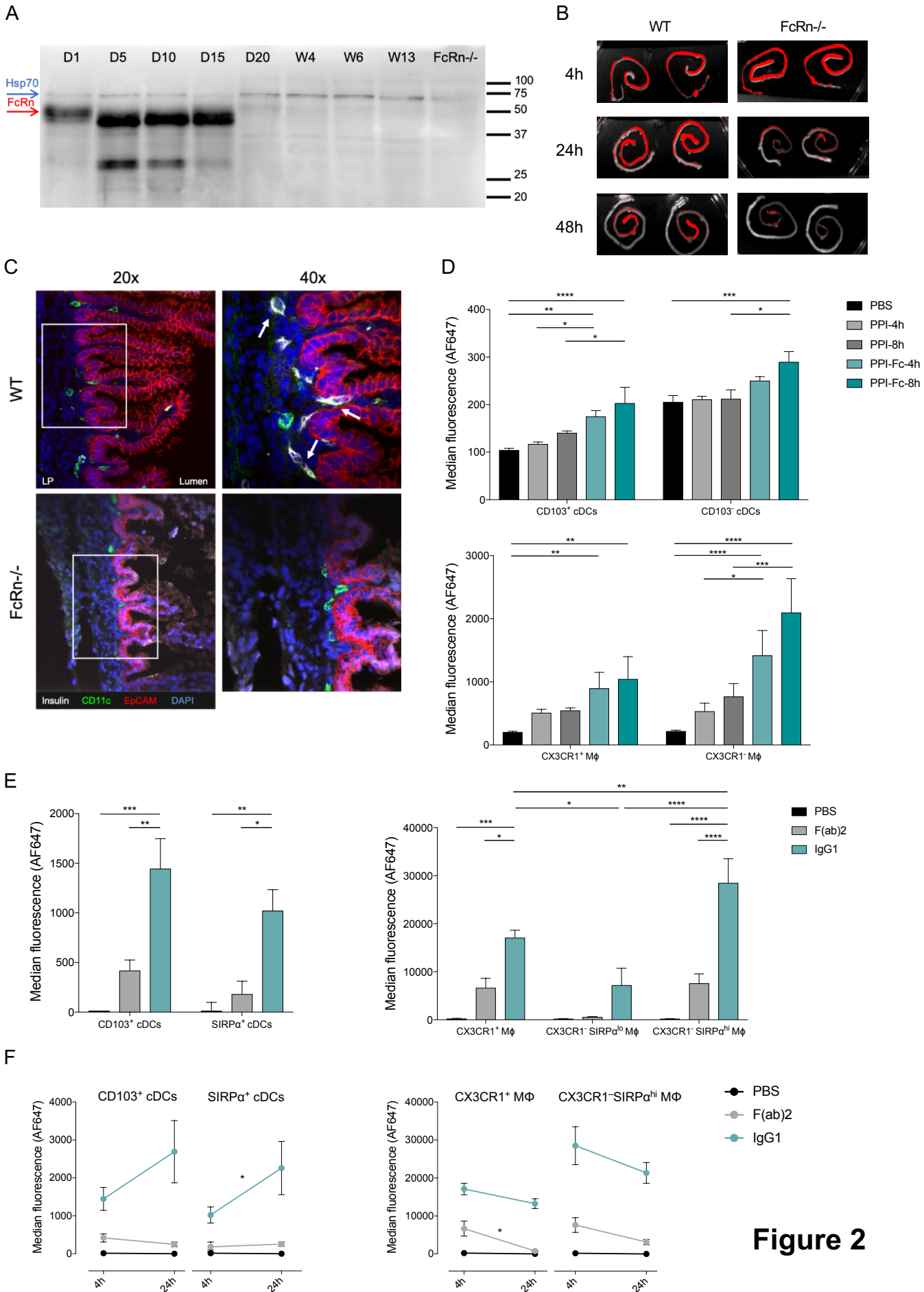
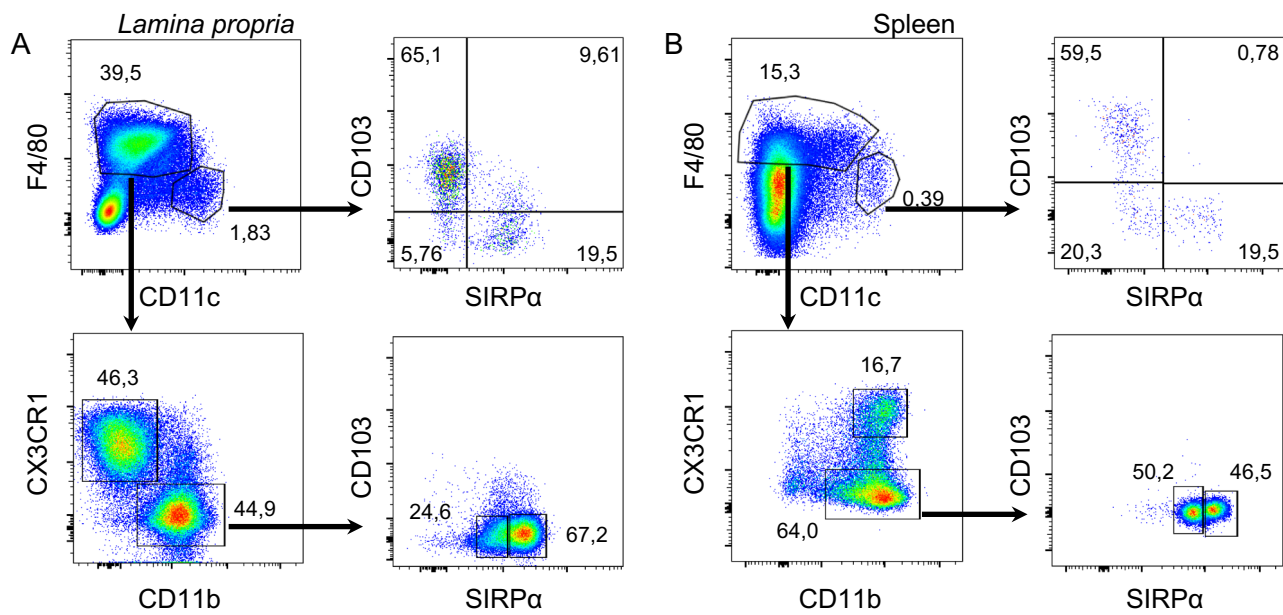


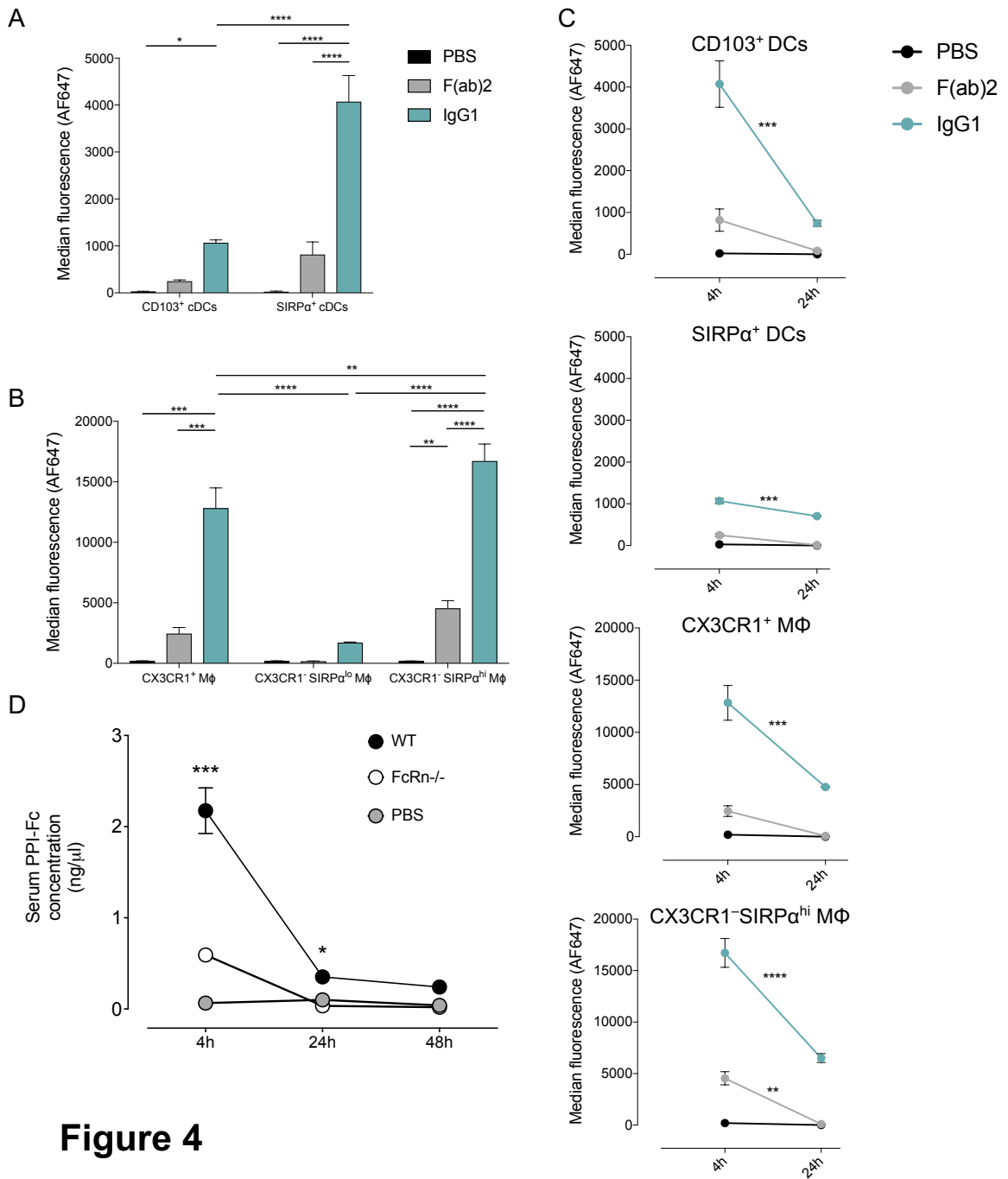
Figure 1



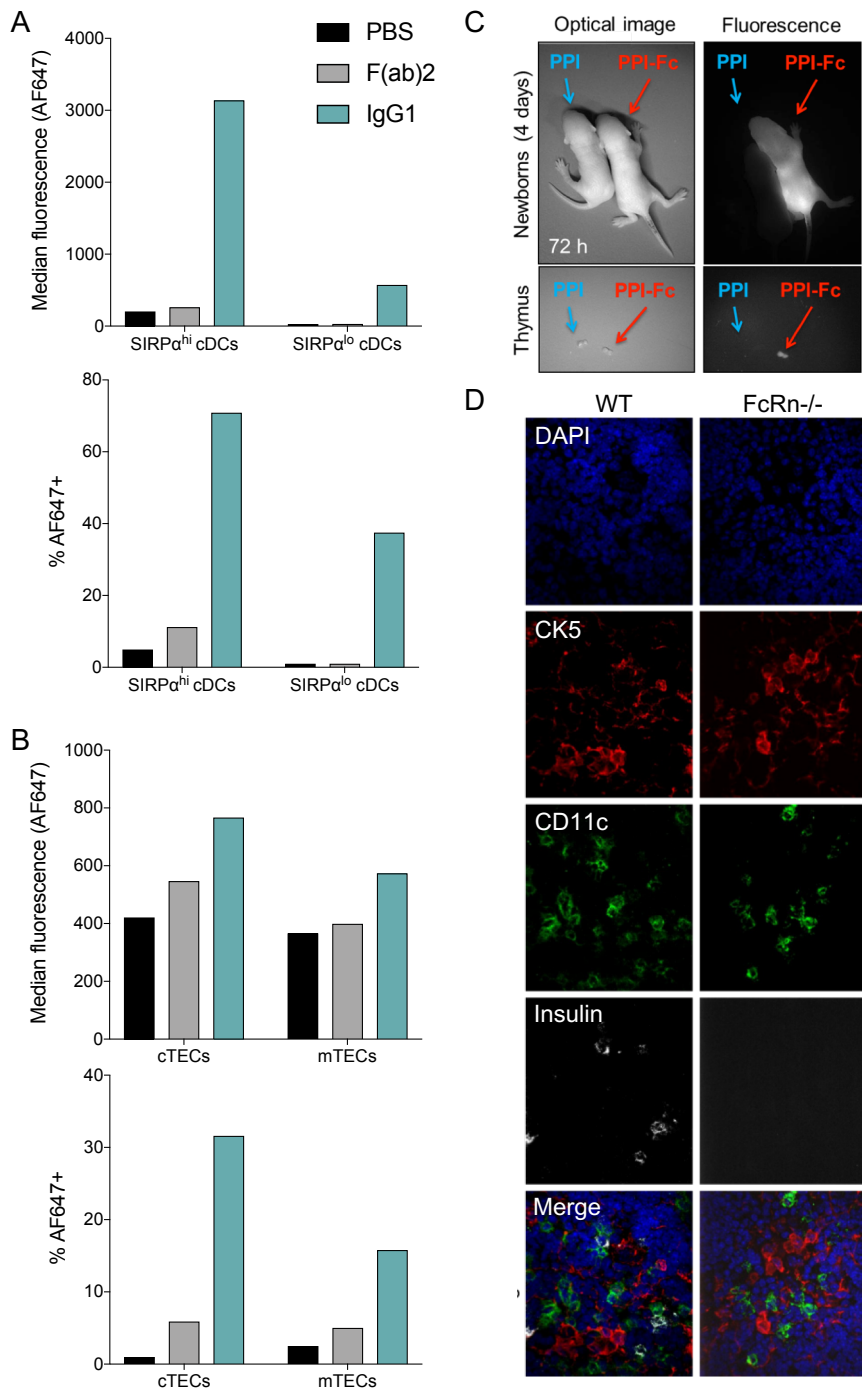
**Figure 2**



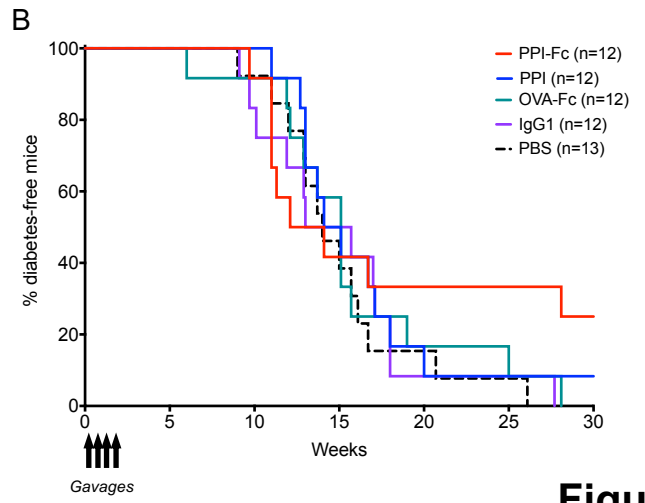
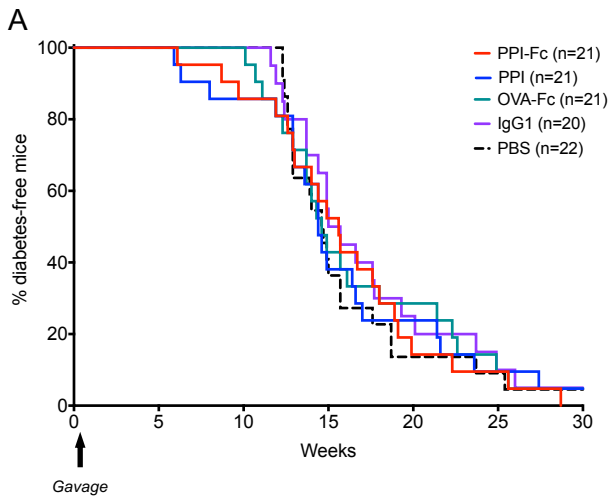
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

## *Supplementary Material*

### **1 Supplementary Methods**

#### **1.1 Tissue preparation for SDS-PAGE and Western blot**

The digestive tract (from duodenum to rectum, excluding cecum) was dissected from G9C8.NOD mice of different ages and from 1-day-old FcRn<sup>-/-</sup>.B6 mice. After removal of adipose tissue and Peyer's patches, tissues were washed with cold PBS, minced and transferred into complete RPMI, supplemented with 10% FBS, 2 mM L-Glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1X non-essential amino-acids and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 25 µg/ml enrofloxacin, 100 U/ml polymyxin B; PSEP mix). Tissue was cut into 1.5 cm pieces and agitated at 200 rpm at 37°C for the following incubation steps:

- 20 ml HBSS-DTT (HBSS, 5mM DTT, 2% FBS, PSEP) for 20 min;
- 30 ml HBSS-EDTA (HBSS, 5 mM EDTA, 2% FBS, PSEP), thrice for 15 min.

The supernatants containing intestinal epithelial cells were pooled and centrifuged at 600g for 5 min.

#### **1.2 Tissue preparation for cell isolation and flow cytometry**

For intestinal LP preparations, the digestive tract was processed as above. Following the last HBSS-EDTA washing step, the remaining tissue was incubated in 10 ml HBSS-HEPES (HBSS, 10 mM HEPES, PSEP) for 10 min. Pieces were then transferred into a Petri dish filled with 10 ml HBSS-HEPES, minced, transferred into a 15-ml tube containing 7 ml of a digestion solution (HBSS, 10 mM HEPES, PSEP, 0.2 Wunsch Units/ml Liberase, 200 Kunitz Units/ml DNase) and incubated at 37°C for 30 min under agitation. The reaction was stopped by adding 5 ml of complete RPMI and tissue pieces were passed through a 70-µm strainer. After centrifugation at 600g for 5 min and two washes in 15 ml HBSS supplemented with 2% FBS, cell pellets were resuspended in PBS and stained.

Spleen, mesenteric (MLN) and pancreatic lymph node (PLN) cells were filtered through a 40-µm strainer, centrifuged at 600g for 10 min. Splenocytes were resuspended in 1 ml hemolytic buffer for 3 min on ice. After washing in complete RPMI, cells were filtered again and kept on ice for subsequent analysis.

Thymi were cut into small pieces in RPMI supplemented with 10 mM HEPES and incubated thrice at room temperature for 15 min under agitation (200 rpm). Thymocyte-containing supernatants were discarded. The pellet was laid onto a 70-µm cell strainer placed in a well of a 6-well plate, and incubated with 2 ml of RPMI/HEPES containing collagenase IV (22 U/ml; Serlabo) for 15 min at 37°C under agitation. The supernatant was collected and the remaining tissue was further incubated thrice for 15 min at 37°C under agitation in 2 ml of RPMI/HEPES containing 22 U/ml collagenase IV, 0.6 U/ml neutral protease (Serlabo) and 50 Kunitz/mL DNase I (Sigma). Supernatants from these digestion steps were pooled and incubated with anti-CD11c magnetic beads (Miltenyi Biotec) for DC isolation. The CD11c<sup>-</sup> fraction was then incubated with anti-EpCAM magnetic beads (Miltenyi #130-105-958) to isolate thymic epithelial cells.



## 2 Supplementary Tables

<b>Marker</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Dilution</b>
<b>Live/DEAD</b>	Aqua	/	Invitrogen	1/1,000
<b>NK1.1</b>	BV510	PK136	BD Biosciences	1/100
<b>CD3</b>	BV510	145-2C11	BD Biosciences	1/100
<b>CD45</b>	BV786	30-F11	BD Biosciences	1/200
<b>F4/80</b>	BV711	BM8	BioLegend	1/50
<b>B220</b>	PE-Cy7	RA3-6B2	BD Biosciences	1/150
<b>SiglecF</b>	AF488	1RNM44N	eBioscience	1/50
<b>CD11c</b>	BV605	N418	BioLegend	1/50
<b>CD11b</b>	BV650	M1/70	BD Biosciences	1/150
<b>CX3CR1</b>	PE	5A011F11	BioLegend	1/200
<b>CD103</b>	PE-CF594	M290	BD Biosciences	1/200
<b>SIRP<math>\alpha</math></b>	PerCP-eFluor710	P84	eBioscience	1/50
<b>PDCA-1</b>	Pacific Blue	927	BioLegend	1/200

Supplementary Table 1. APC antibody panel.

<b>Marker</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Dilution</b>
<b>Live/DEAD</b>	Aqua	/	Invitrogen	1/1,000
<b>NK1.1</b>	BV510	PK136	BD Biosciences	1/100
<b>CD3</b>	BV510	145-2C11	BD Biosciences	1/100
<b>CD45</b>	BV786	30-F11	BD Biosciences	1/200
<b>EpCAM</b>	APC-Cy7	G8.8	BioLegend	1/50
<b>UEA-1</b>	FITC	/	Vector Labs	1/25
<b>Ly51</b>	PE	6C3	BioLegend	1/100

Supplementary Table 2. TEC antibody panel.

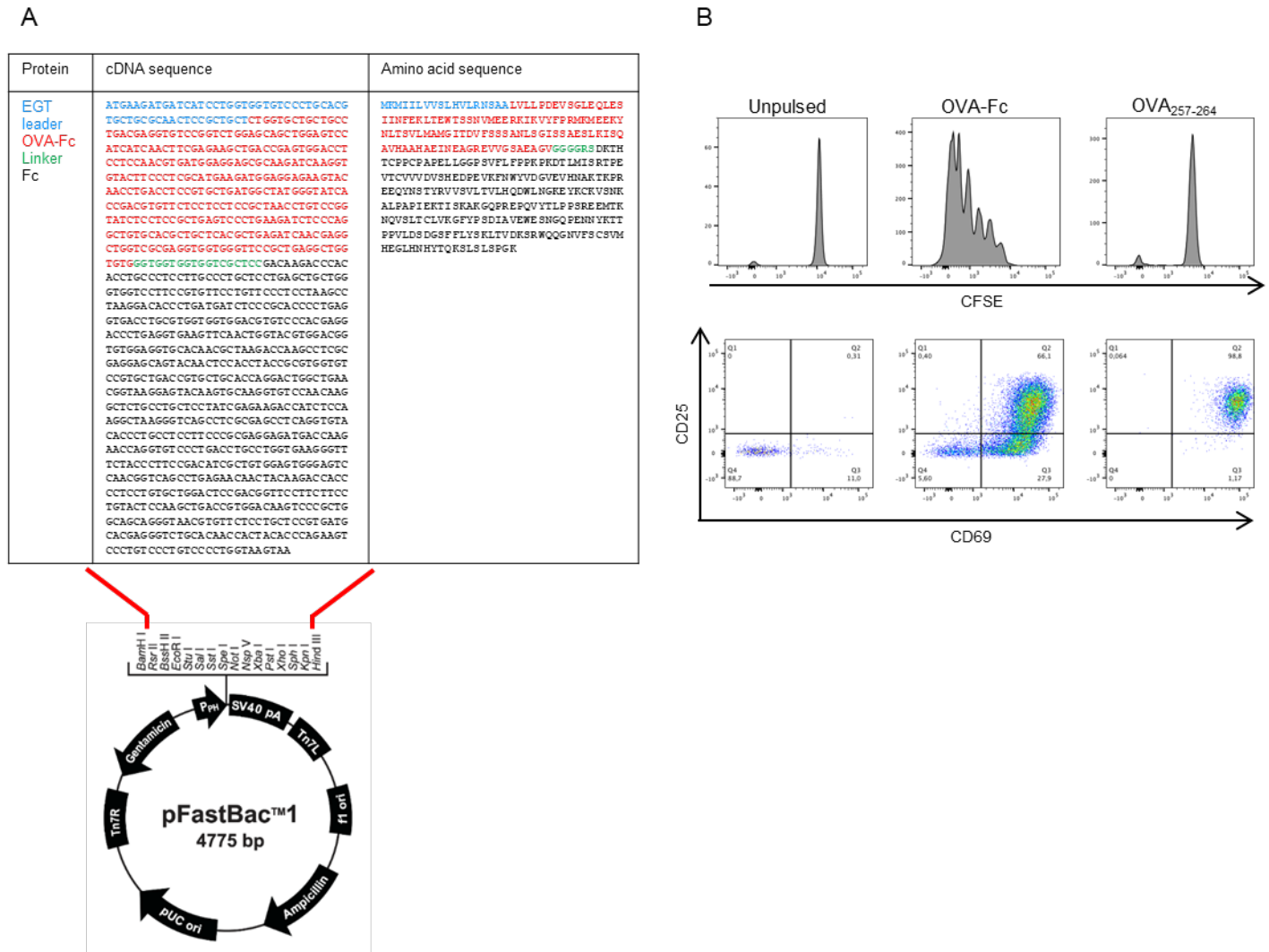
<b>Marker</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Dilution</b>
<b>Live/DEAD</b>	Aqua	/	Invitrogen	1/1,000
<b>TCR V<math>\beta</math>6</b>	PerCP-eFluor710	145-2C11	eBioscience	1/100
<b>CD4</b>	BV711	RM4-5	BD Biosciences	1/200
<b>CD8</b>	AF700	53-6.7	BD Biosciences	1/150
<b>CCR9</b>	PE-Cy7	CW-1.2	BioLegend	1/200
<b>LPAM-1</b>	PE-CF594	DATK32	BD Biosciences	1/100
<b>CD44</b>	BV786	IM7	BD Biosciences	1/200
<b>CD62L</b>	BV605	MEL-14	BD Biosciences	1/200
<b>NRP1</b>	APC	3E12	BioLegend	1/50
<b>Foxp3</b>	PE	FJK-16s	eBioscience	1/50

**Supplementary Table 3. T-cell antibody panel.**

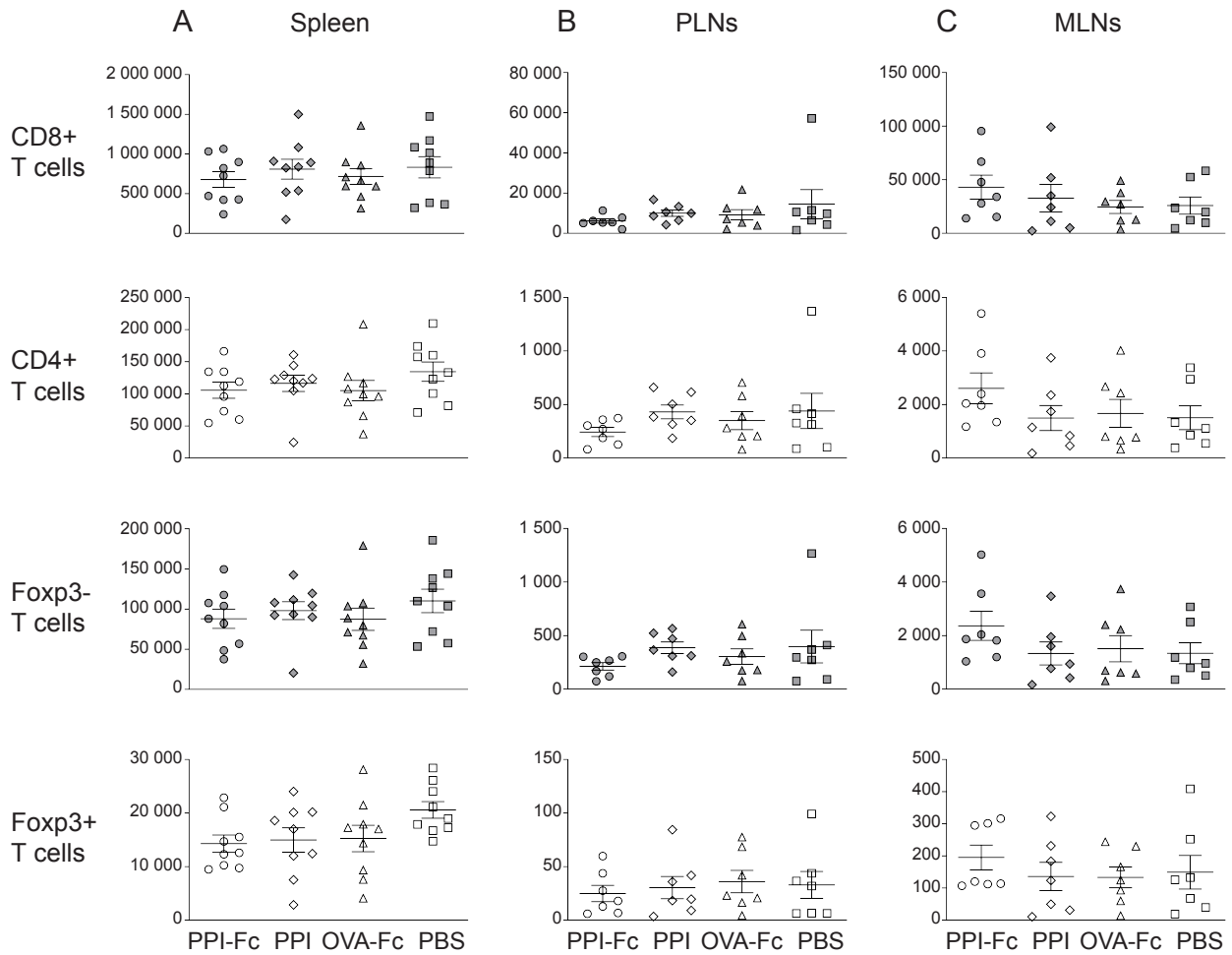
<b>Marker</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Dilution</b>
<b>CD107a</b>	APC	1D4B	BioLegend	1/400
<b>Live/DEAD</b>	Aqua	/	Invitrogen	1/1,000
<b>TCR V<math>\beta</math>6</b>	PerCP-eFluor710	145-2C11	eBioscience	1/100
<b>CD8</b>	BV711	53-6.7	BD Biosciences	1/150
<b>CD4</b>	BV421	GK1.5	BD Biosciences	1/200
<b>CD69</b>	PE-Cy7	CW-1.2	BioLegend	1/200
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	PE	XMG1.2	BD Biosciences	1/50
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	FITC	MP6-XT22	BD Biosciences	1/50

**Supplementary Table 4. Recall antibody panel.**

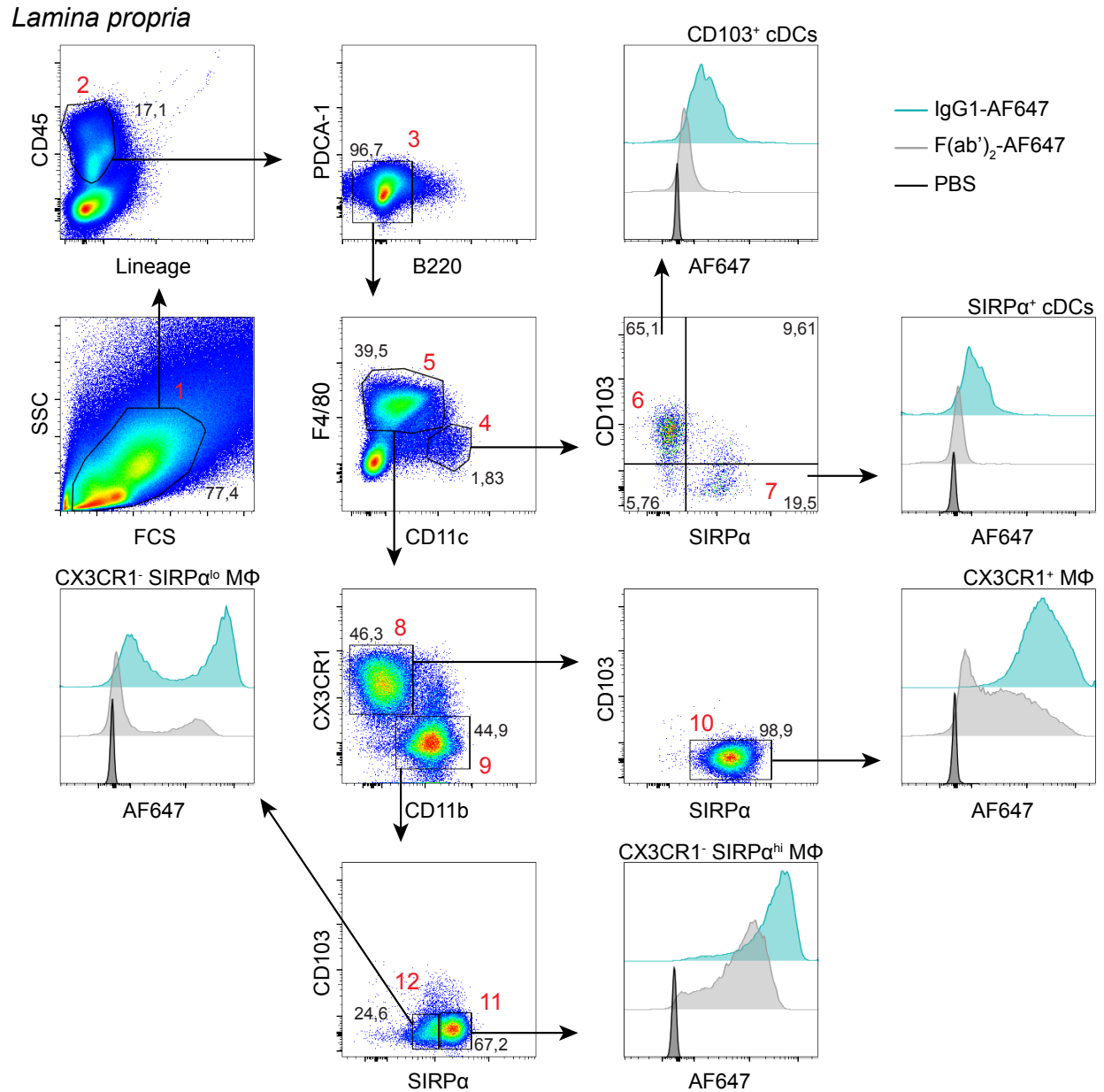
## 3 Supplementary Figures

**Supplementary Figure 1. OVA-Fc construct and validation of the Ova-Fc recombinant protein.**

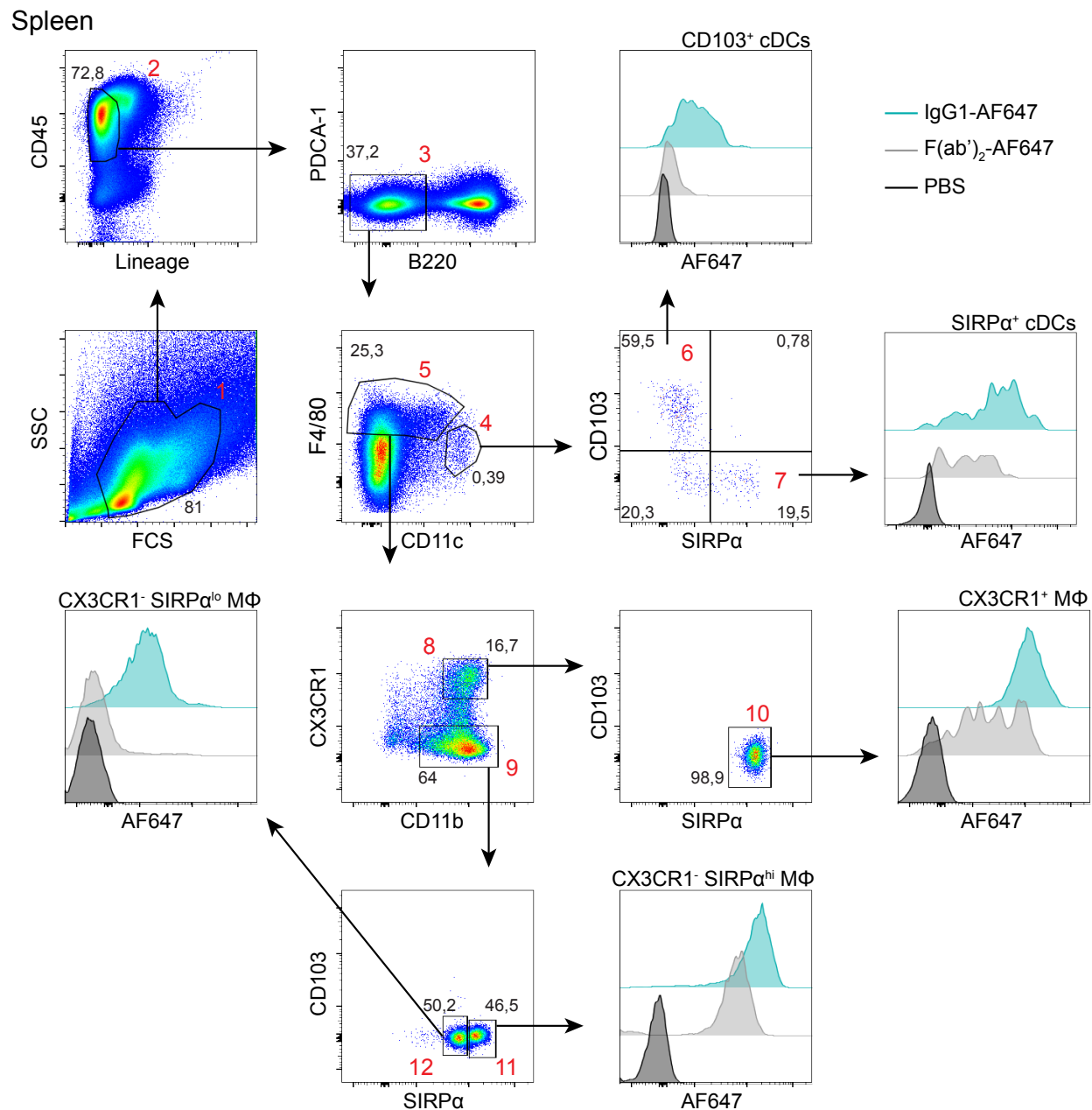
(A) cDNA and amino-acid sequence of the OVA-Fc construct. An EGT insect cell secretion signal sequence was added at the 5'/N-terminal end. The construct was inserted into the pFastBac1 Baculovirus plasmid between BamHI and HindIII restriction sites. (B) *In vitro* validation of OVA-Fc fusion protein. Bone marrow-derived DCs prepared from naïve G9C8 mice were pulsed or not with 13  $\mu$ M OVA-Fc or OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL) peptide, and then matured with lipopolysaccharide prior to culture with CFSE-labeled OT-I cells for 5 days. CFSE profiles (top panels) and CD69/CD25 expression (bottom panels) are shown after gating on CD8<sup>+</sup> T cells.



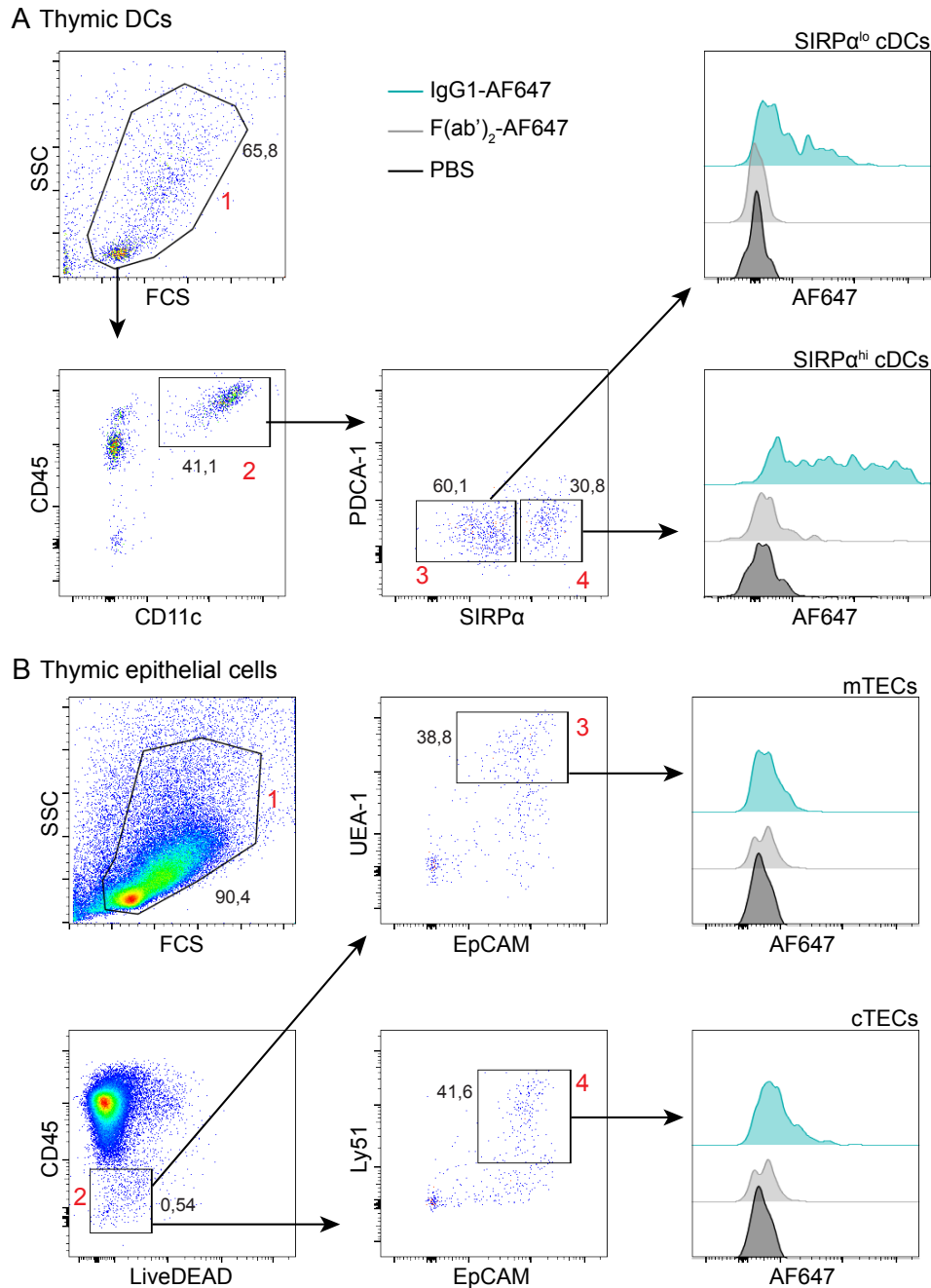
**Supplementary Figure 2. Absolute numbers of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells in PPI-Fc-treated G9C8.NOD mice.** Absolute counts of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells (first and second row) and of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells (third and fourth row) in the spleen (left), PLNs (middle) and MLNs (right) of 4-week-old PPI-Fc- and control-treated G9C8.NOD mice. These mice are the same as those depicted in Figure 1B-D.



**Supplementary Figure 3. Identification of intestinal LP APC subsets and fluorescent protein uptake by flow cytometry.** Red numbers indicate sequential gates. After a first selection based on FSC/SSC morphology (1), CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (CD3/NK1.1<sup>-</sup>) (2) and B220<sup>-</sup> cells (3) were gated. DCs were defined as CD11c<sup>hi</sup> (4), and subdivided into CD103<sup>+</sup>SIRPα<sup>-</sup> (6) and SIRPα<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> (7). Macrophages (MΦ) were selected by gating on F4/80<sup>+</sup> cells (5) and subdivided into CX3CR1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> (8) and CX3CR1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> (9). CX3CR1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> macrophages were all SIRPα<sup>+</sup> (10), while the CX3CR1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> subset was further subdivided into SIRPα<sup>hi</sup> (11) and SIRPα<sup>lo</sup> (12). The AF647-labeled protein uptake by each APC population is depicted in histograms.



**Supplementary Figure 4. Identification of splenic APC subsets and fluorescent protein uptake by flow cytometry.** Red numbers indicate sequential gates. After a first selection based on FSC/SSC morphology (1), CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (CD3/NK1.1<sup>-</sup>) (2) and B220<sup>-</sup> cells (3) were gated. DCs were defined as CD11c<sup>hi</sup> (4), and subdivided into CD103<sup>+</sup>SIRPα<sup>-</sup> (6) and SIRPα<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> (7). Macrophages (MΦ) were selected by gating on F4/80<sup>+</sup> cells (5) and subdivided into CX3CR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (8) and CXCR1-CD11b<sup>+</sup> (9). CX3CR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> macrophages were all SIRPα<sup>+</sup> (10), while the CXCR1-CD11b<sup>+</sup> subset was further subdivided into SIRPα<sup>hi</sup> (11) and SIRPα<sup>lo</sup> (12). The AF647-labeled protein uptake by each APC population is depicted in histograms.



**Supplementary Figure 5. Identification of thymic DC and epithelial cell subsets and fluorescent protein uptake by flow cytometry.** Red numbers indicate sequential gates. (A) Thymic DCs. After a first selection based on FCS/SSC morphology (1), live CD45<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup> DCs (2) were gated and subdivided into SIRP $\alpha^{\text{lo}}$  (3) and SIRP $\alpha^{\text{hi}}$  (4). The AF647-labeled protein uptake by each DC population is depicted in histograms. (B) Thymic epithelial cells. After a first selection based on FCS/SSC morphology (1), live CD45<sup>-</sup> cells (2) were gated and subdivided into mTECs (EpCAM<sup>+</sup>UEA-1<sup>+</sup>, 3) and cTECs (EpCAM<sup>+</sup>Ly51<sup>+</sup>, 4). The AF647-labeled protein uptake by each DC population is depicted in histograms.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES



Mon projet de thèse présente une nouvelle stratégie thérapeutique du DT1, spécifique de l'antigène, non invasive et applicable chez une population pédiatrique, ayant pour objectif d'intervenir avant même le déclenchement de l'auto-immunité anti-cellule  $\beta$ . Nos travaux sont en ligne avec les efforts actuels de recherche de nouvelles immunothérapies pour le DT1, qui ne visent plus à intervenir pendant la phase clinique (symptomatique) de la maladie, mais bien en amont, pendant la phase asymptomatique et même avant l'apparition de l'auto-immunité, afin de prévenir les mécanismes auto-immuns plutôt que leurs conséquences métaboliques (6).

En effets, les essais cliniques évaluant diverses stratégies d'immuno-intervention chez les patients diabétiques de type 1 ont pour l'instant démontré, au mieux, une préservation transitoire des cellules  $\beta$  pancréatiques et de leurs capacités insulino-sécrétrices (cf. Tableau 1, pages 28-29). En aucun cas une guérison n'a été obtenue, même chez des patients présentant un DT1 de découverte très récente (quelques semaines). Une des raisons de ces échecs est une intervention trop tardive par rapport au développement du processus auto-immun. En effet, c'est bien avant les symptômes cliniques d'hyperglycémie, révélateurs des dysfonctionnements métaboliques, que la maladie s'installe. Les travaux de recherche actuels s'orientent donc vers la mise en place de stratégies de prévention précoce du DT1, visant à juguler la cascade auto-immune et éviter la destruction trop massive de cellules  $\beta$  et le déclenchement de la maladie (6).

Agir pendant la phase asymptomatique du DT1 représente un challenge médical et éthique puisqu'il s'agit de traiter en majorité des enfants et adolescents cliniquement non malades. Ceci est renforcé par le fait que les premiers signes détectables de l'auto-immunité que sont les auto-anticorps dirigés contre des antigènes de la cellule  $\beta$  apparaissent dès le plus jeune âge, souvent entre 1 et 3 ans (65, 415). La présence de ces auto-anticorps marque un processus pathologique déjà engagé. Ainsi, dans l'objectif d'intervenir en amont de la réponse auto-immune, les patients candidats à de telles thérapies préventives seraient de très jeunes enfants. Ces considérations imposent le développement d'approches thérapeutiques non invasives possédant un excellent profil de sécurité.

Dans ce contexte, l'administration orale d'antigène représente une stratégie de choix dont l'efficacité a été testée, en utilisant de l'insuline, dans plusieurs essais de prévention secondaire (chez des patients positifs pour les auto-anticorps) et dans une étude de prévention primaire (PREPOINT, patients

possédant les gènes HLA de prédisposition mais négatifs pour les auto-anticorps) (cf. Tableau 4, page 74). A ce jour, aucune protection du DT1 n'a été rapporté car il s'agit d'un essai de phase I sur un petit nombre de participants visant à évaluer le profil de sécurité de l'intervention et à identifier d'éventuels biomarqueurs compatibles avec l'induction d'une tolérance. L'étude PREPOINT a pu ainsi démontrer la faisabilité d'une telle approche et produit des résultats rassurants en termes d'absence d'effets non désirables et d'induction de Tregs spécifiques de l'insuline (379). Ces résultats encouragent la poursuite des thérapies de prévention primaire et soulignent la nécessité d'optimiser le protocole thérapeutique.

Mon projet de thèse s'inscrit dans ce cadre de travail en proposant une nouvelle approche basée sur l'administration orale d'une version modifiée de la préproinsuline à un stade très précoce pour prévenir le DT1. En fusionnant la PPI au fragment Fc des IgG1, notre objectif était d'exploiter la voie physiologique du FcRn pour permettre, après administration orale, un transfert facilité à travers la barrière épithéliale intestinale et une distribution systémique de notre auto-antigène, y compris dans le thymus. Ainsi, notre postulat était que cette stratégie d'introduction forcée de PPI appliquée au stade néonatal pouvait potentiellement améliorer les mécanismes de tolérance centrale, mais aussi périphérique en agissant sur la tolérance intestinale locale, mécanisme cible dans un grand nombre d'études dans l'allergie ou dans d'autres maladies auto-immunes (351). De cette façon, en promouvant la délétion de clones auto-réactifs et/ou la génération de Tregs, nous pourrions parvenir à prévenir l'apparition de l'auto-immunité anti-cellule  $\beta$  et le développement du DT1.

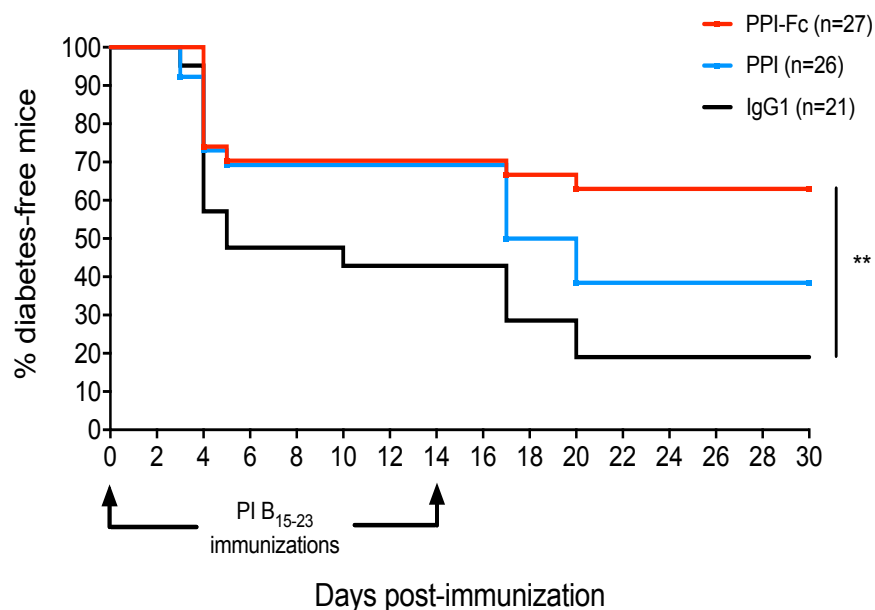
Nos résultats dans différents modèles expérimentaux constituent une preuve de concept que notre stratégie de formulation est pertinente car, contrairement à la PPI seule, notre protéine de fusion PPI-Fc est retrouvée dans les différents organes lymphoïdes, jusque dans le thymus. Nos données montrent un transfert plus efficace à travers la barrière intestinale, dépendant de l'interaction Fc-FcRn, et une meilleure prise en charge de la PPI-Fc par différents types d'APCs - macrophages et cellules dendritiques. Ces dernières, notamment celles exprimant SIRP $\alpha$  et douées de capacités migratoires, pourraient être impliquées dans la bio-distribution de PPI-Fc jusqu'au thymus. Bien que nous ayons récolté plusieurs arguments indirects en faveur de cette hypothèse, ce point reste à confirmer de manière plus directe. Le mécanisme de migration reste également à déchiffrer. Dans l'étude précédente utilisant la voie transplacentaire,

la molécule d'adhésion VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), par son interaction avec l'intégrine VLA-4 (Very Late Antigen-4), était primordiale pour l'efficacité thérapeutique de la PPI-Fc. En effet, l'injection d'un anticorps bloquant anti-VCAM-1 chez la souris gestante avant l'administration intraveineuse de PPI-Fc lève la protection de la descendance vis-à-vis du DT1 (411). La voie VCAM-1/VLA-4 étant impliquée dans la migration des DCs SIRP $\alpha^+$  de la circulation vers le thymus (416), une première série d'expériences a été réalisée pour évaluer l'impact du blocage de VCAM-1 sur la bio-distribution dans le thymus et la prise en charge de la PPI-Fc donnée par voie orale. Cependant, les résultats n'ont pas été concluants et ces expériences demandent à être répétées. En effet, il est apparu difficile de distinguer l'effet lié à l'inhibition de VCAM-1 par rapport à l'effet de compétition de l'anticorps contrôle utilisé, sur la prise en charge de la PPI-Fc par les APCs via les récepteurs Fc. Par ailleurs, d'autres mécanismes de migration vers différents organes pourraient être investigués. Par exemple, le récepteur aux chimiokines CCR7 joue un rôle critique dans la migration des DCs de la LP vers les MLN (333, 417). Nous avons d'ailleurs initié une analyse des APCs présentes dans les MLN des souris nouveau-nées gavées avec PPI-Fc mais le nombre de cellules récupérées était trop faible pour identifier clairement les sous-populations de DCs ou de macrophages exprimant notre protéine de fusion, et potentiellement dérivées de la LP. Ce point reste donc à préciser. Enfin, l'étude des pDCs pourraient être informative. En effet, ces dernières sont également capables de migrer jusqu'au thymus par un mécanisme dépendant de CCR9 et d'y apporter des antigènes circulants (153). De façon intéressante, c'est par la même voie que les pDCs peuvent migrer vers l'intestin (154). On pourrait alors spéculer que les pDCs pourraient apporter au thymus des antigènes captés dans le GALT. Si nous avons retrouvé des pDCs contenant notre protéine dans le thymus (données non montrées), cette population était absente de la LP.

En revanche notre mode de traitement oral au stade néonatal n'est pas suffisant pour induire une protection significative vis-à-vis du diabète chez la souris transgénique NOD.G9C8. Même s'il n'est pas exclu que notre traitement ait eu un impact sur les populations immunitaires juste après le gavage, son effet n'est pas durable et aucune modification des populations T n'est notée à 4 semaines. Si dans le modèle transplacentaire, une diminution de la capacité cytotoxique des LT CD8 $^+$  et une augmentation de la fréquence de Tregs avaient été observées dans la rate, aucune différence n'a été mise en évidence après traitement oral. Cependant, une analyse des populations T de la LP serait

intéressante à réaliser, en particulier parce que les mécanismes de tolérance intestinale permettent la génération de Tregs producteurs de cytokines régulatrices telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (cf Introduction partie II.3.1).

Ces observations ont néanmoins été décevantes aux vues des résultats préliminaires encourageants que j'avais obtenus durant mon Master 2. En effet, le traitement au jour 1 de vie de notre modèle transgénique G9C8.NOD induisait, chez un nombre de souris non négligeable, une nette protection des animaux traités par la PPI-Fc par rapport aux contrôles (PPI et PBS) (**Figure additionnelle 1**). Malheureusement, ces résultats n'ont pas pu être reproduits. En plus des limitations liées à l'utilisation d'un modèle transgénique (diabète inductible, agressivité de la maladie...), d'autres éléments pourraient être liés à cet échec de reproductibilité, en particulier, les différences de conditions sanitaires liées à un changement d'animalerie - ayant d'ailleurs mené à une redérivation de nos lignées et donc le renouvellement de notre colonie - ou l'utilisation de protéines et de CpG provenant de sources de production différentes.



**Figure Additionnelle 1. Résultats préliminaires de l'incidence de diabète chez la souris NOD.G9C8 traitée par PPI-Fc orale.** Des souris nouveau-nées de 1 jour ont été traitées par voie orale avec 50 $\mu$ g de PPI-Fc (rouge) ou des quantités équimolaires des protéines contrôles PPI (bleu) ou IgG1 (noir). Le diabète est induit par immunisation avec le peptide PIB15-23 accompagné de CpG à 4 et 6 semaines d'âge.

Pour toutes ces raisons, nous avons également testé notre thérapie PPI-Fc orale chez des souris *Ins2*<sup>-/-</sup>.NOD, un modèle de DT1 spontané et polyclonal. Même si là encore aucune protection significative n'a été observée après traitement de la souris nouveau-née, il est intéressant de noter qu'aucun effet secondaire

indésirable n'est survenu, et notamment pas d'accélération du développement du diabète. De plus, l'administration de 4 doses de PPI-Fc, mais non PPI, montre une amélioration par rapport à la dose unique. En effet, à l'issue de ce traitement répété, 4 souris sur 12 ont présenté un diabète nettement décalé ou même absent à 30 semaines d'âge, suggérant que notre PPI-Fc orale induit un certain effet thérapeutique. Étant donné la rapidité, la sévérité et la synchronisation du diabète dans ce modèle, une « protection » chez 33% des souris traitées est assez encourageante. Ainsi, ces observations suggèrent qu'une optimisation de nos modalités de traitement pourrait permettre d'induire une protection significative.

En effet, il faut rappeler que le DT1 est une maladie dans laquelle grand nombre d'auto-antigènes est impliqué. La liste continue à s'allonger et beaucoup d'équipes, dont la nôtre, travaillent sur la découverte de nouveaux épitopes potentiellement reconnus par des lymphocytes T auto-réactifs. Dans ce contexte, j'ai contribué à une étude du laboratoire visant à mettre en évidence de nouveaux antigènes impliqués dans le DT1, en analysant les peptides présentés par la cellule  $\beta$  exposée ou non à des cytokines pro-inflammatoires (Gonzalez-Duque et al, Cell Metab 2018, en annexe). Ce travail a montré qu'une grande partie des épitopes présentés à la surface de la cellule  $\beta$  via les molécules du HLA de classe I (HLA-A2 et A3), était issue de protéines des granules d'insuline et était reconnue par des LT circulants chez l'homme. De nouveaux antigènes ont été identifiés, notamment la sécrétogranine (SCG)-5, l'urocortine (UCN)-3 et la proconvertase (PCSK)-2. Le laboratoire a récemment démontré que des LT CD8+, reconnaissant des épitopes orthologues murins de ces 3 antigènes, étaient retrouvés dans l'infiltrat des îlots pancréatiques de la souris NOD prédiabétique et pouvaient transférer le DT1 chez des receveurs NOD.scid, démontrant ainsi leur pathogénicité (Azoury et al., Diabetes 2020, sous presse). Notre traitement ne ciblant qu'un seul de ces auto-antigènes, il est possible que son inefficacité thérapeutique dans la souris *Ins2<sup>-/-</sup>*.NOD possédant un répertoire T polyclonal, soit due à son manque d'action sur différents clones ciblant d'autres auto-antigènes que la PPI. Couvrir un plus grand nombre de spécificités pourrait par conséquent élargir la réponse tolérogène. C'est dans cet optique que nous avons développé un polypeptide (PoPe) composé de plusieurs épitopes connus du DT1, que nous avons lié au Fc (PoPe-Fc). Il est composé d'épitopes immuno-dominants reconnus par les LT CD4+ (BDC2.5 et BDC6.9) ou CD8+ (IGRP<sub>206-214</sub>) auto-réactifs (418-420), permettant ainsi de cibler ces populations lymphocytaires qui agissent de concert pour induire le DT1 (**Figure Additionnelle 2**). J'ai d'ailleurs validé ce polypeptide

en le testant pour l'activation de LT spécifiques à ces épitopes. Nous travaillons actuellement sur la production du PoPe-Fc, en collaboration avec l'équipe de Sébastien Lacroix-Desmazes au Centre de Recherche des Cordeliers à Paris.



**Figure Additionnelle 2. Séquence peptidique de PoPe-Fc.** Le polypeptide PoPe est composé de l'épitope CD4+ BDC2.5 formé par la fusion entre les fragments de peptides issus de PPI et de la chromogranine A (ChgA), de l'épitope CD4+ BDC6.9 correspondant à la fusion de peptides issus de PPI et IAPP, et de l'épitope CD8+ IGRP<sub>206-214</sub>.

De plus, dans l'optique d'induire une efficacité thérapeutique plus durable, une solution serait de traiter de façon répétée et sur une plus longue période. C'est la stratégie utilisée par la majorité des essais cliniques spécifiques de l'antigène dans le DT1 pour induire une tolérance sur le long terme (cf Introduction partie III.1.2). Si l'idéal aurait effectivement été de traiter nos animaux tous les jours, il est difficile d'appliquer un tel protocole à des souris nouveau-nées. En effet, la procédure de gavage remplit de manière non négligeable l'estomac de ces petits qui, par la suite, ne se nourrissent plus pendant plusieurs heures. Un traitement quotidien n'était donc pas envisageable. Par ailleurs, notre traitement dépend de l'expression du FcRn car c'est grâce à cette voie que notre protéine de fusion Fc peut traverser la barrière intestinale. Cet élément nous empêche donc de traiter au-delà de la période néonatale car le FcRn n'est exprimé chez la souris que pendant les 15 premiers jours de vie sur les entérocytes ((399); et nos données présentées dans l'article). Ce n'est toutefois pas le cas chez l'homme, avec une expression du FcRn tout au long de la vie (400). Ainsi, pour élargir la fenêtre thérapeutique, nous mettons actuellement nos efforts dans le développement, par la méthode CRISPR-Cas9, d'un modèle de souris NOD invalidé pour l'expression du FcRn murin et transgénique pour le FcRn humain sous le contrôle de ses promoteurs naturels (NOD.*mFCGRT*<sup>-/-</sup>.*hFCGRT*). Des tests d'injection d'embryons sont actuellement en cours sur la Plateforme de Recombinaison Homologue, Transfert d'Embryons et Cryoconservation de l'Institut Cochin.

Ces nouveaux outils et modèles en main, l'objectif sera de reprendre les expériences *in vivo* d'administration orale de PPI-Fc et de PoPe-Fc chez les souris

*Ins2<sup>-/-</sup>.NOD*, *NOD sauvages* et *NOD.mFCGRT<sup>-/-</sup>.hFCGRT*. Nous espérons ainsi pouvoir déterminer le protocole optimal et les meilleures conditions de traitement pour induire des effets tolérogènes durables sur nos populations de cellules immunitaires, menant à une protection significative de nos animaux. En particulier, l'utilisation de tétramères de CMH de classe I ou II portant des peptides d'intérêt permettra de suivre l'impact de nos protéines de fusion sur les LT, et mettre en évidence par exemple une meilleure déléition des clones auto-réactifs dans le thymus, une diminution de leur fonction effectrice, une augmentation des tTregs et/ou une induction de pTregs dans l'intestin. Les tétramères nécessaires pour ces études sont déjà disponibles au laboratoire et j'ai pu valider leur spécificité de marquage en utilisant des splénocytes issus de souris transgéniques pour les TCR reconnaissant les épitopes d'intérêt. Il s'agit des épitopes CD4<sup>+</sup> I-A<sup>B7</sup>-restreints BDC2.5 et BDC6.9 ; et CD8+ K<sup>d</sup>-restreint PIB<sub>15-23</sub> et IGRP<sub>206-214</sub>.

Enfin, si notre protéine a initialement été développée dans le contexte du DT1, elle pourrait également être utilisée pour une autre pathologie, l'allergie à l'insuline. Cette complication rare (prévalence estimée à 2%) du diabète insulino-traité (de type 1 ou de type 2) survient à la suite de l'exposition chronique à l'insuline due aux injections répétées ((421, 422); Sola-Gazagnes et al, deux articles en préparation issus de l'expérience clinique du Service de Diabétologie de l'Hôpital Cochin, qui est le centre de référence français pour l'allergie à l'insuline). Les réactions allergiques (urticaire, éruption cutanée, angio-œdème, et réactions anaphylactiques dans les cas extrêmes) sont induites par des IgE dirigées contre l'insuline exogène. Les traitements actuels visent à réduire la réaction allergique (anti-histaminiques, corticoïdes), à changer l'insuline utilisée vers une formulation moins allergène ou, dans environ 50% de cas, à passer à un traitement par pompe à insuline, qui est aussi moins allergène. La PPI-Fc orale pourrait être une bonne stratégie pour rétablir la tolérance chez ces patients, offrant ainsi un traitement curatif efficace. Dans un modèle d'allergie à l'OVA, une étude a d'ailleurs démontré l'efficacité de complexes immuns Ab-Ag donnés par voie orale pour l'induction de tolérance et la prévention de l'allergie (407), nous encourageant dans ce sens. Pour évaluer l'efficacité de la PPI-Fc dans un tel contexte, nous développons un modèle d'allergie à l'insuline chez des souris B6 transgéniques pour le FcRn humain. Si les résultats dans ce modèle murin s'avéraient concluants, l'efficacité thérapeutique de la PPI-Fc pourrait être évaluée

plus facilement avec des essais cliniques chez des adultes atteints d'allergie à l'insuline, avec un suivi clinique relativement court (environ 6 mois), des coûts réduits et des exigences réglementaires moindres par rapport aux essais de prévention dans le DT1. En effet, il est à noter que la mise en place d'un essai clinique de prévention du DT1 chez l'homme est un challenge important notamment à cause du coût élevé dû au suivi très long des patients (plusieurs années). Surtout, le DT1 est une maladie pédiatrique qui se déclenche de plus en plus tôt, avec un nombre croissant d'enfants diabétiques avant l'âge de 5 ans (423, 424). Les essais de prévention doivent donc être réalisés chez des enfants, qui ne développeront pas forcément la maladie à terme, ce qui implique que le profil de sécurité de ces essais doit être irréprochable. Une validation préalable de la sécurité de notre protéine dans un contexte pathologique différent pourrait donc permettre une mise sur le marché avec une indication pour le traitement de l'allergie à l'insuline ; puis permettre la reconversion (*repurposing*) de ce produit pour la prévention du DT1. Dans ce sens, des échanges sont en cours avec Akston Biosciences ([www.akstonbio.com](http://www.akstonbio.com)). Cette biotech a développé une protéine insuline-IgG1 (AKS-107) dans laquelle les sites de liaison de l'antigène d'une IgG1 humaine ont été remplacé par la séquence de l'insuline, rendue métaboliquement inactive par mutagenèse ciblée tout en conservant son activité antigénique. L'utilisation envisagée de cette protéine est pour l'instant restreinte à une administration par voie intraveineuse. Les objectifs de cette collaboration sont donc de tester l'administration orale de leur protéine de fusion dans nos modèles de DT1 d'une part, et d'allergie à l'insuline d'autre part. Si les résultats de prévention s'avèrent concluants, il s'agira ensuite de lancer un essai clinique pour le traitement de l'allergie à l'insuline avec leur produit (déjà disponible au format GMP) en première intention.

En conclusion, les résultats encore partiels obtenus à ce jour ouvrent plusieurs perspectives d'utilisation de nos antigènes-Fc pour atteindre des effets thérapeutiques satisfaisants, pour la prévention du DT1 comme pour le traitement de l'allergie à l'insuline, tout en assurant un profil de sécurité convenable, n'induisant pas d'effets secondaires indésirables et facilement applicable chez une population pédiatrique. Plusieurs voies de développement et d'optimisation de notre stratégie sont d'ores et déjà en cours de réalisation, à la fois dans le contexte de la recherche académique mais aussi dans le cadre de la nouvelle collaboration industrielle avec Akston.



# BIBLIOGRAPHIE

1. P. Saeedi, I. Petersohn, P. Salpea, B. Malanda, S. Karuranga, N. Unwin, S. Colagiuri, L. Guariguata, A. A. Motala, K. Ogurtsova, J. E. Shaw, D. Bright, R. Williams, Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition, *Diabetes Res Clin Pr* **157**, 107843 (2019).
2. P. Leete, R. A. Oram, T. J. McDonald, B. M. Shields, C. Ziller, B. O. Roep, T. I. Tree, K. Patel, S. Hammersley, R. Bolt, A. V. Hill, A. T. Hattersley, S. J. Richardson, N. G. Morgan, Studies of insulin and proinsulin in pancreas and serum support the existence of aetiopathological endotypes of type 1 diabetes associated with age at diagnosis, *Diabetologia* **63**, 1258-1267 (2020).
3. L. A. DiMeglio, C. Evans-Molina, R. A. Oram, Type 1 diabetes., *Lancet* **391**, 2449-2462 (2018).
4. A. D. Association, 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018., *Diabetes Care* **41**, S13-S27 (2018).
5. J. S. Flier, L. H. Underhill, G. S. Eisenbarth, Type I Diabetes Mellitus, *New Engl J Med* **314**, 1360-1368 (1986).
6. R. A. Insel, J. L. Dunne, M. A. Atkinson, J. L. Chiang, D. Dabelea, P. A. Gottlieb, C. J. Greenbaum, K. C. Herold, J. P. Krischer, Å. Lernmark, R. E. Ratner, M. J. Rewers, D. A. Schatz, J. S. Skyler, J. M. Sosenko, A.-G. Ziegler, Staging Presymptomatic Type 1 Diabetes: A Scientific Statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association, *Diabetes Care* **38**, 1964-1974 (2015).
7. W. Hao, S. Gitelman, L. A. DiMeglio, D. Boulware, C. J. Greenbaum, T. 1 D. T. S. Group, Fall in C-Peptide During First 4 Years From Diagnosis of Type 1 Diabetes: Variable Relation to Age, HbA1c, and Insulin Dose, *Diabetes Care* **39**, 1664-1670 (2016).
8. M. A. Atkinson, G. S. Eisenbarth, A. W. Michels, Type 1 diabetes., *Lancet* **383**, 69-82 (2013).
9. G. S. Eisenbarth, Update in Type 1 Diabetes, *J Clin Endocrinol Metabolism* **92**, 2403-2407 (2007).
10. J. M. Barker, K. J. Barriga, L. Yu, D. Miao, H. A. Erlich, J. M. Norris, G. S. Eisenbarth, M. Rewers, Prediction of Autoantibody Positivity and Progression to

Type 1 Diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY), *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3896-3902 (2004).

11. L. M. Duca, B. Wang, M. Rewers, A. Rewers, Diabetic Ketoacidosis at Diagnosis of Type 1 Diabetes Predicts Poor Long-term Glycemic Control, *Diabetes Care* **40**, dc170558 (2017).

12. T. D. C. and C. T. R. Group, Effect of Intensive Therapy on Residual  $\beta$ -Cell Function in Patients with Type 1 Diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial: A Randomized, Controlled Trial, *Ann Intern Med* **128**, 517 (1998).

13. J. Ludvigsson, Socio-Psychological Factors and Metabolic Control in Juvenile Diabetes, *Acta Paediatr* **66**, 431-437 (1977).

14. W. G. for the D. R. Group, T. J. Orchard, D. M. Nathan, B. Zinman, P. Cleary, D. Brillon, J.-Y. C. Backlund, J. M. Lachin, Association Between 7 Years of Intensive Treatment of Type 1 Diabetes and Long-term Mortality, *JAMA* **313**, 45 (2015).

15. A. Bignon-Laubert, M. Böni-Schnetzler, B. P. Hubbard, K. Bouzakri, A. Brunner, C. Cavelti-Weder, C. Keller, M. Meyer-Böni, D. T. Meier, C. Brorsson, K. Timper, G. Leibowitz, A. Patrignani, R. Bruggmann, G. Boily, H. Zulewski, A. Geier, J. M. Cermak, P. Elliott, J. L. Ellis, C. Westphal, U. Knobel, J. J. Eloranta, J. Kerr-Conte, F. Pattou, D. Konrad, C. M. Matter, A. Fontana, G. Rogler, R. Schlapbach, C. Regairaz, J. M. Carballido, B. Glaser, M. W. McBurney, F. Pociot, D. A. Sinclair, M. Y. Donath, Identification of a SIRT1 Mutation in a Family with Type 1 Diabetes, *Cell Metab* **17**, 448-455 (2013).

16. F. Pociot, Type 1 diabetes genome-wide association studies: not to be lost in translation, *Clin Transl Immunol* **6**, e162 (2017).

17. J. A. Noble, Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review., *J Autoimmun* **64**, 101-12 (2015).

18. H. Erlich, A. M. Valdes, J. Noble, J. A. Carlson, M. Varney, P. Concannon, J. C. Mychaleckyj, J. A. Todd, P. Bonella, A. L. Fear, E. Lavant, A. Louey, P. Moonsamy, HLA DR-DQ Haplotypes and Genotypes and Type 1 Diabetes Risk Analysis of the Type 1 Diabetes Genetics Consortium Families, *Diabetes* **57**, 1084-1092 (2008).

19. P. Concannon, S. S. Rich, G. T. Nepom, Genetics of Type 1A Diabetes, *New Engl J Med* **360**, 1646-1654 (2009).

20. B. of the E. N. N. (EU-NN), M. Tafti, H. Hor, Y. Dauvilliers, G. J. Lammers, S. Overeem, G. Mayer, S. Javidi, A. Iranzo, J. Santamaria, R. Peraita-Adrados, J. L. Vicario, I. Arnulf, G. Plazzi, S. Bayard, F. Poli, F. Pizza, P. Geisler, A. Wierzbicka, C. L. Bassetti, J. Mathis, M. Lecendreux, C. E. H. M. Donjacour, A. van der Heide, R.

- Heinzer, J. Haba-Rubio, E. Feketeova, B. Högl, B. Frauscher, A. Benetó, R. Khatami, F. Cañellas, C. Pfister, S. Scholz, M. Billiard, C. R. Baumann, G. Ercilla, W. Verduijn, F. H. J. Claas, V. Dubois, J. Nowak, H.-P. Eberhard, S. Pradervand, C. N. Hor, M. Testi, J.-M. Tiercy, Z. Kutalik, DQB1 Locus Alone Explains Most of the Risk and Protection in Narcolepsy with Cataplexy in Europe, *Sleep* **37**, 19–25 (2014).
21. J. A. Noble, A. M. Valdes, M. D. Varney, J. A. Carlson, P. Moonsamy, A. L. Fear, J. A. Lane, E. Lavant, R. Rappner, A. Louey, P. Concannon, J. C. Mychaleckyj, H. A. Erlich, HLA Class I and Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes, *Diabetes* **59**, 2972–2979 (2010).
22. S. Nejentsev, J. M. M. Howson, N. M. Walker, J. Szeszko, S. F. Field, H. E. Stevens, P. Reynolds, M. Hardy, E. King, J. Masters, J. Hulme, L. M. Maier, D. Smyth, R. Bailey, J. D. Cooper, G. Ribas, R. D. Campbell, T. W. T. C. C. Consortium, D. G. Clayton, J. A. Todd, Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A, *Nature* **450**, 887–892 (2007).
23. T. B. D. Registry, E. Mbunwe, B. J. V. der Auwera, I. Weets, P. V. Crombrugge, L. Crenier, M. Coeckelberghs, N. Seret, K. Decochez, E. Vandemeulebroucke, P. Gillard, B. Keymeulen, C. van Schravendijk, J. M. Wenzlau, J. C. Hutton, D. G. Pipeleers, F. K. Gorus, In antibody-positive first-degree relatives of patients with type 1 diabetes, HLA-A\*24 and HLA-B\*18, but not HLA-B\*39, are predictors of impending diabetes with distinct HLA-DQ interactions, *Diabetologia* **56**, 1964–1970 (2013).
24. S. T. Bennett, J. A. Todd, Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes., *Annu Rev Genet* **30**, 343–70 (1996).
25. G. C. Kennedy, M. S. German, W. J. Rutter, The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription, *Nat Genet* **9**, 293–298 (1995).
26. A. Pugliese, M. Zeller, A. Fernandez, L. J. Zalcberg, R. J. Bartlett, C. Ricordi, M. Pietropaolo, G. S. Eisenbarth, S. T. Bennett, D. D. Patel, 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* **15**, 293–7 (1997).
27. P. Vafiadis, S. T. Bennett, J. A. Todd, J. Nadeau, R. Grabs, C. G. Goodyer, S. Wickramasinghe, E. Colle, C. Polychronakos, Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus, *Nat Genet* **15**, 289–292 (1997).

28. T. L. van Belle, K. T. Coppieters, M. G. von Herrath, Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies., *Physiol Rev* **91**, 79-118 (2011).
29. N. Bottini, L. Musumeci, A. Alonso, S. Rahmouni, K. Nika, M. Rostamkhani, J. MacMurray, G. F. Meloni, P. Lucarelli, M. Pellecchia, G. S. Eisenbarth, D. Comings, T. Mustelin, A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes, *Nat Genet* **36**, 337-338 (2004).
30. A. Vella, J. D. Cooper, C. E. Lowe, N. Walker, S. Nutland, B. Widmer, R. Jones, S. M. Ring, W. McArdle, M. E. Pembrey, D. P. Strachan, D. B. Dunger, C. J. R. Twells, D. G. Clayton, J. A. Todd, Localization of a Type 1 Diabetes Locus in the IL2RA/CD25 Region by Use of Tag Single-Nucleotide Polymorphisms, *Am J Hum Genetics* **76**, 773-779 (2005).
31. L. Nisticò, R. Buzzetti, L. E. Pritchard, B. V. der Auwera, C. Giovannini, E. Bosi, M. T. M. Larrad, M. S. Rios, C. C. Chow, C. S. Cockram, K. Jacobs, C. Mijovic, S. C. Bain, A. H. Barnett, C. L. Vandewalle, F. Schuit, F. K. Gorus, R. Tosi, P. Pozzilli, J. A. Todd, The CTLA-4 Gene Region of Chromosome 2q33 Is Linked to, and Associated with, Type 1 Diabetes, *Hum Mol Genet* **5**, 1075-1080 (1996).
32. J. Wu, A. Katrekar, L. A. Honigberg, A. M. Smith, M. T. Conn, J. Tang, D. Jeffery, K. Mortara, J. Sampang, S. R. Williams, J. Buggy, J. M. Clark, Identification of Substrates of Human Protein-tyrosine Phosphatase PTPN22, *J Biol Chem* **281**, 11002-11010 (2006).
33. T. Vang, M. Congia, M. D. Macis, L. Musumeci, V. Orrù, P. Zavattari, K. Nika, L. Tautz, K. Taskén, F. Cucca, T. Mustelin, N. Bottini, Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant, *Nat Genet* **37**, 1317-1319 (2005).
34. H.-Q. Qu, A. Montpetit, B. Ge, T. J. Hudson, C. Polychronakos, Toward Further Mapping of the Association Between the IL2RA Locus and Type 1 Diabetes, *Diabetes* **56**, 1174-1176 (2007).
35. C. E. Lowe, J. D. Cooper, T. Brusko, N. M. Walker, D. J. Smyth, R. Bailey, K. Bourget, V. Plagnol, S. Field, M. Atkinson, D. G. Clayton, L. S. Wicker, J. A. Todd, Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes, *Nat Genet* **39**, 1074-1082 (2007).
36. T. M. Brusko, C. H. Wasserfall, M. J. Clare-Salzler, D. A. Schatz, M. A. Atkinson, Functional Defects and the Influence of Age on the Frequency of CD4+CD25+ T-Cells in Type 1 Diabetes, *Diabetes* **54**, 1407-1414 (2005).

37. H. Ueda, J. M. M. Howson, L. Esposito, J. Heward, Snook, G. Chamberlain, D. B. Rainbow, K. M. D. Hunter, A. N. Smith, G. D. Genova, M. H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R. C. J. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H. E. Rance, V. Everett, L. J. Smink, A. C. Lam, H. J. Cordell, N. M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motzo, F. Cucca, J. F. Hess, M. L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadia, R. Nithiyananthan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K. M. Gillespie, D. E. Undlien, K. S. Rønningen, C. Guja, C. Ionescu-Tîrgoviște, D. A. Savage, A. P. Maxwell, D. J. Carson, C. C. Patterson, J. A. Franklyn, D. G. Clayton, L. B. Peterson, L. S. Wicker, J. A. Todd, S. C. L. Gough, Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease, *Nature* **423**, 506-511 (2003).
38. P. Waterhouse, J. M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K. P. Lee, C. B. Thompson, H. Griesser, T. W. Mak, Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in Ctl $\alpha$ 4, *Science* **270**, 985-988 (1995).
39. M. J. Redondo, J. Jeffrey, P. R. Fain, G. S. Eisenbarth, T. Orban, Concordance for Islet Autoimmunity among Monozygotic Twins, *New Engl J Med* **359**, 2849-2850 (2008).
40. M. J. Redondo, L. Yu, M. Hawa, T. Mackenzie, D. A. Pyke, G. S. Eisenbarth, R. D. G. Leslie, Heterogeneity of Type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States, *Diabetologia* **44**, 354-362 (2001).
41. T. T. S. Group, The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) study: study design, *Pediatr Diabetes* **8**, 286-298 (2007).
42. S. E. Regnéll, A. Lernmark, The environment and the origins of islet autoimmunity and Type 1 diabetes., *Diabet Med* **30**, 155-60 (2013).
43. M. E. Craig, S. Nair, H. Stein, W. D. Rawlinson, Viruses and type 1 diabetes: a new look at an old story: Viruses and type 1 diabetes, *Pediatr Diabetes* **14**, n/a-n/a (2013).
44. L. C. Stene, E. A. M. Gale, The prenatal environment and type 1 diabetes, *Diabetologia* **56**, 1888-1897 (2013).
45. N. G. Morgan, S. J. Richardson, Enteroviruses as causative agents in type 1 diabetes: loose ends or lost cause?, *Trends Endocrinol Metab* **25**, 611-619 (2014).
46. C. M. Filippi, E. A. Estes, J. E. Oldham, M. G. von Herrath, Immunoregulatory mechanisms triggered by viral infections protect from type 1 diabetes in mice, *J Clin Invest* **119**, 1515-1523 (2009).
47. A. Foulis, M. Farquharson, A. Meager, Immunoreactive  $\alpha$ -Interferon in Insulin-Secreting  $\beta$  Cells in Type 1 Diabetes Mellitus, *Lancet* **330**, 1423-1427 (1987).

48. S. J. Richardson, T. Rodriguez-Calvo, I. C. Gerling, C. E. Mathews, J. S. Kaddis, M. A. Russell, M. Zeissler, P. Leete, L. Krogvold, K. Dahl-Jørgensen, M. von Herrath, A. Pugliese, M. A. Atkinson, N. G. Morgan, Islet cell hyperexpression of HLA class I antigens: a defining feature in type 1 diabetes, *Diabetologia* **59**, 2448-2458 (2016).
49. R. C. Ferreira, H. Guo, R. M. R. Coulson, D. J. Smyth, M. L. Pekalski, O. S. Burren, A. J. Cutler, J. D. Doecke, S. Flint, E. F. McKinney, P. A. Lyons, K. G. C. Smith, P. Achenbach, A. Beyerlein, D. B. Dunger, D. G. Clayton, L. S. Wicker, J. A. Todd, E. Bonifacio, C. Wallace, A.-G. Ziegler, A Type I Interferon Transcriptional Signature Precedes Autoimmunity in Children Genetically at Risk for Type 1 Diabetes, *Diabetes* **63**, 2538-2550 (2014).
50. H. Kallionpää, L. L. Elo, E. Laajala, J. Mykkänen, I. Ricaño-Ponce, M. Vaarma, T. D. Laajala, H. Hyöty, J. Ilonen, R. Veijola, T. Simell, C. Wijmenga, M. Knip, H. Lähdesmäki, O. Simell, R. Lahesmaa, Innate Immune Activity Is Detected Prior to Seroconversion in Children With HLA-Conferred Type 1 Diabetes Susceptibility, *Diabetes* **63**, 2402-2414 (2014).
51. D. L. Kaufman, M. G. Erlander, M. Clare-Salzler, M. A. Atkinson, N. K. Maclaren, A. J. Tobin, Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus., *J Clin Invest* **89**, 283-292 (1992).
52. J. Tian, P. V. Lehmann, D. L. Kaufman, T cell cross-reactivity between coxsackievirus and glutamate decarboxylase is associated with a murine diabetes susceptibility allele., *J Exp Med* **180**, 1979-1984 (1994).
53. J. L. Dunne, S. J. Richardson, M. A. Atkinson, M. E. Craig, K. Dahl-Jørgensen, M. Flodström-Tullberg, H. Hyöty, R. A. Insel, Å. Lernmark, R. E. Lloyd, N. G. Morgan, A. Pugliese, Rationale for enteroviral vaccination and antiviral therapies in human type 1 diabetes, *Diabetologia* **62**, 744-753 (2019).
54. V. M. Stone, M. M. Hankaniemi, O. H. Laitinen, A. B. Sioofy-Khojine, A. Lin, I. M. D. Lozano, M. A. Mazur, V. Marjomäki, K. Loré, H. Hyöty, V. P. Hytönen, M. Flodström-Tullberg, A hexavalent Coxsackievirus B vaccine is highly immunogenic and has a strong protective capacity in mice and nonhuman primates, *Sci Adv* **6**, eaaz2433 (2020).
55. J.-F. Bach, The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases, *New Engl J Med* **347**, 911-920 (2002).
56. S. Candon, A. Perez-Arroyo, C. Marquet, F. Valette, A.-P. Foray, B. Pelletier, C. Milani, C. Milani, M. Ventura, J.-F. Bach, L. Chatenoud, Antibiotics in early life alter

- the gut microbiome and increase disease incidence in a spontaneous mouse model of autoimmune insulin-dependent diabetes., *PLoS One* **10**, e0125448 (2015).
57. J. A. Pearson, D. Kakabadse, J. Davies, J. Peng, J. Warden-Smith, S. Cuff, M. Lewis, L. C. da Rosa, L. Wen, F. S. Wong, Altered Gut Microbiota Activate and Expand Insulin B15-23-Reactive CD8+ T-Cells, *Diabetes* **68**, db180487 (2019).
58. F. Calcinaro, S. Dionisi, M. Marinaro, P. Candeloro, V. Bonato, S. Marzotti, R. B. Corneli, E. Ferretti, A. Gulino, F. Grasso, C. D. Simone, U. D. Mario, A. Falorni, M. Boirivant, F. Dotta, Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse, *Diabetologia* **48**, 1565-1575 (2005).
59. A. D. Kostic, D. Gevers, H. Siljander, T. Vatanen, T. Hyötyläinen, A.-M. Hämäläinen, A. Peet, V. Tillmann, P. Pöhö, I. Mattila, H. Lähdesmäki, E. A. Franzosa, O. Vaarala, M. de Goffau, H. Harmsen, J. Ilonen, S. M. Virtanen, C. B. Clish, M. Orešič, C. Huttenhower, M. Knip, D. S. Group, R. J. Xavier, The Dynamics of the Human Infant Gut Microbiome in Development and in Progression toward Type 1 Diabetes, *Cell Host Microbe* **17**, 260-273 (2015).
60. O. Vaarala, M. A. Atkinson, J. Neu, The “Perfect Storm” for Type 1 Diabetes, *Diabetes* **57**, 2555-2562 (2008).
61. E. Bosi, L. Molteni, M. G. Radaelli, L. Folini, I. Fermo, E. Bazzigaluppi, L. Piemonti, M. R. Pastore, R. Paroni, Increased intestinal permeability precedes clinical onset of type 1 diabetes, *Diabetologia* **49**, 2824-2827 (2006).
62. C. Sorini, I. Cosorich, M. L. Conte, L. D. Giorgi, F. Facciotti, R. Lucianò, M. Rocchi, R. Ferrarese, F. Sanvito, F. Canducci, M. Falcone, Loss of gut barrier integrity triggers activation of islet-reactive T cells and autoimmune diabetes, *Proc Natl Acad Sci USA* **116**, 15140-15149 (2019).
63. P. J. Bingley, Clinical Applications of Diabetes Antibody Testing, *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 25-33 (2010).
64. K. Koczwara, E. Bonifacio, A.-G. Ziegler, Transmission of Maternal Islet Antibodies and Risk of Autoimmune Diabetes in Offspring of Mothers With Type 1 Diabetes, *Diabetes* **53**, 1-4 (2004).
65. V. Parikka, K. Näntö-Salonen, M. Saarinen, T. Simell, J. Ilonen, H. Hyöty, R. Veijola, M. Knip, O. Simell, Early seroconversion and rapidly increasing autoantibody concentrations predict prepubertal manifestation of type 1 diabetes in children at genetic risk, *Diabetologia* **55**, 1926-1936 (2012).
66. R. Ahmed, Z. Omidian, A. Giwa, B. Cornwell, N. Majety, D. R. Bell, S. Lee, H. Zhang, A. Michels, S. Desiderio, S. Sadegh-Nasseri, H. Rabb, S. Gritsch, M. L. Suva,

- P. Cahan, R. Zhou, C. Jie, T. Donner, A. R. A. Hamad, A Public BCR Present in a Unique Dual-Receptor-Expressing Lymphocyte from Type 1 Diabetes Patients Encodes a Potent T Cell Autoantigen, *Cell* **177**, 1583-1599.e16 (2019).
67. A. Willcox, S. J. Richardson, A. J. Bone, A. K. Foulis, N. G. Morgan, Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes, *Clin Exp Immunol* **155**, 173-181 (2009).
68. L. Mastrandrea, J. Yu, T. Behrens, J. Buchlis, C. Albin, S. Fourtner, T. Quattrin, Etanercept Treatment in Children With New-Onset Type 1 Diabetes, *Diabetes Care* **32**, 1244-1249 (2009).
69. A. Moran, B. Bundy, D. J. Becker, L. A. DiMeglio, S. E. Gitelman, R. Goland, C. J. Greenbaum, K. C. Herold, J. B. Marks, P. Raskin, S. Sanda, D. Schatz, D. K. Wherrett, D. M. Wilson, J. P. Krischer, J. S. Skyler, T. 1 D. T. C. S. Group, L. Pickersgill, E. de Koning, A.-G. Ziegler, B. Böehm, K. Badenhop, N. Schloot, J. F. Bak, P. Pozzilli, D. Mauricio, M. Y. Donath, L. Castaño, A. Wägner, H. H. Lervang, H. Perrild, T. Mandrup-Poulsen, A. S. Group, Interleukin-1 antagonism in type 1 diabetes of recent onset: two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trials., *Lancet* **381**, 1905-15 (2013).
70. B. Keymeulen, E. Vandemeulebroucke, A. G. Ziegler, C. Mathieu, L. Kaufman, G. Hale, F. Gorus, M. Goldman, M. Walter, S. Candon, L. Schandene, L. Crenier, C. D. Block, J.-M. M. Seigneurin, P. D. Pauw, D. Pierard, I. Weets, P. Rebello, P. Bird, E. Berrie, M. Frewin, H. Waldmann, J.-F. F. Bach, D. Pipeleers, L. Chatenoud, Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes., *New Engl J Med* **352**, 2598-608 (2005).
71. K. C. Herold, W. Hagopian, J. A. Auger, E. Poumian-Ruiz, L. Taylor, D. Donaldson, S. E. Gitelman, D. M. Harlan, D. Xu, R. A. Zivin, J. A. Bluestone, Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus., *New Engl J Med* **346**, 1692-8 (2002).
72. K. C. Herold, S. E. Gitelman, M. R. Ehlers, P. A. Gottlieb, C. J. Greenbaum, W. Hagopian, K. D. Boyle, L. Keyes-Elstein, S. Aggarwal, D. Phippard, P. H. Sayre, J. McNamara, J. A. Bluestone, Teplizumab (Anti-CD3 mAb) Treatment Preserves C-Peptide Responses in Patients With New-Onset Type 1 Diabetes in a Randomized Controlled Trial Metabolic and Immunologic Features at Baseline Identify a Subgroup of Responders, *Diabetes* **62**, 3766-3774 (2013).
73. P. Ambery, T. W. Donner, N. Biswas, J. Donaldson, J. Parkin, C. M. Dayan, Efficacy and safety of low-dose oteplizumab anti-CD3 monoclonal antibody in preserving C-peptide secretion in adolescent type 1 diabetes: DEFEND-2, a



randomized, placebo-controlled, double-blind, multi-centre study, *Diabet Med* **31**, 399-402 (2014).

74. R. Aronson, P. A. Gottlieb, J. S. Christiansen, T. W. Donner, E. Bosi, B. W. Bode, P. Pozzilli, the D. I. Group, Low-Dose Otelixizumab Anti-CD3 Monoclonal Antibody DEFEND-1 Study: Results of the Randomized Phase III Study in Recent-Onset Human Type 1 Diabetes, *Diabetes Care* **37**, 2746-2754 (2014).

75. N. Sherry, W. Hagopian, J. Ludvigsson, S. M. Jain, J. Wahlen, R. J. Ferry, B. Bode, S. Aronoff, C. Holland, D. Carlin, K. L. King, R. L. Wilder, S. Pillemer, E. Bonvini, S. Johnson, K. E. Stein, S. Koenig, K. C. Herold, A. G. Daifotis, for the P. T. Investigators, Teplizumab for treatment of type 1 diabetes (Protégé study): 1-year results from a randomised, placebo-controlled trial, *Lancet* **378**, 487-497 (2011).

76. M. J. Haller, S. A. Long, J. L. Blanchfield, D. A. Schatz, J. S. Skyler, J. P. Krischer, B. N. Bundy, S. M. Geyer, M. V. Warnock, J. L. Miller, M. A. Atkinson, D. J. Becker, D. A. Baidal, L. A. DiMeglio, S. E. Gitelman, R. Goland, P. A. Gottlieb, K. C. Herold, J. B. Marks, A. Moran, H. Rodriguez, W. E. Russell, D. M. Wilson, C. J. Greenbaum, T. 1 D. T. A.-G. S. Group, Low-Dose Anti-Thymocyte Globulin Preserves C-Peptide, Reduces HbA 1c , and Increases Regulatory to Conventional T-Cell Ratios in New-Onset Type 1 Diabetes: Two-Year Clinical Trial Data, *Diabetes* **68**, 1267-1276 (2019).

77. A. Hartemann, G. Bensimon, C. A. Payan, S. Jacqueminet, O. Bourron, N. Nicolas, M. Fonfrede, M. Rosenz wajg, C. Bernard, D. Klatzmann, Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet Diabetes Endo* **1**, 295-305 (2013).

78. M. Rosenz wajg, G. Churlaud, R. Mallone, A. Six, N. Dérian, W. Ch meta, R. Lorenzon, S. A. Long, J. H. Buckner, G. Afonso, H.-P. Pham, A. Hartemann, A. Yu, A. Pugliese, T. R. Malek, D. Klatzmann, Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients, *J Autoimmun* **58**, 48-58 (2015).

79. D. Saadoun, M. Rosenz wajg, F. Joly, A. Six, F. Carrat, V. Thibault, D. Sene, P. Cacoub, D. Klatzmann, Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis., *New Engl J Med* **365**, 2067-77 (2011).

80. E. Mariño, P. A. Silveira, J. Stolp, S. T. Grey, B cell-directed therapies in type 1 diabetes, *Trends Immunol* **32**, 287-294 (2011).

81. R. Mallone, V. Brezar, To B or Not to B: (Anti)bodies of Evidence on the Crime Scene of Type 1 Diabetes?, *Diabetes* **60**, 2020-2022 (2011).

82. M. D. Pescovitz, C. J. Greenbaum, B. Bundy, D. J. Becker, S. E. Gitelman, R. Goland, P. A. Gottlieb, J. B. Marks, A. Moran, P. Raskin, H. Rodriguez, D. A. Schatz, D. K. Wherrett, D. M. Wilson, J. P. Krischer, J. S. Skyler, the T. 1 D. T. A.-C. S. Group, B-Lymphocyte Depletion With Rituximab and  $\beta$ -Cell Function: Two-Year Results, *Diabetes Care* **37**, 453–459 (2014).
83. T. Orban, B. Bundy, D. J. Becker, L. A. DiMeglio, S. E. Gitelman, R. Goland, P. A. Gottlieb, C. J. Greenbaum, J. B. Marks, R. Monzavi, A. Moran, P. Raskin, H. Rodriguez, W. E. Russell, D. Schatz, D. Wherrett, D. M. Wilson, J. P. Krischer, J. S. Skyler, the T. 1 D. T. A. S. Group, Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet* **378**, 412–419 (2011).
84. M. R. Rigby, L. A. DiMeglio, M. S. Rendell, E. I. Felner, J. M. Dostou, S. E. Gitelman, C. M. Patel, K. J. Griffin, E. Tsalikian, P. A. Gottlieb, C. J. Greenbaum, N. A. Sherry, W. V. Moore, R. Monzavi, S. M. Willi, P. Raskin, A. Moran, W. E. Russell, A. Pinckney, L. Keyes-Elstein, M. Howell, S. Aggarwal, N. Lim, D. Phippard, G. T. Nepom, J. McNamara, M. R. Ehlers, the T. S. Team, Targeting of memory T cells with alefacept in new-onset type 1 diabetes (T1DAL study): 12 month results of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial, *Lancet Diabetes Endo* **1**, 284–294 (2013).
85. N. Marek-Trzonkowska, M. Myśliwiec, A. Dobyszek, M. Grabowska, I. Derkowska, J. Juścińska, R. Owczuk, A. Szadkowska, P. Witkowski, W. Młynarski, P. Jarosz-Chobot, A. Bossowski, J. Siebert, P. Trzonkowski, Therapy of type 1 diabetes with CD4+CD25highCD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets — Results of one year follow-up, *Clin Immunol* **153**, 23–30 (2014).
86. N. Marek-Trzonkowska, M. Myśliwiec, D. Iwaszkiewicz-Grześ, M. Gliwiński, I. Derkowska, M. Żalińska, M. Zieliński, M. Grabowska, H. Zielińska, K. Piekarska, A. Jaźwińska-Curyło, R. Owczuk, A. Szadkowska, K. Wyka, P. Witkowski, W. Młynarski, P. Jarosz-Chobot, A. Bossowski, J. Siebert, P. Trzonkowski, Factors affecting long-term efficacy of T regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes, *J Transl Med* **14**, 332 (2016).
87. J. A. Bluestone, J. H. Buckner, M. Fitch, S. E. Gitelman, S. Gupta, M. K. Hellerstein, K. C. Herold, A. Lares, M. R. Lee, K. Li, W. Liu, S. A. Long, L. M. Masiello, V. Nguyen, A. L. Putnam, M. Rieck, P. H. Sayre, Q. Tang, Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells, *Sci Transl Med* **7**, 315ra189–315ra189 (2015).

88. A. W. Michels, L. G. Landry, K. A. McDaniel, L. Yu, M. Campbell-Thompson, W. W. Kwok, K. L. Jones, P. A. Gottlieb, J. W. Kappler, Q. Tang, B. O. Roep, M. A. Atkinson, C. E. Mathews, M. Nakayama, Islet-Derived CD4 T Cells Targeting Proinsulin in Human Autoimmune Diabetes, *Diabetes* **66**, 722-734 (2017).
89. S. Gonzalez-Duque, M. E. Azoury, M. L. Colli, G. Afonso, J.-V. Turatsinze, L. Nigi, A. I. Lalanne, G. Sebastiani, A. Carré, S. Pinto, S. Culina, N. Corcos, M. Bugliani, P. Marchetti, M. Armanet, M. Diedisheim, B. Kyewski, L. M. Steinmetz, S. Buus, S. You, D. Dubois-Laforgue, E. Larger, J.-P. Beressi, G. Bruno, F. Dotta, R. Scharfmann, D. L. Eizirik, Y. Verdier, J. Vinh, R. Mallone, Conventional and Neo-antigenic Peptides Presented by  $\beta$  Cells Are Targeted by Circulating Naïve CD8+ T Cells in Type 1 Diabetic and Healthy Donors, *Cell Metab* **28**, 946-960.e6 (2018).
90. C. M. Hull, M. Peakman, T. I. M. Tree, Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it?, *Diabetologia* **60**, 1839-1850 (2017).
91. F. Safari, S. Farajnia, M. Arya, H. Zarredar, A. Nasrolahi, CRISPR and personalized Treg therapy: new insights into the treatment of rheumatoid arthritis, *Immunopharm Immunot* **40**, 201-211 (2018).
92. L. Chaillous, H. Lefèvre, C. Thivolet, C. Boitard, N. Lahlou, C. Atlan-Gepner, B. Bouhanick, A. Mogenet, M. Nicolino, J.-C. Carel, P. Lecomte, R. Maréchaud, P. Bougnères, B. Charbonnel, P. Saï, for the D. I. O. group, Oral insulin administration and residual ( $\beta$ -cell function in recent-onset type 1 diabetes: a multicentre randomised controlled trial, *Lancet* **356**, 545-549 (2000).
93. B. Ergun-Longmire, J. Marker, A. Zeidler, R. Rapaport, P. Raskin, B. Bode, D. Schatz, A. Vargas, D. Rogers, S. Schwartz, J. Malone, J. Krischer, N. K. Maclaren, Oral Insulin Therapy to Prevent Progression of Immune-Mediated (Type 1) Diabetes, *Ann NY Acad Sci* **1029**, 260-277 (2004).
94. S. Fourlanos, C. Perry, S. A. Gellert, E. Martinuzzi, R. Mallone, J. Butler, P. G. Colman, L. C. Harrison, Evidence That Nasal Insulin Induces Immune Tolerance to Insulin in Adults With Autoimmune Diabetes, *Diabetes* **60**, 1237-1245 (2011).
95. M. Walter, A. Philotheou, F. Bonnici, A.-G. Ziegler, R. Jimenez, No Effect of the Altered Peptide Ligand NBI-6024 on  $\beta$ -Cell Residual Function and Insulin Needs in New-Onset Type 1 Diabetes, *Diabetes Care* **32**, 2036-2040 (2009).
96. M. A. Ali, Y.-F. Liu, S. Arif, D. Tatovic, H. Shariff, V. B. Gibson, N. Yusuf, R. Baptista, M. Eichmann, N. Petrov, S. Heck, J. H. M. Yang, T. I. M. Tree, I. Pujol-Autonell, L. Yeo, L. R. Baumard, R. Stenson, A. Howell, A. Clark, Z. Boulton, J. Powrie, L. Adams, F. S. Wong, S. Luzio, G. Dunseath, K. Green, A. O'Keefe, G. Bayly, N.

- Thorogood, R. Andrews, N. Leech, F. Joseph, S. Nair, S. Seal, H. Cheung, C. Beam, R. Hills, M. Peakman, C. M. Dayan, Metabolic and immune effects of immunotherapy with proinsulin peptide in human new-onset type 1 diabetes, *Sci Transl Med* **9**, eaaf7779 (2017).
97. J. Ludvigsson, D. Krisky, R. Casas, T. Battelino, L. Castaño, J. Greening, O. Kordonouri, T. Otonkoski, P. Pozzilli, J.-J. Robert, H. J. Veeze, J. Palmer, GAD65 antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus., *New Engl J Med* **366**, 433-42 (2012).
98. D. K. Wherrett, B. Bundy, D. J. Becker, L. A. DiMeglio, S. E. Gitelman, R. Goland, P. A. Gottlieb, C. J. Greenbaum, K. C. Herold, J. B. Marks, R. Monzavi, A. Moran, T. Orban, J. P. Palmer, P. Raskin, H. Rodriguez, D. Schatz, D. M. Wilson, J. P. Krischer, J. S. Skyler, the T. 1 D. T. G. S. Group, Antigen-based therapy with glutamic acid decarboxylase (GAD) vaccine in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised double-blind trial, *Lancet* **378**, 319-327 (2011).
99. X. Clemente-Casares, J. Blanco, P. Ambalavanan, J. Yamanouchi, S. Singha, C. Fandos, S. Tsai, J. Wang, N. Garabatos, C. Izquierdo, S. Agrawal, M. B. Keough, V. W. Yong, E. James, A. Moore, Y. Yang, T. Stratmann, P. Serra, P. Santamaria, Expanding antigen-specific regulatory networks to treat autoimmunity, *Nature* **530**, 434-440 (2016).
100. B. Keymeulen, M. Walter, C. Mathieu, L. Kaufman, F. Gorus, R. Hilbrands, E. Vandemeulebroucke, U. V. de Velde, L. Crenier, C. D. Block, S. Candon, H. Waldmann, A. G. Ziegler, L. Chatenoud, D. Pipeleers, Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass, *Diabetologia* **53**, 614-623 (2010).
101. K. C. Herold, S. E. Gitelman, U. Masharani, W. Hagopian, B. Bisikirska, D. Donaldson, K. Rother, B. Diamond, D. M. Harlan, J. A. Bluestone, A Single Course of Anti-CD3 Monoclonal Antibody hOKT3 1(Ala-Ala) Results in Improvement in C-Peptide Responses and Clinical Parameters for at Least 2 Years after Onset of Type 1 Diabetes, *Diabetes* **54**, 1763-1769 (2005).
102. W. Hagopian, R. J. Ferry, N. Sherry, D. Carlin, E. Bonvini, S. Johnson, K. E. Stein, S. Koenig, A. G. Daifotis, K. C. Herold, J. Ludvigsson, Teplizumab Preserves C-Peptide in Recent-Onset Type 1 Diabetes Two-Year Results From the Randomized, Placebo-Controlled Protégé Trial, *Diabetes* **62**, 3901-3908 (2013).
103. M. Rosenzweig, R. Salet, R. Lorenzon, N. Tchitchek, A. Roux, C. Bernard, J.-C. Carel, C. Storey, M. Polak, J. Beltrand, C. Amouyal, A. Hartemann, P. Corbeau, E.

- Vicaut, C. Bibal, P. Bougnères, T.-A. Tran, D. Klatzmann, Low-dose IL-2 in children with recently diagnosed type 1 diabetes: a Phase I/II randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding study, *Diabetologia* **63**, 1808-1821 (2020).
104. L. Klein, B. Kyewski, P. M. Allen, K. A. Hogquist, Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see), *Nat Rev Immunol* **14**, 377-391 (2014).
105. M. Huesmann, B. Scott, P. Kisielow, H. von Boehmer, Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice, *Cell* **66**, 533-540 (1991).
106. K. Shortman, D. Vremec, M. Egerton, The kinetics of T cell antigen receptor expression by subgroups of CD4+8+ thymocytes: delineation of CD4+8+3(2+) thymocytes as post-selection intermediates leading to mature T cells., *J Exp Med* **173**, 323-332 (1991).
107. M. S. Anderson, E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, D. Mathis, Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein., *Science* **298**, 1395-401 (2002).
108. H. Takaba, Y. Morishita, Y. Tomofuji, L. Danks, T. Nitta, N. Komatsu, T. Kodama, H. Takayanagi, Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance, *Cell* **163**, 975-987 (2015).
109. E. R. Breed, M. Watanabe, K. A. Hogquist, Measuring Thymic Clonal Deletion at the Population Level, *J Immunol* , ji1900191 (2019).
110. J. D. Fontenot, M. A. Gavin, A. Y. Rudensky, Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells, *Nat Immunol* **4**, 330-336 (2003).
111. S. Hori, T. Nomura, S. Sakaguchi, Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3, *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
112. F. P. Legoux, J.-B. Lim, A. W. Cauley, S. Dikiy, J. Ertelt, T. J. Mariani, T. Sparwasser, S. S. Way, J. J. Moon, CD4+ T Cell Tolerance to Tissue-Restricted Self Antigens Is Mediated by Antigen-Specific Regulatory T Cells Rather Than Deletion, *Immunity* **43**, 896-908 (2015).
113. T. Lee, M. L. Sprouse, P. Banerjee, M. Bettini, M. L. Bettini, Ectopic Expression of Self-Antigen Drives Regulatory T Cell Development and Not Deletion of Autoimmune T Cells, *J Immunol* **199**, 2270-2278 (2017).
114. M. Meredith, D. Zemmour, D. Mathis, C. Benoist, Aire controls gene expression in the thymic epithelium with ordered stochasticity, *Nat Immunol* **16**, 942-949 (2015).

115. J. Villaseñor, W. Besse, C. Benoist, D. Mathis, Ectopic expression of peripheral-tissue antigens in the thymic epithelium: probabilistic, monoallelic, misinitiated., *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 15854–9 (2008).
116. M. I. Carreres, A. Escalante, B. Murillo, G. Chauvin, P. Gaspar, C. Vegar, E. Herrera, Transcription Factor Foxd1 Is Required for the Specification of the Temporal Retina in Mammals, *J Neurosci* **31**, 5673–5681 (2011).
117. A. Kobayashi, J. W. Mugford, A. M. Krautzberger, N. Naiman, J. Liao, A. P. McMahon, Identification of a Multipotent Self-Renewing Stromal Progenitor Population during Mammalian Kidney Organogenesis, *Stem Cell Rep* **3**, 650–662 (2014).
118. J. Derbinski, S. Pinto, S. Rösch, K. Hexel, B. Kyewski, Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism, *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 657–662 (2008).
119. D. Malhotra, J. L. Linehan, T. Dileepan, Y. J. Lee, W. E. Purtha, J. V. Lu, R. W. Nelson, B. T. Fife, H. T. Orr, M. S. Anderson, K. A. Hogquist, M. K. Jenkins, Tolerance is established in polyclonal CD4+ T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns, *Nat Immunol* **17**, 187–195 (2016).
120. D. Zehn, M. J. Bevan, T Cells with Low Avidity for a Tissue-Restricted Antigen Routinely Evade Central and Peripheral Tolerance and Cause Autoimmunity, *Immunity* **25**, 261–270 (2006).
121. K. Wing, S. Sakaguchi, Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity, *Nat Immunol* **11**, 7–13 (2009).
122. S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, M. Toda, Pillars article: 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., *J Immunol* **186**, 3808–21 (2011).
123. M. R. Walker, D. J. Kasprowicz, V. H. Gersuk, A. Bènard, M. V. Landeghen, J. H. Buckner, S. F. Ziegler, Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells, *J Clin Invest* **112**, 1437–1443 (2003).
124. E. d’Hennezel, M. Ben-Shoshan, H. D. Ochs, T. R. Torgerson, L. J. Russell, C. Lejtenyi, F. J. Noya, N. Jabado, B. Mazer, C. A. Piccirillo, FOXP3 Forkhead Domain Mutation and Regulatory T Cells in the IPEX Syndrome, *New Engl J Med* **361**, 1710–1713 (2009).
125. F. Ramsdell, Foxp3 and Natural Regulatory T Cells Key to a Cell Lineage?, *Immunity* **19**, 165–168 (2003).

126. K. Lahl, C. Loddenkemper, C. Drouin, J. Freyer, J. Arnason, G. Eberl, A. Hamann, H. Wagner, J. Huehn, T. Sparwasser, Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease, *J Exp Med* **204**, 57-63 (2007).
127. Y. Nishizuka, T. Sakakura, Thymus and Reproduction: Sex-Linked Dysgenesis of the Gonad after Neonatal Thymectomy in Mice, *Science* **166**, 753-755 (1969).
128. M. Asano, M. Toda, N. Sakaguchi, S. Sakaguchi, Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation., *J Exp Med* **184**, 387-396 (1996).
129. J. D. Fontenot, J. L. Dooley, A. G. Farr, A. Y. Rudensky, Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny, *J Exp Med* **202**, 901-906 (2005).
130. S. Yang, N. Fujikado, D. Kolodin, C. Benoist, D. Mathis, Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance, *Science* **348**, 589-594 (2015).
131. M. A. Daniels, E. Teixeira, J. Gill, B. Hausmann, D. Roubaty, K. Holmberg, G. Werlen, G. A. Holländer, N. R. J. Gascoigne, E. Palmer, Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling, *Nature* **444**, 724-729 (2006).
132. E. Palmer, D. Naeher, Affinity threshold for thymic selection through a T-cell receptor-co-receptor zipper., *Nat Rev Immunol* **9**, 207-13 (2009).
133. M. L. Borgne, E. Ladi, I. Dzhagalov, P. Herzmark, Y. F. Liao, A. K. Chakraborty, E. A. Robey, The impact of negative selection on thymocyte migration in the medulla, *Nat Immunol* **10**, 823-830 (2009).
134. C.-S. Hsieh, H.-M. Lee, C.-W. J. Lio, Selection of regulatory T cells in the thymus, *Nat Rev Immunol* **12**, 157-167 (2012).
135. C. C. Picca, D. M. Simons, S. Oh, M. Aitken, O. A. Perng, C. Mergenthaler, E. Kropf, J. Erikson, A. J. Caton, CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell formation requires more specific recognition of a self-peptide than thymocyte deletion, *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 14890-14895 (2011).
136. R. A. Gottschalk, E. Corse, J. P. Allison, TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo, *J Exp Med* **207**, 1701-1711 (2010).
137. J. Lohr, B. Knoechel, E. C. Kahn, A. K. Abbas, Role of B7 in T Cell Tolerance, *J Immunol* **173**, 5028-5035 (2004).
138. X. Tai, M. Cowan, L. Feigenbaum, A. Singer, CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2, *Nat Immunol* **6**, 152-162 (2005).

139. B. Salomon, D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, J. A. Bluestone, B7/CD28 Costimulation Is Essential for the Homeostasis of the CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells that Control Autoimmune Diabetes, *Immunity* **12**, 431-440 (2000).
140. C.-W. J. Lio, L. F. Dodson, C. M. Deppong, C.-S. Hsieh, J. M. Green, CD28 Facilitates the Generation of Foxp3– Cytokine Responsive Regulatory T Cell Precursors, *J Immunol* **184**, 6007-6013 (2010).
141. M. Hinterberger, G. Wirnsberger, L. Klein, B7/CD28 in Central Tolerance: Costimulation Promotes Maturation of Regulatory T Cell Precursors and Prevents Their Clonal Deletion, *Front Immunol* **2**, 30 (2011).
142. J. Li, J. Park, D. Foss, I. Goldschneider, Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus, *J Exp Med* **206**, 607-622 (2009).
143. D. Vremec, J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu, K. Shortman, CD4 and CD8 Expression by Dendritic Cell Subtypes in Mouse Thymus and Spleen, *J Immunol* **164**, 2978-2986 (2000).
144. M. H. Lahoud, A. I. Proietto, K. H. Gartlan, S. Kitsoulis, J. Curtis, J. Wettenhall, M. Sofi, C. Daunt, M. O’Keeffe, I. Caminschi, K. Satterley, A. Rizzitelli, P. Schnorrer, A. Hinohara, Y. Yamaguchi, L. Wu, G. Smyth, E. Handman, K. Shortman, M. D. Wright, Signal Regulatory Protein Molecules Are Differentially Expressed by CD8 – Dendritic Cells, *J Immunol* **177**, 372-382 (2006).
145. L. Wu, C. L. Li, K. Shortman, Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny., *J Exp Med* **184**, 903-911 (1996).
146. C. Ardavin, L. Wu, C.-L. Li, K. Shortman, Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population, *Nature* **362**, 761-763 (1993).
147. Y. Lei, A. M. Ripen, N. Ishimaru, I. Ohigashi, T. Nagasawa, L. T. Jeker, M. R. Bösl, G. A. Holländer, Y. Hayashi, R. de W. Malefyt, T. Nitta, Y. Takahama, Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development, *J Exp Med* **208**, 383-394 (2011).
148. A. M. Gallegos, M. J. Bevan, Central Tolerance to Tissue-specific Antigens Mediated by Direct and Indirect Antigen Presentation, *J Exp Med* **200**, 1039-1049 (2004).



149. E. Donskoy, I. Goldschneider, Two Developmentally Distinct Populations of Dendritic Cells Inhabit the Adult Mouse Thymus: Demonstration by Differential Importation of Hematogenous Precursors Under Steady State Conditions, *J Immunol* **170**, 3514-3521 (2003).
150. O. Cédile, M. Løbner, H. Toft-Hansen, I. Frank, A. Wlodarczyk, M. Irla, T. Owens, Thymic CCL2 influences induction of T-cell tolerance, *J Autoimmun* **55**, 73-85 (2014).
151. T. Baba, Y. Nakamoto, N. Mukaida, Crucial Contribution of Thymic Sirp $\alpha$ + Conventional Dendritic Cells to Central Tolerance against Blood-Borne Antigens in a CCR2-Dependent Manner, *J Immunol* **183**, 3053-3063 (2009).
152. J. A. Villadangos, L. Young, Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells, *Immunity* **29**, 352-361 (2008).
153. H. Hadeiba, K. Lahl, A. Edalati, C. Oderup, A. Habtezion, R. Pachynski, L. Nguyen, A. Ghodsi, S. Adler, E. C. Butcher, Plasmacytoid Dendritic Cells Transport Peripheral Antigens to the Thymus to Promote Central Tolerance, *Immunity* **36**, 438-450 (2012).
154. M. Wendland, N. Czeloth, N. Mach, B. Malissen, E. Kremmer, O. Pabst, R. Forster, CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine, *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 6347-6352 (2007).
155. H. Hadeiba, E. C. Butcher, Thymus-homing dendritic cells in central tolerance, *Eur J Immunol* **43**, 1425-1429 (2013).
156. J. S. A. Perry, C.-W. J. Lio, A. L. Kau, K. Nutsch, Z. Yang, J. I. Gordon, K. M. Murphy, C.-S. Hsieh, Distinct Contributions of Aire and Antigen-Presenting-Cell Subsets to the Generation of Self-Tolerance in the Thymus, *Immunity* **41**, 414-426 (2014).
157. B. M. Weist, N. Kurd, J. Boussier, S. W. Chan, E. A. Robey, Thymic regulatory T cell niche size is dictated by limiting IL-2 from antigen-bearing dendritic cells and feedback competition, *Nat Immunol* **16**, 635-641 (2015).
158. P. Vafiadis, H. Ounissi-Benkalha, M. Palumbo, R. Grabs, M. Rousseau, C. G. Goodyer, C. Polychronakos, Class III Alleles of the Variable Number of Tandem Repeat Insulin Polymorphism Associated with Silencing of Thymic Insulin Predispose to Type 1 Diabetes, *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 3705-3710 (2001).
159. I. Durinovic-Belló, R. P. Wu, V. H. Gersuk, S. Sanda, H. G. Shilling, G. T. Nepom, Insulin gene VNTR genotype associates with frequency and phenotype of the autoimmune response to proinsulin, *Genes Immun* **11**, 188-193 (2010).

160. J. H. Velthuis, W. W. Unger, J. R. F. Abreu, G. Duinkerken, K. Franken, M. Peakman, A. H. Bakker, S. Reker-Hadrup, B. Keymeulen, J. W. Drijfhout, T. N. Schumacher, B. O. Roep, Simultaneous Detection of Circulating Autoreactive CD8<sup>+</sup> T-Cells Specific for Different Islet Cell-Associated Epitopes Using Combinatorial MHC Multimers, *Diabetes* **59**, 1721-1730 (2010).
161. K. Thébault-Baumont, D. Dubois-Laforgue, P. Krief, J.-P. Briand, P. Halbout, K. Vallon-Geoffroy, J. Morin, V. Laloux, A. Lehuen, J.-C. Carel, J. Jami, S. Muller, C. Boitard, Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice, *J Clin Invest* **111**, 851-857 (2003).
162. B. Faideau, C. Lotton, B. Lucas, I. Tardivel, J. F. Elliott, C. Boitard, J.-C. Carel, Tolerance to Proinsulin-2 Is Due to Radioresistant Thymic Cells, *J Immunol* **177**, 53-60 (2006).
163. E. S. Husebye, J. Perheentupa, R. Rautemaa, O. Kämpe, Clinical manifestations and management of patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I, *J Intern Med* **265**, 514-529 (2009).
164. K. Kisand, P. Peterson, Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy, *J Clin Immunol* **35**, 463-478 (2015).
165. E. S. Husebye, M. S. Anderson, O. Kämpe, Autoimmune Polyendocrine Syndromes, *New Engl J Med* **378**, 1132-1141 (2018).
166. S. Meyer, M. Woodward, C. Hertel, P. Vlaicu, Y. Haque, J. Kärner, A. Macagno, S. C. Onuoha, D. Fishman, H. Peterson, K. Metsküla, R. Uibo, K. Jääntti, K. Hokynar, A. S. B. Wolff, A. patient collaborative, A. Meloni, N. Kluger, E. S. Husebye, K. T. Podkrajsek, T. Battelino, N. Bratanic, A. Peet, K. Krohn, A. Ranki, P. Peterson, K. Kisand, A. Hayday, AIRE-Deficient Patients Harbor Unique High-Affinity Disease-Ameliorating Autoantibodies, *Cell* **166**, 582-595 (2016).
167. W. Jiang, M. S. Anderson, R. Bronson, D. Mathis, C. Benoist, Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency, *J Exp Med* **202**, 805-815 (2005).
168. S. Culina, A. I. Lalanne, G. Afonso, K. Cerosaletti, S. Pinto, G. Sebastiani, K. Kuranda, L. Nigi, A. Eugster, T. Østerbye, A. Maugein, J. E. McLaren, K. Ladell, E. Larger, J.-P. Beressi, A. Lissina, V. Appay, H. W. Davidson, S. Buus, D. A. Price, M. Kuhn, E. Bonifacio, M. Battaglia, S. Caillat-Zucman, F. Dotta, R. Scharfmann, B. Kyewski, R. Mallone, I. S. Group, Islet-reactive CD8<sup>+</sup> T cell frequencies in the pancreas, but not in blood, distinguish type 1 diabetic patients from healthy donors., *Sci Immunol* **3** (2018), doi:10.1126/sciimmunol.aao4013.

169. A. E. Wiedeman, V. S. Muir, M. G. Rosasco, H. A. DeBerg, S. Presnell, B. Haas, M. J. Dufort, C. Speake, C. J. Greenbaum, E. Serti, G. T. Nepom, G. Blahnik, A. M. Kus, E. A. James, P. S. Linsley, S. A. Long, Autoreactive CD8+ T cell exhaustion distinguishes subjects with slow type 1 diabetes progression, *J Clin Invest* **130**, 480-490 (2019).
170. J. Gotter, B. Brors, M. Hergenbahn, B. Kyewski, Medullary Epithelial Cells of the Human Thymus Express a Highly Diverse Selection of Tissue-specific Genes Colocalized in Chromosomal Clusters, *J Exp Med* **199**, 155-166 (2004).
171. S. Lindley, C. M. Dayan, A. Bishop, B. O. Roep, M. Peakman, T. I. M. Tree, Defective Suppressor Function in CD4+CD25+ T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes, *Diabetes* **54**, 92-99 (2004).
172. T. Brusko, C. Wasserfall, K. McGrail, R. Schatz, H. L. Viener, D. Schatz, M. Haller, J. Rockell, P. Gottlieb, M. Clare-Salzler, M. Atkinson, No Alterations in the Frequency of FOXP3+ Regulatory T-Cells in Type 1 Diabetes, *Diabetes* **56**, 604-612 (2007).
173. W. Liu, A. L. Putnam, Z. Xu-yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. F. de St. Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler, J. A. Bluestone, CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells, *J Exp Med* **203**, 1701-1711 (2006).
174. S. Pinto, C. Michel, H. Schmidt-Glenewinkel, N. Harder, K. Rohr, S. Wild, B. Brors, B. Kyewski, Overlapping gene coexpression patterns in human medullary thymic epithelial cells generate self-antigen diversity, *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, E3497-E3505 (2013).
175. A. Lissina, K. Ladell, A. Skowera, M. Clement, E. Edwards, R. Seggewiss, H. A. van den Berg, E. Gostick, K. Gallagher, E. Jones, J. J. Melenhorst, A. J. Godkin, M. Peakman, D. A. Price, A. K. Sewell, L. Wooldridge, Protein kinase inhibitors substantially improve the physical detection of T-cells with peptide-MHC tetramers, *J Immunol Methods* **340**, 11-24 (2009).
176. C. Rius, M. Attaf, K. Tungatt, V. Bianchi, M. Legut, A. Bovay, M. Donia, P. thor Straten, M. Peakman, I. M. Svane, S. Ott, T. Connor, B. Szomolay, G. Dolton, A. K. Sewell, Peptide-MHC Class I Tetramers Can Fail To Detect Relevant Functional T Cell Clonotypes and Underestimate Antigen-Reactive T Cell Populations, *J Immunol* **200**, ji1700242 (2018).
177. R. Mallone, S. A. Kochik, E. M. Laughlin, V. H. Gersuk, H. Reijonen, W. W. Kwok, G. T. Nepom, Differential Recognition and Activation Thresholds in Human Autoreactive GAD-Specific T-Cells, *Diabetes* **53**, 971-977 (2004).

178. R. Mallone, S. A. Kochik, H. Reijonen, B. Carson, S. F. Ziegler, W. W. Kwok, G. T. Nepom, Functional avidity directs T-cell fate in autoreactive CD4+ T cells, *Blood* **106**, 2798–2805 (2005).
179. A. K. Sewell, Why must T cells be cross-reactive?, *Nat Rev Immunol* **12**, 669–677 (2012).
180. N. K. Jerne, The somatic generation of immune recognition, *Eur J Immunol* **1**, 1–9 (1971).
181. N. K. Jerne, The Natural-Selection Theory of Antibody Formation, *Proc Natl Acad Sci USA* **41**, 849–857 (1955).
182. G. J. Kersh, P. M. Allen, Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: a single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands., *J Exp Med* **184**, 1259–1268 (1996).
183. K. W. Wucherpfennig, P. M. Allen, F. Celada, I. R. Cohen, R. D. Boer, K. C. Garcia, B. Goldstein, R. Greenspan, D. Hafler, P. Hodgkin, E. S. Huseby, D. C. Krakauer, D. Nemazee, A. S. Perelson, C. Pinilla, R. K. Strong, E. E. Sercarz, Polyspecificity of T cell and B cell receptor recognition, *Semin Immunol* **19**, 216–224 (2007).
184. D. B. Wilson, D. H. Wilson, K. Schroder, C. Pinilla, S. Blondelle, R. A. Houghten, K. C. Garcia, Specificity and degeneracy of T cells, *Mol Immunol* **40**, 1047–1055 (2004).
185. D. Mason, A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor, *Immunol Today* **19**, 395–404 (1998).
186. T. P. Arstila, A. Casrouge, V. Baron, J. Even, J. Kanellopoulos, P. Kourilsky, A Direct Estimate of the Human  $\alpha\beta$  T Cell Receptor Diversity, *Science* **286**, 958–961 (1999).
187. L. Wooldridge, J. Ekeruche-Makinde, H. A. van den Berg, A. Skowera, J. J. Miles, M. P. Tan, G. Dolton, M. Clement, S. Llewellyn-Lacey, D. A. Price, M. Peakman, A. K. Sewell, A Single Autoimmune T Cell Receptor Recognizes More Than a Million Different Peptides\*, *J Biol Chem* **287**, 1168–1177 (2012).
188. J. Maynard, K. Petersson, D. H. Wilson, E. J. Adams, S. E. Blondelle, M. J. Boulanger, D. B. Wilson, K. C. Garcia, Structure of an Autoimmune T Cell Receptor Complexed with Class II Peptide-MHC Insights into MHC Bias and Antigen Specificity, *Immunity* **22**, 81–92 (2005).
189. H. S. Hiemstra, P. A. van Veelen, S. J. M. Willemen, W. E. Benckhuijsen, A. Geluk, R. R. P. de Vries, B. O. Roep, J. W. Drijfhout, Quantitative determination of

TCR cross-reactivity using peptide libraries and protein databases, *Eur J Immunol* **29**, 2385-2391 (1999).

190. A. Skowera, R. J. Ellis, R. Varela-Calviño, S. Arif, G. C. Huang, C. Van-Krinks, A. Zaremba, C. Rackham, J. S. Allen, T. I. M. Tree, M. Zhao, C. M. Dayan, A. K. Sewell, W. W. Unger, W. Unger, J. W. Drijfhout, F. Ossendorp, B. O. Roep, M. Peakman, CTLs are targeted to kill  $\beta$  cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope, *J Clin Invest* **118**, 3390-3402 (2008).

191. A. M. Bulek, D. K. Cole, A. Skowera, G. Dolton, S. Gras, F. Madura, A. Fuller, J. J. Miles, E. Gostick, D. A. Price, J. W. Drijfhout, R. R. Knight, G. C. Huang, N. Lissin, P. E. Molloy, L. Wooldridge, B. K. Jakobsen, J. Rossjohn, M. Peakman, P. J. Rizkallah, A. K. Sewell, Structural basis for the killing of human beta cells by CD8<sup>+</sup> T cells in type 1 diabetes, *Nat Immunol* **13**, 283-289 (2012).

192. W. Yu, N. Jiang, P. J. R. Ebert, B. A. Kidd, S. Müller, P. J. Lund, J. Juang, K. Adachi, T. Tse, M. E. Birnbaum, E. W. Newell, D. M. Wilson, G. M. Grotenbreg, S. Valitutti, S. R. Quake, M. M. Davis, Clonal Deletion Prunes but Does Not Eliminate Self-Specific  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes, *Immunity* **42**, 929-941 (2015).

193. R. W. Nelson, D. Beisang, N. J. Tubo, T. Dileepan, D. L. Wiesner, K. Nielsen, M. Wüthrich, B. S. Klein, D. I. Kotov, J. A. Spanier, B. T. Fife, J. J. Moon, M. K. Jenkins, T Cell Receptor Cross-Reactivity between Similar Foreign and Self Peptides Influences Naive Cell Population Size and Autoimmunity, *Immunity* **42**, 95-107 (2015).

194. M. Wölfl, A. Rutebemberwa, T. Mosbrugger, Q. Mao, H. Li, D. Netski, S. C. Ray, D. Pardoll, J. Sidney, A. Sette, T. Allen, T. Kuntzen, D. G. Kavanagh, J. Kuball, P. D. Greenberg, A. L. Cox, Hepatitis C Virus Immune Escape via Exploitation of a Hole in the T Cell Repertoire, *J Immunol* **181**, 6435-6446 (2008).

195. I. Stefanová, J. R. Dorfman, R. N. Germain, Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes, *Nature* **420**, 429-434 (2002).

196. K. Takada, S. C. Jameson, Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place, *Nat Rev Immunol* **9**, 823-832 (2009).

197. K. A. Hogquist, S. C. Jameson, The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate “decisions” and effector function, *Nat Immunol* **15**, 815-823 (2014).

198. A. Posselt, C. Barker, A. Friedman, A. Naji, Prevention of autoimmune diabetes in the BB rat by intrathymic islet transplantation at birth, *Science* **256**, 1321-1324 (1992).

199. B. Charlton, C. Taylor-Edwards, R. Tisch, C. G. Fathman, Prevention of diabetes and insulinitis by neonatal intrathymic islet administration in NOD mice., *J Autoimmun* **7**, 549-60 (1994).
200. I. C. Gerling, D. V. Serreze, S. W. Christianson, E. H. Leiter, Intrathymic islet cell transplantation reduces beta-cell autoimmunity and prevents diabetes in NOD/Lt mice., *Diabetes* **41**, 1672-6 (1992).
201. M. B. French, J. Allison, D. S. Cram, H. E. Thomas, M. Dempsey-Collier, A. Silva, H. M. Georgiou, T. W. Kay, L. C. Harrison, A. M. Lew, Transgenic Expression of Mouse Proinsulin II Prevents Diabetes in Nonobese Diabetic Mice, *Diabetes* **46**, 34-39 (1997).
202. G. Marodon, S. Fisson, B. Levacher, M. Fabre, B. L. Salomon, D. Klatzmann, Induction of antigen-specific tolerance by intrathymic injection of lentiviral vectors, *Blood* **108**, 2972-2978 (2006).
203. C. Kurts, R. M. Sutherland, G. Davey, M. Li, A. M. Lew, E. Blanas, F. R. Carbone, J. F. A. P. Miller, W. R. Heath, CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose, *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 12703-12707 (1999).
204. P. S. Ohashi, S. Oehen, K. Buerki, H. Pircher, C. T. Ohashi, B. Odermatt, B. Malissen, R. M. Zinkernagel, H. Hengartner, Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice, *Cell* **65**, 305-317 (1991).
205. F. A. Harding, J. G. McArthur, J. A. Gross, D. H. Raulet, J. P. Allison, CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones, *Nature* **356**, 607-609 (1992).
206. W. L. Redmond, J. Hernandez, L. A. Sherman, Deletion of Naive CD8 T Cells Requires Persistent Antigen and Is Not Programmed by an Initial Signal from the Tolerogenic APC, *J Immunol* **171**, 6349-6354 (2003).
207. T. R. F. Smith, G. Verdeil, K. Marquardt, L. A. Sherman, Contribution of TCR Signaling Strength to CD8+ T Cell Peripheral Tolerance Mechanisms, *J Immunol* **193**, 3409-3416 (2014).
208. W. L. Redmond, B. C. Marincek, L. A. Sherman, Distinct Requirements for Deletion versus Anergy during CD8 T Cell Peripheral Tolerance In Vivo, *J Immunol* **174**, 2046-2053 (2005).
209. R. H. Schwartz, T Cell Anergy, *Annu Rev Immunol* **21**, 305-334 (2003).
210. C. C. Whiting, L. L. Su, J. T. Lin, C. G. Fathman, GRAIL: a unique mediator of CD4 T-lymphocyte unresponsiveness, *FEBS J* **278**, 47-58 (2011).

211. C. G. Fathman, N. B. Lineberry, Molecular mechanisms of CD4<sup>+</sup> T-cell anergy, *Nat Rev Immunol* **7**, 599–609 (2007).
212. S. Chikuma, S. Terawaki, T. Hayashi, R. Nabeshima, T. Yoshida, S. Shibayama, T. Okazaki, T. Honjo, PD-1-Mediated Suppression of IL-2 Production Induces CD8<sup>+</sup> T Cell Anergy In Vivo, *J Immunol* **182**, 6682–6689 (2009).
213. K. D. Bishop, J. E. Harris, J. P. Mordes, D. L. Greiner, A. A. Rossini, M. P. Czech, N. E. Phillips, Depletion of the programmed death-1 receptor completely reverses established clonal anergy in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes via an interleukin-2-dependent mechanism, *Cell Immunol* **256**, 86–91 (2009).
214. R. J. Martinez, N. Zhang, S. R. Thomas, S. L. Nandiwada, M. K. Jenkins, B. A. Binstadt, D. L. Mueller, Arthritogenic Self-Reactive CD4<sup>+</sup> T Cells Acquire an FR4<sup>hi</sup>CD73<sup>hi</sup> Anergic State in the Presence of Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells, *J Immunol* **188**, 170–181 (2012).
215. K. E. Pauken, J. L. Linehan, J. A. Spanier, N. L. Sahli, L. A. Kalekar, B. A. Binstadt, J. J. Moon, D. L. Mueller, M. K. Jenkins, B. T. Fife, Cutting Edge: Type 1 Diabetes Occurs despite Robust Anergy among Endogenous Insulin-Specific CD4 T Cells in NOD Mice, *J Immunol* **191**, 4913–4917 (2013).
216. S. Sakaguchi, Naturally Arising CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses, *Annu Rev Immunol* **22**, 531–562 (2004).
217. S. J. Szabo, B. M. Sullivan, S. L. Peng, L. H. Glimcher, Molecular Mechanisms Regulating TH1 Immune Responses, *Annu Rev Immunol* **21**, 713–758 (2003).
218. K. M. Ansel, I. Djuretic, B. Tanasa, A. Rao, Regulation of TH2 Differentiation and IL4 Locus Accessibility, *Annu Rev Immunol* **24**, 607–656 (2006).
219. T. S. Davidson, R. J. DiPaolo, J. Andersson, E. M. Shevach, Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- $\beta$ -Mediated Induction of Foxp3<sup>+</sup> T Regulatory Cells, *J Immunol* **178**, 4022–4026 (2007).
220. W. Chen, W. Jin, N. Hardegen, K. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, S. M. Wahl, Conversion of Peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Naive T Cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor Foxp3, *J Exp Med* **198**, 1875–1886 (2003).
221. A. T. Satpathy, X. Wu, J. C. Albring, K. M. Murphy, Re(de)fining the dendritic cell lineage, *Nat Immunol* **13**, ni.2467 (2012).
222. J. L. Coombes, F. Powrie, Dendritic cells in intestinal immune regulation, *Nat Rev Immunol* **8**, nri2235 (2008).

223. S. G. Zheng, J. H. Wang, W. Stohl, K. S. Kim, J. D. Gray, D. A. Horwitz, TGF- $\beta$  Requires CTLA-4 Early after T Cell Activation to Induce FoxP3 and Generate Adaptive CD4+CD25+ Regulatory Cells, *J Immunol* **176**, 3321-3329 (2006).
224. M. A. C. de Lafaille, J. J. Lafaille, Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor?, *Immunity* **30**, 626-635 (2009).
225. M. J. Benson, K. Pino-Lagos, M. Roseblatt, R. J. Noelle, All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation, *J Exp Med* **204**, 1765-1774 (2007).
226. K. Semple, A. Nguyen, Y. Yu, H. Wang, C. Anasetti, X.-Z. Yu, Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling, *Blood* **117**, 3096-3103 (2011).
227. N. Mikami, R. Kawakami, K. Y. Chen, A. Sugimoto, N. Ohkura, S. Sakaguchi, Epigenetic conversion of conventional T cells into regulatory T cells by CD28 signal deprivation, *Proc Natl Acad Sci USA* **117**, 12258-12268 (2020).
228. K. Kretschmer, I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig, H. von Boehmer, Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen, *Nat Immunol* **6**, 1219-1227 (2005).
229. S. Haxhinasto, D. Mathis, C. Benoist, The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells, *J Exp Med* **205**, 565-574 (2008).
230. S. Sauer, L. Bruno, A. Hertweck, D. Finlay, M. Leleu, M. Spivakov, Z. A. Knight, B. S. Cobb, D. Cantrell, E. O'Connor, K. M. Shokat, A. G. Fisher, M. Merckenschlager, T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR, *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 7797-7802 (2008).
231. R. K. Selvaraj, T. L. Geiger, A Kinetic and Dynamic Analysis of Foxp3 Induced in T Cells by TGF- $\beta$ , *J Immunol* **178**, 7667-7677 (2007).
232. K. W. Moore, R. de W. Malefyt, R. L. Coffman, A. O'Garra, Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor, *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765 (2001).
233. M. O. Li, Y. Y. Wan, R. A. Flavell, T Cell-Produced Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation, *Immunity* **26**, 579-591 (2007).
234. L. Fahlén, S. Read, L. Gorelik, S. D. Hurst, R. L. Coffman, R. A. Flavell, F. Powrie, T cells that cannot respond to TGF- $\beta$  escape control by CD4+CD25+ regulatory T cells, *J Exp Med* **201**, 737-746 (2005).
235. E. A. Green, L. Gorelik, C. M. McGregor, E. H. Tran, R. A. Flavell, 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 USA* **100**, 10878-10883 (2003).



236. S. You, M. Belghith, S. Cobbold, M.-A. Alyanakian, C. Gouarin, S. Barriot, C. Garcia, H. Waldmann, J.-F. Bach, L. Chatenoud, Autoimmune Diabetes Onset Results From Qualitative Rather Than Quantitative Age-Dependent Changes in Pathogenic T-Cells, *Diabetes* **54**, 1415-1422 (2005).
237. A. M. Thornton, E. M. Shevach, CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production, *J Exp Med* **188**, 287-296 (1998).
238. M. de la Rosa, S. Rutz, H. Dorninger, A. Scheffold, Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function, *Eur J Immunol* **34**, 2480-2488 (2004).
239. P. Pandiyan, L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, M. J. Lenardo, CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells, *Nat Immunol* **8**, 1353-1362 (2007).
240. T. Bopp, C. Becker, M. Klein, S. Klein-Heßling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit, E. Schmitt, Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression, *J Exp Med* **204**, 1303-1310 (2007).
241. S. Deaglio, K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.-F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom, S. C. Robson, Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression, *J Exp Med* **204**, 1257-1265 (2007).
242. W. J. Grossman, J. W. Verbsky, B. L. Tollefsen, C. Kemper, J. P. Atkinson, T. J. Ley, Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells, *Blood* **104**, 2840-2848 (2004).
243. R. S. McHugh, M. J. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. M. Shevach, M. Collins, M. C. Byrne, CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells, *Immunity* **16**, 311-323 (2002).
244. A. E. Herman, G. J. Freeman, D. Mathis, C. Benoist, CD4+CD25+ T Regulatory Cells Dependent on ICOS Promote Regulation of Effector Cells in the Prediabetic Lesion, *J Exp Med* **199**, 1479-1489 (2004).
245. D. C. Gondek, L.-F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi, R. J. Noelle, Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism, *J Immunol* **174**, 1783-1786 (2005).
246. N. Misra, J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, S. V. Kaveri, Cutting Edge: Human CD4+CD25+ T Cells Restrain the Maturation and Antigen-Presenting Function of Dendritic Cells, *J Immunol* **172**, 4676-4680 (2004).

247. J. A. Bluestone, Q. Tang, How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity?, *Curr Opin Immunol* **17**, 638-642 (2005).
248. D. A. A. Vignali, L. W. Collison, C. J. Workman, How regulatory T cells work, *Nat Rev Immunol* **8**, 523-532 (2008).
249. S. Read, V. Malmström, 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* **192**, 295-302 (2000).
250. F. Fallarino, U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M.-L. Alegre, P. Puccetti, Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells, *Nat Immunol* **4**, 1206-1212 (2003).
251. A. L. Mellor, D. H. Munn, Ido expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism, *Nat Rev Immunol* **4**, 762-774 (2004).
252. C.-T. Huang, C. J. Workman, D. Flies, X. Pan, A. L. Marson, G. Zhou, E. L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H. I. Levitsky, J. D. Powell, D. M. Pardoll, C. G. Drake, D. A. A. Vignali, Role of LAG-3 in Regulatory T Cells, *Immunity* **21**, 503-513 (2004).
253. C. J. Workman, L. S. Cauley, I.-J. Kim, M. A. Blackman, D. L. Woodland, D. A. A. Vignali, Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) Regulates the Size of the Expanding T Cell Population Following Antigen Activation In Vivo, *J Immunol* **172**, 5450-5455 (2004).
254. F. Billiard, E. Litvinova, D. Saadoun, F. Djelti, D. Klatzmann, J. L. Cohen, G. Marodon, B. L. Salomon, Regulatory and Effector T Cell Activation Levels Are Prime Determinants of In Vivo Immune Regulation, *J Immunol* **177**, 2167-2174 (2006).
255. R. J. Mellanby, D. Thomas, J. M. Phillips, A. Cooke, Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells, *Immunology* **121**, 15-28 (2007).
256. Z. Chen, A. E. Herman, M. Matos, D. Mathis, C. Benoist, Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes, *J Exp Med* **202**, 1387-1397 (2005).
257. Q. Tang, J. Y. Adams, C. Penaranda, K. Melli, E. Piaggio, E. Sgouroudis, C. A. Piccirillo, B. L. Salomon, J. A. Bluestone, Central Role of Defective Interleukin-2 Production in the Triggering of Islet Autoimmune Destruction, *Immunity* **28**, 687-697 (2008).
258. Y. Grinberg-Bleyer, A. Baeyens, S. You, R. Elhage, G. Fourcade, S. Gregoire, N. Cagnard, W. Carpentier, Q. Tang, J. Bluestone, L. Chatenoud, D. Klatzmann, B. L. Salomon, E. Piaggio, IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells, IL-2 reverses established T1D, *J Exp Med* **207**, 1871-1878 (2010).

259. C. U. Blank, W. N. Haining, W. Held, P. G. Hogan, A. Kallies, E. Lugli, R. C. Lynn, M. Philip, A. Rao, N. P. Restifo, A. Schietinger, T. N. Schumacher, P. L. Schwartzberg, A. H. Sharpe, D. E. Speiser, E. J. Wherry, B. A. Youngblood, D. Zehn, Defining 'T cell exhaustion,' *Nat Rev Immunol* **19**, 665-674 (2019).
260. J. M. Angelosanto, S. D. Blackburn, A. Crawford, E. J. Wherry, Progressive Loss of Memory T Cell Potential and Commitment to Exhaustion during Chronic Viral Infection, *J Virol* **86**, 8161-8170 (2012).
261. O. Khan, J. R. Giles, S. McDonald, S. Manne, S. F. Ngiow, K. P. Patel, M. T. Werner, A. C. Huang, K. A. Alexander, J. E. Wu, J. Attanasio, P. Yan, S. M. George, B. Bengsch, R. P. Staupe, G. Donahue, W. Xu, R. K. Amaravadi, X. Xu, G. C. Karakousis, T. C. Mitchell, L. M. Schuchter, J. Kaye, S. L. Berger, E. J. Wherry, TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion, *Nature* **571**, 211-218 (2019).
262. A. Ashkenazi, V. M. Dixit, Death Receptors: Signaling and Modulation, *Science* **281**, 1305-1308 (1998).
263. T. Brunner, R. J. Mogil, D. LaFace, N. J. Yoo, A. Mahboubi, F. Echeverri, S. J. Martin, W. R. Force, D. H. Lynch, C. F. Ware, D. R. Green, Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas, *Nature* **373**, 441-444 (1995).
264. D. R. Green, N. Droin, M. Pinkoski, Activation-induced cell death in T cells, *Immunol Rev* **193**, 70-81 (2003).
265. D. R. Green, G. Kroemer, The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death, *Science* **305**, 626-629 (2004).
266. A. Strasser, M. Pellegrini, T-lymphocyte death during shutdown of an immune response, *Trends Immunol* **25**, 610-615 (2004).
267. P. D. Hughes, G. T. Belz, K. A. Fortner, R. C. Budd, A. Strasser, P. Bouillet, Apoptosis Regulators Fas and Bim Cooperate in Shutdown of Chronic Immune Responses and Prevention of Autoimmunity, *Immunity* **28**, 197-205 (2008).
268. E. Mariño, J. Villanueva, S. Walters, D. Liuwantara, F. Mackay, S. T. Grey, CD4+CD25+ T-Cells Control Autoimmunity in the Absence of B-Cells, *Diabetes* **58**, 1568-1577 (2009).
269. S. Glisic-Milosavljevic, J. Waukau, P. Jailwala, S. Jana, H.-J. Khoo, H. Albertz, J. Woodliff, M. Koppen, R. Alemzadeh, W. Hagopian, S. Ghosh, At-Risk and Recent-Onset Type 1 Diabetic Subjects Have Increased Apoptosis in the CD4+CD25+high T-Cell Fraction, *PLoS One* **2**, e146 (2007).

270. S. Glisic-Milosavljevic, T. Wang, M. Koppen, J. Kramer, S. Ehlenbach, J. Waukau, P. Jailwala, S. Jana, R. Alemzadeh, S. Ghosh, Dynamic changes in CD4+ CD25+ high T cell apoptosis after the diagnosis of type 1 diabetes: T1D partial remission and apoptosis of CD4+ CD25+ high T cells, *Clin Exp Immunol* **150**, 75-82 (2007).
271. S. A. Long, K. Cerosaletti, P. L. Bollyky, M. Tatum, H. Shilling, S. Zhang, Z.-Y. Zhang, C. Pihoker, S. Sanda, C. Greenbaum, J. H. Buckner, Defects in IL-2R Signaling Contribute to Diminished Maintenance of FOXP3 Expression in CD4+CD25+ Regulatory T-Cells of Type 1 Diabetic Subjects, *Diabetes* **59**, 407-415 (2010).
272. G. Garg, J. R. Tyler, J. H. M. Yang, A. J. Cutler, K. Downes, M. Pekalski, G. L. Bell, S. Nutland, M. Peakman, J. A. Todd, L. S. Wicker, T. I. M. Tree, Type 1 Diabetes-Associated IL2RA Variation Lowers IL-2 Signaling and Contributes to Diminished CD4 + CD25 + Regulatory T Cell Function, *J Immunol* **188**, 4644-4653 (2012).
273. A. K. Marwaha, S. Q. Crome, C. Panagiotopoulos, K. B. Berg, H. Qin, Q. Ouyang, L. Xu, J. J. Priatel, M. K. Levings, R. Tan, Cutting Edge: Increased IL-17-Secreting T Cells in Children with New-Onset Type 1 Diabetes, *J Immunol* **185**, 3814-3818 (2010).
274. S. A. McClymont, A. L. Putnam, M. R. Lee, J. H. Esensten, W. Liu, M. A. Hulme, U. Hoffmüller, U. Baron, S. Olek, J. A. Bluestone, T. M. Brusko, Plasticity of Human Regulatory T Cells in Healthy Subjects and Patients with Type 1 Diabetes, *J Immunol* **186**, 3918-3926 (2011).
275. G. of T. 1 D. in Finland, J. A. Todd, N. M. Walker, J. D. Cooper, D. J. Smyth, K. Downes, V. Plagnol, R. Bailey, S. Nejentsev, S. F. Field, F. Payne, C. E. Lowe, J. S. Szeszko, J. P. Hafler, L. Zeitels, J. H. M. Yang, A. Vella, S. Nutland, H. E. Stevens, H. Schuilenburg, G. Coleman, M. Maisuria, W. Meadows, L. J. Smink, B. Healy, O. S. Burren, A. A. C. Lam, N. R. Ovington, J. Allen, E. Adlem, H.-T. Leung, C. Wallace, J. M. M. Howson, C. Guja, C. Ionescu-Tîrgoviște, M. J. Simmonds, J. M. Heward, S. C. L. Gough, D. B. Dunger, L. S. Wicker, D. G. Clayton, Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes, *Nat Genet* **39**, 857-864 (2007).
276. S. Jana, H. Campbell, J. Woodliff, J. Waukau, P. Jailwala, J. Ghorai, S. Ghosh, S. Glisic, The Type of Responder T-Cell Has a Significant Impact in a Human In Vitro Suppression Assay, *PLoS One* **5**, e15154 (2010).
277. G. Sebastiani, G. Ventriglia, A. Stabilini, C. Socci, C. Morsiani, A. Laurenzi, L. Nigi, C. Formichi, B. Mfarrej, A. Petrelli, G. Fousteri, T. M. Brusko, F. Dotta, M.

Battaglia, Regulatory T-cells from pancreatic lymphnodes of patients with type-1 diabetes express increased levels of microRNA miR-125a-5p that limits CCR2 expression, *Sci Rep* **7**, 6897 (2017).

278. A. Ferraro, C. Socci, A. Stabilini, A. Valle, P. Monti, L. Piemonti, R. Nano, S. Olek, P. Maffi, M. Scavini, A. Secchi, C. Staudacher, E. Bonifacio, M. Battaglia, Expansion of Th17 Cells and Functional Defects in T Regulatory Cells Are Key Features of the Pancreatic Lymph Nodes in Patients With Type 1 Diabetes, *Diabetes* **60**, 2903-2913 (2011).

279. J. M. Lawson, J. Tremble, C. Dayan, H. Beyan, R. D. G. Leslie, M. Peakman, T. I. M. Tree, Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes, *Clin Exp Immunol* **154**, 353-359 (2008).

280. A. Schneider, M. Rieck, S. Sanda, C. Pihoker, C. Greenbaum, J. H. Buckner, The Effector T Cells of Diabetic Subjects Are Resistant to Regulation via CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells, *J Immunol* **181**, 7350-7355 (2008).

281. L. E. Clough, C. J. Wang, E. M. Schmidt, G. Booth, T. Z. Hou, G. A. Ryan, L. S. K. Walker, Release from Regulatory T Cell-Mediated Suppression during the Onset of Tissue-Specific Autoimmunity Is Associated with Elevated IL-21, *J Immunol* **180**, 5393-5401 (2008).

282. S. You, N. Thieblemont, M. Alyanakian, J. Bach, L. Chatenoud, Transforming growth factor- $\beta$  and T-cell-mediated immunoregulation in the control of autoimmune diabetes, *Immunol Rev* **212**, 185-202 (2006).

283. E. R. Mercadante, U. M. Lorenz, Breaking Free of Control: How Conventional T Cells Overcome Regulatory T Cell Suppression, *Front Immunol* **7**, 193 (2016).

284. A. M. D'Alise, V. Auyeung, M. Feuerer, J. Nishio, J. Fontenot, C. Benoist, D. Mathis, The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors., *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 19857-62 (2008).

285. E.-L. Ihanola, T. Viisanen, A. M. Gazali, K. Näntö-Salonen, A. Juutilainen, L. Moilanen, R. Rintamäki, J. Pihlajamäki, R. Veijola, J. Toppari, M. Knip, J. Ilonen, T. Kinnunen, Effector T Cell Resistance to Suppression and STAT3 Signaling during the Development of Human Type 1 Diabetes, *J Immunol* **201**, 1144-1153 (2018).

286. C. Hundhausen, A. Roth, E. Whalen, J. Chen, A. Schneider, S. A. Long, S. Wei, R. Rawlings, M. Kinsman, S. P. Evanko, T. N. Wight, C. J. Greenbaum, K. Cerosaletti, J. H. Buckner, Enhanced T cell responses to IL-6 in type 1 diabetes are associated with early clinical disease and increased IL-6 receptor expression, *Sci Transl Med* **8**, 356ra119-356ra119 (2016).

287. E. A. Wohlfert, R. B. Clark, 'Vive la Résistance!' - the PI3K-Akt pathway can determine target sensitivity to regulatory T cell suppression, *Trends Immunol* **28**, 154-160 (2007).
288. R. J. Creusot, J. Postigo-Fernandez, N. Teteloshvili, Altered Function of Antigen-Presenting Cells in Type 1 Diabetes: A Challenge for Antigen-Specific Immunotherapy?, *Diabetes* **67**, 1481-1494 (2018).
289. J. D. Trudeau, J. P. Dutz, E. Arany, D. J. Hill, W. E. Fieldus, D. T. Finegood, Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes?, *Diabetes* **49**, 1-7 (2000).
290. S. A. Kassem, I. Ariel, P. S. Thornton, I. Scheimberg, B. Glaser, Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy, *Diabetes* **49**, 1325-1333 (2000).
291. M. Vives-Pi, S. Rodríguez-Fernández, I. Pujol-Autonell, How apoptotic  $\beta$ -cells direct immune response to tolerance or to autoimmune diabetes: a review., *Apoptosis* **20**, 263-72 (2015).
292. C. N. Serhan, Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology., *Nature* **510**, 92-101 (2014).
293. A. F. M. Marée, M. Komba, C. Dyck, M. Łabęcki, D. T. Finegood, L. Edelstein-Keshet, Quantifying macrophage defects in type 1 diabetes, *J Theor Biol* **233**, 533-551 (2005).
294. B. A. O'Brien, X. Geng, C. H. Orteu, Y. Huang, M. Ghoreishi, Y. Zhang, J. A. Bush, G. Li, D. T. Finegood, J. P. Dutz, A deficiency in the in vivo clearance of apoptotic cells is a feature of the NOD mouse, *J Autoimmun* **26**, 104-115 (2006).
295. S. T. Ferris, P. N. Zakharov, X. Wan, B. Calderon, M. N. Artyomov, E. R. Unanue, J. A. Carrero, The islet-resident macrophage is in an inflammatory state and senses microbial products in blood, *J Exp Med* **214**, 2369-2385 (2017).
296. P. N. Zakharov, H. Hu, X. Wan, E. R. Unanue, Single-cell RNA sequencing of murine islets shows high cellular complexity at all stages of autoimmune diabetes, *J Exp Med* **217** (2020), doi:10.1084/jem.20192362.
297. J. M. C. Welzen-Coppens, C. G. van Helden-Meeuwsen, P. J. M. Leenen, H. A. Drexhage, M. A. Versnel, Reduced numbers of dendritic cells with a tolerogenic phenotype in the prediabetic pancreas of NOD mice., *J Leukoc Biol* **92**, 1207-13 (2012).
298. W. Beumer, J. M. C. Welzen-Coppens, C. G. van Helden-Meeuwsen, S. M. Gibney, H. A. Drexhage, M. A. Versnel, The Gene Expression Profile of

CD11c+CD8 $\alpha$ - Dendritic Cells in the Pre-Diabetic Pancreas of the NOD Mouse, *PLoS One* **9**, e103404 (2014).

299. J. D. Price, N. M. Beauchamp, G. Rahir, Y. Zhao, C. C. Rieger, A. W. Lau-Kilby, K. V. Tarbell, CD8 + dendritic cell-mediated tolerance of autoreactive CD4 + T cells is deficient in NOD mice and can be corrected by blocking CD40L, *J Leukoc Biol* **95**, 325-336 (2013).

300. Y. Jin, X. Chen, R. Podolsky, D. Hopkins, L. H. C. Makala, A. Muir, J.-X. She, APC dysfunction is correlated with defective suppression of T cell proliferation in human type 1 diabetes, *Clin Immunol* **130**, 272-279 (2009).

301. E. Badami, C. Sorini, M. Coccia, V. Usuelli, L. Molteni, A. M. Bolla, M. Scavini, A. Mariani, C. King, E. Bosi, M. Falcone, Defective Differentiation of Regulatory FoxP3+ T Cells by Small-Intestinal Dendritic Cells in Patients With Type 1 Diabetes, *Diabetes* **60**, 2120-2124 (2011).

302. I. Gómez-Touriño, C. Sánchez-Espinel, A. Hernández-Fernández, Á. González-Fernández, E. Pena-González, J. Rodríguez, J. M. García-López, R. Varela-Calvino, Galectin-1 synthesis in type 1 diabetes by different immune cell types: Reduced synthesis by monocytes and Th1 cells, *Cell Immunol* **271**, 319-328 (2011).

303. D. H. Munn, A. L. Mellor, Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses, *Trends Immunol* **34**, 137-143 (2013).

304. M. Bscheider, E. C. Butcher, Vitamin D immunoregulation through dendritic cells., *Immunology* **148**, 227-36 (2016).

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

306. T. Nikolic, M. Bunk, H. A. Drexhage, P. J. M. Leenen, Bone Marrow Precursors of Nonobese Diabetic Mice Develop into Defective Macrophage-Like Dendritic Cells In Vitro, *J Immunol* **173**, 4342-4351 (2004).

307. P. A. Morel, A. C. Vasquez, M. Feili-Hariri, Immunobiology of DC in NOD mice, *J Leukoc Biol* **66**, 276-280 (1999).

308. C.-N. Lee, A. M. Lew, K. Shortman, L. Wu, NOD mice are functionally deficient in the capacity of cross-presentation., *Immunol Cell Biol* **93**, 548-57 (2015).

309. R. Peng, Y. Li, K. Brezner, S. Litherland, M. J. Clare-Salzler, Abnormal Peripheral Blood Dendritic Cell Populations in Type 1 Diabetes, *Ann NY Acad Sci* **1005**, 222-225 (2003).

310. C.-Q. Xia, R. Peng, A. V. Chernatynskaya, L. Yuan, C. Carter, J. Valentine, E. Sobel, M. A. Atkinson, M. J. Clare-Salzler, Increased IFN- $\alpha$ -Producing Plasmacytoid

- Dendritic Cells (pDCs) in Human Th1-Mediated Type 1 Diabetes: pDCs Augment Th1 Responses through IFN- $\alpha$  Production, *J Immunol* **193**, 1024-1034 (2014).
311. S. Vuckovic, G. Withers, M. Harris, D. Khalil, D. Gardiner, I. Flesch, S. Tepes, R. Greer, D. Cowley, A. Cotterill, D. N. J. Hart, Decreased blood dendritic cell counts in type 1 diabetic children, *Clin Immunol* **123**, 281-288 (2007).
312. Z. U. A. Mollah, S. Pai, C. Moore, B. J. O'Sullivan, M. J. Harrison, J. Peng, K. Phillips, J. B. Prins, J. Cardinal, R. Thomas, Abnormal NF- $\kappa$ B Function Characterizes Human Type 1 Diabetes Dendritic Cells and Monocytes, *J Immunol* **180**, 3166-3175 (2008).
313. L. Marroqui, R. S. D. Santos, A. O. de Beeck, A. C. de Brachène, L. Marselli, P. Marchetti, D. L. Eizirik, Interferon- $\alpha$  mediates human beta cell HLA class I overexpression, endoplasmic reticulum stress and apoptosis, three hallmarks of early human type 1 diabetes., *Diabetologia* **60**, 656-667 (2017).
314. N. Rabhi, E. Salas, P. Froguel, J.-S. Annicotte, Role of the Unfolded Protein Response in  $\beta$  Cell Compensation and Failure during Diabetes, *J Diabetes Res* **2014**, 1-11 (2014).
315. A. Lombardi, E. Tsomos, S. S. Hammerstad, Y. Tomer, Interferon alpha: The key trigger of type 1 diabetes, *J Autoimmun* **94**, 7-15 (2018).
316. M. L. Marre, J. W. McGinty, I.-T. T. Chow, M. E. DeNicola, N. W. Beck, S. C. Kent, A. C. Powers, R. Bottino, D. M. Harlan, C. J. Greenbaum, W. W. Kwok, J. D. Piganelli, E. A. James, Modifying Enzymes Are Elicited by ER Stress, Generating Epitopes That Are Selectively Recognized by CD4+ T Cells in Patients With Type 1 Diabetes., *Diabetes* **67**, 1356-1368 (2018).
317. X. Wan, B. H. Zinselmeyer, P. N. Zakharov, A. N. Vomund, R. Taniguchi, L. Santambrogio, M. S. Anderson, C. F. Lichti, E. R. Unanue, Pancreatic islets communicate with lymphoid tissues via exocytosis of insulin peptides, *Nature* **560**, 107-111 (2018).
318. A. McI. Mowat, Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens, *Nat Rev Immunol* **3**, 331-341 (2003).
319. C. Jung, J.-P. Hugot, F. Barreau, Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine, *J Inflamm Res* **2010**, 823710 (2010).
320. S. Strobel, A. M. Mowat, Oral tolerance and allergic responses to food proteins, *Curr Opin Allergy Cl* **6**, 207-213 (2006).
321. V. Cerovic, C. C. Bain, A. M. Mowat, S. W. F. Milling, Intestinal macrophages and dendritic cells: what's the difference?, *Trends Immunol* **35**, 270-277 (2014).



322. C. C. Bain, A. Bravo-Blas, C. L. Scott, E. G. Perdiguero, F. Geissmann, S. Henri, B. Malissen, L. C. Osborne, D. Artis, A. M. Mowat, Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice, *Nat Immunol* **15**, 929–937 (2014).
323. S. Tamoutounour, S. Henri, H. Lelouard, B. de Bovis, C. de Haar, C. J. van der Woude, A. M. Woltman, Y. Reyal, D. Bonnet, D. Sichien, C. C. Bain, A. McI. Mowat, C. R. e Sousa, L. F. Poulin, B. Malissen, M. Guilliams, CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis, *Eur J Immunol* **42**, 3150–3166 (2012).
324. F. G. Chirido, O. R. Millington, H. Beacock-Sharp, A. McI. Mowat, Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria, *Eur J Immunol* **35**, 1831–1840 (2005).
325. B. Johansson-Lindbom, M. Svensson, O. Pabst, C. Palmqvist, G. Marquez, R. Förster, W. W. Agace, Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing, *J Exp Med* **202**, 1063–1073 (2005).
326. L. Saurer, K. C. McCullough, A. Summerfield, In Vitro Induction of Mucosa-Type Dendritic Cells by All- Trans Retinoic Acid, *J Immunol* **179**, 3504–3514 (2007).
327. B. Cassani, E. J. Villablanca, F. J. Quintana, P. E. Love, A. Lacy-Hulbert, W. S. Blaner, T. Sparwasser, S. B. Snapper, H. L. Weiner, J. R. Mora, Gut-Tropic T Cells That Express Integrin  $\alpha 4\beta 7$  and CCR9 Are Required for Induction of Oral Immune Tolerance in Mice, *Gastroenterology* **141**, 2109–2118 (2011).
328. D. Mucida, Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg, H. Cheroutre, Reciprocal TH17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid, *Science* **317**, 256–260 (2007).
329. C.-M. Sun, J. A. Hall, R. B. Blank, N. Bouladoux, M. Oukka, J. R. Mora, Y. Belkaid, Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid, *J Exp Med* **204**, 1775–1785 (2007).
330. J. L. Coombes, K. R. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Cárcamo, J. Hall, C.-M. Sun, Y. Belkaid, F. Powrie, A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- $\beta$ - and retinoic acid-dependent mechanism, *J Exp Med* **204**, 1757–1764 (2007).
331. D. Esterházy, J. Loschko, M. London, V. Jove, T. Y. Oliveira, D. Mucida, Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral Treg cells and tolerance, *Nat Immunol* **17**, 545–555 (2016).

332. S. Veenbergen, L. A. van Berkel, M. F. du Pré, J. He, J. J. Karrich, L. M. M. Costes, F. Luk, Y. Simons-Oosterhuis, H. C. Raatgeep, V. Cerovic, T. Cupedo, A. M. Mowat, B. L. Kelsall, J. N. Samsom, Colonic tolerance develops in the iliac lymph nodes and can be established independent of CD103(+) dendritic cells., *Mucosal Immunol* **9**, 894-906 (2015).
333. T. Joeris, K. Müller-Luda, W. W. Agace, A. M. Mowat, Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes, *Mucosal Immunol* **10**, 845-864 (2017).
334. C. C. Bain, A. M. Mowat, Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation, *Immunol Rev* **260**, 102-117 (2014).
335. C. C. Bain, C. L. Scott, H. Uronen-Hansson, S. Gudjonsson, O. Jansson, O. Grip, M. Guilliams, B. Malissen, W. W. Agace, A. M. Mowat, Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors, *Mucosal Immunol* **6**, 498-510 (2012).
336. O. Schulz, E. Jaensson, E. K. Persson, X. Liu, T. Worbs, W. W. Agace, O. Pabst, Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions, *J Exp Med* **206**, 3101-3114 (2009).
337. L. E. Smythies, M. Sellers, R. H. Clements, M. Mosteller-Barnum, G. Meng, W. H. Benjamin, J. M. Orenstein, P. D. Smith, Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity, *J Clin Invest* **115**, 66-75 (2005).
338. V. Cerovic, S. Houston, C. Scott, A. Aumeunier, U. Yrlid, A. Mowat, S. Milling, Intestinal CD103- dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells, *Mucosal Immunol* **6**, 104 (2013).
339. U. Hadis, B. Wahl, O. Schulz, M. Hardtke-Wolenski, A. Schippers, N. Wagner, W. Müller, T. Sparwasser, R. Förster, O. Pabst, Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3+ Regulatory T Cells in the Lamina Propria, *Immunity* **34**, 237-246 (2011).
340. M. H. Jang, M.-N. Kweon, K. Iwatani, M. Yamamoto, K. Terahara, C. Sasakawa, T. Suzuki, T. Nochi, Y. Yokota, P. D. Rennert, T. Hiroi, H. Tamagawa, H. Iijima, J. Kunisawa, Y. Yuki, H. Kiyono, Intestinal villous M cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium, *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 6110-6115 (2004).
341. J. R. McDole, L. W. Wheeler, K. G. McDonald, B. Wang, V. Konjufca, K. A. Knoop, R. D. Newberry, M. J. Miller, Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine, *Nature* **483**, 345-349 (2012).

342. J. Farache, I. Koren, I. Milo, I. Gurevich, K.-W. Kim, E. Zigmond, G. C. Furtado, S. A. Lira, G. Shakhar, Luminal Bacteria Recruit CD103+ Dendritic Cells into the Intestinal Epithelium to Sample Bacterial Antigens for Presentation, *Immunity* **38**, 581-595 (2013).
343. J. H. Niess, H.-C. Reinecker, Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract, *Curr Opin Gastroen* **21**, 687-691 (2005).
344. M. Chieppa, M. Rescigno, A. Y. C. Huang, R. N. Germain, Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement, *J Exp Med* **203**, 2841-2852 (2006).
345. E. Mazzini, L. Massimiliano, G. Penna, M. Rescigno, Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1+ Macrophages to CD103+ Dendritic Cells, *Immunity* **40**, 248-261 (2014).
346. D. Mucida, N. Kutchukhidze, A. Erazo, M. Russo, J. J. Lafaille, M. A. C. de Lafaille, Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs, *J Clin Invest* **115**, 1923-1933 (2005).
347. H. Zeng, R. Zhang, B. Jin, L. Chen, Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance, *Cell Mol Immunol* **12**, 566-571 (2015).
348. N. Gagliani, C. F. Magnani, S. Huber, M. E. Gianolini, M. Pala, P. Licon-Limon, B. Guo, D. R. Herbert, A. Bulfone, F. Trentini, C. D. Serio, R. Bacchetta, M. Andreani, L. Brockmann, S. Gregori, R. A. Flavell, M.-G. Roncarolo, Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells, *Nat Med* **19**, 739-746 (2013).
349. C. F. Magnani, G. Alberigo, R. Bacchetta, G. Serafini, M. Andreani, M. G. Roncarolo, S. Gregori, Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells, *Eur J Immunol* **41**, 1652-1662 (2011).
350. Y. Chen, V. Kuchroo, J. Inobe, D. Hafler, H. Weiner, Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis, *Science* **265**, 1237-1240 (1994).
351. H. L. Weiner, A. P. da Cunha, F. Quintana, H. Wu, Oral tolerance, *Immunol Rev* **241**, 241-259 (2011).
352. S. J. Turley, J.-W. Lee, N. Dutton-Swain, D. Mathis, C. Benoist, Endocrine self and gut non-self intersect in the pancreatic lymph nodes, *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 17729-17733 (2005).

353. J. Paronen, P. Klemetti, J. M. Kantele, E. Savilahti, J. Perheentupa, H. K. Åkerblom, O. Vaarala, Glutamate Decarboxylase-Reactive Peripheral Blood Lymphocytes From Patients With IDDM Express Gut-Specific Homing Receptor  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, *Diabetes* **46**, 583-588 (1997).
354. A. Hanninen, M. Salmi, O. Simell, S. Jalkanen, Mucosa-associated (beta 7-integrinhigh) lymphocytes accumulate early in the pancreas of NOD mice and show aberrant recirculation behavior, *Diabetes* **45**, 1173-1180 (1996).
355. H. M. McGuire, A. Vogelzang, C. S. Ma, W. E. Hughes, P. A. Silveira, S. G. Tangye, D. Christ, D. Fulcher, M. Falcone, C. King, A Subset of Interleukin-21+ Chemokine Receptor CCR9+ T Helper Cells Target Accessory Organs of the Digestive System in Autoimmunity, *Immunity* **34**, 602-615 (2011).
356. M. C. G. Miranda, R. P. Oliveira, L. Torres, S. L. F. Aguiar, N. Pinheiro-Rosa, L. Lemos, M. A. Guimarães, D. Reis, T. Silveira, Ê. Ferreira, T. G. Moreira, D. C. Cara, T. U. Maioli, B. L. Kelsall, D. Carlos, A. M. C. Faria, Frontline Science: Abnormalities in the gut mucosa of non-obese diabetic mice precede the onset of type 1 diabetes, *J Leukoc Biol* **106**, 513-529 (2019).
357. M. Tiittanen, M. Westerholm-Ormio, M. Verkasalo, E. Savilahti, O. Vaarala, Infiltration of forkhead box P3-expressing cells in small intestinal mucosa in coeliac disease but not in type 1 diabetes, *Clin Exp Immunol* **152**, 498-507 (2008).
358. L. G. P. de Marquesini, J. Fu, K. J. Connor, A. J. Bishop, N. E. McLintock, C. Pope, F. S. Wong, C. M. Dayan, IFN-gamma and IL-10 islet-antigen-specific T cell responses in autoantibody-negative first-degree relatives of patients with type 1 diabetes., *Diabetologia* **53**, 1451-60 (2010).
359. E. Savilathi, T. Ormala, T. Saukkonen, U. Sandini-Pohjavuori, J. M. Kantele, A. Arato, J. Ilonen, H. K. Åkerblom, Jejuna of patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) show signs of immune activation, *Clin Exp Immunol* **116**, 70-77 (1999).
360. M. Westerholm-Ormio, O. Vaarala, P. Pihkala, J. Ilonen, E. Savilahti, Immunologic Activity in the Small Intestinal Mucosa of Pediatric Patients With Type 1 Diabetes, *Diabetes* **52**, 2287-2295 (2003).
361. R. M. Rezende, L. M. Cox, H. L. Weiner, Mucosal tolerance therapy in humans: Past and future, *Clin Exp Neuroimmunol* **10**, 20-31 (2019).
362. F. Song, Z. Guan, I. E. Gienapp, T. Shawler, J. Benson, C. C. Whitacre, The thymus plays a role in oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis., *J Immunol* **177**, 1500-9 (2006).

363. D. Daniel, D. R. Wegmann, Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23)., *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 956-960 (1996).
364. C. Ploix, I. Bergerot, N. Fabien, S. Perche, V. Moulin, C. Thivolet, Protection Against Autoimmune Diabetes With Oral Insulin Is Associated With the Presence of IL-4 Type 2 T-Cells in the Pancreas and Pancreatic lymph Nodes, *Diabetes* **47**, 39-44 (1998).
365. A. Muir, A. Peck, M. Clare-Salzler, Y. H. Song, J. Cornelius, R. Luchetta, J. Krischer, N. Maclaren, Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon-gamma transcription., *J Clin Invest* **95**, 628-634 (1995).
366. Z. J. Zhang, L. Davidson, G. Eisenbarth, H. L. Weiner, Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin, *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 10252-10256 (1991).
367. C. Aspord, C. Thivolet, Nasal administration of CTB-insulin induces active tolerance against autoimmune diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice, *Clin Exp Immunol* **130**, 204-211 (2002).
368. C. Ploix, I. Bergerot, A. Durand, C. Czerkinsky, J. Holmgren, C. Thivolet, Oral administration of cholera toxin B-insulin conjugates protects NOD mice from autoimmune diabetes by inducing CD4+ regulatory T-cells., *Diabetes* **48**, 2150-2156 (1999).
369. I. Bergerot, G. A. Arreaza, M. J. Cameron, M. D. Burdick, R. M. Strieter, S. W. Chensue, S. Chakrabarti, T. L. Delovitch, Insulin B-chain reactive CD4+ regulatory T-cells induced by oral insulin treatment protect from type 1 diabetes by blocking the cytokine secretion and pancreatic infiltration of diabetogenic effector T-cells., *Diabetes* **48**, 1720-1729 (1999).
370. D. P. T.-T. 1 D. S. Group, Effects of Insulin in Relatives of Patients with Type 1 Diabetes Mellitus, *New Engl J Med* **346**, 1685-1691 (2002).
371. M. A. Atkinson, N. K. Maclaren, R. Luchetta, Insulinitis and Diabetes in NOD Mice Reduced by Prophylactic Insulin Therapy, *Diabetes* **39**, 933-937 (1990).
372. V. Brezar, S. Culina, M.-C. Gagnerault, R. Mallone, Short-term subcutaneous insulin treatment delays but does not prevent diabetes in NOD mice: Immunomodulation, *Eur J Immunol* **42**, 1553-1561 (2012).
373. W. C. for the T. 1 D. T. O. I. S. Group, J. P. Krischer, D. A. Schatz, B. Bundy, J. S. Skyler, C. J. Greenbaum, Effect of Oral Insulin on Prevention of Diabetes in

Relatives of Patients With Type 1 Diabetes: A Randomized Clinical Trial, *JAMA* **318**, 1891–1902 (2017).

374. K. Näntö-Salonen, A. Kupila, S. Simell, H. Siljander, T. Salonsaari, A. Hekkala, S. Korhonen, R. Erkkola, J. I. Sipilä, L. Haavisto, M. Siltala, J. Tuominen, J. Hakalax, H. Hyöty, J. Ilonen, R. Veijola, T. Simell, M. Knip, O. Simell, Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial, *Lancet* **372**, 1746–1755 (2008).

375. H. E. Larsson, M. Lundgren, B. Jonsdottir, D. Cuthbertson, J. Krischer, for the D. S. Group, Safety and efficacy of autoantigen-specific therapy with 2 doses of alum-formulated glutamate decarboxylase in children with multiple islet autoantibodies and risk for type 1 diabetes: A randomized clinical trial, *Pediatr Diabetes* **19**, 410–419 (2018).

376. T. C. Thayer, J. A. Pearson, E. D. Leenheer, S. J. Hanna, J. Boldison, J. Davies, A. Tsui, S. Ahmed, P. Easton, L. K. Siew, L. Wen, F. S. Wong, Peripheral Proinsulin Expression Controls Low-Avidity Proinsulin-Reactive CD8 T Cells in Type 1 Diabetes, *Diabetes* **65**, 3429–3439 (2016).

377. M. Nakayama, Insulin as a key autoantigen in the development of type 1 diabetes, *Diabetes Metab Res Rev* **27**, 773–777 (2011).

378. R. Maron, M. Guerau-De-Arellano, X. Zhang, H. L. Weiner, Oral Administration of Insulin to Neonates Suppresses Spontaneous and Cyclophosphamide Induced Diabetes in the NOD Mouse, *J Autoimmun* **16**, 21–28 (2001).

379. E. Bonifacio, A.-G. Ziegler, G. Klingensmith, E. Schober, P. J. Bingley, M. Rottenkolber, A. Theil, A. Eugster, R. Puff, C. Peplow, F. Buettner, K. Lange, J. Hasford, P. Achenbach, Effects of High-Dose Oral Insulin on Immune Responses in Children at High Risk for Type 1 Diabetes: The Pre-POINT Randomized Clinical Trial, *JAMA* **313**, 1541–1549 (2015).

380. K. C. Herold, B. N. Bundy, S. A. Long, J. A. Bluestone, L. A. DiMeglio, M. J. Dufort, S. E. Gitelman, P. A. Gottlieb, J. P. Krischer, P. S. Linsley, J. B. Marks, W. Moore, A. Moran, H. Rodriguez, W. E. Russell, D. Schatz, J. S. Skyler, E. Tsalikian, D. K. Wherrett, A.-G. Ziegler, C. J. Greenbaum, An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes, *New Engl J Med* **381**, 603–613 (2019).

381. S. A. Long, J. Thorpe, H. A. DeBerg, V. Gersuk, J. Eddy, K. M. Harris, M. Ehlers, K. C. Herold, G. T. Nepom, P. S. Linsley, Partial exhaustion of CD8 T cells and clinical response to teplizumab in new-onset type 1 diabetes., *Sci Immunol* **1**, eaai7793–eaai7793 (2016).

382. L. Chatenoud, E. Thervet, J. Primo, J. F. Bach, Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice, *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 123-127 (1994).
383. L. Chatenoud, J. Primo, J. F. Bach, CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice., *J Immunol* **158**, 2947-54 (1997).
384. J. S. Skyler, J. P. Krischer, J. Wolfsdorf, C. Cowie, J. P. Palmer, C. Greenbaum, D. Cuthbertson, L. E. Rafkin-Mervis, H. P. Chase, E. Leschek, Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1., *Diabetes care* **28**, 1068-76 (2005).
385. B. Phillips, K. Nylander, J. Harnaha, J. Machen, R. Lakomy, A. Styche, K. Gillis, L. Brown, D. Lafreniere, M. Gallo, J. Knox, K. Hogeland, M. Trucco, N. Giannoukakis, A Microsphere-Based Vaccine Prevents and Reverses New-Onset Autoimmune Diabetes, *Diabetes* **57**, 1544-1555 (2008).
386. F. J. Quintana, G. Murugaiyan, M. F. Farez, M. Mitsdoerffer, A.-M. Tukpah, E. J. Burns, H. L. Weiner, An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis, *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 20768-20773 (2010).
387. A. Yeste, M. C. Takenaka, I. D. Mascanfroni, M. Nadeau, J. E. Kenison, B. Patel, A.-M. Tukpah, J. A. B. Babon, M. DeNicola, S. C. Kent, D. Pozo, F. J. Quintana, Tolerogenic nanoparticles inhibit T cell-mediated autoimmunity through SOCS2., *Sci Signal* **9**, ra61 (2016).
388. S. Tsai, A. Shameli, J. Yamanouchi, X. Clemente-Casares, J. Wang, P. Serra, Y. Yang, Z. Medarova, A. Moore, P. Santamaria, Reversal of Autoimmunity by Boosting Memory-like Autoregulatory T Cells, *Immunity* **32**, 568-580 (2010).
389. A.-S. Bergot, I. Buckle, S. Cikaluru, J. L. Naranjo, C. M. Wright, G. Zheng, M. Talekar, E. E. Hamilton-Williams, R. Thomas, Regulatory T Cells Induced by Single-Peptide Liposome Immunotherapy Suppress Islet-Specific T Cell Responses to Multiple Antigens and Protect from Autoimmune Diabetes, *J Immunol* **204**, 1787-1797 (2020).
390. J. Postigo-Fernandez, R. J. Creusot, A multi-epitope DNA vaccine enables a broad engagement of diabetogenic T cells for tolerance in Type 1 diabetes, *J Autoimmun* **98**, 13-23 (2018).
391. B. O. Roep, N. Solvason, P. A. Gottlieb, J. R. F. Abreu, L. C. Harrison, G. S. Eisenbarth, L. Yu, M. Leviten, W. A. Hagopian, J. B. Buse, M. von Herrath, J. Quan, R. S. King, W. H. Robinson, P. J. Utz, H. Garren, T. B.-3021 Investigators, L. Steinman, Plasmid-Encoded Proinsulin Preserves C-Peptide While Specifically

- Reducing Proinsulin-Specific CD8<sup>+</sup> T Cells in Type 1 Diabetes, *Sci Transl Med* **5**, 191ra82-191ra82 (2013).
392. R. E. Billingham, L. Brent, P. B. Medawar, 'Actively Acquired Tolerance' of Foreign Cells, *Nature* **172**, 603-606 (1953).
393. G. D. Toit, G. Roberts, P. H. Sayre, H. T. Bahnson, S. Radulovic, A. F. Santos, H. A. Brough, D. Phippard, M. Basting, M. Feeney, V. Turcanu, M. L. Sever, M. G. Lorenzo, M. Plaut, G. Lack, Randomized Trial of Peanut Consumption in Infants at Risk for Peanut Allergy, *New Engl J Med* **372**, 803-813 (2015).
394. M. Guerau-de-Arellano, M. Martinic, C. Benoist, D. Mathis, Neonatal tolerance revisited: a perinatal window for Aire control of autoimmunity, *J Exp Med* **206**, 1245-1252 (2009).
395. G. Jhala, J. Chee, P. M. Trivedi, C. Selck, E. N. Gurzov, K. L. Graham, H. E. Thomas, T. W. H. Kay, B. Krishnamurthy, Perinatal tolerance to proinsulin is sufficient to prevent autoimmune diabetes, *JCI Insight* **1**, e86065 (2016).
396. Q. He, Y. M. Morillon, N. A. Spidale, C. J. Kroger, B. Liu, R. B. Sartor, B. Wang, R. Tisch, Thymic Development of Autoreactive T Cells in NOD Mice Is Regulated in an Age-Dependent Manner, *J Immunol* **191**, 5858-5866 (2013).
397. A. C. Apostol, K. D. C. Jensen, A. E. Beaudin, Training the Fetal Immune System Through Maternal Inflammation—A Layered Hygiene Hypothesis, *Front Immunol* **11**, 123 (2020).
398. G. Caballero-Flores, K. Sakamoto, M. Y. Zeng, Y. Wang, J. Hakim, V. Matus-Acuña, N. Inohara, G. Núñez, Maternal Immunization Confers Protection to the Offspring against an Attaching and Effacing Pathogen through Delivery of IgG in Breast Milk, *Cell Host Microbe* **25**, 313-323.e4 (2019).
399. M. Yoshida, K. Kobayashi, T. T. Kuo, L. Bry, J. N. Glickman, S. M. Claypool, A. Kaser, T. Nagaishi, D. E. Higgins, E. Mizoguchi, Y. Wakatsuki, D. C. Roopenian, A. Mizoguchi, W. I. Lencer, R. S. Blumberg, Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria, *J Clin Invest* **116**, 2142-2151 (2006).
400. E. J. Israel, S. Taylor, Z. Wu, E. Mizoguchi, R. S. Blumberg, A. Bhan, N. E. Simister, Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells, *Immunology* **92**, 69-74 (1997).
401. M. Yoshida, S. M. Claypool, J. S. Wagner, E. Mizoguchi, A. Mizoguchi, D. C. Roopenian, W. I. Lencer, R. S. Blumberg, Human Neonatal Fc Receptor Mediates Transport of IgG into Luminal Secretions for Delivery of Antigens to Mucosal Dendritic Cells, *Immunity* **20**, 769-783 (2004).



402. J. Borvak, J. Richardson, C. Medesan, F. Antohe, C. Radu, M. Simionescu, V. Ghetie, E. S. Ward, Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice., *Int Immunol* **10**, 1289-1298 (1998).
403. E. S. Ward, J. Zhou, V. Ghetie, R. J. Ober, Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans, *Int Immunol* **15**, 187-195 (2003).
404. X. Zhu, G. Meng, B. L. Dickinson, X. Li, E. Mizoguchi, L. Miao, Y. Wang, C. Robert, B. Wu, P. D. Smith, W. I. Lencer, R. S. Blumberg, MHC Class I-Related Neonatal Fc Receptor for IgG Is Functionally Expressed in Monocytes, Intestinal Macrophages, and Dendritic Cells, *J Immunol* **166**, 3266-3276 (2001).
405. D. C. Roopenian, S. Akilesh, FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age, *Nat Rev Immunol* **7**, 715-725 (2007).
406. M. Guilliams, P. Bruhns, Y. Saeys, H. Hammad, B. N. Lambrecht, The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages, *Nat Rev Immunol* **14**, nri3582 (2014).
407. A. Ohsaki, N. Venturelli, T. M. Buccigrosso, S. K. Osganian, J. Lee, R. S. Blumberg, M. K. Oyoshi, Maternal IgG immune complexes induce food allergen-specific tolerance in offspring, *J Exp Med* **215**, jem.20171163 (2017).
408. J. Knoop, A. Eugster, A. Gavrisan, R. Lickert, E.-M. Sedlmeier, S. Dietz, A. Lindner, K. Warncke, N. Hummel, A.-G. Ziegler, E. Bonifacio, Maternal Type 1 Diabetes Reduces Autoantigen-Responsive CD4+ T Cells in Offspring, *Diabetes* **69**, 661-669 (2020).
409. E. Bonifacio, M. Pflüger, S. Marienfeld, C. Winkler, M. Hummel, A.-G. Ziegler, Maternal type 1 diabetes reduces the risk of islet autoantibodies: relationships with birthweight and maternal HbA1c, *Diabetologia* **51**, 1245-1252 (2008).
410. V. Brezar, J.-C. Carel, C. Boitard, R. Mallone, Beyond the Hormone: Insulin as an Autoimmune Target in Type 1 Diabetes, *Endocr Rev* **32**, 623-669 (2011).
411. S. Culina, N. Gupta, R. Boisgard, G. Afonso, M.-C. Gagnerault, J. Dimitrov, T. Østerbye, S. Justesen, S. Luce, M. Attias, B. Kyewski, S. Buus, F. S. Wong, S. Lacroix-Desmazes, R. Mallone, Materno-Fetal Transfer of Preproinsulin Through the Neonatal Fc Receptor Prevents Autoimmune Diabetes, *Diabetes* **64**, 3532-3542 (2015).
412. F. S. Wong, L. K. Siew, G. Scott, I. J. Thomas, S. Chapman, C. Viret, L. Wen, Activation of Insulin-Reactive CD8 T-Cells for Development of Autoimmune Diabetes, *Diabetes* **58**, 1156-1164 (2009).

413. N. Gupta, S. Culina, Y. Meslier, J. Dimitrov, C. Arnoult, S. Delignat, B. Gangadharan, M. Lecerf, S. Justesen, V. Gouilleux-Gruart, B. L. Salomon, D. W. Scott, S. V. Kaveri, R. Mallone, S. Lacroix-Desmazes, Regulation of immune responses to protein therapeutics by transplacental induction of T cell tolerance, *Sci Transl Med* **7**, 275ra21-275ra21 (2015).
414. D. M. Czajkowsky, J. Hu, Z. Shao, R. J. Pleass, Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives, *EMBO Mol Med* **4**, 1015-1028 (2012).
415. A.-G. Ziegler, E. Bonifacio, Age-related islet autoantibody incidence in offspring of patients with type 1 diabetes, *Diabetologia* **55**, 1937-1943 (2012).
416. R. Bonasio, M. L. Scimone, P. Schaerli, N. Grabie, A. H. Lichtman, U. H. von Andrian, Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus, *Nat Immunol* **7**, 1092-1100 (2006).
417. M. H. Jang, N. Sougawa, T. Tanaka, T. Hirata, T. Hiroi, K. Tohya, Z. Guo, E. Umemoto, Y. Ebisuno, B.-G. Yang, J.-Y. Seoh, M. Lipp, H. Kiyono, M. Miyasaka, CCR7 Is Critically Important for Migration of Dendritic Cells in Intestinal Lamina Propria to Mesenteric Lymph Nodes, *J Immunol* **176**, 803-810 (2006).
418. A. Amrani, J. Verdaguer, P. Serra, S. Tafuro, R. Tan, P. Santamaria, Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T-cell population, *Nature* **406**, 739-742 (2000).
419. T. DeLong, T. A. Wiles, R. L. Baker, B. Bradley, G. Barbour, R. Reisdorph, M. Armstrong, R. L. Powell, N. Reisdorph, N. Kumar, C. M. Elso, M. DeNicola, R. Bottino, A. C. Powers, D. M. Harlan, S. C. Kent, S. I. Mannering, K. Haskins, Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion., *Science* **351**, 711-4 (2016).
420. T. A. Wiles, T. DeLong, R. L. Baker, B. Bradley, G. Barbour, R. L. Powell, N. Reisdorph, K. Haskins, An insulin-IAPP hybrid peptide is an endogenous antigen for CD4 T cells in the non-obese diabetic mouse., *J Autoimmun* **78**, 11-18 (2016).
421. B. Akinci, S. Yener, F. Bayraktar, S. Yesil, Allergic reactions to human insulin: a review of current knowledge and treatment options., *Endocrine* **37**, 33-9 (2009).
422. J. Jacquier, C. L. Chik, P. A. Senior, A practical, clinical approach to the assessment and management of suspected insulin allergy., *Diabet Med* **30**, 977-85 (2013).
423. C. C. Patterson, G. G. Dahlquist, E. Gyürüs, A. Green, G. Soltész, E. S. Group, Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study., *Lancet* **373**, 2027-33 (2009).

424. A.-G. Ziegler, M. Pflueger, C. Winkler, P. Achenbach, B. Akolkar, J. P. Krischer, E. Bonifacio, Accelerated progression from islet autoimmunity to diabetes is causing the escalating incidence of type 1 diabetes in young children., *J Autoimmun* **37**, 3-7 (2011).

# ANNEXE

**Conventional and Neo-antigenic Peptides Presented by  $\beta$ -Cells  
Are Targeted by Circulating Naïve CD8+ T Cells in Type 1  
Diabetic and Healthy Donors**

Cell Metabolism, 2018

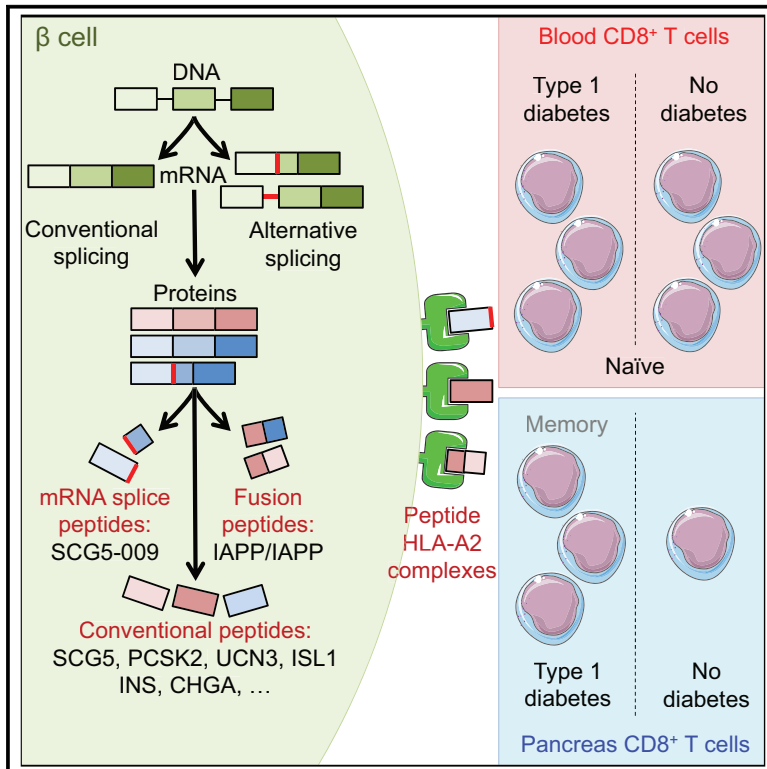
## Résumé.

Le but de cette étude était d'identifier de nouveaux épitopes présentés par les cellules  $\beta$  et potentiellement impliqués dans le développement des réponses T auto-immunes et du DT1. Il s'agissait de mieux caractériser « l'image » que la cellule  $\beta$  donne d'elle-même au système immunitaire, avec l'idée qu'elle n'est pas simplement une cible passive mais participe à sa propre destruction. Pour cela, des lignées cellulaires de cellules  $\beta$  humaines ont été cultivées en conditions basales ou inflammatoires (IFN- $\gamma$  seul ou en combinaison avec TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) et leurs complexes CMH/peptide ont été isolés. Par des méthodes de HLA-peptidomique (spectrométrie de masse) et de transcriptomique, différents épitopes ont été mis en évidence, provenant soit d'antigènes déjà décrits (par exemple l'insuline), ou de nouveaux antigènes tels que la sécrétogranine (SCG)-5, l'urocortine (UCN)-3 et la proconvertase (PCSK)-2. Une grande partie de ces peptides sont issus de protéines présentes dans les granules d'insuline. Ils sont reconnus par des LT CD8+ de patients diabétiques ou d'individus sains, présents dans le sang à des fréquences similaires. En revanche, ils ne sont détectés que dans le pancréas des patients DT1. Ces observations sur les nouveaux antigènes identifiés rejoignent celles précédemment publiées par le laboratoire en utilisant des antigènes déjà connus (Culina et al, Sci Immunol 2018), montrant l'existence d'une auto-immunité bénigne universelle dans le sang de tous les individus et une séquestration de la fraction des LT engagés dans le processus auto-immun au niveau du pancréas, sélectivement chez les patients DT1. Au cours de cette étude, j'ai vérifié l'expression du HLA-A2 à la surface des cellules  $\beta$ , cultivées dans différentes conditions inflammatoires, par Western Blot et cytométrie de flux. L'exposition aux cytokines pro-inflammatoires induisait une augmentation massive de cette expression qui n'était pas si appréciable en cytométrie mais bien plus évident par Western blot. Cette hausse d'expression de l'HLA de classe I en condition inflammatoire est bien connue, et se traduit par un nombre plus important de peptides liés présentés à la surface, comme documenté par les expériences de spectrométrie de masse. L'autre message clé de ces expériences que j'ai conduites sur l'expression de l'HLA de classe I en condition basale et inflammatoire est que cette hausse d'expression n'est pas observée dans des îlots pancréatiques primaires issus de donneurs d'organes. Cela reflète probablement la condition de stress déjà présente à l'état basal dans ces préparations primaires, liée aux conditions péri-mortem du donneur ainsi qu'à la procédure d'isolement des îlots.

# Cell Metabolism

## Conventional and Neo-antigenic Peptides Presented by $\beta$ Cells Are Targeted by Circulating Naïve CD8<sup>+</sup> T Cells in Type 1 Diabetic and Healthy Donors

### Graphical Abstract



### Authors

Sergio Gonzalez-Duque,  
Marie Eliane Azoury, Maikel L. Colli, ...,  
Yann Verdier, Joelle Vinh,  
Roberto Mallone

### Correspondence

roberto.mallone@inserm.fr

### In Brief

Mallone et al. use peptidomics and transcriptomics to identify the epitopes presented by  $\beta$  cells that trigger type 1 diabetes (T1D) autoimmunity. Multiple pathways, including conventional processing and mRNA and peptide splicing, are involved in epitope generation and presentation; these epitopes are selectively recognized by pancreas-infiltrating CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in T1D patients.

### Highlights

- Peptide HLA class I presentation by  $\beta$  cells is increased by inflammatory cytokines
- Peptide sources feature several insulin granule proteins, e.g., SCG5, PCSK2, UCN3
- SCG5-009 mRNA splice products and IAPP fusion peptides are also presented
- In type 1 diabetes, peptide-reactive CD8<sup>+</sup> T cells are enriched in the pancreas



Gonzalez-Duque et al., 2018, *Cell Metabolism* 28, 946–960  
December 4, 2018 © 2018 Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.007>

CellPress

# Conventional and Neo-antigenic Peptides Presented by $\beta$ Cells Are Targeted by Circulating Naïve CD8<sup>+</sup> T Cells in Type 1 Diabetic and Healthy Donors

Sergio Gonzalez-Duque,<sup>1,2,3,4</sup> Marie Eliane Azoury,<sup>1,2,3</sup> Maikel L. Colli,<sup>5</sup> Georgia Afonso,<sup>1,2,3</sup> Jean-Valery Turatsinze,<sup>5</sup> Laura Nigi,<sup>6</sup> Ana Ines Lalanne,<sup>1,2,3</sup> Guido Sebastiani,<sup>6</sup> Alexia Carré,<sup>1,2,3</sup> Sheena Pinto,<sup>7</sup> Slobodan Culina,<sup>1,2,3</sup> Noémie Corcos,<sup>1,2,3</sup> Marco Bugliani,<sup>8</sup> Piero Marchetti,<sup>8</sup> Mathieu Armanet,<sup>9</sup> Marc Diedisheim,<sup>1,2,3,10</sup> Bruno Kyewski,<sup>7</sup> Lars M. Steinmetz,<sup>11,12</sup> Søren Buus,<sup>13</sup> Sylvaine You,<sup>1,2,3</sup> Daniele Dubois-Laforgue,<sup>1,2,3,10</sup> Etienne Larger,<sup>1,2,3,10</sup> Jean-Paul Beressi,<sup>14</sup> Graziella Bruno,<sup>15</sup> Francesco Dotta,<sup>6</sup> Raphael Scharfmann,<sup>1,2,3</sup> Decio L. Eizirik,<sup>5,16</sup> Yann Verdier,<sup>4,16</sup> Joelle Vinh,<sup>4,16</sup> and Roberto Mallone<sup>1,2,3,10,17,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U1016, Cochin Institute, 75014 Paris, France

<sup>2</sup>CNRS, UMR8104, Cochin Institute, 75014 Paris, France

<sup>3</sup>Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, 75014 Paris, France

<sup>4</sup>ESPCI Paris, PSL University, Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique, CNRS USR3149, 75005 Paris, France

<sup>5</sup>Université Libre de Bruxelles Center for Diabetes Research and Welbio, Medical Faculty, Université Libre de Bruxelles, 1070 Brussels, Belgium

<sup>6</sup>University of Siena, Department of Medicine, Surgery and Neuroscience, Diabetes Unit and Fondazione Umberto di Mario ONLUS, Toscana Life Sciences, 53100 Siena, Italy

<sup>7</sup>DKFZ, Division of Developmental Immunology, 69120 Heidelberg, Germany

<sup>8</sup>University of Pisa, Department of Clinical and Experimental Medicine, 56124 Pisa, Italy

<sup>9</sup>Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Cell Therapy Unit, Saint Louis Hospital, 75010 Paris, France

<sup>10</sup>Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Service de Diabétologie, Cochin Hospital, 75014 Paris, France

<sup>11</sup>Stanford University, School of Medicine, Department of Genetics and Stanford Genome Technology Center, Stanford, CA 94305, USA

<sup>12</sup>European Molecular Biology Laboratory, Genome Biology Unit, 69117 Heidelberg, Germany

<sup>13</sup>Panum Institute, Department of International Health, Immunology and Microbiology, 2200 Copenhagen, Denmark

<sup>14</sup>Centre Hospitalier de Versailles André Mignot, Service de Diabétologie, 78150 Le Chesnay, France

<sup>15</sup>University of Turin, Department of Medical Sciences, 10126 Turin, Italy

<sup>16</sup>These authors contributed equally

<sup>17</sup>Lead Contact

\*Correspondence: [roberto.mallone@inserm.fr](mailto:roberto.mallone@inserm.fr)

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.007>

## SUMMARY

Although CD8<sup>+</sup> T-cell-mediated autoimmune  $\beta$  cell destruction occurs in type 1 diabetes (T1D), the target epitopes processed and presented by  $\beta$  cells are unknown. To identify them, we combined peptidomics and transcriptomics strategies. Inflammatory cytokines increased peptide presentation *in vitro*, paralleling upregulation of human leukocyte antigen (HLA) class I expression. Peptide sources featured several insulin granule proteins and all known  $\beta$  cell antigens, barring islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. Preproinsulin yielded HLA-A2-restricted epitopes previously described. Secretogranin V and its mRNA splice isoform SCG5-009, proconvertase-2, urocortin-3, the insulin gene enhancer protein ISL-1, and an islet amyloid polypeptide transpeptidation product emerged as antigens processed into HLA-A2-restricted epitopes, which, as those already described, were recognized by circulating naïve CD8<sup>+</sup> T cells in T1D and healthy donors and by pancreas-infiltrating cells in T1D donors. This peptidome opens new avenues to under-

stand antigen processing by  $\beta$  cells and for the development of T cell biomarkers and tolerogenic vaccination strategies.

## INTRODUCTION

Autoimmune CD8<sup>+</sup> T cells dominate the pancreatic immune infiltrates of human type 1 diabetes (T1D) (Coppieters et al., 2012) and lyse  $\beta$  cells by recognizing surface peptide-human leukocyte antigen class I (pHLA-I) complexes. Identifying these peptides is therefore critical for developing tolerogenic vaccination strategies and immune staging tools targeting islet-reactive CD8<sup>+</sup> T cells.

Most islet antigens (Ags), namely insulin (INS) and its precursor preproinsulin (PPI), glutamic acid decarboxylase (GAD65/GAD2), islet Ag (IA)-2 (PTPRN) (Mallone et al., 2007; Martinuzzi et al., 2008), and zinc transporter 8 (ZnT8/SLC30A8) (Scotto et al., 2012), have been identified based on their targeting by autoantibodies (aAbs). Other Ags such as islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP) (Mallone et al., 2007), chromogranin A (CHGA) (Li et al., 2015), and islet amyloid polypeptide (IAPP) (Standifer et al., 2006) have been identified based on studies in the non-obese diabetic mouse and/or its islet-enriched expression. A systematic

discovery effort is missing, and the available catalog may be biased by the lack of information about the peptides that are naturally processed and presented by  $\beta$  cells.

Mutated sequences in tumor proteins become preferential CD8<sup>+</sup> T cell targets (Gubin et al., 2014), possibly because they are regarded as non-self and therefore not efficiently tolerized. Similarly, other processes in  $\beta$  cells may facilitate tolerance escape: post-translational modifications (PTMs) (McGinty et al., 2014; Rondas et al., 2015), transpeptidation, i.e., the splicing and fusion of non-contiguous peptide fragments from the same protein or from different ones (Babon et al., 2016; De-long et al., 2016), and the use of alternative transcription start sites (Kracht et al., 2017). These studies have mostly focused on CD4<sup>+</sup> T cells, which are stimulated by pHLA class II complexes presented by professional Ag-presenting cells that take up  $\beta$  cell material. These indirect Ag-processing pathways do not reflect those that are specific to  $\beta$  cells. Indeed, several arguments suggest an active role of  $\beta$  cells in their own demise (Eizirik et al., 2009).

First, we recently showed that some T1D susceptibility gene variants modulate islet inflammation (Marroqui et al., 2014, 2015; Moore et al., 2009), suggesting that the  $\beta$  cell response to inflammation is genetically modulated. This response triggers cytokine/chemokine release, endoplasmic reticulum (ER) stress, and HLA-I upregulation (Eizirik et al., 2009; Marroqui et al., 2017), which facilitate a productive autoimmune response. The alternative mRNA splicing signature induced by  $\beta$  cell inflammation (Eizirik et al., 2012; Ortis et al., 2010) has received less attention but may similarly generate neo-sequences not translated in the thymus and regarded as non-self.

Second, we recently reported a circulating islet-reactive CD8<sup>+</sup> T cell repertoire that is predominantly naive and largely overlapping between T1D and healthy subjects (Culina et al., 2018). These findings reveal a general leakiness of central tolerance irrespective of T1D status, begging the question of what determines T1D progression versus the maintenance of a “benign” state of autoimmunity. One hypothesis is that the target  $\beta$  cell and its response to inflammation may be critical in the progression toward T1D in the face of similar autoimmune T cell repertoires across individuals.

In this context, it is crucial to understand the “image” that human  $\beta$  cells deliver to CD8<sup>+</sup> T cells through pHLA-I complexes. To this end, we implemented a strategy combining HLA-I peptidomics on  $\beta$  cells and RNA sequencing (RNA-seq) analysis of the splice isoforms transcribed by primary islets exposed or not to inflammatory cytokines and by thymic medullary epithelial cells (mTECs), focusing primarily on the most prevalent HLA-A2 variant.

## RESULTS

### The HLA-I Peptidome of Human $\beta$ Cells Is Enriched by Cytokine Exposure and Displays the Expected Amino Acid Length and Motifs

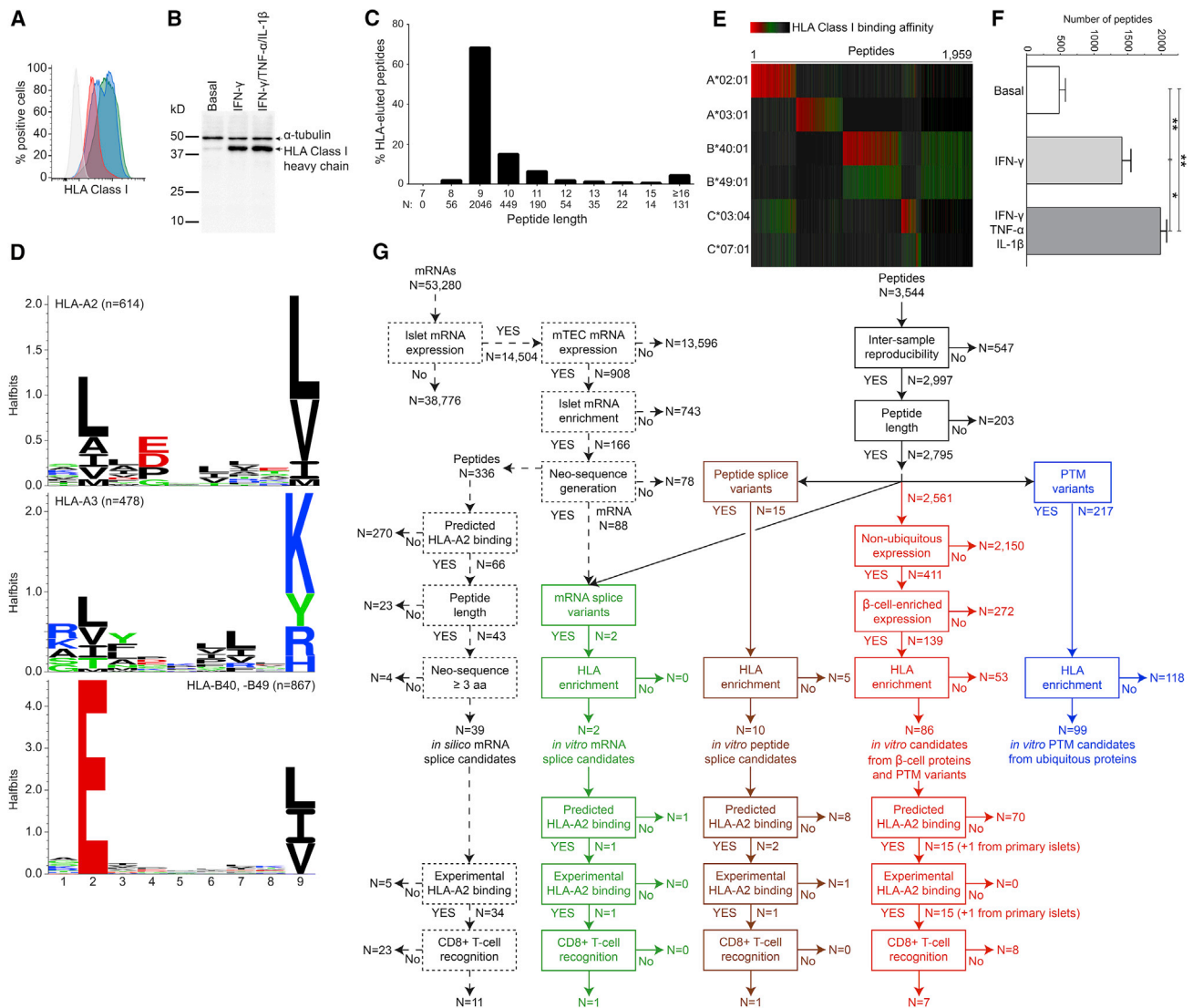
Our first epitope discovery pipeline employed HLA-I peptidomics experiments on the ECN90  $\beta$  cell line (Culina et al., 2018), which carries the HLA-I haplotype A\*02:01/A\*03:01/B\*40:01/B\*49:01/C\*03:04/C\*07:01 (hereafter A2/A3/B40/B49/C3/C7). ECN90  $\beta$  cells were cultured overnight with or without inter-

feron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), alone or in combination with tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and lysed to immunopurify pHLA-I complexes. HLA-I-bound peptides were then analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Although ECN90  $\beta$  cells expressed surface HLA-I under basal conditions, this expression was significantly upregulated upon cytokine treatment (Figures 1A and 1B), without significant cell death (Culina et al., 2018). The 2,997 eluted peptides were mostly (93%) 8- to 12-mers (Figure 1C), i.e., the length required for HLA-I binding. The amino acid (aa) identity at pHLA-I anchor positions (p2 and p9) also revealed the preferences expected based on the aforementioned HLA-I haplotype (Figures 1D and 1E). In line with the observed HLA-I upregulation, the number of eluted peptides was significantly higher in the presence of cytokines and higher in  $\beta$  cells exposed to IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  compared with IFN- $\gamma$  alone (Figure 1F).

These peptide datasets were subsequently analyzed using a stepwise bioinformatics pipeline (Figure 1G). First, only peptides that were reproducibly detected in at least two of five biological replicates (85%; all percentages are given in relation to the number of peptides retained by the previous filter) and that displayed the expected 8- to 12-aa length (93%) were selected.  $\beta$  cell-enriched peptides (both conventional and with PTMs, excluding those derived from peptide or mRNA splicing; red pipeline in Figure 1G) were subsequently filtered based on non-ubiquitous (16%) and enriched  $\beta$  cell expression (34%) of their source proteins. For other non-conventional peptides (i.e., PTM or transcriptional variants), no expression filter was applied, as these species could be  $\beta$  cell specific despite a ubiquitous expression of the source protein or mRNA. PTM peptides (methionine, tryptophan, histidine, and cysteine oxidation, tryptophan conversion to kynurenine) derived from ubiquitous proteins accounted for 8% of the whole dataset (blue pipeline in Figure 1G). Compounds potentially corresponding to peptide splice variants (0.5%; brown pipeline) were identified using an in-house script (Figure S1 and Data S1) based on reported peptide splicing preferences (Berkers et al., 2015) applied to known and putative Ags.

For peptides derived from mRNA splice variants (dotted and green pipeline in Figure 1G), the peptidomics dataset was interrogated against RNA-seq datasets from primary human islets exposed or not to cytokines and from human mTECs (Data S2). First, higher gene expression can favor peptide processing and presentation. Hence, mRNA splice variants were selected based on a median reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) > 5 in islets (27%), based on the median RPKM of known islet Ags (Eizirik et al., 2012). Second, mRNA isoforms poorly expressed in mTECs might favor T cell escape from clonal deletion. Thus, mRNA variants with an RPKM < 0.1 in mTECs or with a fold decrease > 100 versus islets were selected (6%). Third, we selected mRNA isoforms with > 10-fold higher expression in islets versus other tissues. We then analyzed the predicted aa neo-sequences encoded by these mRNA variants, yielding 88/166 mRNA variants (53%) and 336 peptide neo-sequences that were used to interrogate the HLA-I peptidomics dataset, with two hits found. Finally, each dataset was filtered to retain only those peptides found enriched in HLA-I- versus mock-purified samples, leading to the overall exclusion of 48% hits. We focused on predicted HLA-A2-restricted peptides for subsequent HLA-A2 binding and CD8<sup>+</sup> T cell recognition studies.





**Figure 1. The HLA-I Peptidome of Human  $\beta$  Cells Is Enriched by Cytokine Exposure and Displays the Expected Amino Acid Length and Motifs**

(A) HLA-I expression detected by flow cytometry on ECN90  $\beta$  cells under basal (red), IFN- $\gamma$ -stimulated (blue), and IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -stimulated conditions (green). The gray profile displays IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -stimulated cells stained with an isotype control monoclonal antibody (mAb; the identical profiles of basal and IFN- $\gamma$ -stimulated conditions are not shown).

(B) HLA-I heavy-chain expression detected by western blot on the same cell aliquots, with  $\alpha$ -tubulin bands shown as loading control.

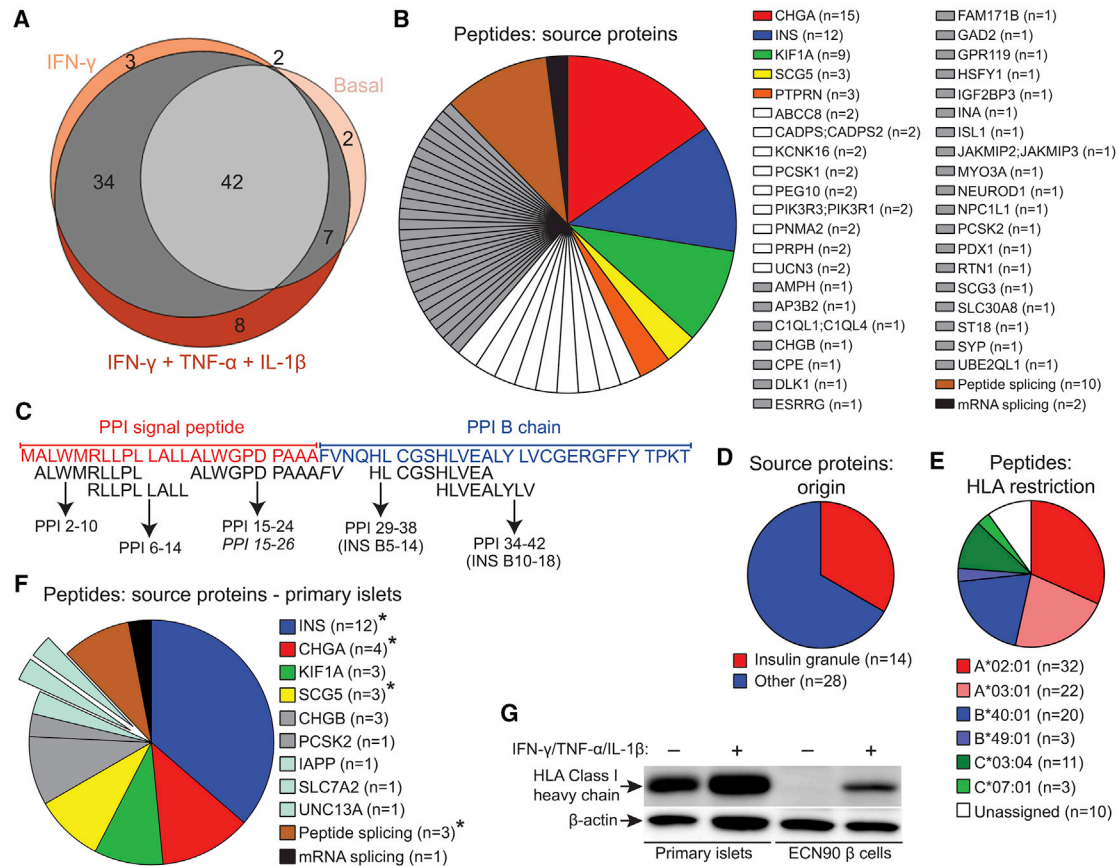
(C) Amino acid (aa) length of the 2,997 peptides detected in  $\geq 2$  out of 5 biological replicates.

(D) Sequence logo plots displaying the HLA-A2 (top), -A3 (middle), and -B40/B49 (bottom) binding motifs for the three major Gibbs clusters. The x axis shows the residue position within nonamer peptide sequences. The y axis shows the information content, with the size of each aa symbol proportional to its frequency.

(E) Heatmap of the predicted HLA-I binding affinities of nonamer peptides. Each column represents a unique peptide. Red, green, and gray shades indicate high binders ( $K_D \leq 50$  nM), low binders ( $K_D \leq 2,000$  nM), and non-binders ( $K_D > 2,000$  nM), respectively.

(F) Number (mean  $\pm$  SEM) of peptides identified in ECN90  $\beta$  cells. \*\*p = 0.008 and \*p = 0.02 by Mann-Whitney test.

(G) The bioinformatics analysis pipeline used (see STAR Methods for details). The 3,544 peptides identified were first filtered based on inter-sample reproducibility (n = 2,997) and aa length (n = 2,795). From this dataset, we identified 217 peptides derived from ubiquitous proteins carrying PTMs (blue), from which 99 (Table S2) were enriched in HLA-I-purified samples, and 15 peptide splice variants (brown; see Figure S1 for the identification strategy), from which 10 were enriched in HLA-I-purified samples. The remaining  $\beta$  cell-enriched peptides (both conventional and with PTMs; red) were filtered based on non-ubiquitous expression (n = 411),  $\beta$  cell-enriched expression (n = 139), and enrichment in HLA-I-purified samples (n = 86; Table S1). Finally, mRNA splice variants (green, n = 2) were identified by searching the HLA-I peptidomics dataset against the predicted aa neo-sequences obtained from RNA-seq analysis. For this RNA-seq pipeline (dashed boxes), 53,280 mRNAs were filtered based on islet mRNA expression (n = 14,504), low mTEC mRNA expression (n = 908), islet enrichment compared with control tissues (n = 166), and generation of a predicted aa neo-sequence (n = 88). The 336 predicted aa neo-sequences obtained from these 88 mRNA variants were analyzed in parallel for the presence of predicted HLA-2 binders (n = 66) with a 9- to 10-aa length (n = 43) and a neo-sequence of  $\geq 3$  aa (n = 39). The indicated epitope candidates were further filtered on predicted and experimental HLA-A2 binding to focus subsequent CD8 $^+$  T cell recognition studies on HLA-A2-restricted peptides (see text).



**Figure 2. pHLA-I Complexes of Human  $\beta$  Cells Are Enriched in Peptides Derived from Secretory Granule Proteins, Including Known PPI Epitopes**

(A) Number of peptides ( $n = 86$  from  $\beta$  cell-enriched proteins,  $n = 10$  transpeptidation products,  $n = 2$  mRNA splice products) identified in ECN90  $\beta$  cells after bioinformatics filtering (Figure 1G).

(B) Source proteins of the 98 peptides (detailed in Table S1).

(C) Mapping of HLA-A2-restricted PPI peptides identified in ECN90  $\beta$  cells. PTM variants (see Table S1) and a PPI<sub>15-26</sub> length variant (in italics) were also identified.

(D) Origin of the 42 proteins yielding the 98 peptides identified in ECN90  $\beta$  cells, including splice peptides generated from IAPP and NPY.

(E) Predicted HLA-I restrictions of the same peptides.

(F) Source proteins of the 33 peptides (Table S3) identified in HLA-A2<sup>+</sup> primary human islets. Asterisks indicate proteins for which some peptides identified were identical or length variants compared with those identified in ECN90  $\beta$  cells, including the identical IAPP<sub>15-17/5-10</sub> splice peptide. Exploded slices indicate source proteins not identified in ECN90  $\beta$  cells.

(G) HLA-I heavy-chain expression detected by western blot on primary islets and ECN90  $\beta$  cells under basal and IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -stimulated conditions, with  $\beta$ -actin bands shown as loading control. A representative islet preparation out of three analyzed is shown.

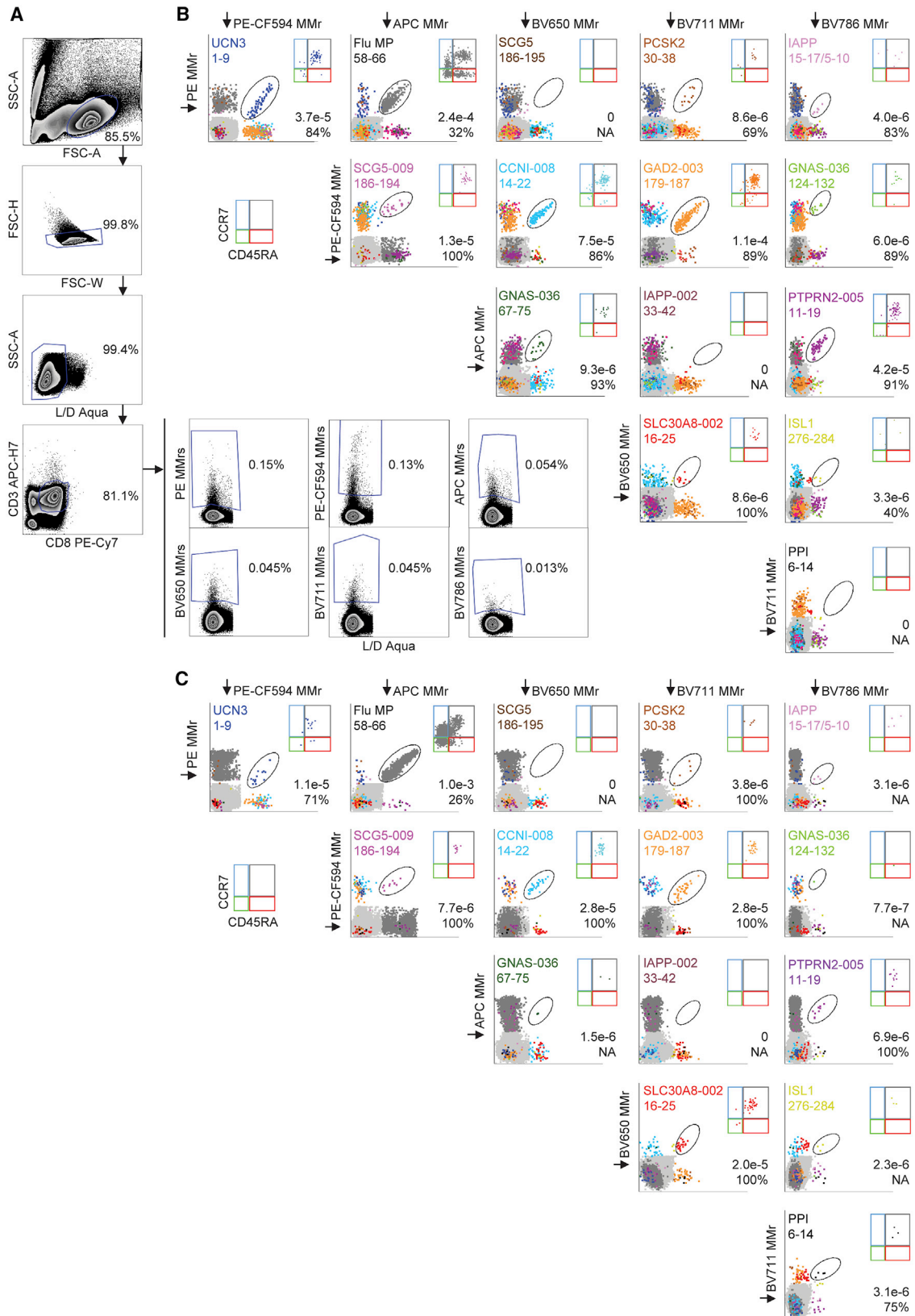
Collectively, these results show that inflammatory cytokines increase pHLA-I presentation and that these peptides display the aa signatures required for HLA-I binding.

### pHLA-I Complexes from Human $\beta$ Cells Are Enriched in Peptides Derived from Secretory Granule Proteins, Including Known PPI Epitopes

The filtered HLA-I peptidomics dataset obtained is described in Figure 2 and detailed in Table S1. While 42 of 98 (43%) eluted peptides were shared among basal and cytokine-treated conditions, 45 of 98 (46%) peptides were only detected upon cytokine exposure (Figure 2A). Also, quantitatively, most peptides (62/98; 63%) were exclusively or more presented in cytokine-treated ECN90  $\beta$  cells (Table S1).

Among the 40 source proteins of HLA-I-eluted peptides (Figure 2B), the most represented ones were the known islet Ags

CHGA ( $n = 15$  peptides) and PPI ( $n = 12$ , plus one derived from an INS-006 mRNA splice variants). Besides the other known Ag IA-2 (PTPRN;  $n = 3$ ), the five top-scoring proteins included two putative Ags: kinesin family member 1A (KIF1A;  $n = 9$ ) and secretogranin V (SCG5/7B2;  $n = 3$ , plus one derived from a SCG5-009 mRNA splice variant). Other proteins included known Ags, i.e., GAD2 (GAD65), SLC30A8 (ZnT8), and IAPP (splice peptide), and several putative ones. Notably, all the HLA-A2-restricted PPI peptides identified, namely PPI<sub>2-10</sub>, PPI<sub>6-14</sub>, PPI<sub>15-24</sub>, PPI<sub>29-38</sub> (INS<sub>B5-14</sub>), and PPI<sub>34-42</sub> (INS<sub>B10-18</sub>) (Figure 2C), are already described as major CD8<sup>+</sup> T cell epitopes, thus validating our discovery strategy. Source proteins were enriched for insulin granule products (14/42, 33%; Figure 2D), namely CHGA, INS, SCG5, PTPRN, ATP-binding cassette subfamily C member 8 (ABCC8), proprotein convertase 1 (PCSK1/PC1), uroctin-3 (UCN3), chromogranin B (CHGB), carboxypeptidase E



(legend on next page)

(CPE), proprotein convertase 2 (PCSK2/PC2), secretogranin III (SCG3), SLC30A8, and IAPP and neuropeptide Y (NPY) generating splice peptides. The predicted HLA-I restrictions of these peptides (Figure 2E) comprised all the alleles expressed by ECN90  $\beta$  cells, while 10% of restrictions could not be assigned. For peptides derived from  $\beta$  cell-enriched proteins, 11 of 98 (11%) carried PTMs, with most of them (8/11; 73%) representing variants of unmodified peptides identified in this same dataset. Most of these modifications (7/11; 64%) were M(+15.99) methionine, C(+47.98) cysteine, and W(+15.99) tryptophan oxidations, with W(+3.99) tryptophan to kynurenine transitions also detected. The 99 PTM peptides derived from ubiquitous source proteins are listed in Table S2.

To validate the results obtained using the ECN90  $\beta$  cell line, we similarly analyzed an HLA-A2<sup>+</sup> primary human islet preparation that did not share other HLA-I alleles with ECN90 cells. The major source proteins of the HLA-I-bound peptides identified were largely overlapping with those found in ECN90 cells (Figure 2F), with INS (n = 12 peptides), CHGA (n = 4), KIF1A (n = 3), and SCG5 (n = 3) ranking highest for both cells and CHGB (n = 3), PCSK2 (n = 1), and an identical IAPP splice peptide also detected in both. When analyzing the identity of individual peptides (including length and PTM variants) (Table S3), 16 of 33 (48%) were shared between ECN90 and primary islet cells. This common repertoire increased to 12 out of 13 peptides (92%) when considering only predicted HLA-A2 binders, supporting the validity of the ECN90  $\beta$  cell model. Of note, shared peptides included all the PPI species already described as CD8<sup>+</sup> T cell epitopes, SCG5<sub>186–196</sub> along with a shorter SCG5<sub>186–195</sub> variant with higher HLA-A2 affinity, and the IAPP<sub>15–17</sub>/IAPP<sub>5–10</sub> splice peptide VAL/KLQVFL. Although this product could also reflect PTPRN<sub>596–598</sub>/IAPP<sub>5–10</sub> *trans* splicing, IAPP<sub>15–17</sub>/IAPP<sub>5–10</sub> is more likely because the intra-protein vicinity of these fragments is more favorable for transpeptidation. The new hits identified were mostly predicted to bind to the HLA-I molecules not shared with ECN90 cells, barring an HLA-A2-restricted CHGB<sub>440–448</sub> peptide retained for further validation. Contrary to ECN90 cells, most peptides were detected at similar levels under basal and cytokine-treated conditions (Table S3). This mirrored a higher basal HLA-I expression in primary islets, possibly reflecting peri-mortem and tissue isolation stress conditions, which was less upregulated by cytokine treatment (Figure 1G). Moreover, detection sensitivity may have been limited by the concomitant isolation of non- $\beta$  cell peptides, i.e., pancreatic polypeptide- and glucagon-derived sequences likely eluted from  $\delta$  and  $\alpha$  cells (n = 4 and n = 5, respectively; not shown because they were excluded by the  $\beta$  cell enrichment filter).

The fragmentation profile of the identified peptides was confirmed by comparing their MS/MS spectra with those of the

corresponding synthetic peptides. Finally, the predicted HLA-A2 binding was experimentally verified (Figures S2A–S2H), leading to the final selection of 18 of 19 (95%) HLA-I-eluted peptides for CD8<sup>+</sup> T cell studies (including CHGB<sub>440–448</sub> eluted from primary islets).

Collectively, these data show that  $\beta$  cells process and present several known HLA-A2-restricted PPI epitopes and additional candidate ones, which are enriched for secretory granule products.

### **In Silico Analysis of mRNA Splice Variants Yields Additional Predicted Neo-Ag Peptides**

The RNA-seq dataset used for assigning *m/z* species was further mined *in silico*, independently of the HLA-I peptidomics pipeline, to identify other potential HLA-A2-restricted peptides (Figure 1G, dotted pipeline). Selection was based on a predicted HLA-A2 binding, a 9- to 10-aa length, and a neo-sequence stretch  $\geq 3$  aa, with 39 candidates retained (Figure S2I). These were splice variants of known  $\beta$  cell Ags (GAD2-003, IAPP-002, IAPP-004, PTPRN-021, SLC30A8-002) and of candidate ones. Most of the source mRNA splice variants (35/39, 90%) were similarly expressed in untreated and cytokine-treated islets. HLA-A2 binding was experimentally confirmed for 34 of 39 candidates (87%; Figure S2I), which were retained for further validation along with the 18 HLA-A2 binders identified by HLA-I peptidomics.

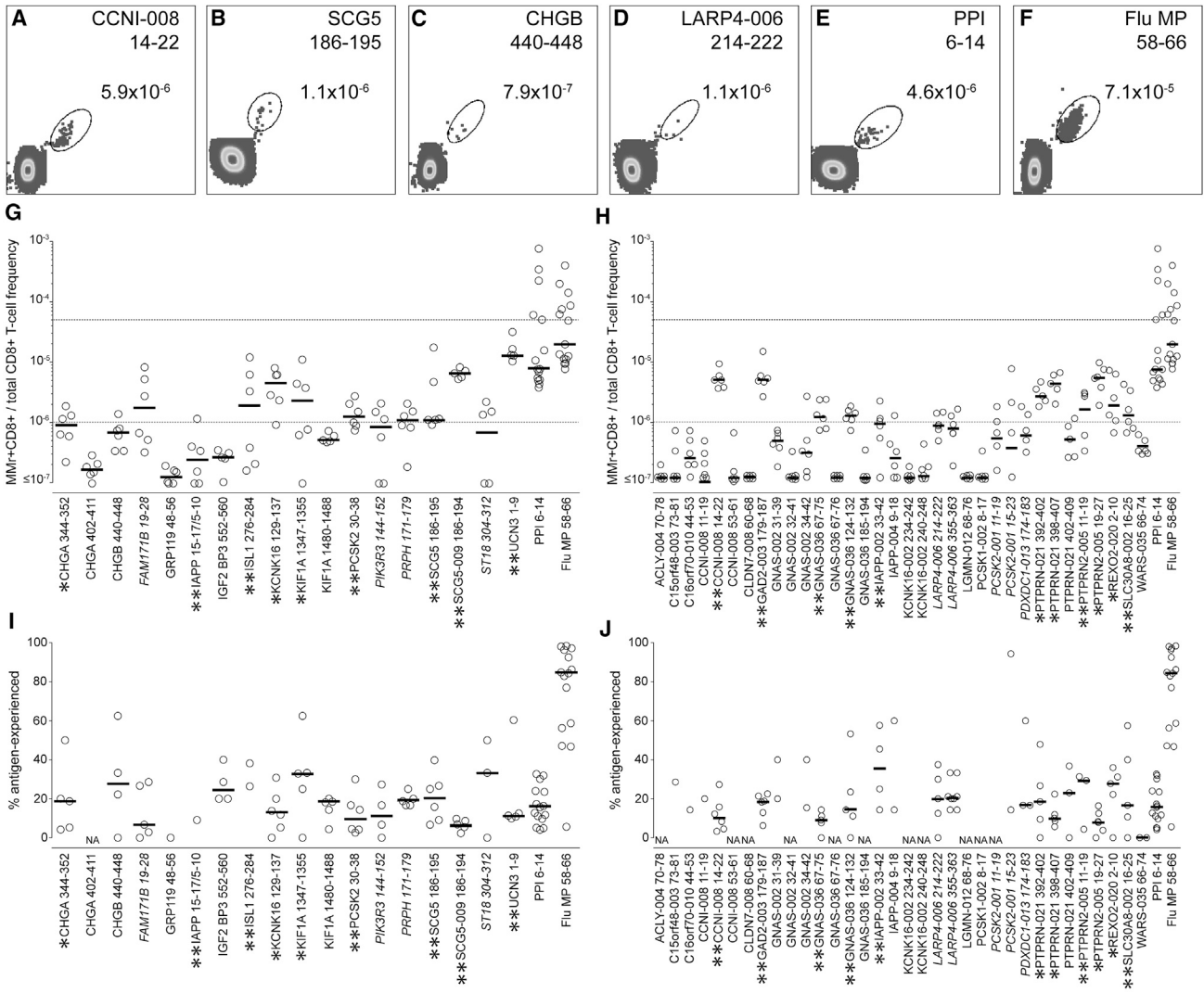
### **HLA-A2-Restricted $\beta$ Cell Peptides Are Targeted by a Circulating Naive CD8<sup>+</sup> T Cell Repertoire in Healthy Donors**

We previously documented that the vast majority of individuals, both T1D and healthy, harbor similar frequencies of circulating, predominantly naive HLA-A2-restricted CD8<sup>+</sup> T cells reactive to known PPI, GAD65, IA-2, IGRP, and ZnT8 epitopes (Culina et al., 2018). Similarly, we reasoned that the presence of a cognate naive CD8<sup>+</sup> T cell repertoire is the preliminary requirement for the immunogenicity of the HLA-A2-restricted candidate epitopes identified in the *in vitro* HLA-I peptidomics and *in silico* transcriptomics pipeline (n = 52, 18, and 34, respectively). We therefore started by screening these candidates for recognition by circulating CD8<sup>+</sup> T cells in HLA-A2<sup>+</sup> healthy donors (Table S4), using combinatorial double-coded HLA-A2 multimers (MMrs) loaded with the corresponding synthetic peptides (Culina et al., 2018). We retained those candidates that harbored a cognate naive CD8<sup>+</sup> T cell repertoire, based on (1) the frequency of this repertoire, which is typically in the range of 1–50/10<sup>6</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (Alanio et al., 2010; Culina et al., 2018), and (2) the pattern of HLA-A2 MMr staining, which is usually clustered rather than spread in the presence of a specific epitope-reactive population (James et al., 2018). The gating strategy is presented in Figure 3

### **Figure 3. Gating Strategy for the Combinatorial Analysis of $\beta$ Cell Peptide MMr<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T Cells in T1D and Healthy Subjects**

(A) Frozen-thawed peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from T1D donor D314D were magnetically depleted of CD8<sup>+</sup> cells before staining, acquisition, and analysis (see STAR Methods). Cells were sequentially gated on small lymphocytes, singlets, live cells (Live/Dead Aqua<sup>+</sup>), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells, and total PE<sup>+</sup>, PE-CF594<sup>+</sup>, APC<sup>+</sup>, BV650<sup>+</sup>, BV711<sup>+</sup>, and BV786<sup>+</sup> MMr<sup>+</sup> T cells. Using Boolean operators, these latter gates allowed selective visualization of each double-MMr<sup>+</sup> population by including only those events positive for the corresponding fluorochrome pair.

(B and C) The final readout obtained for T1D donor D314D (B) and healthy donor H170S (C) is shown for the 15 peptides analyzed. Events corresponding to each epitope-reactive population are overlaid in different colors within each plot, with MMr<sup>+</sup> events overlaid in light gray. The small dot plots on the right of each panel depict CD45RA (x axis) and CCR7 (y axis) expression in the corresponding MMr<sup>+</sup> fraction. Numbers in each panel indicate the MMr<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cell frequency out of total CD8<sup>+</sup> T cells and the percent naive (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) fraction among MMr<sup>+</sup> cells.



**Figure 4. HLA-A2-Restricted  $\beta$  Cell Peptides Are Targeted by a Circulating Naive CD8<sup>+</sup> T Cell Repertoire in Healthy Donors**

MMr<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells reactive to HLA-A2-binding  $\beta$  cell peptides (Figure S2) were stained *ex vivo* from PBMCs of 5–6 HLA-A2<sup>+</sup> healthy donors (Table S4).

(A–F) Representative dot plots of different MMr staining patterns: high frequency, clustered pattern (A; CCNI-008<sub>14-22</sub>); intermediate frequency, clustered pattern (B; SCG5<sub>186-195</sub>); low frequency, clustered pattern (C; CHGB<sub>440-448</sub>); high frequency, spread pattern (D; LARP4-006<sub>214-222</sub>); and the  $\beta$  cell PPI<sub>6-14</sub> (E) and viral Flu MP<sub>58-66</sub> (F) positive controls.

(G and H) MMr<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells reactive to  $\beta$  cell peptides identified in HLA-I peptidomics (G) and RNA-seq (H) pipelines. PPI<sub>6-14</sub> and Flu MP<sub>58-66</sub> peptides were included as controls. Frequencies out of total CD8<sup>+</sup> T cells are depicted. Dotted lines indicate the expected frequency of naive MMr<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells; bars show median values. The 20  $\beta$  cell peptides displaying the expected CD8<sup>+</sup> T cell frequency and a clustered MMr staining pattern were retained and are marked with an asterisk (and two asterisks for the 13 peptides further analyzed).  $\beta$  cell peptides in italics were excluded despite their cognate MMr<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cell frequencies because of their spread MMr staining pattern. At least  $0.6 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup> T cells were counted for each donor (median  $1.4 \times 10^6$ , range  $0.6$ – $4.9 \times 10^6$ ).

(I and J) Percent Ag-experienced cells (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>, and CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>) out of total MMr<sup>+</sup> cells for the  $\beta$  cell peptides depicted in (G) and (H), respectively. Data points with <5 MMr<sup>+</sup> cells were excluded from this analysis (median 19 MMr<sup>+</sup> cells, range 5–808 for  $\beta$  cell peptides). NA, not available.

and representative dot plots in Figures 4A–4F. Using these two criteria, several candidate epitopes displayed a cognate naive CD8<sup>+</sup> T cell repertoire in the expected range in a sizable fraction ( $\geq 50\%$ ) of the healthy individuals analyzed. The frequency of CD8<sup>+</sup> T cells recognizing the known  $\beta$  cell epitope PPI<sub>6-14</sub> previously analyzed (Culina et al., 2018) also fell in the same range, with some outliers noted. In total, 9 of 18 HLA-I-eluted peptides (50%; Figure 4G) were validated, namely CHGA<sub>344-352</sub>, insulin

gene enhancer protein ISL1<sub>276-284</sub>, potassium channel subfamily K member 16 (KCNK16)<sub>129-137</sub>, KIF1A<sub>1347-1355</sub>, PCSK2<sub>30-38</sub>, SCG5<sub>186-195</sub>, SCG5-009<sub>186-194</sub>, and UCN3<sub>1-9</sub>. Despite recognition in only 1 of 6 donors analyzed, the peptide splice product IAPP<sub>15-17</sub>/IAPP<sub>5-10</sub> was also retained, since it was identified in both ECN90 and primary islet cells. Using the same criteria, 11 of 34 candidates selected *in silico* were validated (32%; Figure 4H), namely cyclin I (CCNI)-008<sub>14-22</sub>, GAD2-003<sub>179-187</sub>,

guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit  $\alpha$  isoforms short (GNAS)-036<sub>67-75</sub>, GNAS-036<sub>124-132</sub>, IAPP-002<sub>33-42</sub>, PTPRN-021<sub>392-402</sub>, PTPRN-021<sub>398-407</sub>, phogrin/receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2 (PTPRN2)-005<sub>11-19</sub>, PTPRN2-005<sub>19-27</sub>, mitochondrial oligoribonuclease (REXO2)-020<sub>2-10</sub>, and SLC30A8-002<sub>16-25</sub>. As previously observed for other known  $\beta$  cell epitopes (Culina et al., 2018), including the PPI<sub>6-14</sub> here used as  $\beta$  cell positive control, only a minority (median 16.4%, interquartile range 8.5%–26.7%) of CD8<sup>+</sup> T cells recognizing these candidate epitopes were Ag experienced (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>, or CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>; Figures 4I and 4J). Conversely, the Flu MP<sub>58-66</sub> peptide included as viral positive control displayed the expected predominantly Ag-experienced phenotype. The complete list of the 20 candidates validated for CD8<sup>+</sup> T cell recognition is presented in Table 1. All the peptides validated came from source proteins whose gene expression was detected in islets, both under basal and cytokine-treated conditions. One notable exception was SCG5-009, whose expression was negligible under basal condition but strongly upregulated after cytokine treatment. Gene expression in mTECs was also negligible in all cases with the exception of CHGA, ISL1, and SCG5.

Collectively, these results show that most of the  $\beta$  cell peptides identified display a cognate naive CD8<sup>+</sup> T cell repertoire in the blood of healthy individuals, making them potential targets of islet autoimmunity.

### Circulating CD8<sup>+</sup> T Cells Reactive to HLA-A2-Restricted $\beta$ Cell Peptides Display Similar *Ex Vivo* Frequencies and a Predominantly Naive Phenotype in T1D and Healthy Subjects

Thirteen of the 20  $\beta$  cell peptides validated for recognition by a naive CD8<sup>+</sup> T cell repertoire were selected for further *ex vivo* combinatorial double-coded MMr validation using blood samples from HLA-A2<sup>+</sup> recent-onset T1D and healthy subjects ( $n = 10$  in each; Table S4). For naturally processed and presented peptides identified by HLA-I peptidomics, we focused on six insulin granule putative Ags, namely IAPP<sub>15-17/5-10</sub>, PCSK2<sub>30-38</sub>, SCG5<sub>186-195</sub>, SCG5-009<sub>186-194</sub>, and UCN3<sub>1-9</sub>, and the transcription factor ISL1<sub>276-284</sub>. A less focused selection was made for seven predicted mRNA splice peptides, as these may be derived from short-lived, unstable defective ribosomal products (DRiPs) (Anton and Yewdell, 2014). CCNI-008<sub>14-22</sub>, GAD2-003<sub>179-187</sub>, GNAS-036<sub>67-75</sub>, GNAS-036<sub>124-132</sub>, IAPP-002<sub>33-42</sub>, PTPRN2-005<sub>11-19</sub>, and SLC30A8-002<sub>16-25</sub> were thus selected. The frequency of circulating CD8<sup>+</sup> T cells recognizing these peptides and the control PPI<sub>6-14</sub> epitope was similar in T1D and healthy subjects (Figure 5A) and fell in the same range (1–50/10<sup>6</sup> CD8<sup>+</sup> T cells) detected in the preliminary screening performed on healthy subjects using different fluorochrome-labeled MMr combinations (Figures 4G and 4H), with the exception of IAPP-002<sub>33-42</sub> for which virtually no MMr<sup>+</sup> cells were detected. As in the screening round, frequencies were particularly high and clustered for four CD8<sup>+</sup> T cell specificities, namely SCG5-009<sub>186-194</sub>, UCN3<sub>1-9</sub>, CCNI-008<sub>14-22</sub>, and GAD2-003<sub>179-187</sub>. As reported for PPI<sub>6-14</sub> and other known  $\beta$  cell epitopes (Culina et al., 2018), these MMr<sup>+</sup> cells were predominantly naive in both T1D and healthy subjects (Figure 5B; median 8.3%, interquartile range 0%–20.0%).

Collectively, these results show that the  $\beta$  cell peptides identified are targeted by similar frequencies of predominantly naive circulating CD8<sup>+</sup> T cells in T1D and healthy subjects.

### Pancreas-Infiltrating Cells Reactive to the HLA-A2-Restricted IAPP<sub>15-17/5-10</sub>, ISL1<sub>276-284</sub>, and UCN3<sub>1-9</sub> Peptides Are Enriched in T1D Patients

Given the lack of difference in frequency or markers of prior Ag encounter observed for circulating islet-reactive CD8<sup>+</sup> T cells between T1D and healthy donors, we verified whether these reactivities were present in the pancreas-infiltrating cells of HLA-A2<sup>+</sup> T1D, aAb<sup>+</sup>, non-diabetic, and type 2 diabetes donors by *in situ* MMr staining of consecutive tissue sections from the Network for Pancreatic Organ Donors (nPOD) repository. We selected IAPP<sub>15-17/5-10</sub>, ISL1<sub>276-284</sub>, and UCN3<sub>1-9</sub>, which are representative of the frequency range detected in peripheral blood and stained positive in a preliminary screening on pancreatic sections from one T1D donor (Figure S3; with SCG-009<sub>186-194</sub> also staining positive). Figures 6A–6R display representative images, with scattered MMr<sup>+</sup> cells in the vicinity of the islet or exocrine tissue. The  $\beta$  cell ZnT8<sub>186-194</sub> peptide and the melanocyte MelanA<sub>26-35</sub> peptide provided positive and negative controls, respectively (Culina et al., 2018). Results are summarized in Figure 6S and Table S5. Whereas IAPP<sub>15-17/5-10</sub>, ISL1<sub>276-284</sub>, and UCN3<sub>1-9</sub> (and ZnT8<sub>186-194</sub>) MMr<sup>+</sup> cells were significantly more abundant than MelanA<sub>26-35</sub> MMr<sup>+</sup> cells in T1D, aAb<sup>+</sup> (barring UCN3<sub>1-9</sub>), and non-diabetic cases (barring IAPP<sub>15-17/5-10</sub> and UCN3<sub>1-9</sub>), all islet MMr<sup>+</sup> cells were enriched in the pancreata of T1D versus non-diabetic cases and also in the pancreata of aAb<sup>+</sup> versus non-diabetic cases for IAPP<sub>15-17/5-10</sub> and ISL1<sub>276-284</sub>. In contrast, islet and MelanA<sub>26-35</sub> MMr<sup>+</sup> cells were present at similar densities across all groups in pancreatic lymph node (PLN) sections from the same donors (Figure 6T), as reported for ZnT8<sub>186-194</sub> (Culina et al., 2018).

Fluorescent confocal microscopy on pancreas sections from one T1D donor (Figures 6U–6W) detected 60 CD8<sup>+</sup> cells (2.3 cells/mm<sup>2</sup>), among which 37 (61.7%) were CD45RO<sup>+</sup> and 2 CD45RO<sup>+</sup>MMr<sup>+</sup> using pooled IAPP<sub>15-17/5-10</sub>/ISL1<sub>276-284</sub>/UCN3<sub>1-9</sub> MMrs (5.4% of CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> and 3.3% of total CD8<sup>+</sup> cells), suggesting that pancreas-infiltrating islet MMr<sup>+</sup> cells are Ag-experienced CD8<sup>+</sup> T cells.

Collectively, these results show that IAPP<sub>15-17/5-10</sub>, ISL1<sub>276-284</sub>, and UCN3<sub>1-9</sub>-reactive cells are enriched in the pancreas of T1D patients, similarly to ZnT8<sub>186-194</sub>-reactive cells (Culina et al., 2018), lending support to their relevance in T1D.

## DISCUSSION

Here we provide a first catalog of the HLA-I peptidome of human  $\beta$  cells, using an immortalized  $\beta$  cell line naturally expressing the most prevalent HLA-A2 variant. This cellular model proved informative, since several HLA-A2-restricted peptides identified were also naturally processed and presented by primary human islets. The technical strengths of our approach are the combined HLA-I peptidomics and transcriptomics pipelines, the use of small cell numbers (20 × 10<sup>6</sup>) for HLA-I purification despite its low expression in  $\beta$  cells compared with professional Ag-presenting cells, and the use of a mock immunopurification to exclude peptides not bound to HLA-I. One limitation is the lower sensitivity of the

**Table 1. Summary of  $\beta$  Cell Peptides Tested for Recognition by Circulating Naive CD8<sup>+</sup> T Cells of Healthy Subjects**

Protein or mRNA	Peptide	Sequence	Type	Islet RPKM, Control	Islet RPKM, Cytokines	mTEC RPKM, HLA-II <sup>hi</sup>	mTEC RPKM, HLA-II <sup>lo</sup>	T Cell <sup>+</sup> Donors	Frequency among CD8 <sup>+</sup> Cells	% Ag Experienced	Donors with $\geq 5$ MMr <sup>+</sup> Cells	MMr Staining Pattern	Validation
ACLY-004	70–78	GLVGVNLT	mRNA splice	22.5	5.7	0.0	0.0	0/6	0.00	NA	0/6	ND	no
C15orf48-003	73–81	FLLQNPCPL	mRNA splice	9.8	18.1	0.0	0.0	0/6	$8.30 \times 10^{-8}$	29	1/6	spread	no
C16orf70-010	44–53	VLYSEQVIEV	mRNA splice	0.7	12.3	0.0	0.0	0/6	$2.54 \times 10^{-7}$	14	1/6	spread	no
CCNI-008	11–19	ILDKLNWDL	mRNA splice	41.0	25.9	0.4	0.3	1/6	$1.05 \times 10^{-7}$	20	1/6	spread	no
**CCNI-008	14–22	KLNWDLHTA	mRNA splice	41.0	25.9	0.4	0.3	4/6	$5.05 \times 10^{-6}$	10	6/6	clustered	yes
CCNI-008	53–61	SLPLNSVYV	mRNA splice	41.0	25.9	0.4	0.3	1/6	$5.20 \times 10^{-8}$	NA	0/6	spread	no
*CHGA	344–352	KMDQLAKEL	conventional	587.2	1,881.9	7.9	13.2	3/6	$9.75 \times 10^{-7}$	18	5/6	clustered	yes
CHGA	402–411	SLEAGLPLQV	conventional	587.2	1,881.9	7.9	13.2	0/6	$1.66 \times 10^{-7}$	NA	0/6	spread	no
CHGB	440–448	FLGEGHHRV	conventional	1,212.4	935.2	9.6	18.4	1/6	$6.67 \times 10^{-7}$	28	4/6	clustered	no
CLDN7-008	60–68	GMMSCKIGL	mRNA splice	20.8	17.5	0.0	0.1	0/6	0.00	NA	0/6	ND	no
FAM171B	19–28	VLLKARLVPA	conventional	4.3	4.0	6.5	5.0	3/6	$1.70 \times 10^{-6}$	7	5/6	spread	no
**GAD2-003	179–187	KIIKLFFRL	mRNA splice	22.2	21.2	0.0	0.0	5/6	$5.14 \times 10^{-6}$	19	6/6	clustered	yes
GNAS-002	31–39	ALLWLSCSI	mRNA splice	256.1	123.2	0.6	0.0	0/6	$4.92 \times 10^{-7}$	30	2/6	clustered	no
GNAS-002	32–41	LLWLSCSIAL	mRNA splice	256.1	123.2	0.6	0.0	0/6	0.00	NA	0/6	ND	no
GNAS-002	34–42	WLSCSIALL	mRNA splice	256.1	123.2	0.6	0.0	1/6	$3.16 \times 10^{-7}$	23	2/6	clustered	no
**GNAS-036	67–75	YMCTHRLLL	mRNA splice	48.9	45.1	0.0	0.0	4/6	$1.25 \times 10^{-6}$	9	5/6	clustered	yes
GNAS-036	67–76	YMCTHRLLLL	mRNA splice	48.9	45.1	0.0	0.0	0/6	0.00	NA	0/6	ND	no
**GNAS-036	124–132	AMSNLVPPV	mRNA splice	48.9	45.1	0.0	0.0	5/6	$1.30 \times 10^{-6}$	14	5/6	clustered	yes
GNAS-036	185–194	QLIDCAQYFL	mRNA splice	48.9	45.1	0.0	0.0	0/6	$4.76 \times 10^{-8}$	NA	0/6	ND	no
GPR119	48–56	AVADTLIGV	conventional	9.4	7.4	0.0	0.0	0/6	$1.26 \times 10^{-7}$	NA	0/6	spread	no
**IAPP/IAPP	15-17/5-10	VALKLQVFL	peptide splice	1,257.1	392.4	0.3	0.0	1/6	$2.45 \times 10^{-7}$	9	1/6	clustered	yes
**IAPP-002	33–42	VLSRNILLEL	mRNA splice	74.0	24.3	0.0	0.0	3/6	$9.63 \times 10^{-7}$	35	4/6	clustered	yes
IAPP-004	9–18	CLDQIPIFTV	mRNA splice	609.8	257.1	0.0	0.0	1/6	$2.59 \times 10^{-7}$	37	2/6	clustered	no
IGF2BP3	552–560	KIQEILTQV	conventional	0.2	0.4	5.3	0.9	0/5	$2.66 \times 10^{-7}$	24	4/5	spread	no
**ISL1	276–284	GLQANPVEV	conventional	26.2	27.9	17.0	26.9	3/6	$1.83 \times 10^{-6}$	26	3/6	clustered	yes
*KCNK16	129–137	ALLGIPLNV	conventional	33.3	22.5	0.0	0.0	5/6	$4.44 \times 10^{-6}$	13	6/6	clustered	yes
KCNK16-002	234–242	SLAAIWILL	mRNA splice	33.3	22.5	0.0	0.0	0/6	$4.37 \times 10^{-8}$	NA	0/6	ND	no
KCNK16-002	240–248	ILLGLAWLA	mRNA splice	33.3	22.5	0.0	0.0	0/6	$1.30 \times 10^{-7}$	NA	0/6	spread	no
*KIF1A	1347–1355	VLDTSVAYV	conventional	19.5	17.7	1.0	1.9	3/6	$2.25 \times 10^{-6}$	33	5/6	clustered	yes
KIF1A	1480–1488	KLSEMSVTL	conventional	19.5	17.7	1.0	1.9	0/5	$5.2 \times 10^{-7}$	18.2	5/5	spread	no

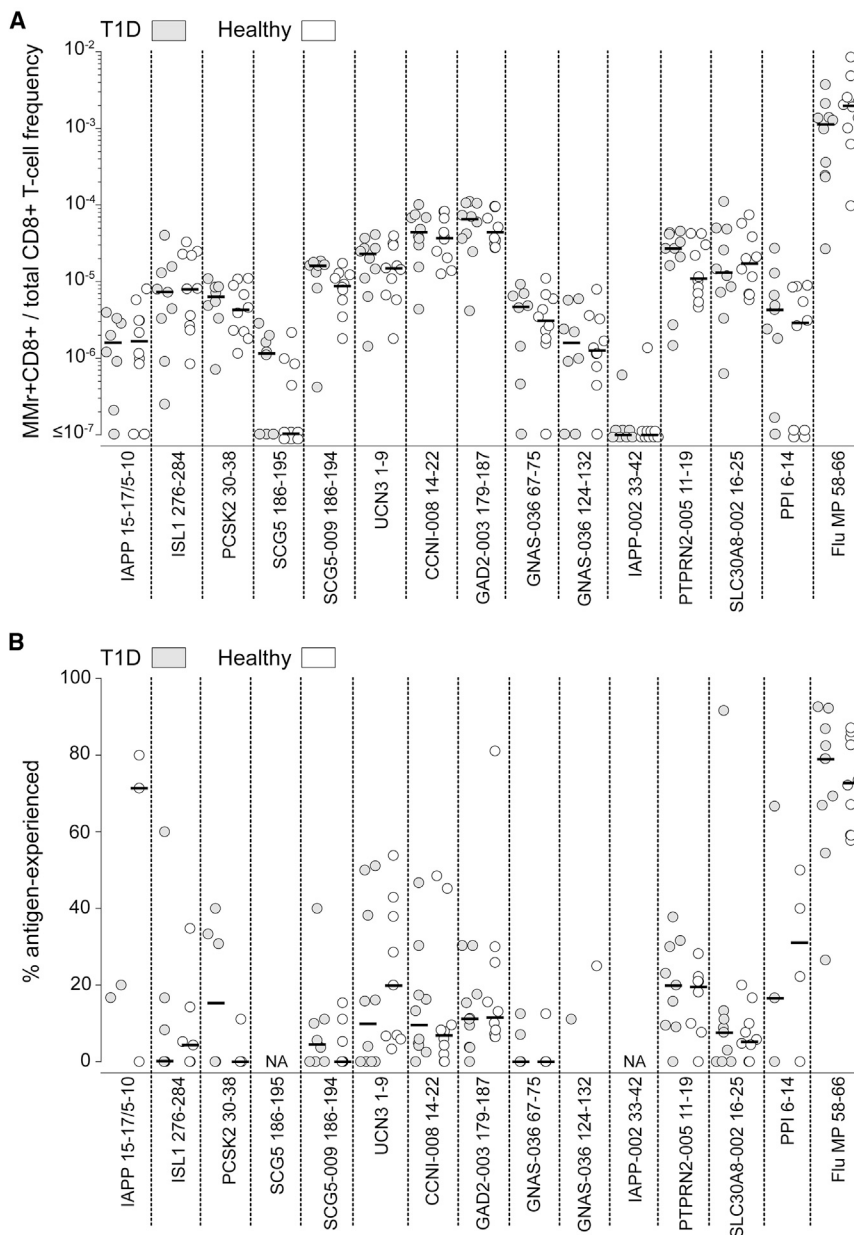
(Continued on next page)

**Table 1. Continued**

Protein or mRNA	Peptide	Sequence	Type	Islet RPKM, Control	Islet RPKM, Cytokines	mTEC RPKM, HLA-II <sup>hi</sup>	mTEC RPKM, HLA-II <sup>lo</sup>	T Cell <sup>+</sup> Donors	Frequency among CD8 <sup>+</sup> Cells	% Ag Experienced	Donors with ≥5 MMr <sup>+</sup> Cells	MMr Staining Pattern	Validation
LARP4-006	214–222	RLMDSSIYS	mRNA splice	6.8	10.5	0.0	0.0	2/6	$8.95 \times 10^{-7}$	20	4/6	spread	no
LARP4-006	355–363	YLQKETSTL	mRNA splice	6.8	10.5	0.0	0.0	2/6	$7.94 \times 10^{-7}$	21	5/6	spread	no
LGMN-012	68–76	VMINPTPGI	mRNA splice	0.0	10.9	0.0	0.0	0/6	0.00	NA	0/6	ND	no
PCSK1-002	8–17	FLFFSQIGSL	mRNA splice	16.2	13.8	0.0	0.0	0/6	0.00	NA	0/6	ND	no
**PCSK2	30–38	FTNHFLVEL	conventional	73.2	43.4	0.7	0.0	4/6	$1.25 \times 10^{-6}$	9	6/6	clustered	yes
PCSK2-001	11–19	AAAGFLFCV	mRNA splice	36.5	17.8	0.0	0.1	2/6	$5.40 \times 10^{-7}$	23	2/6	spread	no
PCSK2-001	15–23	FLFCVMVFA	mRNA splice	36.5	17.8	0.0	0.1	2/6	$3.79 \times 10^{-7}$	54	2/6	spread	no
PDXDC1-013	174–183	YLCNQDVAFL	mRNA splice	13.5	0.8	0.0	0.0	2/6	$6.21 \times 10^{-7}$	17	3/6	spread	no
PIK3R3	144–152	SLAQYNPKL	conventional	2.2	2.4	18.7	9.2	3/6	$8.50 \times 10^{-7}$	12	4/6	spread	no
PRPH	171–179	GLAEDLAAL	conventional	4.0	3.8	1.1	0.5	3/6	$1.08 \times 10^{-6}$	19	5/6	spread	no
*PTPRN-021	392–402	SLAAGVKLLEI	mRNA splice	81.5	98.3	0.0	0.0	5/5	$4.49 \times 10^{-6}$	17	5/5	clustered	yes
*PTPRN-021	398–407	KLLEILAEHV	mRNA splice	81.5	98.3	0.0	0.0	5/5	$4.30 \times 10^{-6}$	13	5/5	clustered	yes
PTPRN-021	402–409	ILAEHVHM	mRNA splice	81.5	98.3	0.0	0.0	1/5	$5.41 \times 10^{-7}$	9	4/5	clustered	no
**PTPRN2-005	11–19	LLLLLPPRV	mRNA splice	33.3	10.8	0.0	0.0	4/6	$1.67 \times 10^{-6}$	NA	3/6	clustered	yes
*PTPRN2-005	19–27	VLPAAPSSV	mRNA splice	33.3	10.8	0.0	0.0	6/6	$5.53 \times 10^{-6}$	8	6/6	clustered	yes
*REXO2-020	2–10	SVANALWIV	mRNA splice	4.2	10.5	0.0	0.0	5/6	$1.94 \times 10^{-6}$	28	5/6	clustered	yes
**SCG5	186–195	YLQGQRLDNV	conventional	252.5	163.2	3.2	2.9	5/6	$1.16 \times 10^{-6}$	20	6/6	clustered	yes
**SCG5-009	186–194	FLSGAVNRL	mRNA splice	0.3	41.4	0.0	0.0	5/5	$6.62 \times 10^{-6}$	7	5/5	clustered	yes
**SLC30A8-002	16–25	KMYAFTLESV	mRNA splice	43.1	38.1	0.3	0.0	4/6	$1.33 \times 10^{-6}$	7	2/6	clustered	yes
ST18	304–312	SLLEQAIAL	conventional	8.2	4.8	0.2	0.5	3/6	$6.70 \times 10^{-7}$	33	3/6	spread	no
**UCN3	1–9	MLMPVHFL	conventional	61.9	26.7	0.2	0.1	5/5	$1.30 \times 10^{-5}$	11	5/5	clustered	yes
WARS-035	66–74	GLDEIDSAV	mRNA splice	0.3	31.8	0.0	0.2	0/6	$3.36 \times 10^{-7}$	0	2/6	spread	no

The peptides presented in Figure 4 are alphabetically listed and classified according to type (conventional, peptide splice, and mRNA splice). The corresponding median RPKM values detected in islets (control- and cytokine-treated) and mTECs (HLA class II<sup>hi</sup> and class II<sup>lo</sup>) are shown. For proteins not arising from alternative mRNA splicing, RPKM values refer to the most prevalent islet mRNA isoform coding for the corresponding peptide. Subsequent columns detail the number of T cell<sup>+</sup> donors ( $\geq 5/10^7$  MMr<sup>+</sup> cells counted), the median MMr<sup>+</sup> frequency, the median percent Ag-experienced cells within the MMr<sup>+</sup> fraction (for peptides/donors with  $\geq 5$  MMr<sup>+</sup> cells), the number of donors with  $\geq 5$  MMr<sup>+</sup> cells, the MMr staining pattern (clustered, spread, or not detected [ND]), and the final validation outcome. The 20 validated  $\beta$  cell peptides displayed the expected CD8<sup>+</sup> T cell frequency and a clustered MMr staining pattern and are marked with an asterisk (or two asterisks for the 13 peptides further analyzed). NA, not available.





**Figure 5. Circulating CD8<sup>+</sup> T Cells Reactive to HLA-A2-Restricted  $\beta$  Cell Peptides Display Similar *Ex Vivo* Frequencies and a Predominantly Naive Phenotype in T1D and Healthy Subjects**

(A) Frequencies of MMr<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells reactive to the indicated  $\beta$  cell peptides in T1D (gray; n = 10) and healthy subjects (white; n = 10; donors listed in Table S4). PPI<sub>6-14</sub> and Flu MP<sub>58-66</sub> peptides were included as controls. At least  $0.6 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup> T cells were counted for each donor (median  $1.0 \times 10^6$ , range  $0.6\text{--}2.4 \times 10^6$ ).

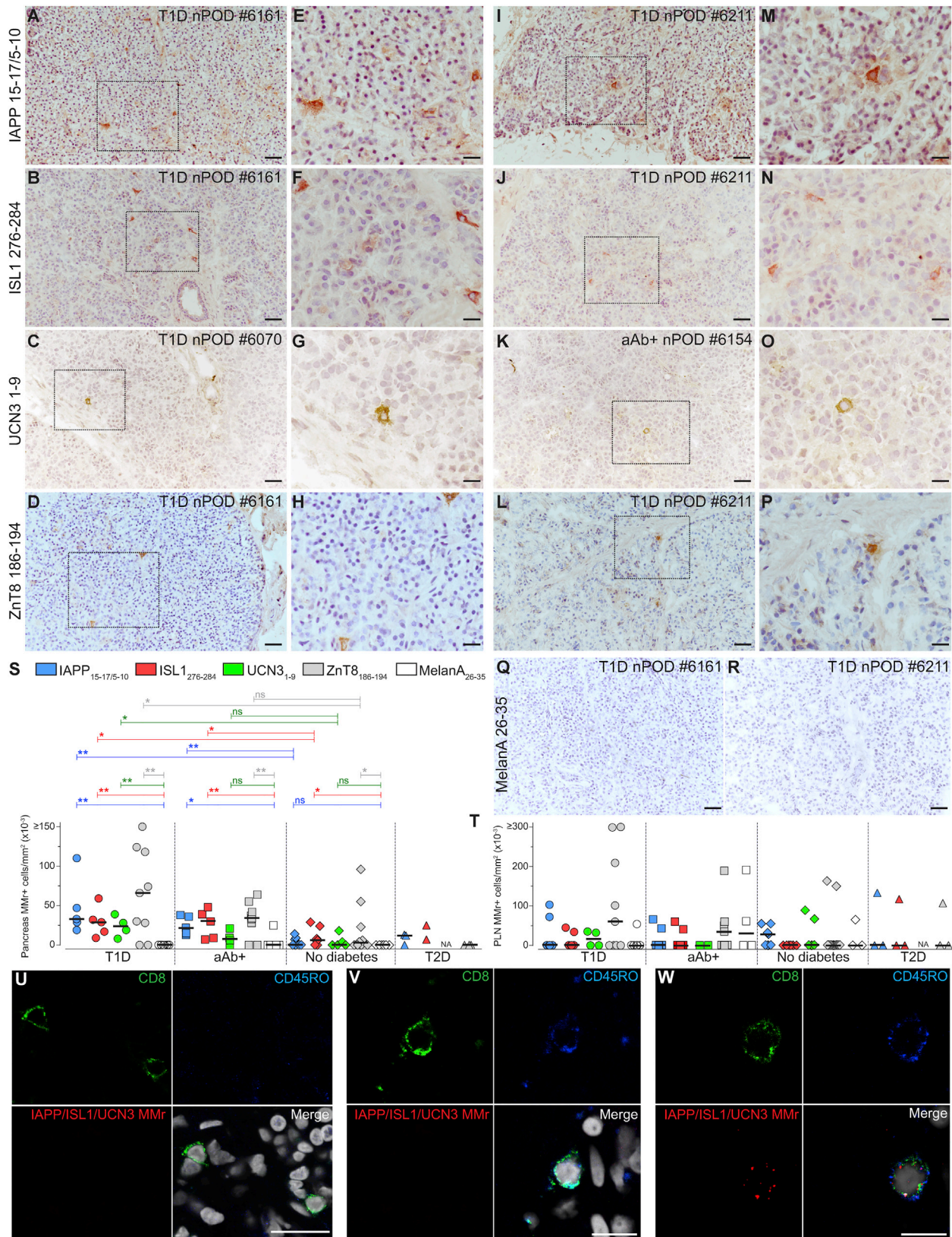
(B) Percent Ag-experienced cells out of total MMr<sup>+</sup> cells for the  $\beta$  cell peptides depicted in (A). Data points with <5 MMr<sup>+</sup> cells were excluded (median 14 MMr<sup>+</sup> cells, range 5–160 for  $\beta$  cell peptides). Bars show median values. NA, not available.

CHGA, PTPRN, GAD2, SLC30A8, and IAPP. The only known Ag missing was IGRP, which may reflect low amounts of IGRP pHLA-I complexes, as reported for murine NIT-1  $\beta$  cells (Dudek et al., 2012). The same may be true for the ZnT8<sub>186-194</sub> epitope, for which a concordant *m/z* value was identified at the MS1 level in several HLA-I-purified ECN90 samples (1/5, 5/5, and 4/5 for basal, IFN- $\gamma$ -treated, and IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -treated conditions, respectively; 1/15 mock-purified samples). More importantly, several as yet undescribed peptides were identified, many of which were derived from secretory granule proteins, namely CHGA, INS, SCG5, PTPRN, ABCC8, PCSK1, UCN3, CHGB, CPE, PCSK2, SCG3, SCL30A8, NPY, and IAPP. This is not surprising considering that granule proteins are abundantly synthesized by  $\beta$  cells, thus favoring HLA-I presentation (Bassani-Sternberg et al., 2015). Their fast turnover also increases the odds of producing misfolded proteins, which are rapidly routed toward proteasomal degradation and HLA-I presentation (Anton and Yewdell, 2014).

LC-MS/MS data-dependent acquisition discovery mode used compared with targeted strategies. Indeed, previous studies on mouse NIT-1  $\beta$  cells (Dudek et al., 2012) detected low amounts of the immunodominant IGRP<sub>206-214</sub> peptide only after using a targeted approach on IFN- $\gamma$ -treated cells. Nonetheless, our sensitivity proved sufficient to detect several known  $\beta$  cell Ags. Although this did not allow a precise quantitation of pHLA-I complexes, it allowed detection of HLA-I-bound peptides without a priori hypotheses.

Expectedly, only ~5% of the HLA-I peptidome originated from proteins preferentially expressed in  $\beta$  cells. Multiple PPI peptides described as major CD8<sup>+</sup> T cell epitopes were detected, validating our discovery approach and documenting their natural processing and presentation by  $\beta$  cells. Peptides derived from all the other known  $\beta$  cell Ags were also identified, namely

mRNA alternative splicing is another mechanism frequently leading to unstable DRiPs, which are rapidly degraded through different pathways (Anton and Yewdell, 2014). Moreover, these mRNA isoforms may translate aa neo-sequences when exons are either added or skipped compared with the canonical mRNA. We therefore performed a parallel *in silico* prediction of mRNA-translated peptide neo-sequences. Although no proof of natural processing and presentation could be provided for most of these theoretical peptide products, the finding of a naive CD8<sup>+</sup> T cell repertoire capable of recognizing them supports their potential relevance as autoimmune T cell targets. Of note, peptides derived from the alternative open reading frame INS mRNA (Kracht et al., 2017) were not detected.



(legend on next page)

Despite presentation by HLA-I molecules, peptides may still be ignored by CD8<sup>+</sup> T cells, thus not triggering an autoimmune response. This primarily reflects the absence of a cognate naive repertoire available for priming (Alanio et al., 2010). We therefore first screened healthy individuals for the presence of cognate naive CD8<sup>+</sup> T cells, which were found for several peptides. Although the poor expression of the genes encoding these proteins in mTECs may exert a facilitating effect, this is not an absolute requirement for peripheral CD8<sup>+</sup> T cell recognition. Indeed, *CHGA*, *ISL1*, and *SCG5* were expressed in mTECs and yet targeted by CD8<sup>+</sup> T cells at frequencies comparable with those of T cells recognizing Ags not expressed in mTECs, in line with the increasing appreciation that thymic clonal deletion is highly incomplete (Culina et al., 2018).

Based on our previous findings on known  $\beta$  cell epitopes (Culina et al., 2018), we did not expect differences in circulating CD8<sup>+</sup> T cells between T1D and healthy subjects, because the Ag-experienced fraction is rather limited, likely reflecting sequestration in the target tissue. This was also the case for the candidates studied herein and for the well-described control PPI<sub>6–14</sub> epitope eluted from pHLA-I complexes. Together with the reactivity against IAPP<sub>15–17/5–10</sub>, ISL1<sub>276–284</sub>, and UCN3<sub>1–9</sub>, which was preferentially detected in the pancreatic infiltrates of T1D (and aAb<sup>+</sup>) donors and localized in CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T cells in one T1D case, these findings provide a first validation of their disease relevance. The degree of evidence for a relevance to T1D is higher for those peptides targeted by CD8<sup>+</sup> T cells and naturally processed and presented by  $\beta$  cells, i.e., SCG5<sub>186–195</sub>, PCSK2<sub>30–38</sub>, UCN3<sub>1–9</sub>, and ISL1<sub>276–284</sub>. These also include the neo-antigenic peptides SCG-009<sub>186–194</sub> and IAPP<sub>15–17/5–10</sub> generated by mRNA splicing and transpeptidation, respectively.

Complementary analyses of the current HLA-I peptidomics dataset will yield additional information. First, only few PTMs were searched and a dedicated analysis is required. This should include the distinction between biological and experimentally induced PTMs, since some of them, e.g., the tryptophan to kynurenine conversion of the PPI<sub>15–24</sub> peptide, were similarly detected in the corresponding synthetic peptides. Second, an unbiased analysis of transpeptidation beyond the described aa preference rules (Berkers et al., 2015) will likely yield additional fusion peptides, which may account for up to one-third of the HLA-I peptidome (Liepe et al., 2016). Third, only HLA-A2-restricted peptides were analyzed for T cell recognition, leaving several HLA-A3- and HLA-B39-restricted candidates available for follow-up studies. HLA-B39 was expressed by the primary islets analyzed and, although rare, is

the HLA-I variant most strongly associated with T1D (Nejentsev et al., 2007).

Finally, the HLA-I peptidome obtained allows formulation of hypotheses about the Ag-processing pathways employed by  $\beta$  cells. Some peptides (UCN3<sub>1–9</sub>, IAPP<sub>15–17/5–10</sub>, PPI<sub>2–10</sub>, PPI<sub>6–14</sub>, PPI<sub>15–24</sub>) are located in the leader sequence of proteins abundantly produced by  $\beta$  cells, which is cleaved in the ER at each protein synthesis. These byproducts may therefore provide a rich peptide source for HLA-I presentation and likely follow alternative Ag-processing pathways within the ER, independent of proteasome cleavage (El Hage et al., 2008; Skowera et al., 2008). It is also noteworthy that several source proteins of HLA-I-bound peptides, i.e., *CHGA*, *INS*, *SCG5*, *PCSK1*, *UCN3*, *CHGB*, *CPE*, *PCSK2*, *SCG3*, *NPY*, and *IAPP*, are synthesized as precursors and incorporated into  $\beta$  cell granules, where they undergo intermediate processing by proconvertases to yield bioactive products. A notable example is *SCG5*, a *PCSK2* chaperone that is gradually degraded along the secretory pathway to competitively prevent the premature activation of *PCSK2* by autocatalytic cleavage (Mbikay et al., 2001). This continuous degradation may explain the abundance of HLA-I-bound *SCG5* peptides. In this respect, the C-terminal SCG5<sub>186–195</sub> peptide is located between furin (RRKRR) and *PCSK2* (KK) cleavage sites and, similar to leader sequence peptides, may behave as a by-product of the intermediate *SCG5* processing (Bartolomucci et al., 2011). The same is true for several *CHGA* peptides, e.g., CHGA<sub>344–352</sub>, which maps to the WE-14 neuropeptide produced by *CHGA* cleavage at dibasic KR motifs (Bartolomucci et al., 2011). These peptides may access the HLA-I pathway following crinophagy, i.e., the disposal of unused secretory granules through fusion with lysosomes (Goginashvili et al., 2015; Weckman et al., 2014). In this scenario, islet inflammation may provide a key switch for progression of the “benign” autoimmunity of healthy individuals toward T1D at two levels: on T cells, by impairing peripheral immunoregulation, and on  $\beta$  cells, by increasing the overall number of pHLA-I complexes available for T cell recognition.

### Limitations of This Study

One limitation of our work is that the pathogenic role of the CD8<sup>+</sup> T cells recognizing the epitopes described herein remains to be definitively established. Islets from T1D patients were not available for HLA peptidomics studies, and the enrichment of these T cells in the pancreas of patients could reflect a cause or consequence of disease. It should be noted, however, that the same uncertainty applies to all the other islet-reactive T cell specificities described to date. The capacity to kill  $\beta$  cells that has

### Figure 6. Pancreas-Infiltrating Cells Reactive to the HLA-A2-Restricted IAPP<sub>15–17/5–10</sub>, ISL1<sub>276–284</sub>, and UCN3<sub>1–9</sub> Peptides Are Enriched in T1D Patients

Pancreas sections from nPOD cases (Table S5) were immunohistochemically stained *in situ* with MMrs loaded with IAPP<sub>15–17/5–10</sub>, ISL1<sub>276–284</sub>, UCN3<sub>1–9</sub> (selected from Figure S3), positive control ZnT8<sub>186–194</sub>, and negative control melanocyte MelanA<sub>26–35</sub> peptide.

(A–D, I–L, Q, and R) Representative pancreas images (20 $\times$  magnification; scale bar, 100  $\mu$ m).

(E–H and M–P) Higher magnification of the dotted areas highlighted on the left of each panel (scale bars, 40  $\mu$ m for E and M; 38  $\mu$ m for F and N; 45  $\mu$ m for G and O; 36  $\mu$ m for H and P).

(S and T) Number of MMr<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup> section area of pancreas (S) and PLNs (T). Each point represents an individual case; bars indicate median values. \**p*  $\leq$  0.05 and \*\**p*  $\leq$  0.009 by Mann-Whitney test. NA, not assessed.

(U–W) Fluorescent confocal microscopy on pancreas sections from T1D EUnPOD case #060217 for CD8 (green), CD45RO (blue), and pooled IAPP<sub>15–17/5–10</sub>/ISL1<sub>276–284</sub>/UCN3<sub>1–9</sub> MMrs (red). Examples of CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>−</sup>MMr<sup>−</sup>, CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>MMr<sup>−</sup>, and CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>MMr<sup>+</sup> cells are shown in (U) (scale bar, 25  $\mu$ m), (V) (scale bar, 10  $\mu$ m), and (W) (scale bar, 10  $\mu$ m), respectively.

been described for some of them cannot be taken as conclusive evidence for their pathogenic role, since T cell clones obtained from T1D and healthy donors kill  $\beta$  cells to a similar extent (Culina et al., 2018). Nonetheless, we here provide two key findings: first, that these epitopes are naturally processed and presented by  $\beta$  cells and are covered by the natural CD8<sup>+</sup> T cell repertoire, hence providing potential targets for  $\beta$  cell killing; second, that the CD8<sup>+</sup> T cells recognizing them accumulate preferentially in the pancreas of T1D patients. This latter finding is unlikely to be serendipitous, as it did not apply to CD8<sup>+</sup> T cells recognizing the melanocyte MelanA<sub>26–35</sub> epitope, despite the fact that their frequency in the blood is  $\sim$ 100-fold higher than for islet epitope-reactive CD8<sup>+</sup> T cells (Culina et al., 2018).

In conclusion, the HLA-I peptidome of human  $\beta$  cells described herein provides information about the Ag-processing features of  $\beta$  cells, the targets amenable to autoimmune recognition, and a valuable tool for developing T cell biomarkers and tolerogenic vaccines.

## STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - Cell Lines
  - Primary Human Tissues and PBMCs
- METHOD DETAILS
  - Purification of pHLA-I Complexes
  - LC-MS/MS
  - RNA-Seq
  - HLA-I Peptidomics and Transcriptomics Bio-Informatics Analysis
  - HLA-A2 Binding Assays
  - HLA-A2 MMr Assays
  - In-Situ HLA-A2 MMr Staining
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
- DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes three figures, six tables, and two data files and can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.007>.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Jones, K. Zehrouni, and the Diabetology nursing and medical staff of the Cochin and A. Mignot Hospital for patient recruitment; C. Maillard for technical assistance; Univercell Biosolutions for the ECN90  $\beta$  cell line; the CyBio platform (Cochin Institute) for assistance with flow cytometry; and T. Loukanov (University of Heidelberg) for human thymi. This work was performed within the Département Hospitalo-Universitaire (DHU) AutHorS and supported by a PhD fellowship of the Ile-de-France CORDDIM and Aide aux Jeunes Diabétiques and by grants from the JDRF (1-PNF-2014-155-A-V, 2-SRA-2016-164-Q-R), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-2015-CE17-0018-01), the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20140329520), the Société Francophone du Diabète, the Association pour la Recherche sur le Diabète, and the Helmsley Charitable Trust Eisenbarth nPOD Award for Team Science (2015PG-T1D052) to R.M.; Lilly and

Fondation Bettencourt-Schueller to R.S.; European Research Council (ERC-2012-AdG) to B.K.; FRFSWelbio (CR-2015A-06) and NIH-NIDDK-HIRN Consortium (1UC4DK104166-01) to D.L.E.; and Ile-de-France SESAME 2010 (10022268), the City of Paris, and ESPCI Paris to J.V. This project received funding from the Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking (INNODIA, 115797), which receives support from the EU Horizon 2020 program, the European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations, JDRF, and the Helmsley Charitable Trust. This research was supported by nPOD, a collaborative T1D research project funded by JDRF. Organ Procurement Organizations partnering with nPOD are listed at [www.jdrfnpod.org/our-partners.php](http://www.jdrfnpod.org/our-partners.php).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, D.L.E. and R.M.; Methodology, S.G.-D., M.E.A., M.L.C., G.A., J.-V.T., A.C., A.I.L., F.D., Y.V., J.V., and R.M.; Software, S.G.-D.; Investigation, S.G.-D., M.E.A., M.L.C., G.A., J.-V.T., L.N., A.I.L., G.S., A.C., S.P., S.C., N.C., L.M.S., S.Y., F.D., D.L.E., Y.V., J.V., and R.M.; Resources, S.P., M.B., P.M., M.A., M.D., B.K., L.M.S., S.B., D.D.-L., E.L., J.-P.B., G.B., and R.S.; Data Curation, S.G.-D., M.L.C., J.-V.T., D.L.E., Y.V., J.V., and R.M.; Writing – Original Draft, D.L.E., Y.V., and R.M.; Writing – Review & Editing, S.G.-D., S.Y., M.L.C., D.L.E., Y.V., J.V., and R.M.; Visualization, S.G.-D., M.E.A., M.L.C., G.A., J.-V.T., L.N., G.S., Y.V., and R.M.; Supervision, B.K., F.D., D.L.E., Y.V., J.V., and R.M.; Funding Acquisition, S.P., B.K., S.Y., D.L.E., J.V., and R.M.

## DECLARATION OF INTERESTS

Some peptide sequences described herein are covered by pending patents filed by Inserm Transfert.

Received: January 2, 2018

Revised: May 20, 2018

Accepted: July 11, 2018

Published: August 2, 2018

## REFERENCES

- Alanio, C., Lemaitre, F., Law, H.K., Hasan, M., and Albert, M.L. (2010). Enumeration of human antigen-specific naive CD8<sup>+</sup> T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood* 115, 3718–3725.
- Anton, L.C., and Yewdell, J.W. (2014). Translating DRiPs: MHC class I immunosurveillance of pathogens and tumors. *J. Leukoc. Biol.* 95, 551–562.
- Babon, J.A., DeNicola, M.E., Blodgett, D.M., Crevecoeur, I., Buttrick, T.S., Maehr, R., Bottino, R., Naji, A., Kaddis, J., Elyaman, W., et al. (2016). Analysis of self-antigen specificity of islet-infiltrating T cells from human donors with type 1 diabetes. *Nat. Med.* 22, 1482–1487.
- Bartolomucci, A., Possenti, R., Mahata, S.K., Fischer-Colbrie, R., Loh, Y.P., and Salton, S.R. (2011). The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. *Endocr. Rev.* 32, 755–797.
- Bassani-Sternberg, M., Pletscher-Frankild, S., Jensen, L.J., and Mann, M. (2015). Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol. Cell. Proteomics* 14, 658–673.
- Berkers, C.R., de Jong, A., Schuurman, K.G., Linnemann, C., Meiring, H.D., Janssen, L., Neeffjes, J.J., Schumacher, T.N., Rodenko, B., and Ovaa, H. (2015). Definition of proteasomal peptide splicing rules for high-efficiency spliced peptide presentation by MHC Class I molecules. *J. Immunol.* 195, 4085–4095.
- Caron, E., Espona, L., Kowalewski, D.J., Schuster, H., Ternette, N., Alpizar, A., Schittenhelm, R.B., Ramarathinam, S.H., Lindestam Arlehamn, C.S., Chiek Koh, C., et al. (2015). An open-source computational and data resource to analyze digital maps of immunopeptidomes. *Elife* 4, <https://doi.org/10.7554/eLife.07661>.
- Coppieters, K.T., Dotta, F., Amirian, N., Campbell, P.D., Kay, T.W., Atkinson, M.A., Roep, B.O., and von Herrath, M.G. (2012). Demonstration of

- islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *J. Exp. Med.* 209, 51–60.
- Culina, S., Lalanne, A.I., Afonso, G., Cerosaletti, K., Pinto, S., Sebastiani, G., Kuranda, K., Nigi, L., Eugster, A., Osterby, T., et al. (2018). Islet-reactive CD8+ T cell frequencies in the pancreas, but not in blood, distinguish type 1 diabetic patients from healthy donors. *Sci. Immunol.* 3, eaao4013.
- Delong, T., Wiles, T.A., Baker, R.L., Bradley, B., Barbour, G., Reisdorph, R., Armstrong, M., Powell, R.L., Reisdorph, N., Kumar, N., et al. (2016). Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion. *Science* 351, 711–714.
- Dudek, N.L., Tan, C.T., Gorasia, D.G., Croft, N.P., Illing, P.T., and Purcell, A.W. (2012). Constitutive and inflammatory immunopeptidome of pancreatic beta-cells. *Diabetes* 61, 3018–3025.
- Eizirik, D.L., Colli, M.L., and Ortis, F. (2009). The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5, 219–226.
- Eizirik, D.L., Sammeth, M., Bouckennooghe, T., Bottu, G., Sisino, G., Igoillo-Esteve, M., Ortis, F., Santin, I., Colli, M.L., Barthson, J., et al. (2012). The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. *PLoS Genet.* 8, e1002552.
- El Hage, F., Stroobant, V., Vergnon, I., Baurain, J.F., Echchakir, H., Lazar, V., Chouaib, S., Coulie, P.G., and Mami-Chouaib, F. (2008). Preprocalcitonin signal peptide generates a cytotoxic T lymphocyte-defined tumor epitope processed by a proteasome-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 10119–10124.
- Goginashvili, A., Zhang, Z., Erbs, E., Spiegelhalter, C., Kessler, P., Mihlan, M., Pasquier, A., Krupina, K., Schieber, N., Cinque, L., et al. (2015). Insulin granules. Insulin secretory granules control autophagy in pancreatic beta cells. *Science* 347, 878–882.
- Gubin, M.M., Zhang, X., Schuster, H., Caron, E., Ward, J.P., Noguchi, T., Ivanova, Y., Hundal, J., Arthur, C.D., Krebber, W.J., et al. (2014). Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 515, 577–581.
- James, E.A., Abreu, J.R.F., McGinty, J.W., Odegard, J.M., Fillie, Y.E., Hocter, C.N., Culina, S., Ladell, K., Price, D.A., Alkanani, A., et al. (2018). Combinatorial detection of autoreactive CD8+ T cells with HLA-A2 multimers: a multi-centre study by the Immunology of Diabetes Society T Cell Workshop. *Diabetologia* 61, 658–670.
- Kracht, M.J., van Lummel, M., Nikolic, T., Joosten, A.M., Laban, S., van der Slik, A.R., van Veelen, P.A., Carlotti, F., de Koning, E.J., Hoeben, R.C., et al. (2017). Autoimmunity against a defective ribosomal insulin gene product in type 1 diabetes. *Nat. Med.* 23, 501–507.
- Li, Y., Zhou, L., Li, Y., Zhang, J., Guo, B., Meng, G., Chen, X., Zheng, Q., Zhang, L., Zhang, M., et al. (2015). Identification of autoreactive CD8+ T cell responses targeting chromogranin A in humanized NOD mice and type 1 diabetes patients. *Clin. Immunol.* 159, 63–71.
- Liepe, J., Marino, F., Sidney, J., Jeko, A., Bunting, D.E., Sette, A., Kloetzel, P.M., Stumpf, M.P., Heck, A.J., and Mishto, M. (2016). A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides. *Science* 354, 354–358.
- Mallone, R., Martinuzzi, E., Blancou, P., Novelli, G., Afonso, G., Dolz, M., Bruno, G., Chaillous, L., Chatenoud, L., Bach, J.M., et al. (2007). CD8+ T-cell responses identify beta-cell autoimmunity in human type 1 diabetes. *Diabetes* 56, 613–621.
- Marroqui, L., Dos Santos, R.S., Floyel, T., Grieco, F.A., Santin, I., Op de Beeck, A., Marselli, L., Marchetti, P., Pociot, F., and Eizirik, D.L. (2015). TYK2, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates apoptosis and the innate immune response in human pancreatic beta-cells. *Diabetes* 64, 3808–3817.
- Marroqui, L., Dos Santos, R.S., Op de Beeck, A., Coomans de Brachene, A., Marselli, L., Marchetti, P., and Eizirik, D.L. (2017). Interferon-alpha mediates human beta cell HLA class I overexpression, endoplasmic reticulum stress and apoptosis, three hallmarks of early human type 1 diabetes. *Diabetologia* 60, 656–667.
- Marroqui, L., Santin, I., Dos Santos, R.S., Marselli, L., Marchetti, P., and Eizirik, D.L. (2014). BACH2, a candidate risk gene for type 1 diabetes, regulates apoptosis in pancreatic beta-cells via JNK1 modulation and crosstalk with the candidate gene PTPN2. *Diabetes* 63, 2516–2527.
- Martinuzzi, E., Novelli, G., Scotto, M., Blancou, P., Bach, J.M., Chaillous, L., Bruno, G., Chatenoud, L., van, E.P., and Mallone, R. (2008). The frequency and immunodominance of islet-specific CD8+ T-cell responses change after type 1 diabetes diagnosis and treatment. *Diabetes* 57, 1312–1320.
- Mbikay, M., Seidah, N.G., and Chretien, M. (2001). Neuroendocrine secretory protein 7B2: structure, expression and functions. *Biochem. J.* 357, 329–342.
- McGinty, J.W., Chow, I.T., Greenbaum, C., Odegard, J., Kwok, W.W., and James, E.A. (2014). Recognition of post-translationally modified glutamic acid decarboxylase 65 epitopes in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes* 63, 3033–3040.
- Montgomery, S.B., Sammeth, M., Gutierrez-Arcelus, M., Lach, R.P., Ingle, C., Nisbett, J., Guigo, R., and Dermizakis, E.T. (2010). Transcriptome genetics using second generation sequencing in a Caucasian population. *Nature* 464, 773–777.
- Moore, F., Colli, M.L., Cnop, M., Esteve, M.I., Cardozo, A.K., Cunha, D.A., Bugliani, M., Marchetti, P., and Eizirik, D.L. (2009). PTPN2, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates interferon-gamma-induced pancreatic beta-cell apoptosis. *Diabetes* 58, 1283–1291.
- Nejentsev, S., Howson, J.M., Walker, N.M., Szeszkó, J., Field, S.F., Stevens, H.E., Reynolds, P., Hardy, M., King, E., Masters, J., et al. (2007). Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature* 450, 887–892.
- Ortis, F., Naamane, N., Flamez, D., Ladriere, L., Moore, F., Cunha, D.A., Colli, M.L., Thykjaer, T., Thorsen, K., Orntoft, T.F., et al. (2010). Cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha regulate different transcriptional and alternative splicing networks in primary beta-cells. *Diabetes* 59, 358–374.
- Pinto, S., Sommermeier, D., Michel, C., Wilde, S., Schendel, D., Uckert, W., Blankenstein, T., and Kyewski, B. (2014). Misinitiation of intrathymic MART-1 transcription and biased TCR usage explain the high frequency of MART-1-specific T cells. *Eur. J. Immunol.* 44, 2811–2821.
- Ravassard, P., Hazhouz, Y., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Armanet, M., Czernichow, P., and Scharfmann, R. (2011). A genetically engineered human pancreatic beta cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J. Clin. Invest.* 121, 3589–3597.
- Rondas, D., Crevecoeur, I., D’Hertog, W., Bomfim Ferreira, G., Staes, A., Garg, A.D., Eizirik, D.L., Agostinis, P., Gevaert, K., Overbergh, L., et al. (2015). Citrullinated glucose-regulated protein 78 is an autoantigen in type 1 diabetes. *Diabetes* 64, 573–586.
- Scotto, M., Afonso, G., Larger, E., Raverdy, C., Lemonnier, F.A., Carel, J.C., Dubois-Laforgue, D., Baz, B., Levy, D., Gautier, J.F., et al. (2012). Zinc transporter (ZnT)8(186-194) is an immunodominant CD8+ T cell epitope in HLA-A2+ type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 55, 2026–2031.
- Skowera, A., Ellis, R.J., Varela-Calvino, R., Arif, S., Huang, G.C., Van-Krinks, C., Zaremba, A., Rackham, C., Allen, J.S., Tree, T.I., et al. (2008). CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope. *J. Clin. Invest.* 118, 3390–3402.
- Standifer, N.E., Ouyang, Q., Panagiotopoulos, C., Verchere, C.B., Tan, R., Greenbaum, C.J., Pihoker, C., and Nepom, G.T. (2006). Identification of novel HLA-A\*0201-restricted epitopes in recent-onset type 1 diabetic subjects and antibody-positive relatives. *Diabetes* 55, 3061–3067.
- Villate, O., Turatsinze, J.V., Mascali, L.G., Grieco, F.A., Nogueira, T.C., Cunha, D.A., Nardelli, T.R., Sammeth, M., Salunkhe, V.A., Esguerra, J.L., et al. (2014). Nova1 is a master regulator of alternative splicing in pancreatic beta cells. *Nucleic Acids Res.* 42, 11818–11830.
- Weckman, A., Di Ieva, A., Rotondo, F., Syro, L.V., Ortiz, L.D., Kovacs, K., and Cusimano, M.D. (2014). Autophagy in the endocrine glands. *J. Mol. Endocrinol.* 52, R151–R163.

## STAR★METHODS

## KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Mouse monoclonal anti-HLA Class I, clone W6/32	ATCC	ATCC HB-95; RRID: CVCL_7872
Mouse monoclonal anti-HLA Class I, clone HC10	Laboratory of Hidde L. Ploegh	RRID: AB_2728622
Mouse monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin, clone DM1A	Thermo Fisher Scientific; eBioscience	Cat#14-4502-80; RRID: AB_1210457
Mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin, clone AC-15	Sigma	Cat#A5441; RRID: AB_476744
Goat polyclonal Anti-mouse Ig (H+L) HRP	SouthernBiotech	Cat#1010-05; RRID: AB_2728714
Mouse monoclonal anti-HLA-A2, clone BB7.2	ATCC	ATCC HB-82; RRID: CVCL_7246
Goat polyclonal anti-mouse Ig FITC	BD Pharmingen	Cat#554001; RRID: AB_395197
Goat polyclonal anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Interchim	Cat#FP-SA4010; RRID: AB_2728715
EasySep™ Human CD8+ T Cell Enrichment Kit	StemCell Technologies	Cat#19053; RRID: AB_2728716
Mouse monoclonal anti-human CD3 APC-H7, clone SK7	BD Pharmingen	Cat#560176; RRID: AB_1645475
Mouse monoclonal anti-human CD8 PE-Cy7, clone RPA-T8	BD Pharmingen	Cat#557746; RRID: AB_396852
Mouse monoclonal anti-human CD45RA FITC, clone HI100	BD Pharmingen	Cat#555488; RRID: AB_395879
Mouse monoclonal anti-human CCR7 BV421, clone 150503	BD Horizon	Cat#562555; RRID: AB_2728119
LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat#L34965
LIVE/DEAD™ Fixable Red Dead Cell Stain Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# L23102
Streptavidin PE	BD Pharmingen	Cat#554061; RRID: AB_10053328
Streptavidin PE-CF594	BD Horizon	Cat#562284; RRID: AB_11154598
Streptavidin APC	BD Pharmingen	Cat#554067; RRID: AB_10050396
Streptavidin BV650	BD Horizon	Cat#563855
Streptavidin BV711	BD Horizon	Cat#563262
Streptavidin BV786	BD Horizon	Cat#563858
Rabbit polyclonal anti-B phycoerythrin	Abcam	Cat#ab7011; RRID: AB_305700
Swine polyclonal anti-rabbit Ig HRP	Dako	Cat#P0217; RRID: AB_2728719
Rat monoclonal anti-human CD8, clone YTC182.20	Abcam	Cat#ab60076; RRID: AB_940921
Mouse monoclonal anti-human CD45RO, clone UCHL1	BioLegend	Cat#304202; RRID: AB_314418
Goat polyclonal anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11037; RRID: AB_2534095
Goat polyclonal anti-rat IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-11006; RRID: AB_2534074
Goat polyclonal anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 647	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-21236; RRID: AB_2535805
<b>Biological Samples</b>		
Human pancreas unfixed frozen sections	nPOD	<a href="http://www.jdrfnpod.org">http://www.jdrfnpod.org</a>
Human pancreatic lymph node unfixed frozen sections	nPOD	<a href="http://www.jdrfnpod.org">http://www.jdrfnpod.org</a>
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
HLA-A2 heavy chain	immunAware	N/A
$\beta$ 2-microglobulin	Lee Biosolutions	Cat#126-11
Dasatinib	LC Laboratories	Cat#D-3307
<b>Deposited Data</b>		
Human reference proteome Swiss-Prot/UniProt, up000005640, release December 2012	Uniprot	<a href="http://www.uniprot.org/proteomes/UP000005640">http://www.uniprot.org/proteomes/UP000005640</a>
Human Protein Atlas v.13.0	Human Protein Atlas	<a href="http://www.proteinatlas.org">http://www.proteinatlas.org</a>

(Continued on next page)

<b>Continued</b>		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Human Protein Reference Database, release 9	Human Protein Reference Database	<a href="http://www.hprd.org">http://www.hprd.org</a>
Single-Cell Gene Expression Atlas of Human Pancreatic Islets	Sandberg Lab	<a href="http://sandberg.cmb.ki.se/pancreas">http://sandberg.cmb.ki.se/pancreas</a>
Gencode release 18	The GENCODE Project	<a href="https://www.gencodegenes.org">https://www.gencodegenes.org</a>
Illumina BodyMap 2.0	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=E-MTAB-513">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=E-MTAB-513</a>	GEO:GSE30611
Human islet RNA-seq	This paper	GEO: GSE108413
Human mTEC RNA-seq	This paper	<a href="#">Data S2</a>
<b>Experimental Models: Cell Lines</b>		
Human: ECN90 $\beta$ -cell line	<a href="#">Culina et al., 2018</a> ; Univercell Biosolutions	N/A
Human: T2 (174 $\times$ CEM.T2) cell line	ATCC	ATCC CRL-1992; RRID: CVCL_2211
Mouse: W6/32 hybridoma cell line	ATCC	ATCC HB-95; RRID: CVCL_7872
Mouse: HC10 hybridoma cell line	Laboratory of Hidde L. Ploegh	RRID: AB_2728622
Mouse: BB7.2 hybridoma cell line	ATCC	ATCC HB-82; RRID: CVCL_7246
<b>Software and Algorithms</b>		
FlowJo v.10	FlowJo	<a href="https://www.flowjo.com">https://www.flowjo.com</a>
Flux Capacitor v.1.6.1	<a href="#">Montgomery et al., 2010</a>	<a href="http://sammeth.net/confluence/display/FLUX/Home">http://sammeth.net/confluence/display/FLUX/Home</a>
Gibbs clustering v.1.1	DTU Bioinformatics	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/GibbsCluster">http://www.cbs.dtu.dk/services/GibbsCluster</a>
LAS v.2.6.0.7266	Leica Microsystems	N/A
MaxQuant v.1.5.3.8	Max Planck Institute of Biochemistry	<a href="http://www.coxdocs.org">http://www.coxdocs.org</a>
MUSCLE v.3.8	EMBL-EBI	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle</a>
NetMHC v.4.0	DTU Bioinformatics	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC</a>
NetMHCstab v.1.0	DTU Bioinformatics	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCstab-1.0">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCstab-1.0</a>
NetMHCstabPan v.1.0	DTU Bioinformatics	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCstabpan">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCstabpan</a>
NIS-Elements D v.4.40	Nikon	N/A
Perseus v.1.5.2.4	Max Planck Institute of Biochemistry	<a href="http://www.coxdocs.org">http://www.coxdocs.org</a>
Python and R Scripts	<a href="#">Caron et al., 2015</a>	<a href="https://elifesciences.org/articles/07661/figures#SD9-data">https://elifesciences.org/articles/07661/figures#SD9-data</a>
Script for the prediction of peptide splice products	This paper	<a href="#">Data S1</a>
TopHat v.2.0.10	J. Hopkins University Center for Computational Biology	<a href="http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml">http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml</a>

## CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Roberto Mallone ([roberto.mallone@inserm.fr](mailto:roberto.mallone@inserm.fr)).

## EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

### Cell Lines

The ECN90 cell line (HLA-A\*02:01/03:01, -B\*40:01/49:01, -C\*03:04/07:01) was derived from a human neonatal pancreas using described protocols ([Ravassard et al., 2011](#)). Cells were seeded in 15-cm diameter tissue culture dishes (Techno Plastic Products AG) coated with 0.1% fibronectin solution from human plasma (Sigma; 400 ng/cm<sup>2</sup>) and extracellular matrix from

Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma (Sigma; 1–2.4 mg/cm<sup>2</sup>). They were maintained in DMEM/F12 medium supplemented with 2% bovine serum albumin, 6.7 ng/ml sodium selenite, 10 mM nicotinamide, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol and penicillin/streptomycin. IFN- $\gamma$  (R&D) was added to the cell culture at 80%–90% confluence at a final concentration of 500 U/ml for 16–18 h. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (all from R&D) were added at a final concentration of 2,000 U/ml, 1,100 U/ml, and 1,000 U/ml, respectively.

### Primary Human Tissues and PBMCs

For HLA-I peptidomics experiments, transplantation-grade, undispersed primary human islets (75% purity; HLA-A\*02:01/25:01, -B\*39:01/51:01, -C\*12:03/14:02) were obtained from a brain-dead non-diabetic organ donor (age 49 years, male, BMI 37 kg/m<sup>2</sup>; protocol approved by the *Agence de la Biomédecine*) with standard procedures and maintained in CMRL 1066 medium (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum. For RNA-seq analyses, primary human islets from 5 brain-dead non-diabetic organ donors (mean age 50.6  $\pm$  10.2 years, 3 females, 2 males, BMI 25  $\pm$  2 kg/m<sup>2</sup>; 57%  $\pm$  5%  $\beta$  cells; protocol approved by the Ethics Committee of the University of Pisa, Italy) were exposed or not to IFN- $\gamma$  (1,000 U/ml) and IL-1 $\beta$  (50 U/ml) for 48 h. For HLA-I expression analyses (Figure 2G), primary human islets were from 3 non-diabetic organ donors (mean age 54.7  $\pm$  14.3 years, 1 female, 2 males, BMI 29  $\pm$  5 kg/m<sup>2</sup>; protocol approved by the Ethics Committee of the University of Pisa, Italy). Primary human HLA Class II<sup>lo</sup> and Class II<sup>hi</sup> mTECs were purified as described (Pinto et al., 2014) from the thymi of 3 children (male gender, age 6 days, 4 months and 9 months) undergoing corrective cardiac surgery at the University of Heidelberg, Germany (Ethics approval 367/2002). Blood was drawn into 9 ml sodium heparin tubes from T1D and healthy donors (Table S4) under the Ethics approval DC-2015-2536 Ile-de-France I. Informed consent was obtained from all subjects, or next-of-kin for islet donors. For *in-situ* MMr staining, pancreas and PLN sections were provided by nPOD.

## METHOD DETAILS

### Purification of pHLA-I Complexes

W6/32 and HC10 anti-HLA-I mAbs were purified on a protein A Prosep Ultraplus column (Millipore) from hybridoma supernatants. The W6/32 mAb recognizes a conformational epitope formed by the interaction of the HLA-I heavy chain and  $\beta$ 2-microglobulin and was used for purifying pHLA-I complexes and for flow cytometry in conjunction with an FITC-conjugated goat anti-mouse Ig Ab (BD). The HC10 mAb recognizes a linear epitope on the HLA-I heavy chain and was used for western blotting along with an anti- $\alpha$ -tubulin mAb for loading control (Figure 1B). Since  $\alpha$ -tubulin expression is higher in ECN90  $\beta$  cells than in primary islets, an anti- $\beta$ -actin mAb was used for loading control to compare HLA-I expression and upregulation between the two cell types (Figure 2G). To this end, the membrane previously probed for HLA-I (45 kD) was stripped and reprobed for  $\beta$ -actin (42 kD).

The HLA-I peptidome of the ECN90  $\beta$ -cell line was obtained from 5 biological replicates. A single biological replicate was available for primary human islets. Frozen cell pellets ( $\sim$ 20 $\times$ 10<sup>6</sup>/condition for ECN90 cells;  $\sim$ 25,000 islet equivalents/condition for primary islets, corresponding to  $\sim$ 19 $\times$ 10<sup>6</sup>  $\beta$  cells) were resuspended in a buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% (v/v) Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche), and 1% (w/v) octyl- $\beta$ -D glucopyranoside (Sigma). Lysis was carried out at 4°C for 1 h under rotation, with two sonication steps at 30 and 60 min. Lysates were cleared by centrifugation and pHLA-I complexes immunoaffinity-purified with the W6/32 mAb covalently bound to Protein A Sepharose CL-4B beads (GE Healthcare) by dimethyl pimelimidate cross-linking. Beads were subsequently loaded on GELoader Tips (20  $\mu$ l; ThermoFisher) and washed before elution of pHLA-I complexes with 10% acetic acid. Aliquots were collected at each washing and elution step for analysis by 12% SDS-PAGE and western blot using the HC10 mAb to verify the yield and purity of the eluted HLA-I.

Eluted peptides and the associated HLA-I heavy chain and  $\beta$ 2-microglobulin obtained from 20 $\times$ 10<sup>6</sup> cells were concentrated to 20  $\mu$ l by vacuum centrifugation, acidified with 10  $\mu$ l of 1% formic acid (Normapur) and loaded on C18 stage tips (ThermoFisher) prewashed with 100% methanol and equilibrated with 2% acetonitrile (ACN) in 0.1% formic acid in LC-MS grade water. After loading, the C18 stage tips were washed with 2% ACN/0.1% formic acid and peptides separated from the HLA-I heavy chain and  $\beta$ 2-microglobulin species by eluting them with 50% ACN/0.1% formic acid. The ACN was evaporated by vacuum centrifugation and the peptides resuspended up to 6  $\mu$ l of volume in a solution of 2% ACN/0.1% formic acid and spiked with 10 fmol/ $\mu$ l of a cytomegalovirus pp65 495-503 peptide (NLVPMVATV) as internal control. For LC-MS analysis, 5  $\mu$ l of this peptide solution were used.

### LC-MS/MS

Peptides were loaded and separated by a nanoflow HPLC (RSLC Ultimate 3000, Dionex) on a C18 Acclaim PepMap nanocolumn (50 cm length, 75  $\mu$ m internal diameter; Dionex) coupled on-line to a nano-electrospray ionization Q Exactive HF mass spectrometer (ThermoFisher) with a glass emitter (New Objective). Peptides were eluted with a linear gradient of 2%–50% buffer B (80% ACN, 0.05% formic acid) at a flow rate of 220 nl/min over 60 min at 35°C. Data were acquired using a data-dependent acquisition “Top 20” method. We acquired one full-scan MS spectrum at a resolution of 60,000 at 200  $m/z$  with an automatic gain control (AGC) target value of 3 $\times$ 10<sup>6</sup> ions, followed by 10 MS/MS spectra in higher energy collisional dissociation mode on the 10 most intense ions at a resolution of 15,000 at 200  $m/z$  with an AGC target value of 1 $\times$ 10<sup>5</sup> with a maximum injection time of 120 ms and a dynamic exclusion of 20 s. Unassigned precursor ion charge states and charge states >4 were excluded. The peptide match option was set to ‘preferred’. The resulting spectra were analyzed by MaxQuant ([www.coxdocs.org](http://www.coxdocs.org)) using a custom database comprising: a) the reference human proteome (Swiss-Prot/UniProt, up000005640, release December 2012); b) an in-house database containing 119,305 predicted peptide splice products (Berkers et al., 2015) from major known and candidate  $\beta$ -cell protein Ags (Figure S1 and Data S1); and c)



the predicted aa neo-sequences encoded by mRNA splice variants identified by RNASeq. The following parameters were set: enzyme specificity: unspecific; variable modifications: methionine, tryptophan, and histidine oxidation (+15.99 Da), cysteine oxidation to cysteic acid (+47.98 Da) and tryptophan conversion to kynurenine (+3.99 Da); maximum false discovery rate 5%. Since the MS identification was targeted on HLA-I-eluted peptides rather than on proteins, the protein false discovery rate parameter was set to 100%. The initial allowed mass deviation of the precursor ion was set to 10 ppm and the maximum fragment mass deviation was set to 20 mDa. The “match between runs” option was enabled to match identifications across different replicates in a time window of 0.5 min and an initial alignment time window of 20 min.

### RNA-Seq

RNAs from 5 individual preparations of primary human islets exposed or not to IFN- $\gamma$  and IL-1 $\beta$  for 48 h and from HLA Class II<sup>lo</sup> and Class II<sup>hi</sup> human mTECs were sequenced on an Illumina HiSeq 2000 at high depth (coverage >150x10<sup>6</sup> reads, which is sufficient to detect >80% of splice variants). RNA sequencing reads were mapped to the human reference genome hg19 using TopHat 2 and the Gencode release 18 annotation dataset. Mapped reads were used to quantify abundance and analyse the differential expression of genes and transcripts using Flux Capacitor (Montgomery et al., 2010).

### HLA-I Peptidomics and Transcriptomics Bio-Informatics Analysis

Predicted HLA-I binding affinities for each nonamer peptide were visualized as sequence logo plots using Gibbs clustering ([www.cbs.dtu.dk/services/GibbsCluster](http://www.cbs.dtu.dk/services/GibbsCluster); Figure 1D), and as heat maps (Figure 1E) using the open-source script of Caron et al. (Caron et al., 2015).

For conventional peptides, source proteins were selected with Perseus ([www.coxdocs.org](http://www.coxdocs.org)) based on: a) a non-ubiquitous expression pattern, based on the Human Protein Atlas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)); b) a pancreas- and  $\beta$ -cell-enriched expression pattern, based on the Human Protein Atlas, the Human Protein Reference Database ([www.hprd.org](http://www.hprd.org)) and the Single-Cell Gene Expression Atlas of Human Pancreatic Islets (<http://sandberg.cmb.ki.se/pancreas>). The bioinformatics analysis pipeline is detailed in Figure 1G. The 3,544 peptides identified were first filtered based on inter-sample reproducibility ( $\geq 2$  of 5 biological replicates; n=2,997, 85%) and aa length (8-12 aa; n=2,795, 93%). For all peptides, the final filter was based on an enrichment in HLA-I-purified samples compared with mock-purified ones based on *m/z* peak intensity, which verified the specific association of the identified peptides with pHLA-I complexes. From this dataset, we identified:

1) 217 (8%) peptides derived from ubiquitous proteins carrying PTMs (blue pipeline in Figure 1G), from which 99 (46%; Table S2) were enriched in HLA-I-purified samples.

2) 15 (0.5%) peptide splice variants (brown pipeline in Figure 1G; see Figure S1 for the identification strategy), from which 10 (67%) were enriched in HLA-I-purified samples (listed in Table S1).

3) The remaining 2,561 peptides (both conventional and PTM species derived from  $\beta$ -cell-enriched proteins; red pipeline in Figure 1G) were filtered by Perseus based on non-ubiquitous expression of their source proteins (n=411; 16%), using the Human Protein Atlas; and pancreas- and  $\beta$ -cell-enriched expression (n=139, 34%), using the Human Protein Atlas, the Human Protein Reference Database and the Single-Cell Gene Expression Atlas of Human Pancreatic Islets. Finally, the 86 (62%) remaining peptides were retained as enriched in HLA-I-purified samples (listed in Table S1).

4) mRNA splice variants (green pipeline in Figure 1G; n=2, 0.1%; both enriched in HLA-purified samples; listed in Table S1) were identified by analyzing the HLA-I peptidomics dataset against the predicted aa neo-sequences obtained from RNA-seq analysis. For this RNA-seq pipeline (dashed boxes in Figure 1G), 53,280 mRNAs were filtered based on:

a) A median RPKM>5 in islets, either under basal or inflammatory conditions, a cut-off selected based on the median RPKM of known islet Ags (islet expression filter; n=14,504, 27%).

b) A median RPKM<0.1 in mTECs (either HLA Class II<sup>lo</sup> or Class II<sup>hi</sup>), or a median RPKM fold-decrease>100 vs. islet (mTEC expression filter; n=908, 6%).

c) A median RPKM fold-increase>10 in islets compared to 12 control tissues (adipose tissue, breast, colon, heart, kidney, liver, lung, lymph node, ovary, prostate, skeletal muscle, white blood cells), using the Illumina BodyMap 2.0 dataset (islet enrichment filter; n=166, 18%). Tissues of neuroendocrine origin (brain, testis, adrenal gland and thyroid) were excluded for this filtering.

d) We subsequently focused our analysis on mRNA isoforms, as described (Eizirik et al., 2012; Villate et al., 2014). The predicted translation products were aligned using MUSCLE 3.8 ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle)), and aa neo-sequences were defined by comparing the predicted aa sequence of each mRNA isoform with that of the reference mRNA, taking as reference the longest and/or most prevalent mRNA isoform in islets (neo-sequence generation filter; n=88, 53%).

The 336 predicted aa neo-sequences obtained from these 88 mRNA variants were used to interrogate HLA-I peptidomics datasets and searched in parallel for:

e) Potential HLA-A2 binders, based on their predicted HLA-A2 binding affinity ( $K_D$ <100 nM by NetMHC 4.0; [www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC)) and stability (half-life  $\geq 1.5$  h by NetMHCstab 1.0; [www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCstab-1.0](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCstab-1.0)) (predicted HLA-A2 binding filter; n=66, 20%).

f) A 9-10-aa length (peptide length filter; n=43, 65%).

g) A neo-sequence  $\geq 3$  aa (neo-sequence filter; n=39, 92%).

Overall, this combined HLA-I peptidomics and transcriptomics analysis pipeline led to the identification of 99 *in vitro* PTM candidates from ubiquitous proteins (Table S2); 10 *in vitro* peptide splice candidates, 86 *in vitro* candidates from  $\beta$ -cell proteins (including

PTM variants) and 2 *in vitro* mRNA splice candidates (Table S1); and 39 *in silico* mRNA splice candidates (Figure S21). PTM candidates were not further analyzed. The other candidates underwent additional filtering steps to focus subsequent studies on HLA-A2-restricted peptides. Predicted HLA-A2 binders were first selected *in silico* using NetMHC 4.0 and NetMHCstab 1.0 (except for *in silico* mRNA splice candidates, which had already been filtered for predicted HLA-A2 binding in the same way), then *in vitro* for experimental HLA-A2 binding and, finally, for CD8<sup>+</sup> T-cell recognition.

### HLA-A2 Binding Assays

Peptide binding to HLA-A\*02:01 was measured using the transporter associated with Ag processing (TAP)-deficient T2 cell line. TAP deficiency leads to defective translocation of endogenous peptides from the cytosol into the ER, leading to the expression of unstable, empty HLA-A\*02:01 molecules on the cell surface. This expression is stabilized in the presence of HLA-A\*02:01-binding peptides, resulting in a higher surface expression that can be monitored by flow cytometry. T2 cells were washed in RPMI medium and plated in round-bottom 96-well plates at  $0.2 \times 10^6$  cells/200  $\mu$ l in the presence of 5  $\mu$ g/ml  $\beta$ 2-microglobulin. Peptides prepared in DMSO were sequentially diluted 4-fold in RPMI and added to final concentrations of 102.4 to 0.1  $\mu$ M for 24 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. The HLA-A\*02:01-binding peptide Flu MP<sub>58-66</sub> (GILGFVFTL), and a non-binding peptide CHGA<sub>382-390</sub> (HPVGEADYF) were included as positive and negative controls, respectively. After incubation, the cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and stained with the viability marker Live/Dead Red and mouse anti-HLA-A2 mAb BB7.2, followed by an Alexa Fluor 488-labeled goat-anti-mouse IgG Ab (Interchim). Following acquisition on a BD Fortessa cytometer, results were analyzed by gating on viable cells and expressed as the median fluorescence intensity fold increase of the test peptide compared with the negative control peptide at the same concentration.

### HLA-A2 MMr Assays

All peptides were synthesized at >90% purity (Synpeptides). HLA-A2 MMr were produced and used as described (Culina et al., 2018). Each pHLA-A2 complex was used at a final concentration of 8-27 nM and conjugated with fluorochrome-labeled streptavidin at a 1:4 ratio. The combinatorial MMr panel was first set up by staining HLA-A2<sup>+</sup> PBMCs with the same set of fluorescent streptavidin-labeled MMr, all loaded with the Flu MP<sub>58-66</sub> epitope. Compensations were set using fluorescence-minus-one samples (i.e. omitting one streptavidin at a time). The concentration of each fluorescent MMr was corrected for the variable staining index of each streptavidin, in order to obtain a distinct double-MMr<sup>+</sup> population for each fluorochrome pair. The identification of the same MMr<sup>+</sup> population by each pair validated the panel. PBMCs were isolated by density gradient centrifugation using 50 ml Leucosep tubes (Greiner/Dominique Dutscher), washed twice in RPMI medium supplemented with AB human serum (Sigma), counted on a ThermoFisher Countess II automated counter and frozen in pre-chilled 10% DMSO solution in AIM-V medium (ThermoFisher) using CoolCell containers (Biocision) stored overnight at -80°C prior to transfer into liquid nitrogen. At thawing, PBMCs were immediately diluted in pre-warmed AIM-V medium. Following centrifugation and one additional wash in AIM-V, PBMCs were counted and rested in the presence of 50 nM dasatinib for 30 min at 37°C before magnetic depletion of CD8<sup>-</sup> cells (StemCell Technologies). Staining was performed for 20 min at 20°C in 20  $\mu$ l PBS-dasatinib for 10<sup>7</sup> cells with the combinatorial double-coded MMr panels (Culina et al., 2018) detailed in Figure 3, followed, without washing, by mAb and Live/Dead Aqua staining at 4°C for 20 min. After one wash, cells were acquired using a FACSAria III cytometer configured as detailed in Table S6. Candidate epitopes binding to HLA-A2 (Figure S2) that did not yield any appreciable MMr staining provided negative controls for each panel. Data were analyzed with FlowJo software as described in Figure 3. Cells were sequentially gated on small lymphocytes, singlets, live cells (Live/Dead Aqua<sup>-</sup>), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells and total PE<sup>+</sup>, PE-CF594<sup>+</sup>, APC<sup>+</sup>, BV650<sup>+</sup>, BV711<sup>+</sup> and BV786<sup>+</sup> MMr<sup>+</sup> T cells. Using Boolean operators, these latter gates allowed to selectively visualize each double-MMr<sup>+</sup> population by including only those events positive for the corresponding fluorochrome pair. For example, UCN3<sub>1-9</sub> MMr<sup>+</sup> cells (PE<sup>+</sup>PE-CF594<sup>+</sup>) were visualized by gating on events that were PE<sup>+</sup>PE-CF594<sup>+</sup> APC<sup>-</sup>BV650<sup>-</sup>BV711<sup>-</sup>BV786<sup>-</sup>. Events negative for all MMr fluorochromes (PE<sup>-</sup>PE-CF594<sup>-</sup>APC<sup>-</sup>BV650<sup>-</sup>BV711<sup>-</sup>BV786<sup>-</sup>) were represented in the same PE/PE-CF-594 dot plot to set the double-MMr<sup>+</sup> gate, as shown in Figures 4A–4F. CD45RA and CCR7 staining was subsequently visualized by gating on these MMr<sup>+</sup> cells. Each dot plot of Figures 3B and 3C displays a color-coded overlay of each double-MMr<sup>+</sup> fraction and of the MMr<sup>-</sup> population to visualize the separation of each epitope-reactive CD8<sup>+</sup> T-cell fraction relative to the others.

### In-Situ HLA-A2 MMr Staining

*In-situ* immunohistochemistry staining was performed as described (Culina et al., 2018). Unfixed, frozen sections were dried for 2 h, loaded with 1  $\mu$ g of PE-labeled MMr overnight at 4°C, washed gently with PBS and fixed in 2% paraformaldehyde for 10 min. After a further wash, endogenous peroxidase activity was blocked with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sections were then incubated serially with a rabbit anti-PE Ab (Abcam), horseradish peroxidase-conjugated swine anti-rabbit Ig (Dako) and 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride substrate (ThermoFisher). After a final wash, sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated via sequential passages in 95%–100% ethanol and xylene, mounted, and analyzed using a Nikon Eclipse Ni microscope with NIS-Elements D software v4.40.

*In-situ* immunofluorescence staining was performed similarly, but non-specific reactions were blocked with 5% goat serum for 2 h at room temperature before serial incubations with rabbit anti-PE Ab (1:250, 1.5 h at room temperature) and Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (ThermoFisher; 1:500, 1 h at room temperature). After a further wash, sections were incubated for 1 h at room temperature with rat anti-CD8 mAb (Abcam; 1:100) together with mouse anti-CD45RO mAb (BioLegend; 1:200) followed, after one wash, by one final incubation for 1 h at room temperature with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rat IgG together with Alexa

Fluor 647-conjugated goat anti-mouse IgG (1:500/each; both from ThermoFisher). After DNA counterstaining with DAPI, sections were mounted and analyzed using a Leica TCS SP5 confocal laser scanning microscope with LAS software v2.6.0.7266.

### **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

Statistical details of experiments can be found in the legends of each figure. A two-tailed  $p < 0.05$  cut-off was used to define statistical significance.

### **DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY**

The custom script used to predict peptide splice products is provided in [Data S1](#). The islet RNA-seq datasets have been deposited under GEO: GSE108413. The mTEC RNA-seq dataset is provided in [Data S2](#).

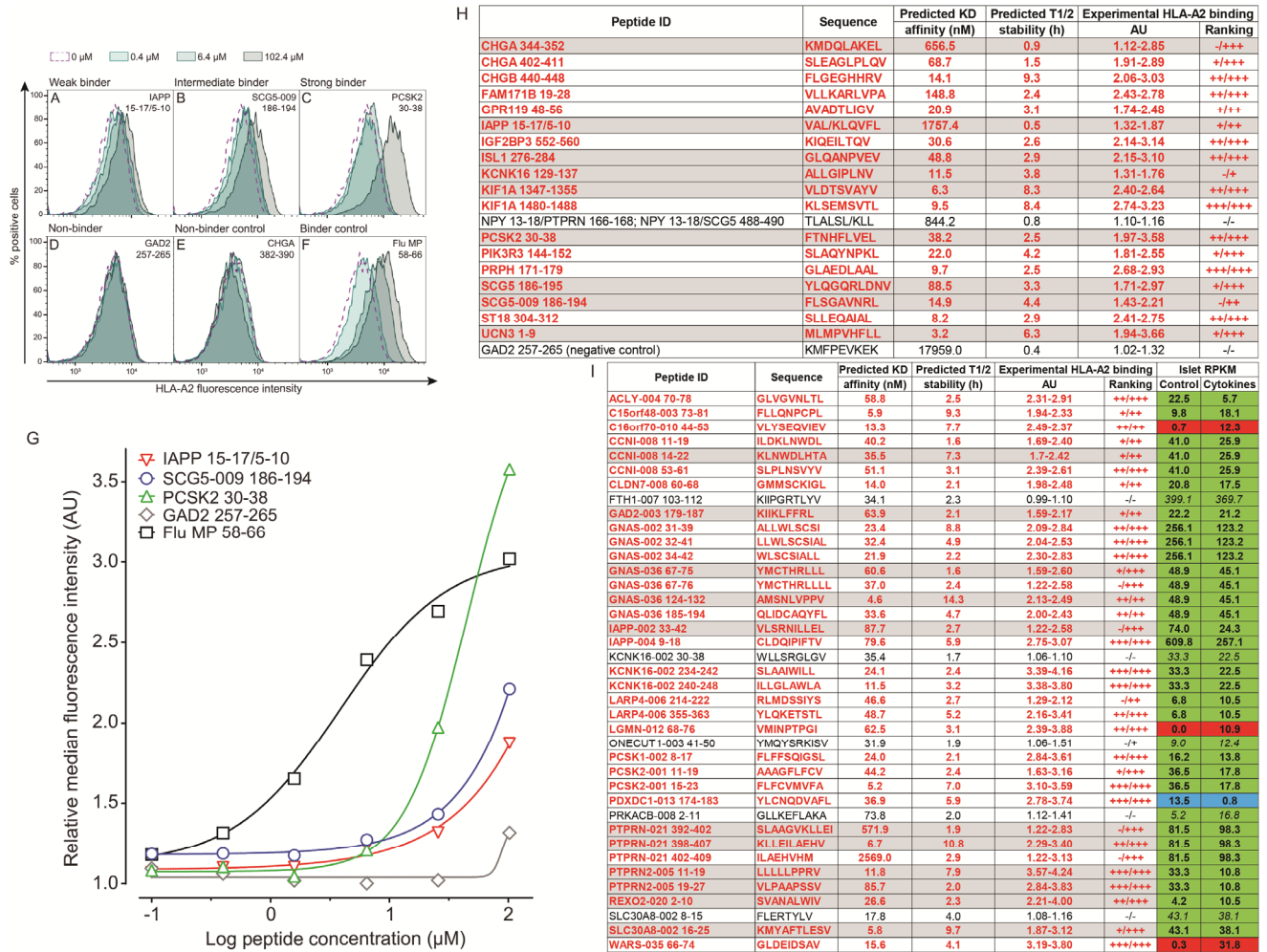
## Supplemental Information

### **Conventional and Neo-antigenic Peptides Presented by $\beta$ Cells Are Targeted by Circulating Naïve CD8<sup>+</sup> T Cells in Type 1 Diabetic and Healthy Donors**

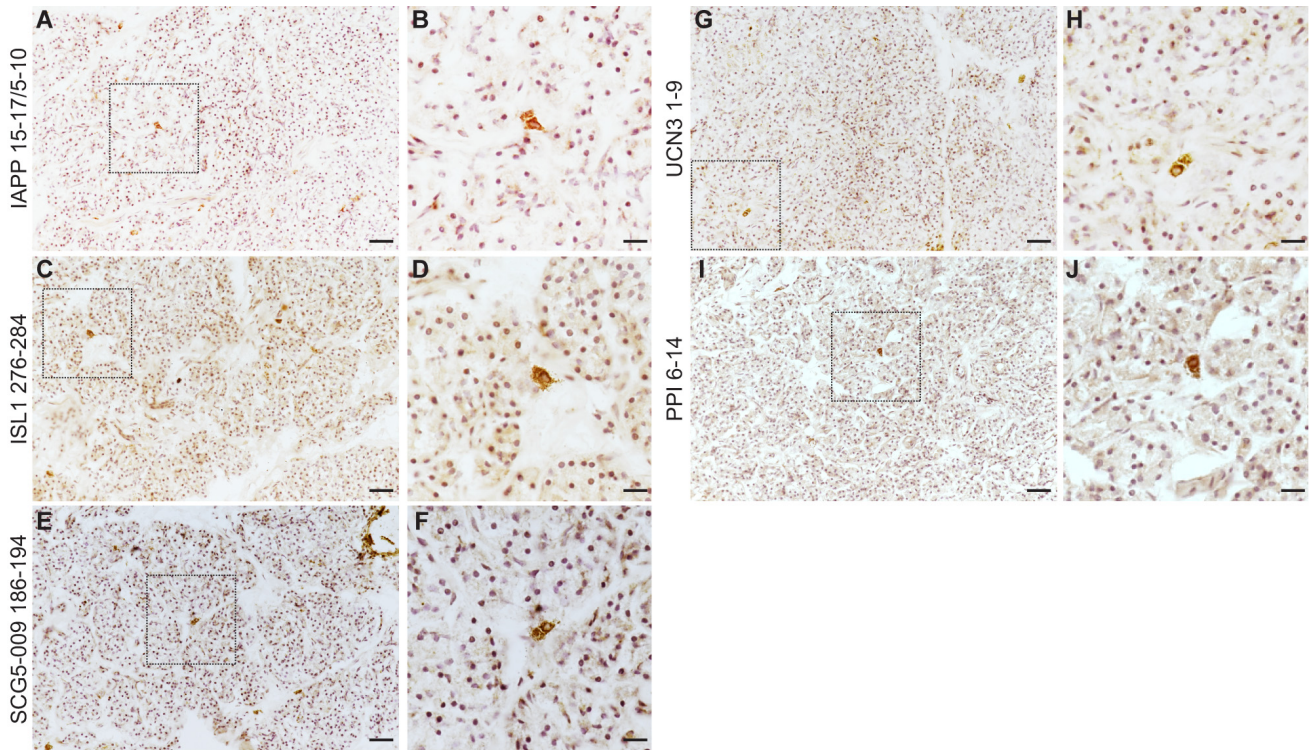
**Sergio Gonzalez-Duque, Marie Eliane Azoury, Maikel L. Colli, Georgia Afonso, Jean-Valery Turatsinze, Laura Nigi, Ana Ines Lalanne, Guido Sebastiani, Alexia Carré, Sheena Pinto, Slobodan Culina, Noémie Corcos, Marco Bugliani, Piero Marchetti, Mathieu Armanet, Marc Diedisheim, Bruno Kyewski, Lars M. Steinmetz, Søren Buus, Sylvaine You, Daniele Dubois-Laforgue, Etienne Larger, Jean-Paul Beressi, Graziella Bruno, Francesco Dotta, Raphael Scharfmann, Decio L. Eizirik, Yann Verdier, Joelle Vinh, and Roberto Mallone**

Source protein	N-terminal precursor sequence	C-terminal precursor sequence	N-terminal precursor	C-terminal precursor	Cis splice peptide candidates	Trans splice peptide candidates
PPI	P1: D/E/Q/N/S/T/Φ P2: G/A/N/Q/S/T/D/E/Φ P3-P9: any 	P1: K/R P2: Φ P3: Φ P4'-P9': any 	PPI-1 PPI-2	PPI-A	PPI-1 / PPI-A PPI-2 / PPI-A	PPI-1 / IGRP-A PPI-1 / IGRP-B PPI-2 / IGRP-A PPI-2 / IGRP-B IGRP-1 / PPI-A ...
IGRP			IGRP-1	IGRP-A IGRP-B	IGRP-1 / IGRP-A IGRP-1 / IGRP-B	
CHGA						
SCG5						
PTPRN						
NPY						
SLC30A8						
IAPP						
PCSK2						
GAD2						

**Figure S1. Related to Fig. 1G. Schematic of the strategy used for predicting peptide splice variants.** The indicated known or putative  $\beta$ -cell Ags (first column; PPI, IGRP, CHGA, SCG5, PTPRN/IA-2, NPY, SLC30A8/ZnT8, IAPP, PCSK2, GAD2/GAD65) were scanned with an in-house Python script (Data S1) based on reported peptide splicing preferences (Berkers et al., 2015) for the presence of the indicated N- and C-terminal preferred precursor sequences (second and third column, respectively, where  $\Phi$  indicates any hydrophobic aa residue). Each N-terminal precursor sequence identified was then combined with each C-terminal precursor sequence, derived either from the same protein (*cis*-splicing) or from a different protein (*trans*-splicing). An example is shown for PPI and IGRP. The 119,305 predicted peptide splice sequences thus obtained (26,396 *cis*-spliced and 92,909 *trans*-spliced) were saved in FASTA format and appended to the Swiss-Prot human proteome database used for assigning aa sequences to the identified MS spectra with the MaxQuant algorithm.



**Figure S2. Related to Fig. 4. HLA-A2 binding measurements for the  $\beta$ -cell peptides selected for CD8<sup>+</sup> T-cell validation. (A-F)** Flow cytometry measurement of peptide binding to HLA-A2 using TAP-deficient T2 cells. T2 cells were pulsed with the indicated peptides at 4-fold sequential dilutions (102.4 to 0.1  $\mu$ M) at 37°C and stained for HLA-A2. Representative stains at 0.4, 6.4 and 102.4  $\mu$ M are shown for peptides that are weak binders (IAPP<sub>15-17/5-10</sub>; A), intermediate binders (SCG5-009<sub>186-194</sub>; B), strong binders (PCSK2<sub>30-38</sub>; C) and non-binders (GAD2<sub>257-265</sub>; D), along with the non-binding (ChgA<sub>382-390</sub>; E) and binding (Flu MP<sub>58-66</sub>; F) control peptides included in each assay. **G.** Plotting of relative median fluorescence intensity values (arbitrary units, AU) for all peptide dilutions normalized to the non-binding ChgA<sub>382-390</sub> control peptide. Representative examples of two independent experiments are shown. **(H-I)** Summary of the HLA-A2 binding values measured for the  $\beta$ -cell peptides selected from the *in vitro* HLA-I peptidomics (H) and *in silico* RNAseq pipeline (I) using the T2 assays depicted in panels A-G. The relative median fluorescence intensity measured at 25.6 and 102.4  $\mu$ M peptide concentrations is shown along with their relative ranking: – (<1.50 AU); + (1.50-1.99 AU); ++ (2-2.49 AU); +++ ( $\geq$ 2.50 AU). The *in silico* predicted HLA-A2 binding affinity (NetMHC 4.0) and stability values (NetMHCstab 1.0) are also shown. Peptides in bold red fonts bound HLA-A2 and were retained for CD8<sup>+</sup> T-cell validation, with those eventually validated (see Fig. 4) highlighted in grey. In panel H, the GAD2<sub>257-265</sub> peptide eluted from ECN90 cells with a predicted HLA-A3 restriction is included as negative control. For  $\beta$ -cell peptides selected from the *in silico* RNAseq pipeline (panel I), RPKM values of the source mRNA splice variant in control- and cytokine-treated islets are shown in the last two columns. The color codes indicate no change in mRNA expression (<2 log<sub>2</sub> fold-change, either positive or negative; green), an increase for cytokine-treated islets ( $\geq$ +2 log<sub>2</sub> fold-change; red) or a decrease for cytokine-treated islets ( $\leq$ -2 log<sub>2</sub> fold-change; blue).



**Fig. S3. Related to Fig. 6. Screening of HLA-A2-restricted peptide reactivities in pancreas-infiltrating cells from a T1D case.** Pancreas sections from T1D EUnPOD case #060217 (39-year-old female, T1D duration 21 years, positive for anti-GAD aAbs) were immunohistochemically stained *in situ* with the following MMRs: IAPP<sub>15-17/5-10</sub> (A-B), ISL1<sub>276-284</sub> (C-D), SCG5-009<sub>186-194</sub> (E-F), UCN3<sub>1-9</sub> (G-H) and the positive control PPI<sub>6-14</sub> (I-J). For each MMR, pancreas images at 20X magnification are shown on the left (scale bar 100  $\mu$ m), and higher magnifications of the dotted areas are shown on the right (scale bar 36  $\mu$ m).







Source protein(s)	Accession number(s)	Aminoacid positions	Sequence	HLA restriction	Predicted affinity (nM)	Predicted stability (h)	IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ log <sub>2</sub> FC
INS (n=12)	P01308	2-10	ALWMRLLPL	A*02:01	26.7	5.6	Basal only
		2-12*	ALWMRLLPLLA	A*02:01	83.8	2.8	-2.16
		5-13	MRLPLLAL	B*39:01	71.4	0.6	1.71
		5-13	M(+16)RLLPLLAL	B*39:01	71.4	0.6	Basal only
		15-24	ALWGPDPAAA	A*02:01	95.5	1.8	-3.26
		15-24	ALW(+16)GPDPAAA	A*02:01	95.5	1.8	-3.58
		15-24	ALW(+4)GPDPAAA	A*02:01	95.5	1.8	Basal only
		17-24*	WGPDPAAA	NA	NA	NA	-3.87
		29-38	HLCGSHLVEA	A*02:01	521.1	1.5	6.64
		33-41	SHLVEALYL	B*39:01	283.8	0.4	IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ only
		34-42	HLVEALYLV	A*02:01	3.3	17.8	Basal only
		57-67*	EAEDLQVGQVE	NA	NA	NA	0.13
CHGA (n=4)	P10645	344-352	KMDQLAKEL	A*02:01	543.8	0.6	0.04
		344-354	KMDQLAKELTA	A*02:01	823.2	0.6	-1.68
		381-390	YGFRGPGPQL	C*12:03, C*14:02	150.2, 139.9	0.2, 0.2	-0.37
		383-390	FRGPGPQL	B*39:01	380.7	0.7	-0.90
KIF1A (n=3)	Q12756	791-800	DQKNGATHYW	NA	NA	NA	-1.08
		1058-1066	EVTKSFIEY	A*25:01	370.6	1.3	-1.86
		1319-1327	NRVTGVYEL	B*39:01	19.8	0.7	-0.72
SCG5 (n=3)	P05408	136-144	DTAEFSREF	A*25:01	187.4	0.7	4.61
		186-195*	YLQGQRLDNV	A*02:01	44.8	2.2	1.77
		186-196	YLQGQRLDNVV	A*02:01	151.8	1.7	-1.19
CHGB (n=3)	P05060	429-437	YFMSDTREE	C*14:02	1857.7	0.1	Basal only
		429-437	YFM(+16)SDTREE	C*14:02	1857.7	0.1	IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ only
		440-448	FLGEGHHRV	A*02:01	4.4	8.6	-3.35
PCSK2 (n=1)	P16519	26-34	ERPVTNHF	C*14:02	3731.5	0.1	0.74
IAPP (n=1)	P10997	23-30	TPIESHQV	B*51:01	1423.2	1.1	1.84
SLC7A2 (n=1)	P52569	650-658	IFHEKTSEF	C*14:02	27.4	0.3	0.33
UNC13A (n=1)	Q9UPW8	1234-1243	DIISKDFASY	A*25:01	73.9	0.8	-0.58
IAPP/IAPP;PTPRN/IAPP	P10997/P10997;Q16849/P10997	15-17/5-10;596-598/5-10	VAL/KLQVFL	A*02:01, C*12:03	3599.1, 3763.0	0.5, 0.1	-0.58
SCG5/PCSK2;SLC30A8/PCSK2	P05408/P16519;Q81WU4/P16519	113-115/565-570;168-170/565-570	YPD/RGTWTL	B*39:01	10.0	0.8	IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ only
PTPRN/IAPP	Q16849/P10997	795-802/44-48	WQM(+16)VWESG/RLANF	B*39:01, C*14:02	1487.1, 1801.9	0.3, 0.2	1.84
WARS-035	WARS-035	18-26	SVAQAGVHW	NA	NA	NA	IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ only

**Table S3. Related to Fig 2F. List of the 33 HLA-I-bound peptides identified in primary human islets.** The same bioinformatics filters used for ECN90  $\beta$  cells (Fig. 1G) were applied, barring the inter-sample reproducibility and HLA-I enrichment filters due to the analysis of a single split islet preparation (cytokine-treated or not), without mock immunopurification. Aa sequences are listed according to the number of peptides identified for each source protein. HLA-I restrictions were assigned based on the predicted affinity and stability (NetMHCstabpan). The last column displays the log<sub>2</sub> median FC in peptide content for the IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  vs. basal condition (color codes as in Table S1). Source proteins and/or peptides previously identified or not in ECN90  $\beta$  cells are in blue and red, respectively, with peptide length variants marked with an asterisk. The 3 HLA-A2-restricted peptides retained for CD8<sup>+</sup> T-cell studies are highlighted in yellow: a SCG5<sub>186-195</sub> shorter variant with a higher affinity than the previously identified SCG5<sub>186-196</sub> peptide, a newly identified CHGB<sub>440-448</sub> peptide and an IAPP<sub>15-17</sub>/IAPP<sub>5-10</sub> or PTPRN<sub>596-598</sub>/IAPP<sub>5-10</sub> peptide splice aa sequence (VAL/KLQVFL) previously identified in ECN90  $\beta$  cells, which was finally assigned an HLA-A2 restriction based on the HLA-I haplotype of the islet preparation (HLA-A\*02:01/25:01, -B\*39:01/51:01, -C\*12:03/14:02, i.e. sharing only HLA-A2 with ECN90  $\beta$  cells). NA, not available.

Study phase	Group	Case ID	Age (yrs)	Gender (M/F)	T1D duration (wks)	GADA	IA-2A	ZnT8A	Therapy
Screening	Healthy (n=14)	H004N	44	M	NA	NA	NA	NA	NA
		H005N	36	F	NA	NA	NA	NA	NA
		H017N	35	F	NA	NA	NA	NA	NA
		H079O	36	F	NA	NA	NA	NA	NA
		H087N	34	M	NA	NA	NA	NA	NA
		H106S	47	F	NA	NA	NA	NA	NA
		H297S	28	M	NA	NA	NA	NA	NA
		H312C	36	M	NA	NA	NA	NA	NA
		H314C	26	M	NA	NA	NA	NA	NA
		H315C	43	F	NA	NA	NA	NA	NA
		H316C	27	F	NA	NA	NA	NA	NA
		H354C	26	F	NA	NA	NA	NA	NA
		H356C	28	M	NA	NA	NA	NA	NA
		H372C	24	F	NA	NA	NA	NA	NA

34.5 43% M  
(24-47) 57% F

Validation	T1D (n=10)	D216P	27	M	10.9	+	-	-	Insulin	
		D217Db	34	M	19.0	+	NA	NA	Insulin	
		L264D	28	F	32.0	+	+	+	Insulin	
		D267T	25	F	1.0	+	NA	NA	Insulin	
		D287T	30	M	4.1	+	NA	NA	Insulin	
		D314D	44	F	0.6	+	+	+	Insulin	
		D324D	28	F	11.3	+	+	NA	Insulin	
		D325D	19	M	0.3	-	-	+	Insulin	
		D327V	34	F	0.7	+	-	NA	Insulin	
		D339V	29	M	0.4	+	+	NA	Insulin	
			28.5 50% M (19-44) 50% F	2.6 (0.3-32.0)						
	Healthy (n=10)	H015T	30	M	NA	NA	NA	NA	NA	
		H170S	34	F	NA	NA	NA	NA	NA	
		H172O	33	F	NA	NA	NA	NA	NA	
		H192C	25	F	NA	NA	NA	NA	NA	
		H193C	45	F	NA	NA	NA	NA	NA	
		H227C	26	M	NA	NA	NA	NA	NA	
		H230C	29	F	NA	NA	NA	NA	NA	
		H245C	22	M	NA	NA	NA	NA	NA	
		H314C	26	M	NA	NA	NA	NA	NA	
H354C		26	F	NA	NA	NA	NA	NA		

27.5 40% M  
(22-45) 60% F

**Table S4. Related to Fig. 4-5. Characteristics of HLA-A2<sup>+</sup> study subjects for ex-vivo MMr studies on PBMCs.** The healthy donors analyzed in Fig. 4 (screening phase) and the T1D and age/sex-matched healthy donors analyzed in Fig. 5 (validation phase) are listed. The distribution of age, gender and T1D duration is shown at the bottom of each list (median and range for numerical variables). GADA, IA-2A, ZnT8A, anti-GAD, -IA-2 and -ZnT8 aAbs, respectively; NA, not available or not applicable.

	nPOD case	Sex	Age (yrs)	T1D T2D (yrs)	Positive aAbs	C-peptide (ng/ml)	Pancreas MMr <sup>+</sup>					PLN MMr <sup>+</sup>				
							IAPP	ISL1	UCN3	ZnT8	MelanA	IAPP	ISL1	UCN3	ZnT8	MelanA
T1D (n=9)	6070	F	23	7	IA-2/mIAA	<0.05			39	74	0			32	0	
	6161	F	19	7	IA-2/mIAA	<0.05	110	59		124	0	0	0		1176	0
	6211	F	24	4	GAD/IA-2/ZnT8/mIAA	<0.05	29	32		30	0	103	45		60	54
	6212	M	20	5	mIAA	<0.05	19	29		0		0	0		0	
	6237	F	18	12	GAD/mIAA	<0.05			8	267	0			0	0	
	6242	M	39	19	IA-2/mIAA	<0.05	33	9		66	0	0	0		101	0
	6243	M	13	5	mIAA	0.42	47	17		0		72	34		209	0
	6258	F	39	37	mIAA	<0.05			19	118	0			0	299	0
	6325	F	20	6	GAD/IA-2	0.14			28	28	0			35	0	0
aAb+ (n=9)	6080	F	69	NA	GAD/mIAA	1.84	38	39		55	25	43	41		50	61
	6101	M	65	NA	GAD	26.18	36	30		0		0	0		0	
	6123	F	23	NA	GAD	2.01	22	48		0		0	0		0	
	6151	M	30	NA	GAD	5.49			9	28	0					
	6154	F	49	NA	GAD	<0.05			21	64	0					
	6171	F	4	NA	GAD	8.95	13	9		37	0	0	0		0	
	6347	M	9	NA	mIAA	3.26	15	7		33	0	66	60		60	191
	6388	F	25	NA	GAD/mIAA	1.38			0	34	0			0	35	0
	6397	F	21	NA	GAD	12.8			6	42	0			0	189	0
No diabetes (n=12)	6103	M	2	NA	—	0.98			0	55	0			0	0	
	6174	M	21	NA	—	3.00	0	0				28	0			
	6179	F	20	NA	—	2.74			0	96	0			67	150	0
	6182	M	3	NA	—	2.28			4	23	0			89	163	65
	6227	F	17	NA	—	2.75			18	3	0			0	0	
	6234	F	20	NA	—	6.89			0	6	0			0	0	
	6254	M	38	NA	—	6.43	0	0		0		0		0		
	6271	M	17	NA	—	11.47	0	5		0		0	0		0	0
	6287	F	57	NA	—	4.75	7	8		4	0	0	0		0	
	6289	M	19	NA	—	8.05	0	6		0		55	0		0	
	6357	M	5	NA	—	8.82	9	29		0		32	0		0	
	6366	F	21	NA	—	0.41	14	24		0		55	0		0	
T2D (n=4)	6028	M	33	17	—	22.40		25		0			0		0	
	6059	F	19	0.3	—	10.68	12			0					107	0
	6273	F	45	2	—	3.17	13	7				0	0			
	6275	M	48	2	—	3.46	0			0		133	117		0	

**Table S5. Related to Fig. 6. nPOD cases analyzed by *in-situ* tissue MMr staining.** The clinical characteristics of each case are reported along with the counts ( $\times 10^{-3}$ ) of MMr<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup> pancreas and PLN section area for each of the indicated peptides. Positive sections are marked in red. Case #6287 (presenting a circumscribed neuroendocrine tumor in the pancreatic pan-body region; pan-tail region analyzed here) was classified as a non-diabetic control. NA, not applicable; mIAA, micro-insulin aAbs.

<b>Lasers and filters</b>	<b>Photomultiplier tubes (PMTs)</b>					
<b>488 nm blue laser</b>	C	B	A			
Long pass (LP) filter	\	502	655			
Band pass (BP) filter	488/10	530/30	695/40			
Fluorochrome	SSC	FITC				
<b>561 nm yellow-green laser</b>	E	D	C	B	A	
Long pass (LP) filter	\	600	635	685	735	
Band pass (BP) filter	582/15	610/20	660/20	710/50	780/60	
Fluorochrome	PE	PE-CF594			PE-Cy7	
<b>633 nm red laser</b>	C	B	A			
Long pass (LP) filter	\	710	750			
Band pass (BP) filter	660/20	730/45	780/60			
Fluorochrome	APC		APC-H7			
<b>405 nm violet laser</b>	F	E	D	C	B	A
Long pass (LP) filter	\	502	595	630	675	750
Band pass (BP) filter	450/50	525/50	605/20	655/8	710/50	780/60
Fluorochrome	BV421	L/D Aqua		BV650	BV711	BV786

**Table S6. Related to STAR Methods. Configuration of the flow cytometer used for HLA-A2 MMr assays. L/D, Live/Dead.**

ACTIVITES SCIENTIFIQUES  
ANNEXES

## Communications scientifiques

**2019** - Federation of Clinical Immunology society (FOCIS), Boston - poster

**2019** - Journées des doctorants de l'institut Cochin, Paris - présentation orale

**2018** - Forum des doctorants de l'ED BioSPC, Dourdan - présentation orale

**2018** - Immunology of Diabetes Society (IDS), Londres - poster + présentation flash

**2018** - Workpackage Meeting 3 INNODIA, Bruxelles - présentation orale

**2018** - Séminaire du département Endocrinologie Métabolisme et Diabète (EMD) de l'Institut Cochin, Paris - présentation orale

**2017** - Retraite du département EMD de l'Institut Cochin, Amboise - poster

## Missions doctorales

**2018-2019 - Mission d'enseignement**

UE 5.01 TP Immunogénétique, Licence 3 Sciences pour la Santé, UFR de Biologie Cellulaire

**2017-2018 - Mission d'expertise ANIMA5**

Participation à la Structure Chargée du Bien-Être Animal (SCBEA), suivi de l'expérimentation animale au sein de l'animalerie de l'Institut Cochin

## Encadrement

**2017-2019 - Encadrement stagiaires 3<sup>ème</sup>**

**2017 - Encadrement stagiaire L2**

