

Le diabète de type 1 : de l'identification d'un épitope autoantigénique crucial vers une approche thérapeutique ciblée

Type 1 diabetes: from the identification of a crucial autoantigenic epitope to a targeted therapeutic approach

Par Anne GAUVRIT^{(1)*}, Sabine SEVERE^{(2)*} et Jean-Marie BACH⁽³⁾
(communication présentée le 18 décembre 2003)

RÉSUMÉ

La caractérisation d'épitopes T CD8 est déterminante pour mieux comprendre le rôle des lymphocytes T CD8 autoréactifs dans la pathogénie du diabète de type 1 (DT1) et devrait permettre de tester de nouvelles approches thérapeutiques ciblées. Afin d'identifier des épitopes T CD8 relevant de l'autoantigène « Décarboxylase de l'Acide Glutamique » (GAD), nous avons administré à des souris NOD femelles, un plasmide codant pour la GAD65 (pc-GAD). L'immunisation plasmidique pc-GAD induit l'activation de lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope GAD 90-98 (p90). Ces lymphocytes sont de sous-type Tc1, sécrétant de l'IFN γ et du TNF α , cytokines très souvent associées au développement d'un diabète autoimmunitaire. Spontanément, les souris NOD présentent une réaction lymphocytaire T CD8 Tc1 spécifique de p90 très précoce, dès l'âge de 4 semaines. De plus, les lymphocytes T CD8 spécifiques de p90 attaquent les cellules d'îlots pancréatiques *in vitro* et induisent un diabète chez la souris NOD scid. Enfin, nous présentons ici les premiers résultats de protocoles d'administration de p90 à des souris NOD. Une telle administration pourrait prévenir l'apparition de la maladie si elle est effectuée avant son activation spontanée.

Mots-clés : autoimmunité, diabète, souris NOD, peptides, lymphocytes T CD8, immunoprévention.

(1) PhD

* Les deux auteurs ont contribué de façon équivalente à ce travail

(2) Ingénieur d'Étude, Doctorant

(3) PhD, D.V.M., Maître de Conférences, Directeur de l'UMR 707 ENVN/INRA/Université, École Vétérinaire, Atlanpôle La Chantrerie, BP40706, 44307 Nantes CEDEX 03. bach@vet-nantes.fr.

SUMMARY

The characterisation of CD8 epitopes is essential to understand the role of autoreactive CD8 T lymphocytes in the development of type 1 diabetes, and will eventually lead to testing new targeted therapeutic approaches. To identify GAD (Glutamic Acid Decarboxylase)-derived CD8 T epitopes, we administered a GAD65-coding plasmid (pc-GAD) to NOD female mice. The pc-GAD plasmidic immunisation activates CD8 T lymphocytes specific of the GAD 90-98 epitope (p90). These lymphocytes are Tc1 cells secreting the cytokines IFN γ and TNF α , often associated with autoimmune diabetes. NOD mice developed spontaneously a p90-specific CD8 T cell reaction, as early as 4 weeks of age. Moreover, these lymphocytes were also able to destroy pancreatic islet cells in vitro and can cause diabetes in NOD scid mouse. We present here the initial results of p90 administration to NOD mice, which we hope may prevent the onset of diabetes if administered before its spontaneous activation.

Key words: *autoimmunity, diabetes, NOD mice, peptides, CD8 T lymphocytes, immunoprevention.*

• INTRODUCTION

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune spécifique d'organe qui résulte de la destruction des cellules β insulinosécrétrices localisées dans les îlots de Langerhans pancréatiques (DELOVITCH et SINGH, 1997). Une meilleure compréhension de la réponse auto-immune menant au DT1 est nécessaire pour envisager (1) sa prévention spécifique chez les individus pré-diabétiques (et prédisposés), mais aussi (2) pour augmenter la faisabilité des approches de remplacement des cellules β une fois détruites (diabète déclaré) en prévenant, cette fois-ci, la récurrence de la réponse auto-immune. L'utilisation de peptides dérivés d'autoantigènes constitue une approche d'immunoprévention envisageable aujourd'hui. Les peptides sont en effet faciles à produire en grande quantité et représentent des produits inertes « sécuritaires ». Avant leur utilisation, il convient d'identifier des épitopes déterminants pour le DT1. L'objectif d'une partie de nos travaux récents a été de caractériser des épitopes activant des lymphocytes T CD8 autoréactifs chez la souris NOD (*Non Obese Diabetic*), modèle animal privilégié du DT1. Nous avons choisi comme autoantigène majeur, la Décarboxylase de l'Acide Glutamique de 65 kDa (GAD65) dont le rôle dans la pathogénie de la maladie apparaît déterminant (YOON *et al.*, 1999).

La destruction des cellules β menant au DT1 implique des lymphocytes T CD4 reconnaissant des peptides dérivés d'autoantigènes et présentés par des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces lymphocytes T CD4 autoréactifs secrètent le plus souvent des cytokines pro-inflammatoires de sous-type Th1 (IFN γ , TNF α , IL-12...) (KATZ *et al.*, 1995 ; RABINOVITCH *et al.*, 1995 ; TREMBLEAU *et al.*, 1995). Le rôle dans la destruction des cellules β des lymphocytes T CD8, le plus souvent cytotoxiques et dont l'activation est restreinte à la présentation d'autoantigène par des molécules de classe I du CMH, est moins bien identifié. Quelques arguments sous-tendent leur rôle, tous obtenus chez la souris NOD. Les deux catégories de lymphocytes T, CD4 et CD8, sont nécessaires au transfert

adoptif du diabète à des souris adultes irradiées (MILLER *et al.*, 1988). Les souris NOD dépourvues de molécules de classe I du CMH (NOD-beta2m $^{-/-}$) ne développent pas de diabète (WICKER *et al.*, 1994). Par ailleurs, un certain nombre de clones T CD8 peuvent transférer un diabète en l'absence de lymphocytes T CD4 (WONG *et al.*, 1999). Plus récemment, certaines études ont montré que ces cellules pourraient jouer un rôle fondamental non seulement dans la phase initiale de l'agression des cellules β (VIZLER *et al.*, 1999) mais aussi dans la progression vers une insulite destructrice et un diabète clinique (AMRANI *et al.*, 2001 ; AMRANI *et al.*, 2000).

L'identification d'épitopes autoantigéniques pertinents et reconnus par des lymphocytes T CD8 chez la souris NOD est très difficile et nécessite une immunisation préalable des souris en présence d'adjuvant (BOWIE *et al.*, 1999 ; QUINN *et al.*, 2001). L'immunisation plasmidique apparaît comme une approche très attractive pour la caractérisation de la réponse lymphocytaire T CD8 spécifique de la GAD chez cette souris. En effet, cette approche permet une synthèse intracellulaire de l'antigène recombinant, l'apprêtement de peptides dérivés sur les molécules du CMH de classe I et une activation importante et durable de lymphocytes T CD8 spécifiques (GURUNATHAN *et al.*, 2000). La mise en œuvre de ce mode d'immunisation nous est donc apparue comme un moyen efficace pour accroître la fréquence des précurseurs T CD8 auto-réactifs spécifiques et ainsi, d'étudier le rôle éventuel des lymphocytes T CD8 anti-GAD dans la pathogénie du diabète auto-immun et d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques spécifiques d'autoantigène.

Les travaux présentés ici proviennent de deux projets menés conjointement dans notre UMR IECM 707 ENVN/INRA/Université et ne sont pas encore publiés. L'UMR IECM développe trois thématiques sur le diabète de type 1 : (1) autoimmunité et immunoprévention chez l'animal et chez l'homme, (2) xénogreffe d'îlots de porc et (3) thérapie cellulaire du remplacement des cellules β détruites.

• MATÉRIELS ET MÉTHODES

Souris, diabète et transfert adoptif

Les souris NOD Ltj (*Non Obese Diabetic*) et NOD scid (*Severe Combined Immuno-Deficiency*) (Jackson Laboratories, USA) sont maintenues dans des conditions EOPS (Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques) dans notre animalerie. Chez les femelles NOD, 80 à 100 % développent un diabète à l'âge de 12 mois, pour 40 à 60 % chez les mâles. Les souris NOD scid dépourvues de lymphocytes T et B ne développent pas de diabète spontané. Elles sont utilisées pour tester le rôle diabéto-gène des lymphocytes T CD8, par injection de 5.10^6 cellules dans 200 ml de PBS par voie intraveineuse (IV). Les souris NOD et NOD scid expriment les allèles du CMH de classe I H2-K^d et H2-D^b, et les allèles du CMH de classe II I-Ag⁷. Le diagnostic de diabète est donné lorsque deux glycémies à une semaine d'intervalle sont supérieures à 13,5 mmol/l.

Injection plasmidique

Les souris NOD femelles reçoivent à l'âge de 3 ou 8 semaines, dans chaque muscle tibial antérieur, 50 µg de plasmide exempt d'endotoxine : pc-GAD contenant l'ADNc complet de la GAD65 ou pc-LacZ [pcDNA3.1/LacZ codant pour la βGalactosidase (βGal), Invitrogen, Pays-Bas] ou du PBS. Chaque injection plasmidique est précédée, cinq jours auparavant, par une injection de 100 µL au même site de cardiotoxine 10 µM (Latoxan, Rosans, France).

Tests de cytotoxicité

La cytotoxicité des lymphocytes T CD8 est mesurée par un test de relargage dans le surnageant de culture d'une enzyme cytoplasmique : la lactate déshydrogénase (LDH), qui provoque l'oxydation du lactate en pyruvate. Les cellules testées sont mises en contact (en triplicate) 5h en présence de 5 000 cellules cibles P815 (H2-K^d), préalablement incubées avec le peptide antigénique (5 µM, 1h30 à 37°C) ou infectées par un virus *Vaccinia* recombinant exprimant la GAD65 (vv-GAD) ou un contrôle (vv-TAP). Différents ratios cellules/P815 sont testés. Le relargage de LDH par les cellules cibles P815 est analysé conformément aux directives du test utilisé (Cytotox 96 non-radioactive cytotoxicity assay, Promega, WI, USA).

Obtention et phénotypage de mini-lignées lymphocytaires T CD8 spécifiques d'épitopes GAD

Les splénocytes sont isolés et les globules rouges sont lysés par choc osmotique en présence de NH₄Cl 0,17M pendant 10 mn dans la glace. Les cellules sont ensuite cultivées in vitro 6 jours à 37°C et 5 % de CO₂ dans le milieu complet suivant : AIMV sans sérum (Gibco, Invitrogen,

France) supplémenté avec 1 % d'acides aminés non essentiels (Gibco, Invitrogen) et 0,1 % de βmercaptoéthanol (Sigma, St Louis, MO, USA), en présence de peptide antigénique (5µM), puis le lendemain, d'IL-2 humaine recombinante (20 UI/ml, Roche Diagnostics, France) et d'IL-7 murine recombinante (10 ng/ml). Dans certains cas, sont rajoutés en plus de l'IL-2 et de l'IL-7, des anticorps anti-CD4 (clone GK1.15, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) et anti-I-A^k (clone 10.3.6, BD Biosciences) (1 µg/ml chacun). Le phénotype CD8 des mini-lignées obtenues a été contrôlé par analyse au FACSCalibur™ (clone 53-6.7, BD Biosciences). Elles sont à plus de 90 % CD8 positives.

Caractérisation des lymphocytes T CD8 spécifiques d'épitopes GAD

Après lavages, les lymphocytes T CD8 sont incubés ou non en présence de 100 UI/ml d'IL-2 recombinante humaine et 15 µg/ml d'anticorps anti-CD3 de souris (clone 145-2C11, BD Biosciences). La sécrétion d'IL-4, IFNγ et TNFα dans les surnageants de culture est évaluée par test "Cytometric Bead Array" (CBA, BD Biosciences). Les résultats sont analysés à l'aide des logiciels CellQuest™ et BD CBA™ (BD Biosciences).

Le phénotype des lignées lymphocytaires T CD8 est vérifié par marquage des cellules avec les anticorps anti-CD4 FITC (clone H129.19, Sigma), anti-CD3 PE (clone 145-2C11, BD Biosciences) et anti-CD8 Cy-5 (clone 53-6.7, BD Biosciences) et analyse par FACSCalibur™ (BD Biosciences).

Immunomodulation par injection de peptides

Des souris NOD femelles de 3 semaines sont injectées avec les peptides p90 et p507 ou du PBS en intrapéritonéale à la dose de 50 nmol dans 100 µl de PBS sans adjuvant.

Analyses statistiques et résultats

Les résultats sont présentés en moyenne ± sem. La significativité statistique a été évaluée par test de Student ou de Mann-Whitney. p<0,05 est considéré comme significatif.

• RÉSULTATS - DISCUSSION

Pour identifier les épitopes relevant de la GAD65 présentés par des molécules de classe I du CMH à des lymphocytes T CD8 et pour spécifier leur immunogénicité, nous avons administré à des souris NOD femelles, un plasmide codant pour la GAD65 (pc-GAD) ou un plasmide contrôle (pc-LacZ) codant pour la βgalactosidase.

L'immunisation plasmidique codant pour la GAD65 induit l'activation de lymphocytes T CD8 Tc1 spécifiques de l'épitope GAD 90-98 (p90)

Soixante-douze heures après une seule injection pc-GAD, nous détectons une forte réponse cytotoxique spécifique de cet autoantigène dans la rate et les ganglions drainant le site d'injection ($p < 0,04$, figure 1A). Seuls les lymphocytes T CD8 purifiés et non les lymphocytes T CD4 supportent cette cytotoxicité et cette spécificité ($p < 0,04$, figure 1A). Pour définir la spécificité épitopique de cette réponse T CD8, nous avons testé la reconnaissance de ces lymphocytes T CD8 vis-à-vis des peptides ayant le plus de chance de se fixer (et donc d'être présentés) par les molécules de classe I du CMH H-2Kd (figure 1B). La synthèse de GAD65 intracellulaire après immunisation plasmidique pc-GAD permet l'activation spécifique de lymphocytes T CD8 spécifiques du peptide GAD 90-98 (p90) ($p < 0,009$, figure 1C). P90 est le seul peptide testé reconnu spécifiquement par ces cellules. Jusqu'à présent, l'identification

d'épitopes dérivés d'autoantigènes β insulaires, ne se faisait qu'après immunisation avec le peptide en présence d'adjuvant (BOWIE *et al.*, 1999 ; QUINN *et al.*, 2001). Notre approche, plus directe, utilise la voie d'apprêtement et de présentation antigénique endogène "physiologique" d'un antigène de séquence complète (ici la GAD65).

Pour définir le sous-type fonctionnel Tc1 (sécrétion d'IFN γ et de TNF α) ou Tc2 (sécrétion d'IL-4) des lymphocytes T CD8 spécifiques de p90, nous avons évalué la production de TNF α , d'IFN γ et d'IL-4 par ces cellules. Le résultat est présenté dans la figure 1D : ces cellules sont de sous-type Tc1 ($p < 0,05$). Une sécrétion d'IFN γ et de TNF α est très souvent associée à la progression vers un diabète auto-immun déclaré chez la souris NOD (DEBRAY-SACHS *et al.*, 1991 ; GREEN et FLAVELL, 1999 ; VIZLER *et al.*, 2000), suggérant un rôle pathogène pour les lymphocytes T CD8 anti-p90. A l'inverse, les lymphocytes T CD8 spécifiques de sous-type Tc2 pourraient réduire l'effet agresseur des lymphocytes T CD8 de même spécificité de sous-type Tc1 (VIZLER *et al.*, 2000).

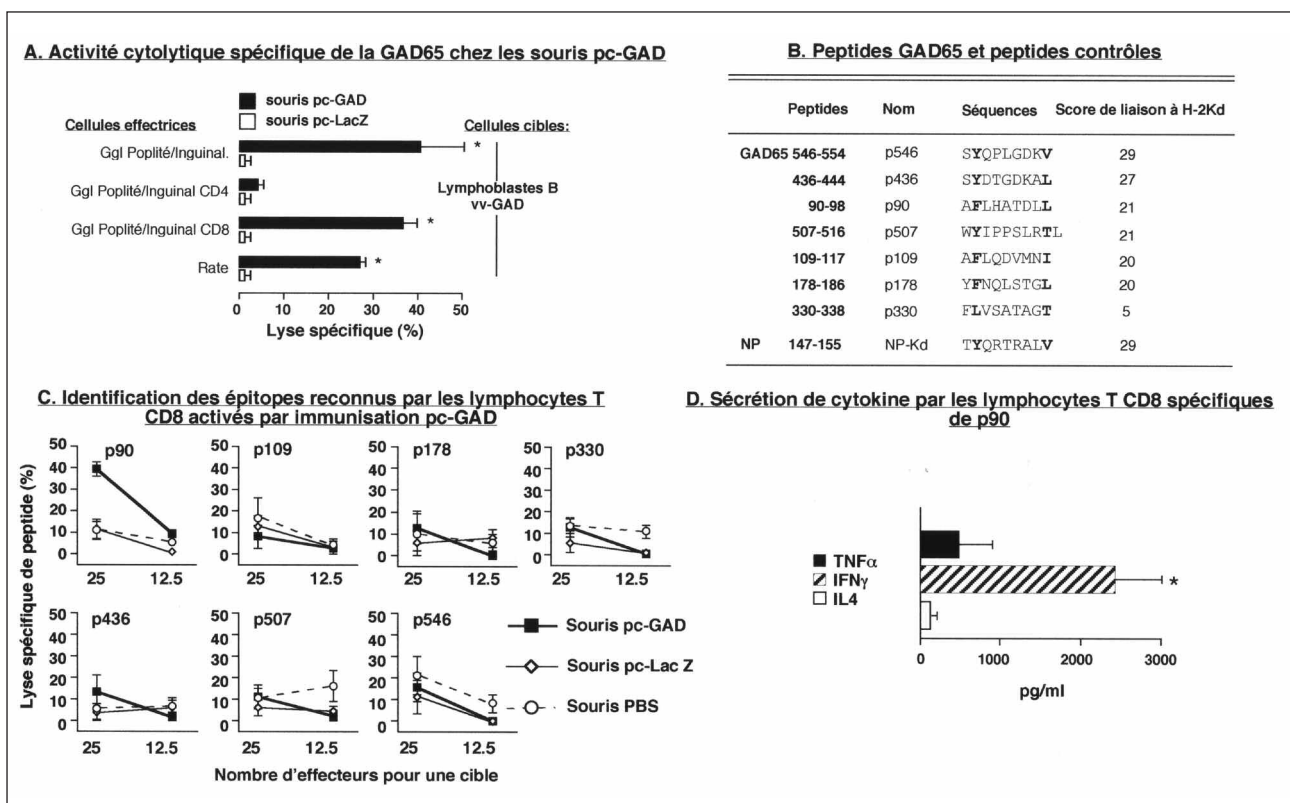


Figure 1 :

- A. L'activité cytolytique des cellules totales ou des lymphocytes T CD8 ou CD4 purifiés, de la rate ou des ganglions (Ggl) drainant le site d'injection plasmidique de souris NOD femelles ayant reçu une injection pc-GAD ou pc-LacZ, est testée en présence de P815 infectées par vvGAD ou vv-TAP comme contrôle négatif (ratio 10 : 1). Le % de lyse présenté est celui obtenu avec des P815 vv-GAD déduit du résultat obtenu avec des p815 vv-TAP. ($n \geq 3$) * $p < 0,04$.
- B. Les scores arbitraires de liaison à H-2Kd présentés ont été calculés à partir de la base SYFPEITHI (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>). Les peptides GAD p330 et NP-Kd (Nucléoprotéine) sont des peptides témoins.
- C. Les splénocytes de souris NOD immunisées 2 fois avec pc-GAD ou pc-LacZ ont été cultivés 6 jours en présence d'IL-2 et d'IL-7 sans peptide. Leur activité lytique a ensuite été testée vis-à-vis de 5000 P815 chargées en peptides ($n \geq 3$). Le nombre d'effecteurs (splénocytes cultivés *in vitro*) testés en présence des 5000 cibles (P815) est indiqué en abscisse. * $p < 0,009$.
- D. L'IFN γ , le TNF α et l'IL-4 produits par des lymphocytes T CD8 purifiés de la rate de souris pc-GAD ont été dosés par test CBA ($n \geq 3$) * $p < 0,05$.

Les souris NOD présentent une réaction lymphocytaire T CD8 Tc1 spécifique de p90 spontanée

Après avoir identifié l'épitope p90 en utilisant l'immunisation plasmidique, nous avons recherché si cette spécificité existait spontanément chez la souris NOD. Pour cela, nous avons examiné la cytotoxicité de mini-lignées lymphocytaires T CD8 obtenues après 6 jours de culture de splénocytes de souris NOD non manipulées, de différents âges, en présence de peptide p90 ou p546 (épitope précédemment identifié (QUINN *et al.*, 2001)) et d'IL-2 et d'IL-7 (figure 2A). De la même façon que QUINN *et al.*, nous détectons une réactivité spécifique du peptide p546 dès l'âge de 2 semaines ($p < 0,05$). La réactivité spécifique du peptide p90 est elle aussi précoce (dès 4 semaines d'âge, $p < 0,05$) et perdure dans le temps (8 semaines, $p < 0,05$). Ce résultat montre que les lymphocytes T CD8 spécifiques de p90 sont activés précocement. Ceci ren-

force leur rôle potentiel dans l'agression des cellules β pancréatiques. Comme indiqué dans la figure 2B, les mini-lignées de lymphocytes T CD8 spécifiques de p90 ou de p546 sont de sous-type Tc1.

Les lymphocytes T CD8 spécifiques de p90 sont diabétogènes

Pour tester le rôle réel de ces cellules, nous avons évalué leur rôle diabétogène *in vitro* (figure 2C) et *in vivo*. *In vitro*, il s'agit de tester la cytotoxicité, vis-à-vis de cellules d'îlot de Langerhans, des lymphocytes des ganglions drainant le site d'injection du plasmide pc-GAD. Cette injection permet l'activation, nous l'avons vu, de cellules T CD8 spécifiques de p90. Une immunisation pc-GAD induit une réponse cytotoxique spécifique de cellules d'îlots pancréatiques ($p < 0,04$, figure 2C). Nous avons par la suite testé le rôle pathogène des lymphocytes T CD8

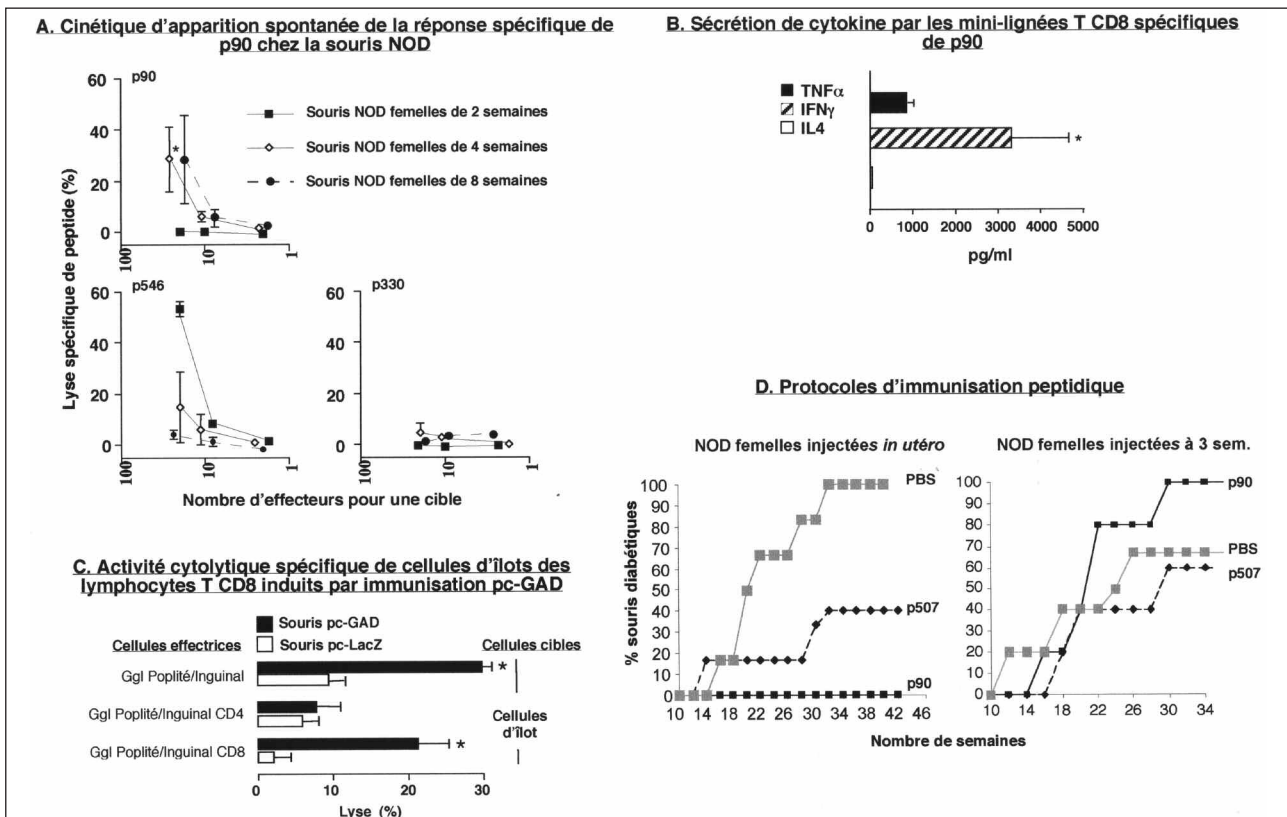


Figure 2 :

- A. Les splénocytes de souris NOD âgées de 2, 4 ou 8 semaines ont été cultivés en présence de peptide et d'IL-2 avant d'être testés pour leur activité lytique vis-à-vis de 5000 P815 chargés en peptide. Le nombre d'effecteurs (splénocytes cultivés *in vitro*) testés en présence des 5000 cibles (P815) est indiqué en abscisse. Le % de lyse présenté est déduit du résultat obtenu avec des P815 sans peptide. ($n \geq 2$) * $p < 0,05$.
- B. Les splénocytes de souris NOD femelles de 6 semaines sont stimulés *in vitro* pendant 6 jours avec IL-2 et le peptide p90 en présence des anticorps bloquants anti-CD4 et anti-I-Ag7. Les cellules sont ensuite incubées 24h avec de l'IL-2 et un anticorps anti-CD3. Les cytokines sécrétées dans le surnageant de culture sont dosées par test CBA ($n \geq 3$) * $p < 0,05$.
- C. L'activité lytique des cellules totales ou CD8 purifiées des ganglions drainant le site d'injection de souris pc-GAD ou pc-LacZ (une injection) est testée vis-à-vis de cellules d'îlots de Langerhans pancréatiques (ratio 10 :1) ($n \geq 3$) * $p < 0,04$.
- D. L'incidence est exprimée en pourcentages cumulés de souris hyperglycémiques en fonction du temps, par rapport au nombre de souris initial dans chaque lot. Les souris reçoivent des peptides avant la naissance (*in utero*) ($n=1$, 6 et 6 respectivement pour p90, p507 et PBS) ou à l'âge de trois semaines ($n=5$).

spécifiques de p90, *in vivo*, en les injectant par voie IV à des souris NOD scid (5.10⁶ cellules par souris NOD scid). Les lymphocytes T CD8 spécifiques de p90 induisent un diabète chez 5/5 souris NOD scid, ce qui n'est pas le cas des lymphocytes T CD8 anti-p546 (1/5). Ce dernier résultat confirme les expériences de Quinn *et al.* qui avaient montré le déclenchement de l'insulite, mais pas de la maladie, par les lymphocytes T CD8 anti-p546 (QUINN *et al.*, 2001). Confirmant le rôle très probablement crucial du peptide p90 dans la pathogénie du diabète chez la souris NOD, nous avons précédemment montré que l'immunisation pc-GAD pouvait aggraver et accélérer la maladie chez les souris NOD (GAUVRIT *et al.*, 2003).

L'administration de peptides GAD65 module l'apparition du diabète

L'administration de peptide p90 avant la détection d'une réponse T CD8 spécifique et spontanée chez la souris NOD (pré-diabète) pourrait prévenir l'apparition de la maladie (figure 2D). Par contre, l'administration de ce peptide pendant l'activation des lymphocytes T CD8 anti-p90 (3 semaines) semble accélérer l'apparition du diabète (figure 2D). Ces résultats méritent d'être confirmés par un nombre plus important de souris.

• CONCLUSION

Dans cette étude, nous montrons pour la première fois, qu'après apprêtement de la protéine autoantigénique entière et présentation par des molécules H-2Kd, le peptide p90 dérivé de la GAD65 est celui qui active les lymphocytes T CD8 avec le plus d'efficacité. Les lymphocytes T CD8 spécifiques de p90 sont détectés précocement chez la souris NOD naïve, sont de sous-type Tc1 et sont pathogènes. Ces caractéristiques font de ces lymphocytes des cellules très probablement cruciales dans la progression vers la maladie. Enfin, l'identification de p90 permet d'ors et déjà d'entrevoir la possibilité d'une immunomodulation peptidique basée sur des épitopes dérivés d'autoantigènes et reconnus par des lymphocytes T CD8. Parallèlement à cette étude, nous commençons une identification exhaustive des épitopes T CD8 dérivés de la GAD65 chez l'homme.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Anh-Tuan Vu, Marie Allard, Claude Chevalier et Michèle Ouary pour leur collaboration technique essentielle.

BIBLIOGRAPHIE

- AMRANI A, SERRA P, YAMANOUCI J, TRUDEAU JD, TAN R, ELLIOTT JF, SANTAMARIA P (2001) Expansion of the antigenic repertoire of a single T cell receptor upon T cell activation. *J. Immunol.*, **167**, 655-666.
- AMRANI A, VERDAGUER J, SERRA P, TAFURO S, TAN R, SANTAMARIA P (2000) Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T cell population. *Nature*, **406**, 739-742.
- BOWIE L, TITE J, COOKE A (1999) Generation and maintenance of autoantigen-specific CD8+ T cell clones isolated from NOD mice. *J. Immunol. Methods*, **228**, 87-95.
- DEBRAY-SACHS M, CARNAUD C, BOITARD C, COHEN H, GRESSER I, BÉDOSSA P, BACH J-F (1991) Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN-gamma. *J. Autoimmun.*, **4**, 237-248.
- DELOVITCH TL, SINGH B (1997) The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the nod. *Immunity*, **7**, 727-738.
- GAUVRIT A, SAÏ P, BACH JM (2003) DNA Vaccination Encoding intracellular Glutamic Acid Decarboxylase Could Enhance Insulinitis and Diabetes correlated with a specific Th2/3 CD4 T cell response in Non-Obese Diabetic Mouse. *Clin. Exp. Immunol. (en révision)*.
- GREEN EA, FLAVELL RA (1999) Tumor necrosis factor-alpha and the progression of diabetes in non-obese diabetic mice. *Immunol. Rev.*, **169**, 11-22.
- GURUNATHAN S, KLINMAN DM, SEDER RA (2000) DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Ann. Rev. Immunol.*, **18**, 927-974.
- KATZ JD, BENOIST C, MATHIS D (1995) T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science*, **268**, 1185-1188.
- MILLER BJ, APPEL MC, O'NEIL JJ, WICKER LS (1988) Both the Lyt 2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in non obese diabetic mice. *J. Immunol.*, **140**, 52-58.

- QUINN A, McINERNEY MF, SER-CARZ EE (2001) MHC class I-restricted determinants on the glutamic acid decarboxylase 65 molecule induce spontaneous CTL activity. *J. Immunol.*, **167**, 1748-1757.
- RABINOVITCH A, SUAREZPINZON WL, SORENSEN O, BLEACKLEY RC, POWER RF (1995) IFN-gamma gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.*, **154**, 4874-4882.
- TREMBLEAU S, PENNA G, BOSI E, MORTARA A, GATELY MK, ADO-RINI L (1995) Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J. Exp. Med.*, **181**, 817-821.
- VIZLER C, BERCOVICI N, CORNET A, CAMBOURIS C, LIBLAU RS (1999) Role of autoreactive CD8+ T cells in organ-specific autoimmune diseases: insight from transgenic mouse models. *Immunol. Rev.*, **169**, 81-92.
- VIZLER C, BERCOVICI N, HEURTIER A, PARDIGNON N, GOUDE K, BAILLY K, COMBADIÈRE C, LIBLAU RS (2000) Relative diabetogenic properties of islet-specific Tc1 and Tc2 cells in immunocompetent hosts. *J. Immunol.*, **165**, 6314-6321.
- WICKER LS, LEITER EH, TODD JA, RENJILIAN RJ, PETERSON E, FISCHER PA, PODOLIN PL, ZIJLSTRA M, JAENISCH R, PETERSON LB (1994) Beta 2-microglobulin-deficient NOD mice do not develop insulinitis or diabetes. *Diabetes*, **43**, 500-504.
- WONG FS, KARTTUNEN J, DUMONT C, WEN L, VISINTIN I, PILIP IM, SHASTRIN, PAMER EG, JANEWAY CA, JR. (1999) Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat. Med.*, **5**, 1026-1031.
- YOON JW, YOON CS, LIM HW, HUANG QQ, KANG Y, PYUN KH, HIRASAWA K, SHERWIN RS, JUN HS (1999) Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in β cells. *Science*, **284**, 1183-1187.