



**HAL**  
open science

# Quantification des lymphocytes T autoréactifs circulants au cours du diabète insulino-dépendant

Baptiste Moreira

► **To cite this version:**

Baptiste Moreira. Quantification des lymphocytes T autoréactifs circulants au cours du diabète insulino-dépendant. Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-03623267

**HAL Id: dumas-03623267**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03623267>**

Submitted on 1 Apr 2022

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0  
International License

# AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

*Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4*

*Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10*

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES  
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2017

N° 262

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE  
DOCTEUR EN MÉDECINE  
Spécialité Biologie médicale

Quantification des lymphocytes T autoréactifs circulants au  
cours du diabète insulino-dépendant

Présentée et soutenue publiquement  
Le 23 octobre 2017

Par

***Baptiste MOREIRA***

Né le 26 janvier 1987 à Rosny-Sous-Bois

Dirigée par Mme le Professeur Sophie CANDON

Jury :

Mme le Professeur Lucienne CHATENOU

Président

Mme le Professeur Sophie CANDON

M. le Professeur Jean-Louis BEAUDEUX

M. Le Docteur Jacques BELTRAND

M. le Professeur Xavier NASSIF

M. le Professeur Michel POLAK



Except where otherwise noted, this work is licensed under  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

## Remerciements

A Madame le Professeur Sophie Candon pour son encadrement et son accompagnement tout au long de cette thèse. Merci pour tes précieux conseils, ta bonne humeur et ton enthousiasme, mais aussi pour tous les déjeuners partagés qui sont tout autant de bons moments. J'espère avoir l'occasion de travailler à nouveau avec toi.

A Madame le Professeur Lucienne Chatenoud, pour sa confiance et ses remarques pertinentes. Je suis vraiment très heureux de rejoindre votre équipe et de pouvoir travailler avec vous sur de nouveaux projets.

A Monsieur le Professeur Michel Polak et Monsieur le Docteur Jacques Beltrand pour avoir cru en ce projet. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur Xavier Nassif, que je tiens à remercier pour ce semestre riche en enseignements dans son service. Merci pour votre bienveillance et votre disponibilité.

A Monsieur le Professeur Jean-Louis Beaudeau, qui me fait l'honneur de faire partie de ce jury. Merci de vous être rendu disponible.

A l'équipe du Cellulaire : Mimouna, Laurence, Marguerite, merci de m'avoir accompagné dans cette aventure et de m'avoir aidé pour toutes ces manips !

Au reste de l'équipe du laboratoire : Nathalie, Julie, Anne, Marie, Serge, MC... Un grand merci pour votre soutien et tous vos petits coups de pouce qui m'ont bien aidé dans ce travail.

A Marie-Alexandra pour tous ces moments passés à discuter dans la chambre noire. Vivement nos prochaines conversations !

Un immense merci à Anne-Perrine, pour avoir été toujours présente, pour un café, un déjeuner, une question, etc. Je suis à la fois ravi et impatient de travailler avec toi, nous formerons une super équipe !

Merci à mes parents, pour leur confiance, et pour m'avoir toujours soutenu sans réserve.

A mon frère Clément, pour son soutien et ses blagues toujours au top !

A mon ami Banglun, pour ses encouragements et ses conseils avisés.

A Isabelle pour son soutien, son aide, sa patience et tout le reste.

A ma fille Rose, pour avoir illuminé ces longues après-midis de travail !

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>2</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>3</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>8</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>11</b>
<b>1) LE DIABETE DE TYPE 1 (OU DIABETE INSULINODEPENDANT) .....</b>	<b>13</b>
1.1 EPIDEMIOLOGIE .....	14
1.2 PHYSIOPATHOLOGIE .....	18
1.3 LE ROLE PATHOGENE DES LYMPHOCYTES T .....	26
<b>2) LES AUTOANTIGENES DES CELLULES BETA INSULINOSECRETICES .....</b>	<b>29</b>
<b>3) LES AUTOANTICORPS ANTI-CELLULES BETA .....</b>	<b>33</b>
<b>4) L'INTERET DU SUIVI DE LA REPOSE LYMPHOCYTAIRE T SPECIFIQUE DES ANTIGENES DES CELLULES BETA .....</b>	<b>36</b>
<b>5) TOUR D'HORIZON DES TECHNIQUES DE DETECTION DES LYMPHOCYTES T SPECIFIQUES D'ANTIGENE .....</b>	<b>38</b>
5.1 LES TETRAMERES.....	38
5.2 LE MARQUAGE INTRACELLULAIRE DES CYTOKINES (ICS) .....	41
5.3 L'ELISPOT .....	41
<b>6) OBJECTIFS DE L'ETUDE.....</b>	<b>43</b>
<b>PATIENTS ET METHODES .....</b>	<b>45</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>49</b>
<b>1) LES AUTOANTICORPS .....</b>	<b>49</b>
<b>2) L'ELISPOT DIABETE .....</b>	<b>50</b>
2.1 LA COMPARAISON DES GROUPES DE PATIENTS ET DE SUJETS CONTROLES .....	54
2.2 LA DEFINITION D'UN SEUIL DE POSITIVITE SUR LA BASE DES RESULTATS DU GROUPE CONTROLE .....	55
2.3 L'EXPRESSION DES RESULTATS PAR RAPPORT AU CONTROLE NEGATIF INDIVIDUEL : LE «SEUIL TECHNIQUE DE DETECTION» .....	56
<b>3) LA RELATION ENTRE L'ELISPOT ET LES AUTOANTICORPS .....</b>	<b>58</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>59</b>
<b>1) LES AUTOANTICORPS ANTI-CELLULES BETA DANS UNE POPULATION PEDIATRIQUE .....</b>	<b>59</b>
<b>2) L'ELISPOT DIABETE DANS UNE POPULATION PEDIATRIQUE .....</b>	<b>60</b>
<b>3) UNE APPROCHE TECHNIQUE DE L'ELISPOT .....</b>	<b>62</b>
<b>4) L'INTERET DISCUTABLE DES POOLS DE PEPTIDES.....</b>	<b>64</b>

5) UN ZOOM SUR LA REPONSE SPECIFIQUE DE L'AUTOANTIGENE ZNT8 DANS UNE POPULATION PEDIATRIQUE.....	69
6) L'AVENIR DES TESTS DE DETECTION DES LYMPHOCYTES T AUTOREACTIFS .....	70
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>72</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>73</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>80</b>

## Liste des figures

*Figure 1 : carte des taux d'incidence annuels (pour 100 000 habitants) par pays du diabète de type 1 chez les enfants. Soltész et al. 2006.*

*Figure 2 : comparaison des taux d'incidence du diabète de type 1 chez les enfants vivants au Pakistan, chez les enfants de migrants pakistanais dans le Yorkshire et de la population anglaise locale. Staines A. (1997) and Bodansky H.J. (1992).*

*Figure 3 : taux d'incidence annuelle entre 1990 et 1999 de la cohorte The DIAMOND Project Group.*

*Figure 4 : transfert du diabète chez un receveur immuno-incompétent par l'injection de splénocytes de souris NOD diabétiques*

*Figure 5 : Odds ratio des différents gènes impliqués dans le diabète. Pociot Diabetologia 2010.*

*Figure 6 : mimétisme moléculaire : comparaison des séquences peptidiques de GAD65 et de la protéine 2C du virus Coxsackie B4.*

*Figure 7 : diversité microbienne en fonction du temps, chez les enfants sains, diabétiques, et ceux présentant uniquement une séroconversion. Kostic et al. 2015.*

*Figure 8 : physiopathologie du diabète de type 1. Van Belle TL, et al. Physiol Rev. 2011.*

*Figure 9 : suivi sur 12 mois de souris NOD et de souris NOD invalidées pour la chromogranine A. Rocky L. Baker et al. J Immunol 2016.*

*Figure 10 : courbe de prédiction du diabète : suivi sur 5 ans de 549 enfants ayant un antécédent familial de diabète au 1er degré. Etude ENDIT.*

*Figure 11 : prévalences superposées des anticorps anti-insuline, GAD65, IA2 et ZnT8 chez les patients au moment du diagnostic. Wenzlau et al. 2007(57).*

*Figure 12 : évolution de la dose d'insuline nécessaire au contrôle de la glycémie : traitement par anticorps anti-CD3 versus placebo. Keymeulen B. Diabetologia 2009.*

*Figure 13 : avantage des tétramères pour la détection de lymphocytes T spécifiques d'un antigène : meilleure stabilité de l'interaction avec les TCR par rapport aux monomères. Davis et al 2011.*

*Figure 14 : la technique des tétramères : A. Synthèse du tétramère. B. Révélation des cellules positives pour le tétramère. <http://www.medscape.com>*

*Figure 15 : schéma d'un dextramère. <http://www.immudex.com>*

*Figure 16 : les étapes de la technique de l'ELISPOT*

*Figure 17 : présences superposées des auto-anticorps chez les patients*

*Figure 18 : un exemple d'ELISPOT diabète : présence de spots dans les puits IA2, PP65 et PHA (contrôle positif)*

*Figure 19 : résultats de l'ELISPOT diabète : groupe patients à gauche, groupe contrôle à droite, échelle log10 en haut et linéaire en bas*

*Figure 20 : comparaison des résultats de l'ELISPOT diabète pour chaque antigène ; groupe patients versus groupe contrôle*

*Figure 21 : illustration de la différence de taille et d'intensité des spots entre le contrôle négatif et un antigène donné*

*Figure 22 : exemple d'un patient dont les réponses sont constituées essentiellement de lymphocytes T CD4+. Fuchs et al. 2015.*

*Figure 23 : exemples de peptides hybrides*

*Figure 24 : A : production d'interféron gamma en réponse à un antigène, chez la souris NOD ; comparaison des réponses en fonction de la concentration d'antigène : peptide hybride (carrés noirs) et peptide non modifié (carrés blancs). B : identification d'un peptide hybride chez l'homme : fusion d'un fragment du peptide C et du neuropeptide Y. Delong et al. 2016.*

## Liste des tableaux

*Tableau 1 : caractéristiques du diabète de type 1 et de type 2*

*Tableau 2 : exemples de polymorphismes HLA prédisposants et protecteurs*

*Tableau 3 : caractéristiques des groupes patients et contrôle*

*Tableau 4 : résultats des auto-anticorps chez les patients*

*Tableau 5 : nombre d'auto-anticorps présents simultanément chez les patients*

*Tableau 6 : données brutes après soustraction du bruit de fond (réactivité non spécifique mesurée par mise en culture des cellules dans du milieu seul : AIM V et IL7) du groupe patients, en SFC/million de CD3+*

*Tableau 7 : données brutes après soustraction du bruit de fond du groupe contrôle, en SFC/million de CD3+*

*Tableau 8 : calcul du seuil de positivité (en rouge) à partir des données du groupe contrôle*

*Tableau 9 : résultats interprétés avec le seuil de positivité préalablement établi avec le groupe contrôle*

*Tableau 10 : réactivité simultanée dans le groupe patients (en utilisant le seuil +3DS)*

*Tableau 11 : résultats du groupe patients interprétés avec un seuil de positivité défini comme la moyenne du contrôle négatif majorée de 3, 4 ou 5 écarts-types, valeurs brutes (nombre de spots par puits, sans soustraction du bruit de fond)*

*Tableau 12 : réactivité simultanée dans le groupe patients (en utilisant le seuil Basal+3DS)*

*Tableau 13 : concordance entre l'ELISPOT diabète et les auto-anticorps*

*Tableau 14 : relation entre l'ELISPOT diabète et les auto-anticorps : coefficient de Bravais-Pearson*

*Tableau 15 : comparaison des résultats des auto-anticorps avec ceux d'autres études ayant des critères d'inclusion comparables (\*calculée avec les données brutes ; \*\* dans le sous-groupe 0-14 ans)*

*Tableau 16 : comparaison des résultats de l'ELISPOT diabète avec ceux d'autres études comparables (\*23 pools de 2 peptides pour ZnT8)*

*Tableau 17 : comparaison des fréquences des réponses lymphocytaires dans le diabète de type 1 (\* résultats exprimés en SFC/million de CD3+ ; \*\*calculé avec les données brutes)*

*Tableau 18 : réactivités chez les patients HLA A2+ et HLA A2-*

## Abréviations

BKV : B.K. virus

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

EBV : virus d'Epstein-Barr

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ELISPOT : Enzyme-Linked ImmunoSPOT

GABA : Acide Gamma-aminobutyrique

GAD : décarboxylase de l'acide glutamique

IA-2 : phosphatase IA-2

ICA : anticorps anti-cellules d'îlots de Langerhans

ICS : Intracellular Cytokine Staining, marquage intracellulaire des cytokines

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBMC : peripheral blood mononuclear cell, cellules mononucléées du sang périphérique

RE : Réticulum Endoplasmique

RIA : Radioimmunoassay, dosage radio-immunologique

ZnT8 : transporteur de zinc ZnT8

## Introduction

---

Le diabète de type 1 ou insulino-dépendant est une maladie auto-immune caractérisée par une carence en insuline, conséquence d'une destruction sélective des cellules bêta des îlots de Langerhans par des lymphocytes T auxiliaires (CD4+) et cytotoxiques (CD8+) autoréactifs.

Ces lymphocytes T reconnaissent des peptides issus de molécules propres à la cellule bêta, à l'instar de l'insuline, la décarboxylase de l'acide glutamique (GAD), la phosphatase IA-2 et le transporteur de zinc ZnT8.

La détection fiable de ces lymphocytes T autoréactifs constitue un défi majeur, dont la résolution permettrait à la fois d'établir un profil de réactivité d'intérêt diagnostique chez les patients à risque de développer la maladie et d'évaluer l'efficacité des thérapies d'immuno-intervention chez les patients diabétiques.

Plusieurs techniques de détection ont été mises en œuvre, mais leur utilisation est restée limitée du fait de considérations pratiques liées à leur réalisation. Parmi ces techniques, on peut citer l'utilisation de tétramères incluant les peptides d'intérêt pour détecter les lymphocytes CD4+ et CD8+ autoréactifs, ou encore la détection de la production d'interféron  $\gamma$  par des cellules T autoréactives CD8+ circulantes stimulées par les peptides d'intérêt (ELISPOT).

Dans les deux cas, le recours à ces techniques est limité à une population porteuse d'un certain haplotype HLA (essentiellement HLA-A2), capable de présenter les peptides d'intérêt identifiés à l'heure actuelle. De plus, la technique des tétramères, principalement pour la détection des lymphocytes autoréactifs CD4+, est laborieuse, car elle nécessite une expansion préalable en culture *in vitro* des lymphocytes T. Par ailleurs, la fabrication des tétramères eux-mêmes est complexe et le coût associé à cette technologie élevé.

Depuis maintenant plusieurs années, nous avons développé une technique ELISPOT reposant sur l'utilisation de pools de peptides chevauchants, représentatifs de la séquence des antigènes entiers. C'est principalement chez des patients immunodéprimés, à l'instar des transplantés d'organes, que cette technique a été initialement mise en œuvre. Elle a été appliquée aux antigènes viraux (de l'EBV, du CMV ou encore du BKV) afin de détecter de manière fiable les lymphocytes T spécifiques de ces épitopes viraux et de suivre leur devenir en fonction du traitement immunosuppresseur appliqué(1,2).

La technique ELISPOT est caractérisée par sa très grande spécificité et, lorsque l'on utilise des pools de peptides chevauchants, par la possibilité de détecter les cellules T spécifiques chez tous les patients - indépendamment de leurs haplotypes HLA.

Il a été clairement démontré par différents laboratoires dont le nôtre, qu'il est possible de détecter les lymphocytes T spécifiques de l'antigène d'intérêt présents en circulation chez l'individu au moment de l'analyse, après une stimulation de courte durée, seulement 16 à 20 heures(3,4).

Permettant ainsi d'obtenir une image instantanée du statut « d'autoréactivité » des patients analysés, la méthode de l'ELISPOT a été appliquée par plusieurs équipes à la détection des autoantigènes impliqués dans le diabète de type 1, en utilisant des peptides uniques dérivés d'autoantigène, pour la seule détection des lymphocytes cytotoxiques CD8+ chez des patients porteurs de l'haplotype HLA-A2(5-8).

Notre but a été d'appliquer le nouveau test ELISPOT basé sur l'utilisation des pools de peptides chez des enfants atteints de diabète de type 1 nouvellement diagnostiqués. Nous visons à identifier le profil de spécificité et la fréquence des lymphocytes T autoréactifs de ces enfants, et ce de façon plus exhaustive par rapport aux études antérieures puisque tous les enfants pouvaient être testés, indépendamment de leurs haplotypes HLA. Les réponses vis-à-vis des quatre autoantigènes majeurs du diabète ont été explorées simultanément. Les résultats ont été analysés en relation avec les paramètres immunologiques (autoanticorps anti-cellules bêta circulants) utilisés habituellement pour le diagnostic de la maladie.

L'objectif principal a été de tester l'utilisation des pools de peptides chevauchants chez tous les enfants diabétiques et de quantifier, de ce fait, les fréquences des réponses lymphocytaires T dans le sang circulant.

L'objectif secondaire a été d'étudier plus spécifiquement les réponses anti-ZnT8 dans une population pédiatrique.

## 1) Le diabète de type 1 (ou diabète insulino-dépendant)

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par une défaillance des mécanismes de régulation de la glycémie : une hormone produite par le pancréas, l'insuline, est insuffisamment produite ou mal utilisée par l'organisme, aboutissant à une hyperglycémie non contrôlée.

Cette hyperglycémie est responsable de nombreuses complications dégénératives à long terme. De multiples organes peuvent être touchés, notamment les systèmes vasculaire et nerveux. Le diabète constitue la cinquième cause de mortalité dans le monde et représente en France la première cause d'insuffisance rénale terminale, de cécité avant 65 ans et d'amputation non traumatique, ce qui en fait une maladie grave et un problème de santé publique.

L'OMS s'accorde sur une définition purement biologique, en caractérisant un diabète sucré en présence :

- D'une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L
- Ou d'une glycémie aléatoire supérieure à 2 g /L, accompagnée de signes cliniques d'hyperglycémie

Une distinction est établie entre le diabète de type 1 (ou insulino-dépendant, résultant d'une carence absolue en insuline) et le diabète de type 2 (ou non insulino-dépendant, résultant d'une carence relative en insuline par insulino-résistance). Leurs caractéristiques respectives sont illustrées dans le *tableau 1*.

	Type 1	Type 2
<b>Age de survenue</b>	Enfant et adulte jeune	Après 35 ans
<b>Antécédents familiaux</b>	Rares	Fréquents
<b>Début</b>	Rapide et explosif	Lent et insidieux
<b>Symptomatologie</b>	Bruyante	Pauvre
<b>Poids</b>	Normal ou maigre	Obésité
<b>Facteur déclenchant</b>	Souvent présent	Souvent présent
<b>Hyperglycémie au diagnostic</b>	Majeure	Modérée
<b>Cétose</b>	Souvent présente	Absente
<b>Complication dégénérative au diagnostic</b>	Absente	Présente dans 50% des cas
<b>Cause principale de mortalité</b>	Insuffisance rénale	Maladie cardiovasculaire

*Tableau 1 : caractéristiques du diabète de type 1 et de type 2*

## 1.1 Epidémiologie

En France, on dénombre environ 3,5% de diabétiques dans la population, ce qui représente environ 2 millions de personnes, parmi lesquelles 10% sont atteintes de diabète de type 1.

L'incidence annuelle du diabète insulino-dépendant est environ de 13,5 cas pour 100 000 enfants de moins de 15 ans en France.

Deux pics d'incidence ont été mis en évidence : le premier entre 5 et 7 ans, le second au moment de la puberté. L'incidence suit également un rythme saisonnier, étant plus élevée à l'automne, et plus basse en été.

Alors que beaucoup de pathologies auto-immunes touchent préférentiellement les femmes, le sex-ratio des patients atteints de diabète de type 1 semble être proche de 1, avec toutefois une controverse sur une modeste prédominance chez les hommes(9,10).

Une exception est celle où le diabète est une manifestation d'une endocrinopathie auto-immune associant en particulier une thyroïdite ; les patients sont alors en majorité des femmes adultes jeunes.

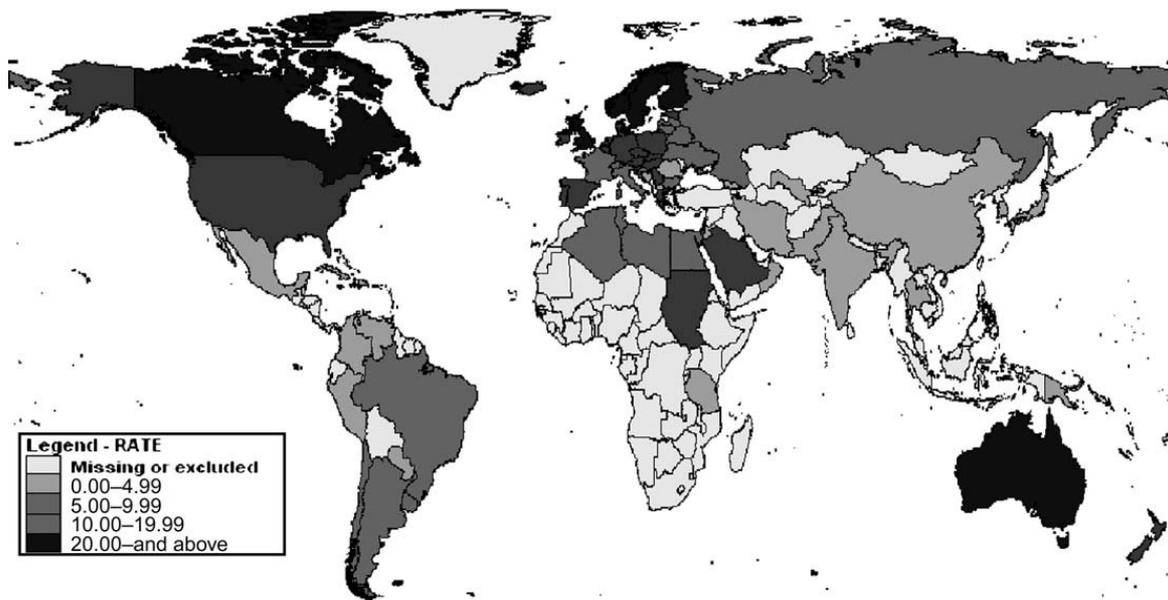
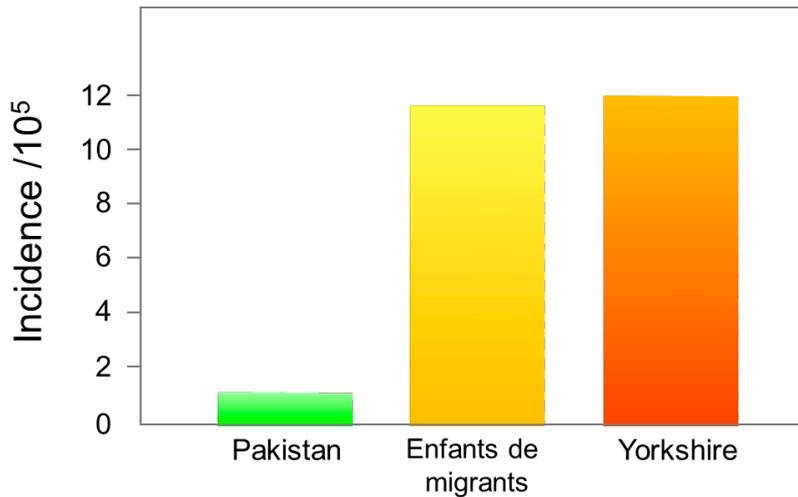


Figure 1 : carte des taux d'incidence annuels (pour 100 000 habitants) par pays du diabète de type 1 chez les enfants. Soltész et al. 2006.

Les études épidémiologiques ont montré que l'incidence suit également un gradient géographique nord-sud : les pays nordiques présentent une incidence très élevée (à l'instar de la Finlande avec 60 cas/100 000/an), alors que les pays du sud ont une incidence beaucoup plus faible (Venezuela et Inde, 0.1 cas/100 000/an)(11-13).

Par ailleurs, il est intéressant de noter des variations significatives d'incidence :

- Chez des pays pourtant voisins : l'Estonie, bien que voisine de la Finlande, présente une incidence trois fois moindre.
- Chez des groupes de personnes de mêmes origines, mais vivant à des endroits différents : par exemple, l'incidence du diabète chez les enfants de migrants est identique à celle de la population locale, et non à celle du pays d'origine (*figure 2*)(14)



*Figure 2 : comparaison des taux d'incidence du diabète de type 1 chez les enfants vivants au Pakistan, chez les enfants de migrants pakistanais dans le Yorkshire et de la population anglaise locale. Staines A. (1997) and Bodansky H.J. (1992).*

Des facteurs, comme l'environnement ou la génétique, jouent donc un rôle dans la survenue du diabète de type 1. Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer le rôle de l'environnement. L'une des plus importantes, l'hypothèse de l'hygiène, selon laquelle la plus faible exposition aux agents infectieux perturberait le fonctionnement du système immunitaire, expliquerait la progression des allergies et des maladies auto-immunes(15,16).

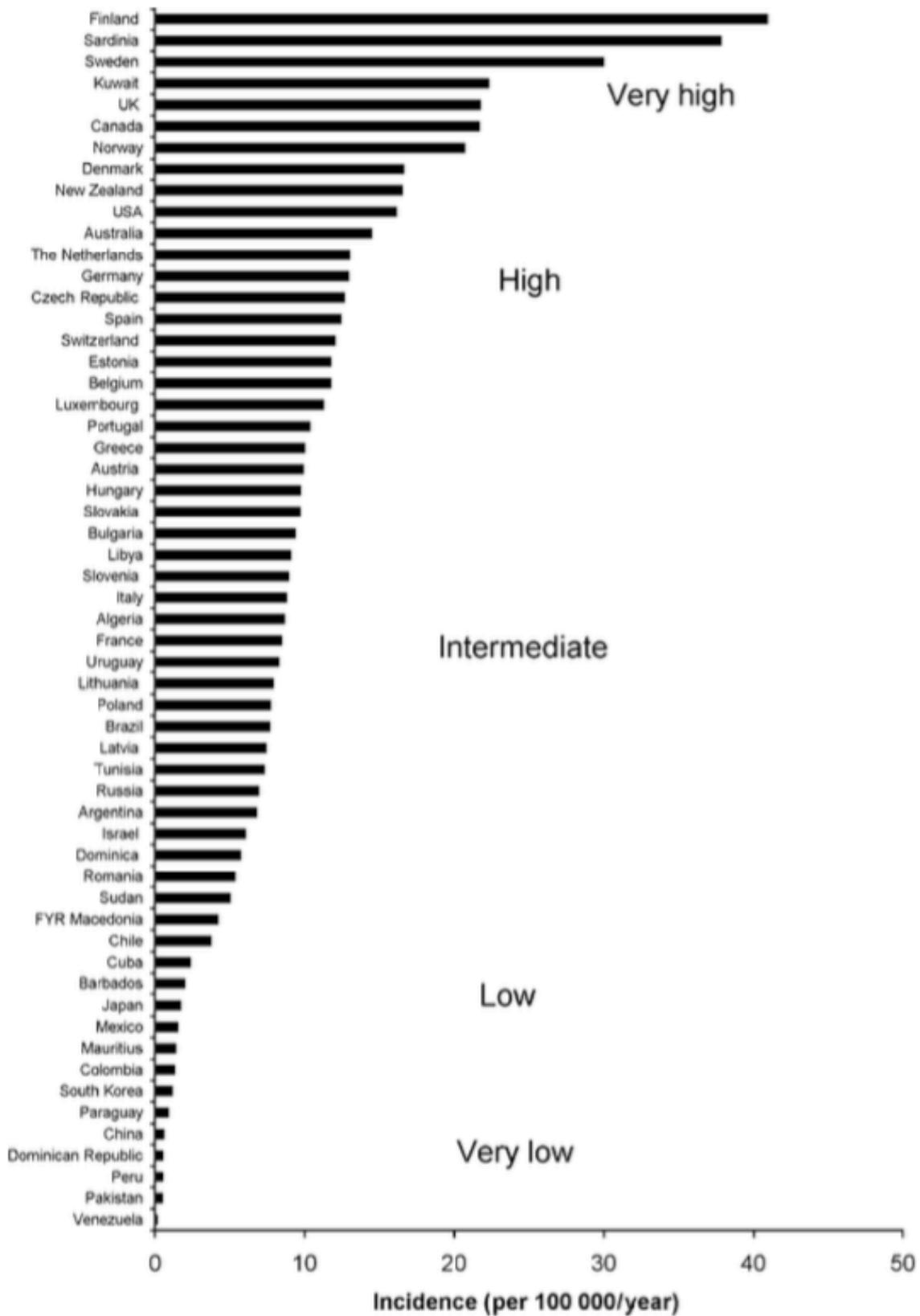


Figure 3 : taux d'incidence annuelle entre 1990 et 1999 de la cohorte The DIAMOND Project Group.

De manière générale, l'incidence est en augmentation depuis plusieurs décennies (avec par exemple une croissance annuelle de 3.3% en Suède, et 2.4% en Finlande), et plus particulièrement chez les moins de 5 ans(17–21). Le diabète de type 1 constitue ainsi un véritable problème de santé publique mondial, actuel et futur.

## 1.2 Physiopathologie

Le diabète de type 1 est causé par la destruction auto-immune sélective des cellules bêta pancréatiques productrices d'insuline. Les autres cellules endocrines de l'îlot de Langerhans ne sont pas touchées.

Un double-effet résulte de cette carence en insuline :

- D'une part, cette hormone, indispensable à la régulation de la glycémie, provoque normalement l'entrée du glucose dans les cellules, notamment les adipocytes, les hépatocytes et les cellules musculaires afin de constituer un stock d'énergie facilement mobilisable. En l'absence d'insuline, le glucose n'entre plus dans lesdites cellules, et reste en circulation dans le sang.
- D'autre part, l'absence d'insuline est interprétée par les organes régulateurs du métabolisme glucido-lipidique (le foie, les muscles et le tissu adipeux) comme un manque de glucose, donc une nécessité de l'économiser, voire d'en fabriquer, pour le bon fonctionnement cérébral.

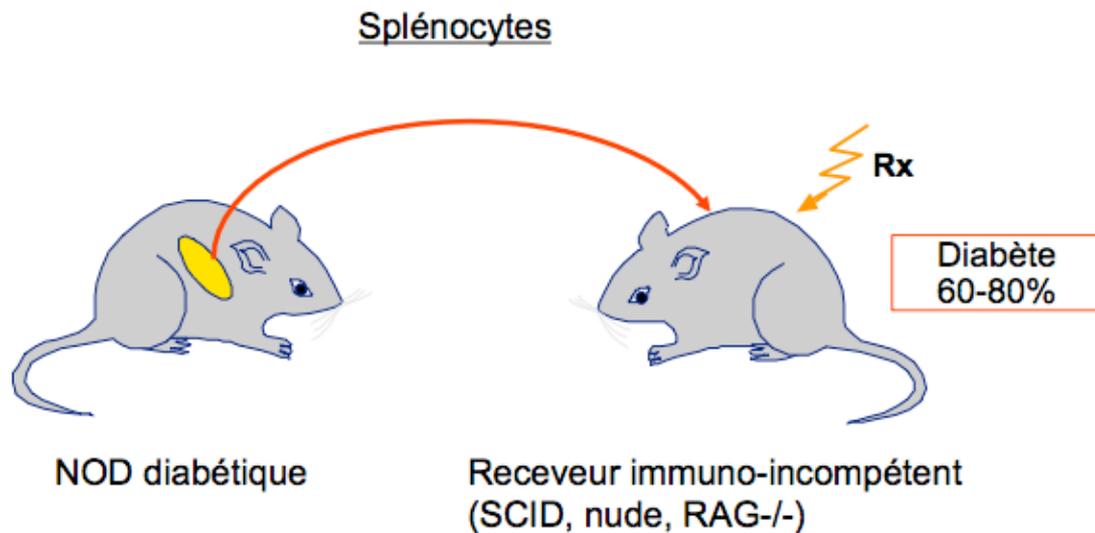
Ainsi, dans le diabète de type 1, malgré la poursuite des apports alimentaires, le glucose s'accumule dans le sang, menant à une hyperglycémie. Celle-ci apparaît lorsqu'il ne reste plus qu'environ 30% de cellules bêta fonctionnelles.

Il s'agit de la maladie chronique la plus fréquente de l'enfant. Le diagnostic est établi suite à l'identification du syndrome cardinal typique (caractérisé par une glycosurie, une polyurie, une déshydratation, un amaigrissement et une asthénie, associés de façon inconstante à une polyphagie), ou d'une complication métabolique (acidocétose diabétique).

Le traitement repose sur l'administration pluriquotidienne d'insuline.

Le diabète de type 1 est une maladie d'origine auto-immune, ce que viennent étayer les éléments suivants, qui seront en outre détaillés par la suite :

- Des autoanticorps dirigés contre les antigènes de la cellule bêta pancréatique sont retrouvés dans le sérum des patients diabétiques.
- L'histologie des prélèvements pancréatiques humains post-mortem montre une infiltration des îlots de Langerhans par des cellules de l'immunité dont une majorité de lymphocytes T, avec une prédominance des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ lors de l'insulite(22).
- Le diabète est fortement associé avec le système HLA, certains polymorphismes étant des facteurs de prédisposition, d'autres des facteurs protecteurs.
- Quelques cas de transfert du diabète sont décrits lors d'une greffe de moelle entre deux jumeaux HLA identiques, montrant l'origine immunitaire de la maladie. Le receveur, non diabétique lors de la greffe, le devient dans les mois ou années qui suivent la greffe (le donneur étant diabétique au moment du don)(23).
- La souris NOD, modèle expérimental très similaire sur de nombreux aspects à ce qui se passe chez l'homme, développe spontanément la maladie entre 90 et 180 jours de vie. C'est essentiellement sur ce modèle que reposent la compréhension de la physiopathologie du diabète, mais également l'exploration de possibles voies thérapeutiques. Le rôle pathogène direct des lymphocytes T est démontré par l'induction d'un diabète chez un receveur immuno-incompétent par l'injection de splénocytes de souris NOD diabétique (*figure 4*). De plus, les lymphocytes T impliqués chez la souris NOD sont spécifiques d'autoantigènes des îlots bêta, comme l'insuline(24,25), la décarboxylase de l'acide glutamique (GAD)(26,27), ou l'IGRP (Islet specific G6P related protein)(28).
- Enfin, les immuno-interventions ciblant les lymphocytes T sont efficaces pour la prévention et le traitement de la pathologie chez la souris NOD et ont également montré des résultats encourageants chez les patients(29,30).



*Figure 4 : transfert du diabète chez un receveur immuno-incompétent par l'injection de splénocytes de souris NOD diabétiques*

L'histoire naturelle du diabète, déterminée grâce aux études familiales et aux modèles animaux, se décompose en trois phases successives :

- Une phase préclinique, silencieuse et étalée sur plusieurs mois ou années, pouvant être subdivisée en deux étapes : la première, non destructrice, pendant laquelle le processus auto-immun débute et progresse ; la seconde, au cours de laquelle a lieu la destruction des cellules bêta ;
- L'expression clinique de la maladie, lorsque la sécrétion d'insuline devient insuffisante, correspondant à une destruction de plus de 70% des cellules bêta ;
- Une phase clinique séquellaire.

Les différents essais de prévention et de traitement actuels reposent sur ce modèle théorique incomplet, dont nombre de paramètres restent méconnus : la vitesse de progression, l'existence de points de non-retour (checkpoints), la régénération possible des cellules bêta.

Par essence, le diabète de type 1 est une maladie multifactorielle. Son étiologie implique la présence de facteurs génétiques de prédisposition, qui, associés aux facteurs environnementaux, permettent d'une part la rupture de tolérance aux autoantigènes des îlots bêta et le développement d'un processus auto-immun, et d'autre part, la progression de la maladie.

### Des facteurs génétiques :

L'existence de facteurs génétiques de prédisposition est insuffisante pour induire à elle-seule une auto-immunité pathologique. Le diabète peut être qualifié de maladie polygénique à pénétrance variable. C'est en effet ce que viennent appuyer des études menées chez des jumeaux homozygotes, qui montrent une concordance pour la maladie dans seulement 40% des cas.

Les principaux gènes de susceptibilité impliqués sont ceux du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ainsi, certains polymorphismes HLA de classe II (DR/DQ) augmentent le risque de développer un diabète de type 1 chez le sujet porteur, comme par exemple les allèles à risque DQB1\*0201 et DQB1\*0302(31). A l'inverse, certains allèles sont dits protecteurs (*tableau 2*).

Haplotypes prédisposants	DR4-DQ8 (DQB1*0302) DR3-DQ2 (DQB1*0201)
Génotypes prédisposants	DR4-DQ8 / DR3-DQ2 DR4-DQ8 / DR4-DQ8
Haplotypes protecteurs	DQ6 (DQB1*0602)

*Tableau 2 : exemples de polymorphismes HLA prédisposants et protecteurs*

De nombreux autres gènes non CMH sont également associés à la maladie. Le gène de l'insuline peut également être cité avec la séquence répétée VNTR I courte constituant un facteur de susceptibilité à l'inverse de la séquence répétée VNTR III longue protectrice (détail ci-après).

D'autres gènes ont également été identifiés comme des facteurs de prédisposition au diabète de type 1, à l'instar du gène PTPN22, qui présente un Odds ratio supérieur à 2 (*figure 5*). L'Odds ratio exprime ici le degré de dépendance entre la survenue de la maladie et la présence ou non d'un gène donné. Un Odds ratio proche de 1 signifie que les deux variables sont indépendantes. En revanche, lorsqu'il est supérieur à 1, la maladie est plus fréquente dans le groupe porteur du gène étudié.

Il est ainsi à noter que la plupart des gènes de prédisposition identifiés présentent un Odds ratio très bas (souvent inférieur à 1,5), ce qui est synonyme d'une faible dépendance avec la survenue du diabète de type 1.

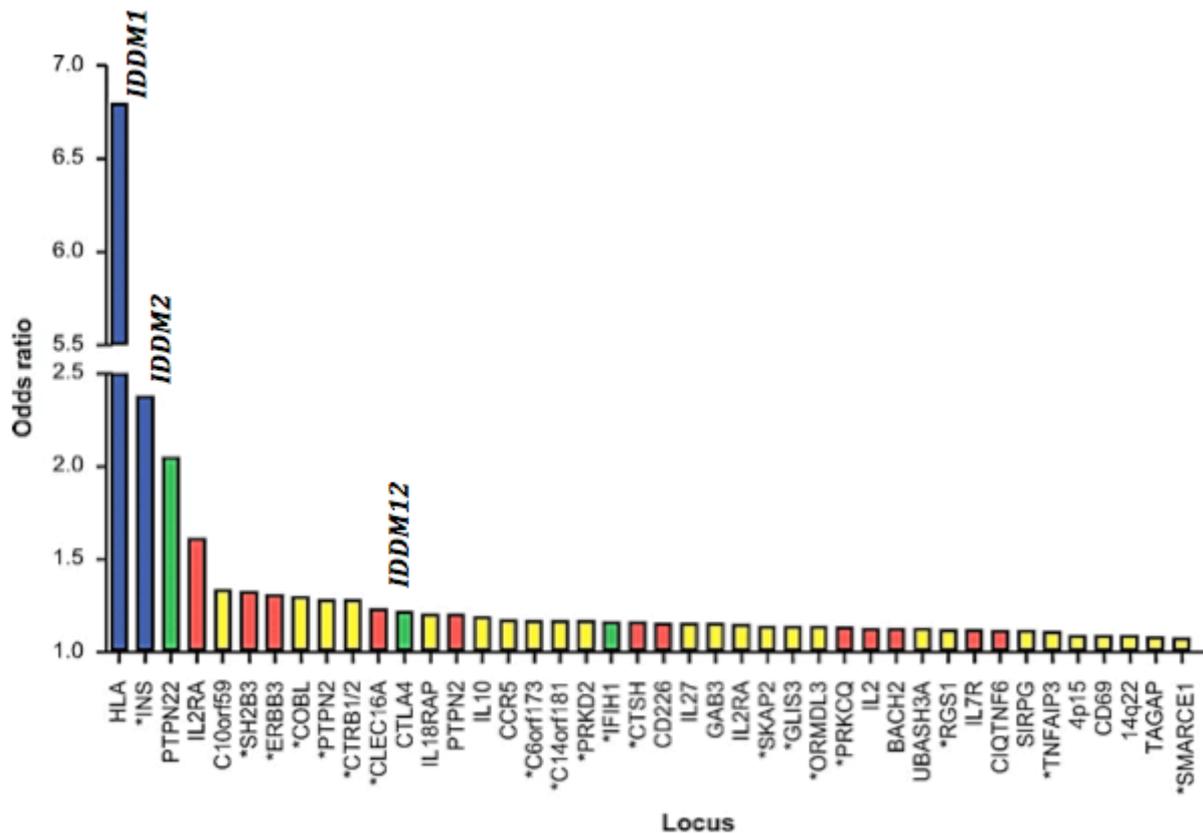


Figure 5 : Odds ratio des différents gènes impliqués dans le diabète. Pociot Diabetologia 2010.

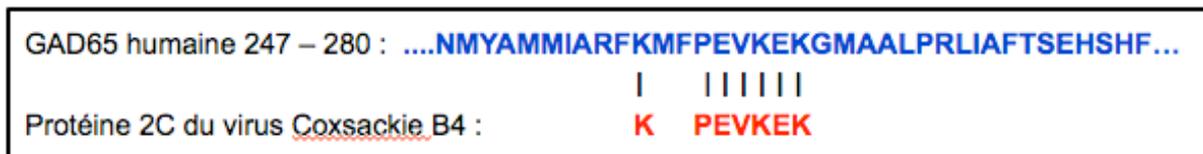
Différents modèles de prédiction associant plusieurs gènes de susceptibilité sont à l'étude. Par exemple, sur la cohorte prospective DAISY, deux modèles, l'un associant trois facteurs et l'autre dix, semblent prometteurs(32).

#### Des facteurs environnementaux :

Comme le suggèrent certaines données épidémiologiques susmentionnées, l'environnement apparaît jouer un rôle dans le développement de la maladie.

Un exemple frappant est celui de la Carélie finlandaise et de la Carélie russe, régions voisines peuplées par des habitants de même origine génétique mais que la Guerre Froide a longtemps isolées, La différence notable d'incidence de la maladie entre ces deux régions plaide en faveur d'un rôle environnemental fort, les fréquences du génotype prédisposant HLA DQ étant similaires dans les deux populations(33).

Parmi les nombreux facteurs environnementaux incriminés, une contribution virale est fortement suspectée et le mécanisme en serait une perte de tolérance périphérique, soit par infection directe (le virus pancréatotrope induirait une inflammation locale et conséquemment une augmentation de l'immunogénicité des autoantigènes), soit par activation par contiguïté ou « bystander » ou par mimétisme moléculaire (entre le virus Coxsackie B4 et l'autoantigène GAD, *figure 6*(26)). Un variant de l'entérovirus Coxsackie B4 a de plus été isolé d'un pancréas d'un patient décédé d'une acidocétose diabétique(34).



*Figure 6 : mimétisme moléculaire : comparaison des séquences peptidiques de GAD65 et de la protéine 2C du virus Coxsackie B4.*

Les hypothèses selon lesquelles des virus comme la rubéole, les oreillons, le rotavirus ou le CMV pourraient être incriminés n'ont jamais été confirmées.

Un lien est établi entre la vitamine D et le diabète de type 1. Chez la souris NOD, l'administration de vitamine D prévient l'insulite et la survenue de la maladie (35,36), notamment par son rôle d'immuno-modulation sur les cellules dendritiques(37). Chez l'homme, des études montrent une forte prévalence de déficit en vitamine D chez les patients diabétiques(38). La supplémentation en vitamine D durant la grossesse et l'enfance diminue le risque de développer un diabète de type 1(39). En revanche, d'autres études, sur des cohortes importantes comme l'étude DAISY, nuancent ces observations, ne mettant pas en évidence d'association entre la maladie et le taux de vitamine D chez les individus suivis (40).

Outre la vitamine D, l'alimentation serait un facteur de risque associé à la maladie, en particulier l'exposition précoce aux protéines complexes du lait de vache. L'étude TRIGR montre une diminution de 50% de l'incidence cumulative des autoanticorps du diabète à l'âge moyen de 4,7 ans dans le groupe d'enfants recevant une formule de lait fortement hydrolysé lors du sevrage par rapport au groupe contrôle(41).

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer les bénéfices du lait hydrolysé en comparaison du lait de vache, à savoir : la non-exposition précoce à l'insuline bovine présente dans le lait de vache(42), la meilleure maturation des lymphocytes T régulateurs dans le tissu lymphoïde associé aux muqueuses intestinales(43) ou encore la modification du microbiote.

Plus récemment, a été proposée la participation active du microbiote intestinal dans la survenue du diabète. Par exemple, l'administration de cathélicidines chez des souris NOD prédiabétiques, qui ne produisent pas ce peptide antimicrobien, réduit l'incidence de la maladie. Les cathélicidines sont normalement produites par les cellules bêta ; production modulée par des acides gras à chaînes courtes produits par le microbiote intestinal. Ainsi, la manipulation du microbiote chez la souris NOD permet de moduler l'inflammation au niveau des ilots de Langerhans(44).

Chez l'homme, une étude récente a mis en évidence un changement du microbiote intestinal chez les enfants diabétiques, et ce bien avant l'apparition de la maladie clinique. En effet, dès la séroconversion (définie par la présence d'au moins deux auto-anticorps du diabète), l'étude faisait observer une modification de la composition du microbiote, allant de pair avec une diminution de la diversité microbienne (*figure 7*), comparativement aux sujets sains et aux individus faisant une séroconversion mais n'évoluant pas vers la maladie(45). L'origine de ces modifications du microbiote n'est pas connue ; il est toutefois impossible de les étiqueter comme une cause ou une conséquence du diabète de type 1.

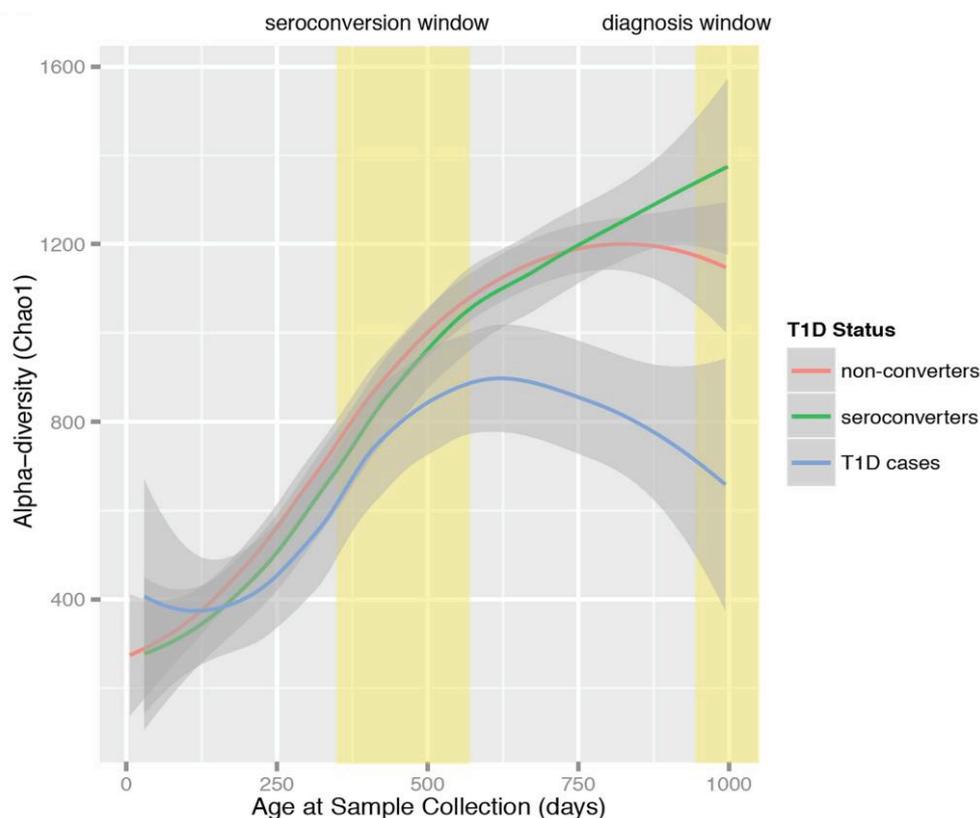


Figure 7 : diversité microbienne en fonction du temps, chez les enfants sains, diabétiques, et ceux présentant uniquement une séroconversion. Kostic et al. 2015.

### Le développement du processus auto-immun :

L'initiation du processus auto-immun nécessite une perte de tolérance aux autoantigènes de la cellule bêta :

- Un défaut de tolérance centrale provoquant un échappement de lymphocytes T autoréactifs. Par exemple, l'allèle de susceptibilité VNTR I induit une diminution de l'expression de la pro-insuline thymique et donc de la délétion centrale des lymphocytes T spécifiques de celle-ci.
- Une perte de tolérance périphérique par un changement des conditions de présentation des autoantigènes et une activation des lymphocytes T autoréactifs. Plusieurs causes peuvent être évoquées : l'inflammation locale, le mimétisme moléculaire ou encore la présence d'autoantigènes modifiés (peptides hybrides).

Des facteurs de progression peuvent également intervenir dans le développement de ce processus, comme les gènes de résistance ou de susceptibilité à l'auto-immunité des cellules bêta(46). L'influence des circuits immuno-régulateurs joue certainement un rôle avec des anomalies des lymphocytes T régulateurs. Chez la souris NOD, ces derniers peuvent voir leur capacité régulatrice diminuer. Les lymphocytes T pathogènes peuvent également résister à la régulation(47).

### 1.3 Le rôle pathogène des lymphocytes T

Bien que les mécanismes initiateurs ne soient pas connus, il est admis que les autoantigènes de la cellule bêta, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et T sont impliqués dans le processus auto-immun du diabète de type 1.

Les lymphocytes T autoréactifs pathogènes ont été mis en évidence par différents moyens, qui seront détaillés plus bas :

- Des données chez l'homme : des prélèvements post-mortem chez des sujets diabétiques montrent une infiltration des îlots de Langerhans par des cellules mononuclées, dont une majorité de lymphocytes T ;
- Des expériences menées sur la souris NOD, modèle animal se rapprochant du modèle humain, permettent d'incriminer les lymphocytes T dans le développement de la maladie ;
- Des stratégies d'immuno-intervention ciblant les lymphocytes T se sont avérées efficaces pour prévenir la maladie, voire pour favoriser sa régression.

Rares sont les données collectées chez des patients. En effet, le pancréas est un organe profond difficilement accessible pour une biopsie, cette dernière étant de surcroît peu acceptable d'un point de vue éthique.

Quelques études sur des prélèvements de pancréas post-mortem chez des sujets diabétiques ont cependant pu montrer une infiltration des îlots de Langerhans par des cellules de l'immunité avec une majorité de lymphocytes T. Plus exactement, au sein de l'insulite, les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) prédominent largement, associés aux lymphocytes T auxiliaires (CD4+) présents dans une moindre mesure. Les macrophages sont également nombreux, avec une apparition précoce lors de la constitution de

l'infiltrat inflammatoire et une persistance tardive. Enfin, les lymphocytes B (CD20+), bien que présent dès le début, sont recrutés au fur et à mesure de la mort des cellules bêta(22,48).

D'autres études, réalisées cette fois sur le sang de sujets diabétiques, ont mis en évidence une diminution de la sécrétion d'insuline lors de la mise en culture d'ilots de Langerhans de souris avec les lymphocytes T des patients, par rapport aux ilots cultivés seuls(49).

La souris NOD est un modèle expérimental spontané, caractérisé par la survenue d'un diabète entre 90 et 180 jours, préférentiellement chez les femelles (incidence 60-80% versus 20-30% chez les males)(50). Ce modèle mime de manière assez fidèle la pathologie humaine. Ainsi, l'apparition de l'hyperglycémie est précédée d'une phase de pré-diabète ; les premières cellules mononuclées infiltrant les ilots de Langerhans sont détectées dès 3 semaines d'âge. On note que la souris NOD présente également des manifestations auto-immunes extra-pancréatiques comme une thyroïdite ou une sialite. De nombreuses expériences ont été réalisées sur ce modèle, et permettent d'incriminer les lymphocytes T dans le développement de la maladie :

- L'injection d'anticorps anti-thymocytes prévient l'apparition de la maladie, laissant suggérer le rôle des lymphocytes T dans la physiopathologie diabète(51).
- L'injection d'anticorps anti-CD3 (anti-lymphocytes T) réduit l'incidence du diabète et de l'insulite(52).
- Il est possible d'induire un diabète chez des souris NOD athymiques en leur transférant des cellules de souris NOD diabétiques. L'injection de lymphocytes T CD4+ et CD8+ provoque une insulite et un diabète chez les souris ; l'injection de lymphocytes T CD4+ uniquement induit une insulite mais pas de diabète ; enfin, l'injection de lymphocytes T CD8+ seuls ne provoque ni insulite ni diabète(53).
- Le diabète est prévenu par la thymectomie néonatale, avec une réduction de près de moitié de l'incidence de l'insulite(54).
- L'injection d'anticorps anti-récepteur à l'IL2 prévient la survenue du diabète, limitant la prolifération des lymphocytes T(55).
- L'évolution du diabète ralentit suite à l'administration d'anticorps dirigés contre des protéines d'adhésion, indispensables à la migration des lymphocytes T vers l'îlot, à l'instar de la molécule Mucosal-Addressin CAM1(56).

Les stratégies d'immuno-intervention ciblant les lymphocytes T, comme par exemple les anticorps anti-CD3, semblent prometteuses dans des modèles précliniques mais également lors d'essais thérapeutiques. Ces anticorps ont montré des résultats encourageants chez la souris NOD, avec une prévention de l'apparition du diabète. Leur administration dans les premiers jours de la maladie déclarée permet même une rémission complète et durable du diabète chez 64 à 80% des animaux(29).

Plusieurs essais cliniques de phase 2 ont été réalisés chez l'homme. Dans l'un deux, les anticorps anti-CD3 étaient injectés à des patients nouvellement diagnostiqués (recevant un traitement par insuline depuis moins de 4 semaines) ; le groupe contrôle recevait un placebo. Les doses d'insuline nécessaires au contrôle de la glycémie à 18 mois étaient inférieures dans le groupe traité. Le traitement par anti-CD3 préserve donc la cellule bêta pendant un minimum de 18 mois(30).

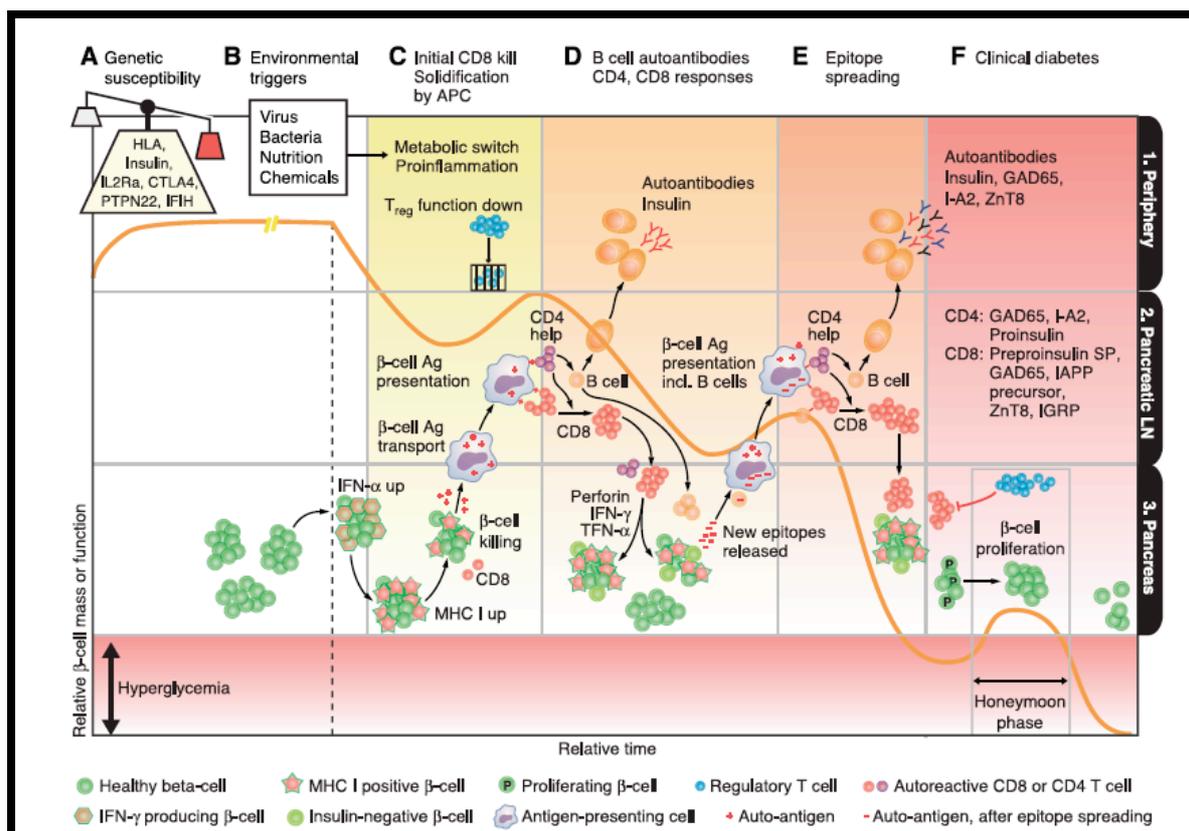


Figure 8 : physiopathologie du diabète de type 1. Van Belle TL, et al. *Physiol Rev.* 2011.

La *figure 8* résume la physiopathologie du diabète de type 1 et les mécanismes immunologiques effecteurs impliqués : des facteurs génétiques de susceptibilité et des facteurs environnementaux favorisant voire déclenchant vont permettre le développement progressif d'un processus auto-immun dirigé contre des autoantigènes de la cellule bêta. La diminution de la masse fonctionnelle de cellules bêta aboutit à une carence absolue en insuline, synonyme de maladie clinique.

## 2) Les autoantigènes des cellules bêta insulinosécrétrices

Le processus de destruction auto-immun cible des autoantigènes issus de la cellule bêta pancréatique. Ces autoantigènes sont l'insuline, la décarboxylase de l'acide glutamique GAD, la tyrosine phosphatase IA2, le transporteur de zinc ZnT8(57) et l'IGRP.

Les autoantigènes sont excrétés par la cellule bêta et/ou libérés lors de la mort cellulaire. Ils sont pour la plupart localisés au niveau du système de sécrétion de l'insuline, pour partie dans le granule de sécrétion lui-même.

La destruction de la cellule bêta peut être causée par différents mécanismes. Plusieurs ont été mis en évidence grâce aux modèles animaux. Tout d'abord, l'inflammation locale peut induire l'apoptose de la cellule, plus précisément les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les différents acteurs de l'immunité en présence (à l'instar de l'interféron gamma, le facteur de nécrose tumorale TNF- $\alpha$ , et l'interleukine-1 $\beta$ ). L'apoptose peut aussi être provoquée directement par l'expression du ligand de Fas (système Fas/Fas-Ligand) par les lymphocytes T activés. Enfin, il peut y avoir une cytotoxicité cellulaire directe via les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (système perforine/granzyme)(58–61).

L'insuline et l'IGRP sont des antigènes spécifiques de la cellule bêta, contrairement aux autres antigènes identifiés comme cibles par les lymphocytes T autoréactifs dans le diabète, qui peuvent être retrouvés ailleurs dans l'organisme, principalement au niveau du système nerveux central en lien avec la dérivation embryologique.

⇒ L'insuline

Premier autoantigène à avoir été découvert, l'insuline, dans certains modèles dont celui de la souris NOD, est considérée comme l'autoantigène initial.

Chez un individu présentant une susceptibilité auto-immune, la présentation de l'insuline et l'activation de lymphocytes T spécifiques constitue le point de départ du processus auto-immun. Les autres autoantigènes se trouvent ensuite exposés secondairement et progressivement, du fait de la progression du processus auto-immun, de l'inflammation locale et de l'apoptose des cellules beta, aboutissant à l'activation d'autres spécificités lymphocytaires et constituant le phénomène de la dérive épitopique (intra- et inter-moléculaire).

Ainsi, le fait de transférer des clones de lymphocytes T CD4+ et CD8+ reconnaissant spécifiquement l'insuline induit un diabète chez la souris(62). Parallèlement, certaines variations génétiques, en réduisant l'expression de l'insuline dans le thymus et les organes lymphoïdes, provoquent un défaut de la tolérance centrale, résultant en un échappement de lymphocytes T autoréactifs(63). La séquence répétée VNTR I courte est ainsi un facteur de susceptibilité ayant pour conséquences une diminution de la pro-insuline thymique, une diminution de la délétion centrale des lymphocytes T spécifiques de celle-ci, et donc un répertoire périphérique riche en lymphocytes T autoréactifs. A l'inverse, la séquence répétée VNTR III longue est protectrice.

D'un poids moléculaire d'environ 6kDa, l'insuline est un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques, à savoir la chaîne A (constituée de 21 acides aminés) et la chaîne B (de 30 acides aminés), reliées toutes-deux par deux ponts disulfures.

L'insuline existe sous forme monomérique, ce qui est sa forme active. Elle peut aussi se dimériser spontanément. Subséquemment, trois dimères peuvent s'associer autour de deux atomes de zinc pour former un hexamère. Cette forme hexamérique, quant à elle, est la forme de stockage dans les granules de sécrétion de la cellule bêta.

Le précurseur de l'insuline, la prépro-insuline, est codé par un gène situé sur le bras court du chromosome 11. La prépro-insuline passe dans la lumière du réticulum endoplasmique grâce au peptide signal, qui est ensuite clivé par les enzymes protéolytiques du RE pour former la pro-insuline. Cette dernière traverse le cis-golgi

puis le trans-golgi, où elle est clivée pour donner le peptide C et l'insuline. Ces deux molécules sont sécrétées par exocytose dans des proportions équimolaires.

Plusieurs peptides immunodominants HLA A2 restreints ont été identifiés, notamment au niveau de la pro-insuline(64).

La souris possède deux gènes de l'insuline, *ins1* et *ins2*. Chez la souris NOD, l'inactivation du gène *ins2* provoque une accélération du développement du diabète et une augmentation de la production d'anticorps anti-insuline(65). A l'inverse, chez la souris NOD invalidée pour le gène *ins1*, on observe une diminution de l'incidence du diabète et de l'insulite, bien que les anticorps anti-insuline restent présents(66).

⇒ La décarboxylase de l'acide glutamique

La décarboxylase de l'acide glutamique GAD65 a été identifiée très tôt comme un autoantigène du diabète de type 1(67). C'est une enzyme importante qui intervient dans la production du neurotransmetteur GABA, l'acide gamma amino-butyrique. Elle est retrouvée dans les cellules bêta, mais également au niveau du système nerveux. Sa fonction au sein du pancréas n'est pas parfaitement connue, elle jouerait un rôle local de régulateur de la sécrétion du glucagon(68). A noter que des souris invalidées pour GAD65 ne présentent aucune dysfonction pancréatique(69). On notera qu'il existe deux isoformes de GAD, GAD65 et GAD67, partageant 65% d'homologie. Leurs activités enzymatiques sont identiques mais GAD65 présente une plus grande flexibilité au niveau de sa région carboxy-terminale, cette flexibilité étant corrélée à son antigénicité supérieure(70).

⇒ La phosphatase IA2

La phosphatase IA2 est un peptide signal membranaire, situé au niveau des granules de sécrétion de l'insuline. Il se compose d'une partie extra-membranaire, une transmembranaire et une intra-membranaire. Son rôle, bien qu'encore méconnu, tient probablement de son influence sur la mobilité des granules dans le cytoplasme de la cellule bêta.

Chez les souris invalidées pour IA2, les ilots de Langerhans contiennent moins de granules d'insuline, et moins d'insuline est excrétée(71).

⇒ Le transporteur du zinc ZnT8

La concentration en zinc au niveau des ilots de Langerhans est une des plus élevée de l'organisme(72). Comme mentionné précédemment, le zinc est nécessaire au stockage de l'insuline, sous sa forme hexamérique. Le transporteur de zinc le plus fréquemment exprimé au niveau des cellules bêta est ZnT8, peptide de 369 acides aminés codé par le gène *SLC30A8*. ZnT8 est principalement localisé au niveau des vésicules de sécrétion de l'insuline. Le rôle spécifique de ZnT8 n'est pas clairement identifié, étant donné que d'autres transporteurs de zinc sont également présents dans la cellule bêta.

La souris NOD invalidée pour ZnT8 développe une intolérance au glucose et des granules de sécrétion d'insuline atypiques(73).

⇒ La chromogranine A

La chromogranine A est retrouvée dans les tissus neuroendocriniens, comprenant la zone médullaire de la glande surrénale, le système nerveux central et le pancréas. Elle appartient à la famille des granines. Récemment identifiée comme autoantigène du diabète(74), la chromogranine A est un des composants des granules de sécrétion de l'insuline. Chez la souris invalidée pour la chromogranine A, les ilots pancréatiques sont présents en plus petit nombre et la production d'insuline est réduite. Chez la souris NOD, elle aussi invalidée pour la chromogranine A, l'incidence du diabète diminue (*figure 9*), suggérant son rôle essentiel dans l'initiation et le développement de la maladie(75).

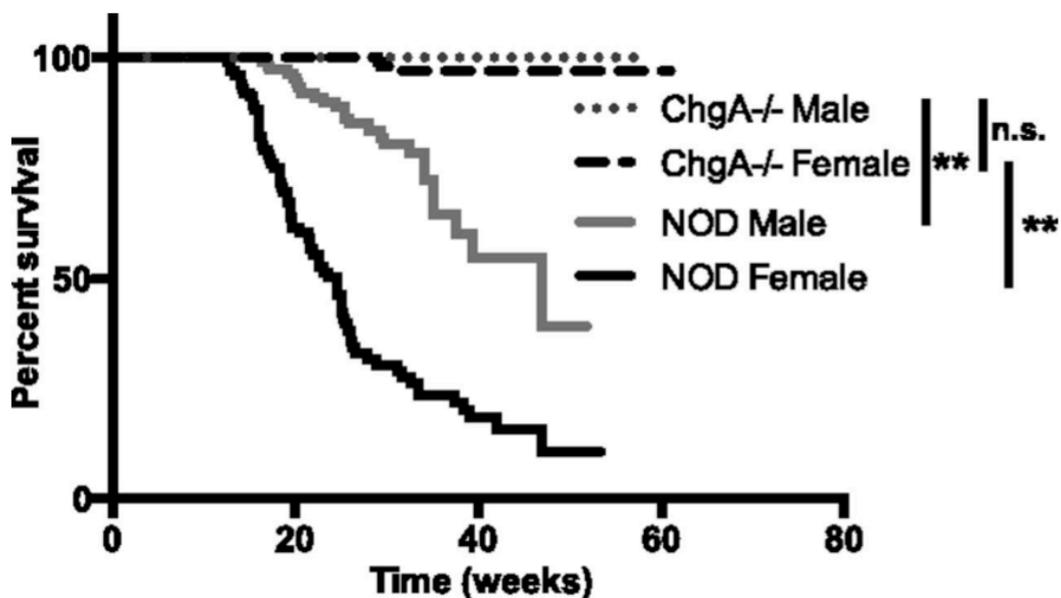


Figure 9: suivi sur 12 mois de souris NOD et de souris NOD invalidées pour la chromogranine A. Rocky L. Baker et al. *J Immunol* 2016.

⇒ L'IGRP (Islet specific G6P related protein)

L'IGRP, de la famille des glucose-6-phosphatases, est une glycoprotéine du réticulum endoplasmique et a été identifiée comme une cible des lymphocytes T chez la souris NOD(76) et chez l'homme(5). Chez la souris invalidée pour IGRP, le taux de glycémie est abaissé d'environ 15%(77).

⇒ L'IAAP (Islet amyloid polypeptide)

L'IAAP est normalement présent au niveau des granules de sécrétion de l'insuline et est sécrété de manière concomitante(78).

### 3) Les autoanticorps anti-cellules bêta

La première description d'autoanticorps dirigés contre ilots de Langerhans (ICA), et retrouvés dans les sérums de patients diabétiques, a été réalisée par F. Bottazzo et D. Doniach au début des années 1970(79).

L'apparition des auto-anticorps survient plusieurs mois ou années avant celle du tableau clinico-biologique et constitue le seul marqueur d'auto-immunité largement accessible à une utilisation clinique.

Si les lymphocytes B - probablement par leur capacité de présentation des antigènes - jouent un rôle clé dans le développement du diabète chez la souris NOD, le transfert des anticorps seuls ne provoque pas la maladie(80). Les autoanticorps, bien que n'ayant pas de rôle pathogène direct, sont fortement associés au risque de développer un diabète de type 1 et représentent un stigmate du processus auto-immun à l'origine de la maladie. Ainsi, chez des sujets parents de patients diabétiques, la présence mais aussi le titre d'anticorps anti-ilots (ou ICA) sont corrélés au risque de développer la maladie(81).

Les autoanticorps anti-insuline, anti-GAD65, anti-IA2 et anti-ZnT8 sont retrouvés respectivement chez environ 50 à 70%, 70 à 75%, 70% et 60% des patients diabétiques de type 1 au moment du diagnostic.

La présence d'autoanticorps est un marqueur prédictif de la maladie. Ainsi, l'étude ENDIT indique que le risque de développer la maladie est d'autant plus élevé qu'il y a d'anticorps positifs chez les enfants à risque. En effet, en prenant pour référence le groupe présentant uniquement les anticorps anti-ilots (ICA) positifs, le rapport du risque instantané (*hazard ratio HR*) est de 5,81 en présence d'un anticorps positif en plus des ICA, de 21,04 en présence de deux anticorps, et de 33,1 pour trois anticorps(*figure 10*)(82).

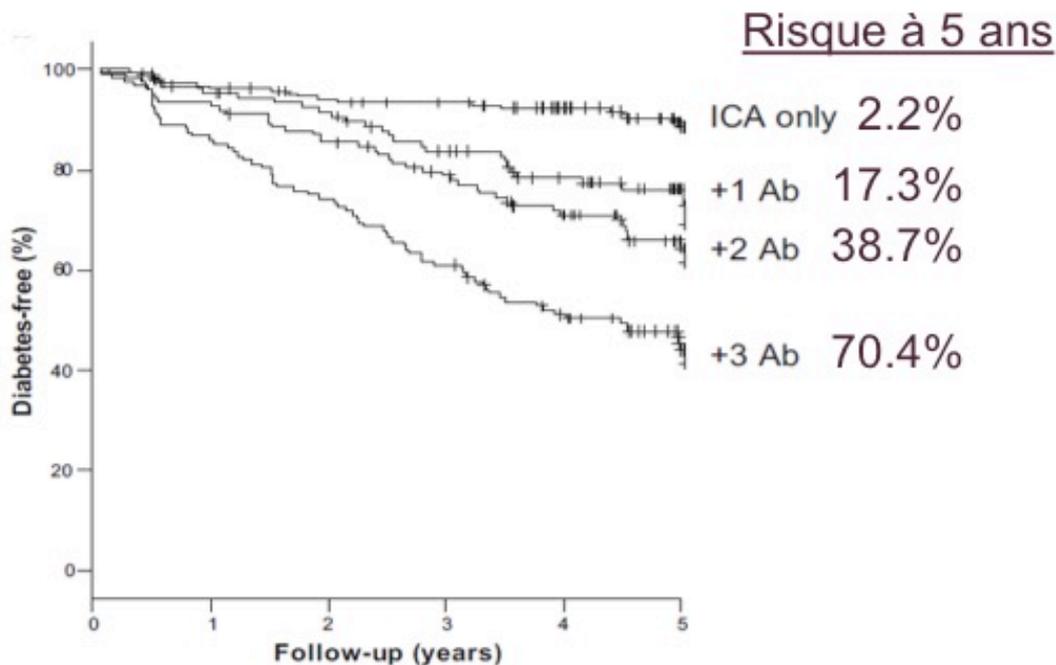


Figure 10 : courbe de prédiction du diabète : suivi sur 5 ans de 549 enfants ayant un antécédent familial de diabète au 1er degré. Etude ENDIT.

La combinaison des anticorps anti-GAD65, IA2 et insuline permet de détecter l'auto-immunité chez 94% des patients. Les anticorps anti-ZnT8 permettent d'accroître ce pourcentage de détection, chez les patients ICA+ sans auto-anticorps « classiques » (anti-GAD65, IA2, et insuline). Ils sont considérés comme des marqueurs indépendants du diabète de type 1. Les différentes combinaisons possibles associant des anticorps anti-ZnT8 avec deux des trois autres anticorps ne sont pas associées à un risque supérieur de survenue de la maladie. C'est la combinaison des quatre anticorps qui permet de réduire le nombre de patients sans anticorps identifiés (de 5,8% à 1,8%), et d'augmenter la proportion de patients présentant deux anticorps et plus (de 72% à 82%)(*figure 11*)(83).

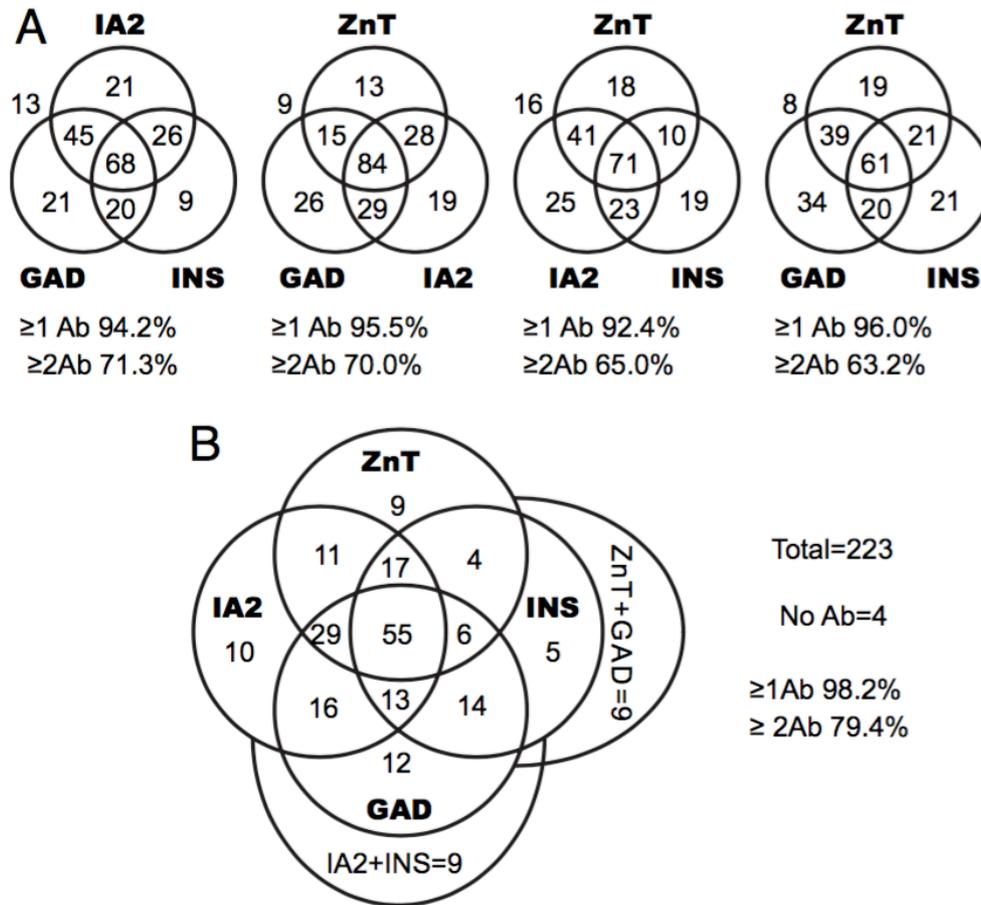


Figure 11 : prévalences superposées des anticorps anti-insuline, GAD65, IA2 et ZnT8 chez les patients au moment du diagnostic. Wenzlau et al. 2007(83).

Les anticorps anti-ZnT8 permettent également de mieux prédire la maladie chez des sujets à risque. Par exemple, dans une population comprenant des sujets parents de patients diabétiques, ou ayant des haplotypes HLA de susceptibilité, on observe que 36,8% des sujets ayant des anticorps anti-ZnT8 ont développé un diabète, contre 7,3% des sujets n'en ayant pas(84). De plus, en association à certains génotypes, les anti-Znt8 favorisent une progression plus rapide vers la maladie(85).

Enfin, les enfants présentant de multiples anticorps ont 34% de risque de développer un diabète si les anti-ZnT8 sont absents, contre 62% s'ils sont présents(86).

#### 4) L'intérêt du suivi de la réponse lymphocytaire T spécifique des antigènes des cellules bêta

La mise en évidence d'une réponse lymphocytaire T vis-à-vis des autoantigènes du diabète constitue pour des raisons évidentes un paramètre prometteur pour la prédiction et le suivi du diabète insulino-dépendant, puisque identifiable, au moins en théorie, plus précocement que les autoanticorps.

L'association des autoanticorps, des gènes de prédisposition HLA, et des tests fonctionnels cliniques (hyperglycémie provoquée), permet d'atteindre une prédiction du risque de près de 80%(82). La détection de la réponse lymphocytaire T, couplée aux autres marqueurs, pourrait permettre d'améliorer ce pouvoir prédictif, en se rapprochant des 100%. La détection des « futurs » patients diabétiques n'a toutefois d'intérêt que s'il existe des traitements à proposer en phase « pré-diabétique ».

Par ailleurs, le développement d'immuno-interventions thérapeutiques nécessite d'avoir recours à de nouveaux marqueurs d'efficacité immunologique. Par exemple, le traitement par anticorps anti-CD3 permet de diminuer la dose d'insuline nécessaire au contrôle de la glycémie, comparativement aux patients recevant un placebo (*figure 12*). Cet effet, bien que persistant au moins 2 ans, semble s'estomper avec le temps, et ce, en fonction de l'âge des patients et de la masse résiduelle initiale de cellules bêta fonctionnelles(87).

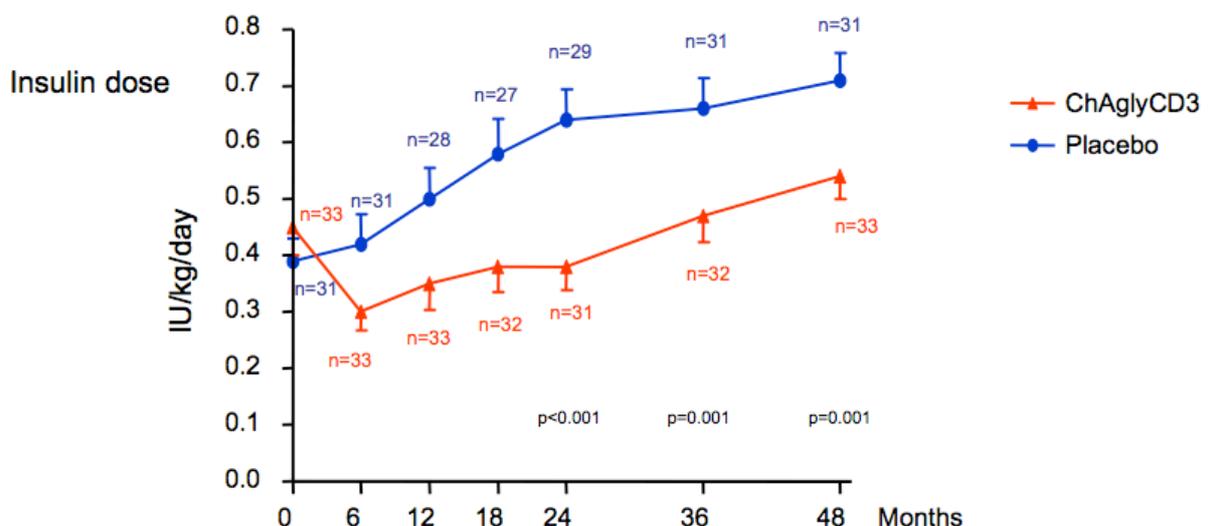


Figure 12 : évolution de la dose d'insuline nécessaire au contrôle de la glycémie : traitement par anticorps anti-CD3 versus placebo. Keymeulen B. Diabetologia 2009.

Cette perte d'efficacité dans le temps est-elle liée au métabolisme, à l'épuisement de la masse fonctionnelle de cellules bêta, ou à une nouvelle rupture de tolérance ? Pour confirmer une de ces hypothèses, les auto-anticorps ne suffisent pas, puisqu'ils ne varient pas de façon significative(88). De nouveaux marqueurs immunologiques sont donc nécessaires. Les réponses lymphocytaires T, effectrices ou régulatrices, pourraient constituer ce marqueur d'efficacité thérapeutique. La détection des réponses lymphocytaires T serait un nouvel outil au service des immuno-interventions thérapeutiques.

Enfin, pour une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie, il est primordial de caractériser les lymphocytes T autoréactifs en termes de phénotype, d'affinité, antigènes cibles, de chronologie d'apparition, etc.

Chez la souris NOD, beaucoup de données sont disponibles grâce aux nombreux prélèvements possibles (pancréas, rates, ganglions lymphatiques, etc.) sur lesquels des études cellulaires peuvent être menées. De multiples études décrivent ainsi les phénotypes des cellules de l'immunité présentes chez la souris NOD aux différents stades de la maladie.

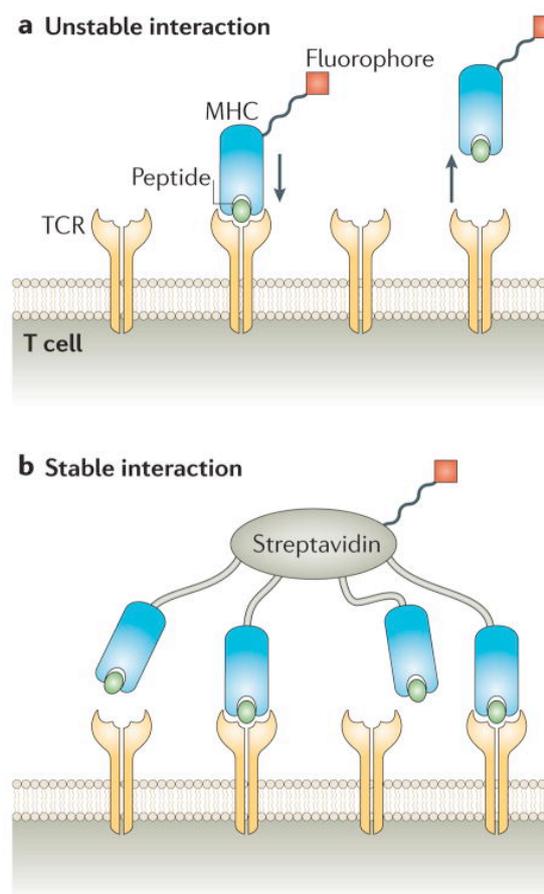
En revanche, chez l'homme, comme évoqué plus haut, seuls des prélèvements de sang périphérique sont possibles. Quelques études réalisées sur des prélèvements pancréatiques de patients diabétiques décédés montrent une majorité de lymphocytes T CD8+, associés aux CD4+. Mais ces données restent succinctes, et ne donnent que peu d'information quant aux caractéristiques de ces lymphocytes. Un test de détection fiable et facile à mettre en œuvre permettrait de mesurer et décrire ces réponses lymphocytaires T chez tous les patients, lors de larges études prospectives, et d'en suivre la cinétique avec précision.

## 5) Tour d'horizon des techniques de détection des lymphocytes T spécifiques d'antigène

### 5.1 Les tétramères

Cette méthode permet de rechercher directement les lymphocytes T spécifiques d'un antigène donné(89). Les tétramères sont des complexes de quatre molécules CMH associées à un peptide, et liées à un fluorochrome. Une fois fixés aux lymphocytes exprimant le TCR spécifique correspondant, ils peuvent être visualisés par cytométrie en flux. Les tétramères de classe I se lient aux récepteurs des lymphocytes T CD8+, et ceux de classe II aux lymphocytes T CD4+.

Ils présentent l'avantage de stabiliser la liaison CMH/TCR, permettant ainsi d'identifier les lymphocytes T spécifiques avec une plus grande fiabilité (*figure 13*)(90).



*Figure 13 : avantage des tétramères pour la détection de lymphocytes T spécifiques d'un antigène : meilleure stabilité de l'interaction avec les TCR par rapport aux monomères. Davis et al 2011.*

La production de tétramères est relativement longue et laborieuse. A titre d'exemple, voici les différentes phases conduisant à la production des tétramères de CMH de classe I. Pour commencer, la chaîne lourde du CMH est synthétisée par des bactéries (*Escherichia coli*). Ensuite, une séquence polypeptidique, identifiable par l'enzyme BirA, est incorporée à la partie carboxy terminale. La conformation correcte est obtenue lors de l'addition des chaînes légères (la beta2-microglobuline) et du peptide d'intérêt. L'enzyme BirA est alors utilisée pour attacher la biotine à la molécule. Puis, par l'intermédiaire de la biotine, le complexe est lié à une molécule de streptavidine, elle-même précédemment conjuguée à un fluorochrome. Chaque molécule de streptavidine ayant quatre sites de liaison avec la biotine, on produit ainsi un complexe tétramérique de quatre molécules de classe I du CMH (*figure 14*).

Les pentamères sont une variante des tétramères, constitués de 5 molécules de CMH situées sur un même plan, ceci permettant de présenter 5 sites de liaison aux lymphocytes. Dans un contexte de détection en cytométrie en flux, leurs caractéristiques sont intéressantes (avec notamment, une meilleure intensité de fluorescence).

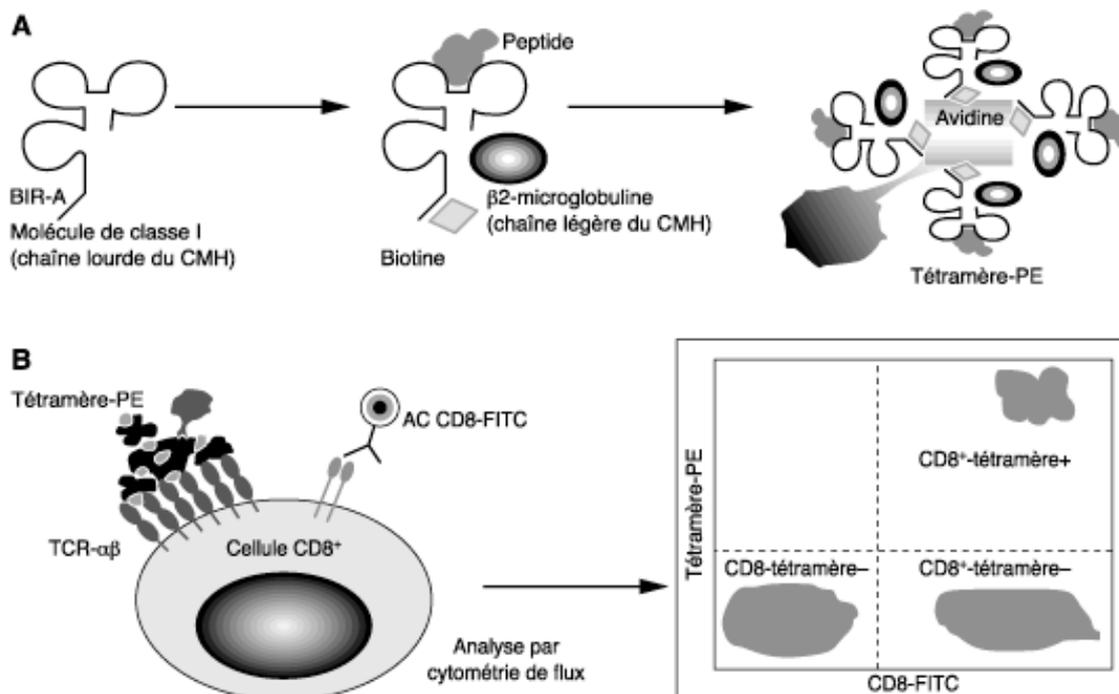


Figure 14 : la technique des tétramères : A. Synthèse du tétramère. B. Révélation des cellules positives pour le tétramère. <http://www.medscape.com>

Les dextramères, développés et commercialisés par Immudex, sont constitués d'un polymère ramifié de dextrose - le dextrane - sur lequel sont fixées plusieurs molécules de CMH et de fluorochrome (*figure 15*). Conséquemment, ils présentent une avidité plus importante pour les lymphocytes T spécifiques recherchés, et permettent de fixer ceux présentant des TCR de faible affinité. En cytométrie en flux, on observe également un meilleur ratio signal/bruit.

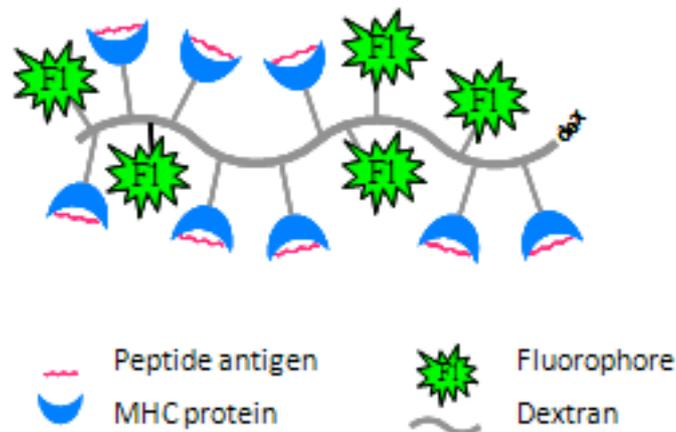


Figure 15 : schéma d'un dextramère. <http://www.immudex.com>

Les avantages des tétramères :

- Le marquage de type quantitatif
- Pas d'utilisation d'isotopes radioactifs
- La rapidité d'exécution : possibilité d'analyse sur sang frais, pas d'étape longue d'activation des cellules
- La viabilité préservée des cellules marquées
- Une détection de tous les lymphocytes T spécifiques
- La possibilité de customiser des tétramères

Les inconvénients :

- La restriction HLA, limitant leur utilisation aux patients porteurs de l'haplotype utilisé
- La nécessité d'une expansion préalable pour étudier les cellules T CD4+
- La fabrication des tétramères, relativement longue et laborieuse
- Le coût élevé de la technologie

- Le manque de sensibilité de la technique (la limite de détection étant proche de 0.1% des lymphocytes T CD8+)
- Enfin, la technique des tétramères permet d'identifier les lymphocytes T reconnaissant un peptide, mais qui ne renseigne pas sur leur fonctionnalité.

Cette technique, appliquée aux patients diabétiques de type 1, a permis de mettre en évidence in vivo des réponses aux antigènes IA2, GAD, insuline et ZnT8. Ces réponses, impliquant des lymphocytes T CD8+, sont facilement détectables, à l'inverse des réponses des lymphocytes T CD4+ plus difficiles à déceler(91,92).

## 5.2 Le marquage intracellulaire des cytokines (ICS)

Les cellules sont activées quelques heures par le peptide d'intérêt. Puis, on incorpore un inhibiteur du transport protéique (la bréfeldine A) afin de retenir les cytokines en intracellulaire. Après lavage, des anticorps de marquage de surface peuvent être ajoutés. Les cellules sont ensuite fixées (à l'aide de paraformaldehyde), puis perméabilisées. Enfin, après ajout de l'anticorps de marquage anti-cytokine, les cellules sont analysées par cytométrie en flux.

Cette technique est encore moins sensible que celle des tétramères pour détecter les lymphocytes T spécifiques d'un antigène. Elle est très peu utilisée dans le diabète de type 1.

## 5.3 L'ELISPOT

La technique ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSPOT) a été décrite pour la première fois à la fin des années 1980(93). Elle consiste à détecter des cellules produisant une cytokine au niveau unicellulaire. Les plaques de culture de 96 puits, dont le fond est généralement constitué d'une membrane de nitrocellulose, sont d'abord recouvertes d'un anticorps de capture spécifique de la cytokine étudiée. Ensuite, commence la mise en culture des cellules, en présence du peptide d'intérêt. La cytokine, sécrétée par les cellules reconnaissant l'antigène, est fixée par l'anticorps de capture.

Après élimination des cellules, la présence de la cytokine est révélée par un deuxième anticorps, dit « de détection ». Ce dernier est généralement couplé à la biotine et se fixe sur la cytokine sur un site distinct de l'anticorps de capture. Une enzyme dont le substrat est coloré, couplée à la streptavidine, est ajoutée et vient se fixer sur la biotine. Enfin, le substrat de l'enzyme transformé par celle-ci, permet de révéler les sites de production de la cytokine étudiée. Chaque spot ainsi formé représente une cellule productrice de la cytokine en réponse au peptide d'intérêt (figure 16).

La grande majorité des ELISPOT est basée sur la détection d'interféron gamma ou du facteur de nécrose tumorale TNF alpha.

Afin d'améliorer la sensibilité de l'ELISPOT, des molécules de co-stimulation peuvent être ajoutées lors de la phase d'incubation des cellules avec le peptide d'intérêt. L'utilisation de l'interleukine 7 améliore de 50% la sensibilité du test, en augmentant le signal spécifique, sans augmenter pour autant le bruit de fond(94). L'intérêt potentiel de l'interleukine 7, en améliorant la survie cellulaire au cours de la culture, est d'autant plus grand que les réponses lymphocytaires à mettre en évidence sont faibles.

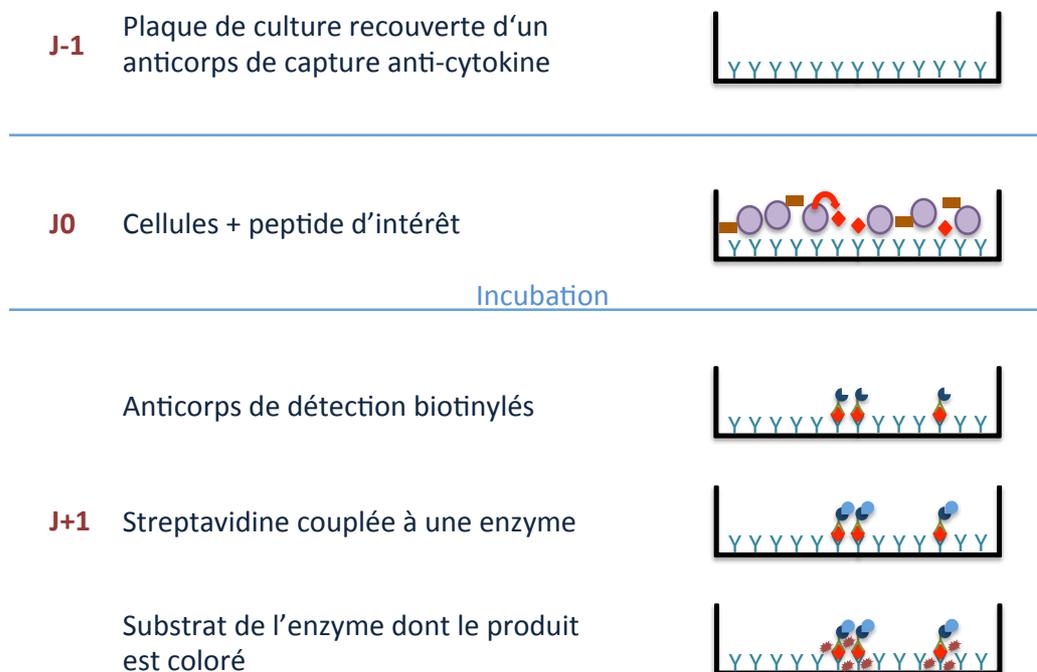


Figure 16 : les étapes de la technique de l'ELISPOT

Il a été clairement démontré par différents laboratoires - dont le nôtre, qu'il est possible de détecter les lymphocytes T présents chez l'individu au moment de l'analyse, et spécifiques de l'antigène d'intérêt, après une stimulation courte de seulement 16 à 20 heures(95,96).

Pour ce qui est du diabète, l'ELISPOT est une technique utilisée pour mettre en évidence les lymphocytes T, principalement cytotoxiques CD8+, spécifiques des antigènes impliqués, comme l'insuline, GAD, IA2 et ZnT8. Les réponses obtenues, rares et faibles en terme de fréquences, sont difficilement mises en évidence, contrairement aux autres domaines d'application de l'ELISPOT lymphocytaire T comme la détection des réponses anti-virales, allergiques, ou anti-tumorales. Qui plus est, les tests sont utilisables chez une fraction des patients (en fonction du contexte HLA) et nécessitent une connaissance précise des épitopes immuno-dominants de chaque antigène.

L'utilisation de pools de peptides permet cependant de s'affranchir du système HLA et du choix des épitopes, en testant l'ensemble de la molécule.

## 6) Objectifs de l'étude

A l'heure actuelle, la plupart des études publiées concernent des populations adultes et sont basées sur l'utilisation des épitopes immuno-dominants HLA-restreints connus, restreignant les tests à une fraction seulement des individus. Très peu de données sont disponibles chez l'enfant. La population pédiatrique est en effet plus difficilement accessible aux études, de par les contraintes légales mais également de par le volume important de prélèvements nécessaires à ces techniques de détection des réponses lymphocytaires T.

Notre objectif principal a été d'appliquer la technique de l'ELISPOT afin de tester l'utilisation des pools de peptides chevauchants permettant de réaliser l'analyse chez tous les enfants diabétiques sans restriction et limitant le volume de prélèvement nécessaire ; et de revisiter, de ce fait, les fréquences des réponses lymphocytaires T.

De la même façon, si beaucoup d'études existent sur ZnT8, le plus récent des autoantigènes identifiés, dans la population adulte, peu de données sont disponibles chez les enfants.

L'objectif secondaire a donc été d'étudier plus spécifiquement les réponses anti-ZnT8 dans une population pédiatrique.

## PATIENTS ET METHODES

---

### ⇒ Les patients

Les patients ont été inclus au cours de l'hospitalisation consécutive au diagnostic initial du diabète, dans le service d'Endocrinologie, Gynécologie et Diabétologie pédiatrique de l'hôpital universitaire Necker-Enfants malades (Paris, France).

Chaque patient, son représentant légal, ou le titulaire de l'autorité parentale le cas échéant, a été dûment informé de l'objectif et de la nature des contraintes, du traitement des données le concernant recueillies au cours de cette recherche, ainsi que de ses droits d'accès, d'opposition ou de rectification relatifs à ces données. Un document d'information résumant ces différents points lui était remis, suite à quoi il donnait son consentement écrit.

La participation de chaque patient était unique.

Les prélèvements étaient organisés au moment d'un prélèvement programmé dans le parcours de soin. Ils étaient réalisés sur tubes héparinés, le volume de sang étant adapté au poids de l'enfant (*voir annexes*).

Tels étaient les critères d'inclusion :

- Enfant âgé de 1 an à 18 ans
- Recueil du consentement éclairé de l'autorité parentale
- Diabète insulino-dépendant au moment de l'hospitalisation initiale, 5 à 10 jours après le début du traitement par insuline (après au moins 48h d'équilibre glycémique)

Et les critères d'exclusion :

- Enfant ou parent ayant refusé de signer ou présentant une incapacité à comprendre le contenu de la note d'information et du formulaire de consentement de l'étude.

⇒ Les études immunologiques

Les études immunologiques ont été réalisées sur sang veineux fraîchement ponctionné, le jour-même du prélèvement, après acheminement au laboratoire à température ambiante.

L'ELISPOT diabète :

Les plaques 96 puits étaient « coatées » une nuit avec l'anticorps de capture anti-interféron gamma (kit U-CyTech Biosciences) en suivant les instructions du fabricant. Le jour du test, la plaque était lavée trois fois en PBS en conditions stériles, puis saturée avec du milieu RPMI 1640 10% sérum AB mâle humain (Biosera) filtré 1h à 37°C avant utilisation.

Les cellules mononuclées du sang périphérique étaient isolées à partir du sang total hépariné par centrifugation en gradient de densité (Ficoll). Après numération, les cellules étaient re-suspendues dans du milieu AIM V® (Thermo Fisher Scientific) contenant 0,5 ng/ml d'interleukine 7.

Dans chaque puits correspondant, étaient ajoutés soit les pools de peptides testés (Insuline, GAD, IA2, ZnT8) à la concentration finale de 10 µmol/L, soit de la phytohémagglutinine (PHA, un agent mitogénique, utilisé comme un contrôle positif, 1 µg/mL), ou encore du milieu seul (utilisé comme un contrôle négatif). En plus des contrôles négatif et positif, un pool de peptides représentant la protéine de tégument PP65 (UL83) du cytomégalovirus humain (HCMV) était testé, constituant ainsi un troisième contrôle interne. Pour finir, les cellules étaient incorporées de sorte qu'il y ait 500 000 lymphocytes T CD3+ par puits. S'en suivait une mise en incubation de 20h à 37°C.

Le lendemain, la plaque était lavée deux fois en PBS et cinq fois en PBS Tween, avant l'ajout de l'anticorps biotinylé de détection.

Après 1h à 37°C, puis cinq lavages en PBS Tween, la streptavidine-HRP (*horseradish peroxidase*, peroxydase de raifort) était ajoutée.

Après 1h à 37°C, et une procédure de lavage analogue, intervenait l'ajout de l'AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, substrat chromogénique de la peroxydase HRP) dans chaque puits. Pour finir, la plaque était incubée dans le noir, pendant 20 minutes, à température ambiante. La réaction était arrêtée par un lavage à l'eau.

La plaque séchée était lue grâce au lecteur de plaque AID et au logiciel d'interprétation AID Elispot 5.0. La lecture des spots était ainsi automatisée, avec une possible correction des seuils de taille et d'intensité, et une révision manuelle permettant d'éliminer les artefacts comptés par erreur comme des spots (taches, défauts de membrane, doublons).

Les résultats étaient validés si les contrôles listés ci-après s'avéraient concluants :

- Le contrôle positif, à savoir la PHA : existence d'une réponse lors d'une stimulation non spécifique des cellules
- Le contrôle négatif, à savoir l'absence d'antigène : permet d'estimer le bruit de fond (cellules produisant de l'interféron gamma spontanément, sans stimulation)

Le bruit de fond était soustrait aux résultats, qui étaient ensuite exprimés en spots/million de CD3+.

Les pools de peptides utilisés étaient les suivants :

- GAD65, IA-2, Insuline : pools commercialisés par la société Myltenyi Biotec : gamme PepTivator (peptides de longueur 15 mer, overlap de 11 acides aminés)
- ZnT8 : peptides fabriqués individuellement à façon par la société Sigma : 90 peptides de 15 mer avec un overlap de 11 acides aminés (*voir annexes*). Ces 90 peptides ont ensuite été additionnés pour former un pool de peptides chevauchants représentant l'entièreté de la molécule ZnT8.

Des peptides de longueur de 15 mer représente le meilleur compromis pour détecter à la fois les réponses des lymphocytes T auxiliaires CD4+ et T cytotoxiques CD8+(97-99). L'overlap de 11 acides aminés permet d'avoir l'ensemble des épitopes possibles présents dans le pool de peptides.

Le dosage des autoanticorps :

Le dosage des anticorps sériques a été réalisé par les techniques habituelles du laboratoire (techniques de référence : immunofluorescence pour les ICA ; Radio-immunologie RIA et Radioligand assay RLA pour les anticorps spécifiques de la GAD, l'insuline, IA2 et ZnT8).

## RESULTATS

Au total, 27 patients ont été inclus sur une période de 26 mois : 14 de sexe féminin et 13 de sexe masculin (sexe-ratio = 0,93), présentant un âge moyen de 7,8 ans (écart-type de 4,2 ans) et un âge médian de 8 ans (étalé de 11 mois à 15 ans).

Le groupe contrôle était constitué d'enfants prélevés en consultation d'allergologie, chez qui était réalisé un ELISPOT testant des allergènes ; l'ELISPOT diabète était réalisé en parallèle sur les cellules restantes : 3 patients de sexe féminin et 9 de sexe masculin (sexe-ratio = 3), d'âge moyen 11,1 ans (écart-type 3,1 ans) et d'âge médian 11,1 ans (allant de 6,3 ans à 15 ans).

	Nombre	Sexe masculin	Sexe féminin	Age moyen (écart-type)	Age médian (intervalle)
Patients	27	13	14	7,8 ans (4,2)	8 ans (11 mois à 15 ans)
Contrôles	12	9	3	11,1 ans (3,1)	11,1 ans (6,3 à 15 ans)

Tableau 3 : caractéristiques des groupes patients et contrôle

### 1) Les autoanticorps

Les autoanticorps anti-ilots de Langerhans (ICA) étaient présents chez 100% des patients testés ; les anti-GAD, anti-IA2, anti-ZnT8 et anti-insuline chez respectivement 69,2%, 61,5%, 20% et 34,8% des patients (tableau 4).

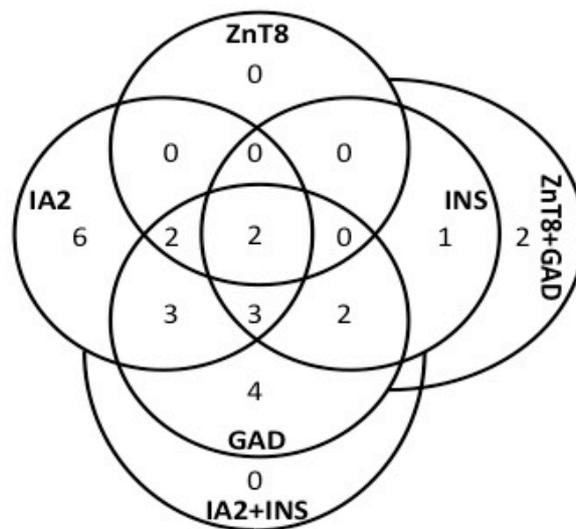
	GAD	IA2	ZnT8	Insuline	ICA
Positifs	18	16	5	8	23
Testés	26	26	25	23	23
Pourcentage	69,2%	61,5%	20,0%	34,8%	100%

Tableau 4 : résultats des autoanticorps chez les patients

Seul 1 patient ne présentait aucun autoanticorps en dehors des anti-ilots de Langerhans (ICA). 25 patients étaient positifs pour au moins 1 autoanticorps et 14 présentaient des associations de 2 autoanticorps ou plus (lesquelles sont illustrées ci-après, *tableau 5 et figure 17*).

	Patients	Soit en %
Pas d'auto-anticorps	1	3,7%
≥ 1 auto-anticorps	25	92,6%
≥ 2 auto-anticorps	14	51,9%
≥ 3 auto-anticorps	7	25,9%
4 auto-anticorps	2	7,4%

*Tableau 5 : nombre d'autoanticorps présents simultanément chez les patients*



*Figure 17 : présences superposées des auto-anticorps chez les patients*

## 2) L'ELISPOT diabète

Après soustraction du bruit de fond (correspondant à la réactivité spontanée en l'absence de stimulation), et réajustement pour des résultats exprimés en SFC/million de CD3+, 27 patients ont été testés pour l'antigène GAD (moyenne de 6,9 SFC/million de CD3+) et pour l'insuline (moyenne de 7,2 SFC/million de CD3+).

24 patients ont été testés pour l'antigène IA2 (moyenne de 8,9 SFC/million de CD3+) et pour ZnT8 (moyenne de 4,2 SFC/million de CD3+) (*tableau 6*).

Trois patients n'ont pas été testés pour les antigènes IA2 et ZnT8 faute d'un nombre de cellules suffisant après isolement.

<b>Patient</b>	<b>GAD</b>	<b>IA2</b>	<b>ZnT8</b>	<b>Insuline</b>
1	10	37,5	2,5	7,5
2	45	7,5	0	32,5
3	5	0	0	0
4	5	7,5	17,5	7,5
5	1,25	0	0	16,25
6	0	27,5	0	0
7	13,75	1,25	0	1,25
8	2,5	7,5	7,5	2,5
9	0	0	0	0
10	0	6	2	0
11	0	0	0	3
12	0	69	35	58
13	5	3	5	4
14	0		0	13
15	0		0	0
16	0	1	0	0
17	0			0
18	6	1		2
19	2	5	1	3
20	0	4	4	1
21	3	7	0	0
22	0	2		0
23	58,5	17,5	0	38,5
24	4,5	0	0	4,5
25	0	1	3	0
26	0	5	9	0
27	24	4	14	0
<b>Moyenne</b>	<b>6,9</b>	<b>8,9</b>	<b>4,2</b>	<b>7,2</b>

*Tableau 6 : données brutes après soustraction du bruit de fond (réactivité non spécifique mesurée par mise en culture des cellules dans du milieu seul : AIM V et IL7) du groupe patients, en SFC/million de CD3+*

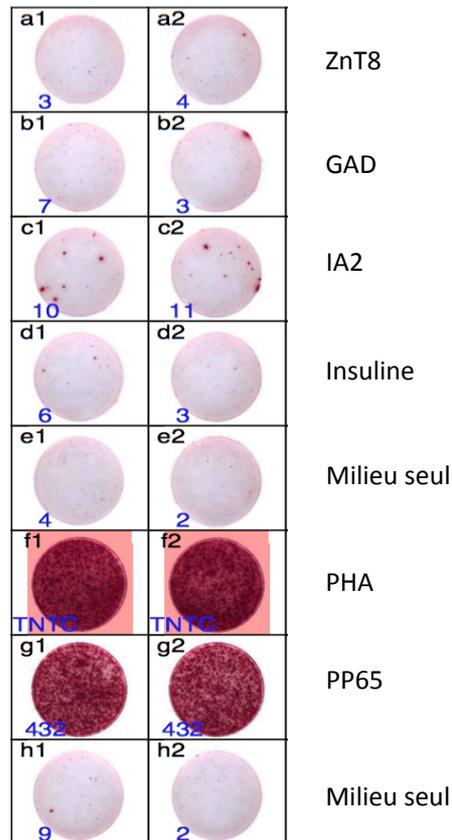


Figure 18 : un exemple d'ELISPOT diabète : présence de spots dans les puits IA2, PP65 et PHA (contrôle positif)

Deux patients ont été exclus du groupe contrôle à cause d'une réactivité non spécifique importante, source d'un bruit de fond gênant l'interprétation et diminuant la sensibilité du test. En effet, les réponses spontanées en l'absence d'antigène étaient de plusieurs centaines de SFC/million de CD3+ (453 SFC/million de CD3+ pour l'un, 677 pour l'autre). Dans ce groupe contrôle, les réponses moyennes vis-à-vis des antigènes GAD, IA2, ZnT8 et insuline étaient respectivement de 1,04, 1,15, 0,73 et 2,40 SFC/million de CD3+ (tableau 7).

Contrôle	GAD	IA2	ZnT8	Insuline
1	0	0	3,75	0
2	8,75	6,25	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	2,5	0
5	3,75	3,75	0	3,75
6	0	2,5	0	5
7	0	0	0	6,25
8	0	0	0	5
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	1,25	0	1,25
12	0	0	2,5	7,5
<b>Moyenne</b>	<b>1,04</b>	<b>1,15</b>	<b>0,73</b>	<b>2,40</b>

Tableau 7 : données brutes après soustraction du bruit de fond du groupe contrôle, en SFC/million de CD3+

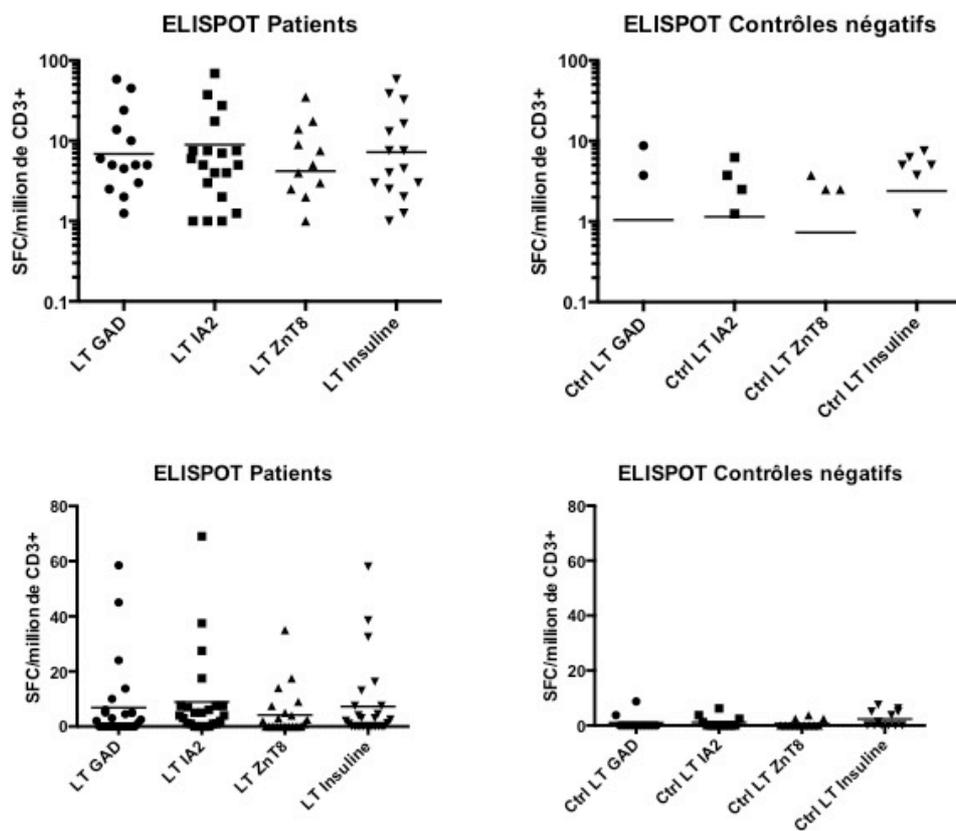


Figure 19 : résultats de l'ELISPOT diabète : groupe patients à gauche, groupe contrôle à droite, échelle log10 en haut et linéaire en bas

## 2.1 La comparaison des groupes de patients et de sujets contrôles

La comparaison, pour chaque antigène, des groupes patients et contrôle a été réalisée par le test non paramétrique de Mann et Whitney.

Ainsi, une différence statistiquement significative a été retrouvée entre les groupes patients et contrôle pour les antigènes GAD et IA2 ( $p < 0,05$  ; respectivement  $p = 0,0492$  et  $p = 0,0060$ ) (figure 20). En revanche, aucune différence n'a été mise en évidence pour ZnT8 et insuline ( $p = 0,1557$  et  $p = 0,6750$ ).

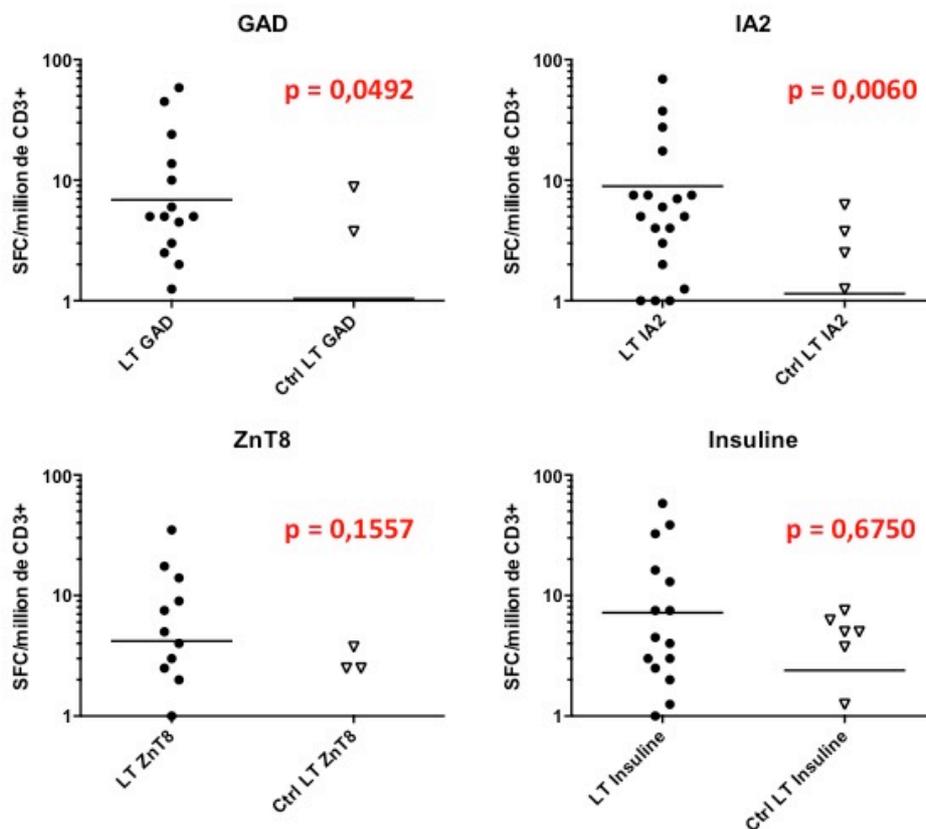


Figure 20 : comparaison des résultats de l'ELISPOT diabète pour chaque antigène ; groupe patients versus groupe contrôle

## 2.2 La définition d'un seuil de positivité sur la base des résultats du groupe contrôle

Le seuil de positivité défini, pour chaque antigène, par la moyenne des résultats du groupe contrôle majorée de 3 écarts-types, était de 9,01 SFC/million de CD3+ pour GAD, 7,23 pour IA2, 4,79 pour ZnT8 et 11,07 pour l'insuline (*tableau 8*).

Contrôles négatifs	GAD	IA2	ZnT8	Insuline
Moyenne	1,04	1,15	0,73	2,40
DS	2,66	2,03	1,35	2,89
Moyenne +2DS	6,35	5,20	3,44	8,18
<b>Moyenne +3DS</b>	<b>9,01</b>	<b>7,23</b>	<b>4,79</b>	<b>11,07</b>

Tableau 8 : calcul du seuil de positivité (en rouge) à partir des données du groupe contrôle

En utilisant ce seuil, 13 patients étaient positifs pour au moins un antigène, soit 48,1%. Dans le détail, 5 étaient positifs pour GAD (soit 18,5%), 7 pour IA2 (soit 29,2%), 6 pour ZnT8 (soit 25%) et 5 pour l'insuline (soit 18,5%) (*tableau 9* ; la réactivité simultanée est résumée dans le *tableau 10*).

Patients	GAD	IA2	ZnT8	Insuline
Testés	27	24	24	27
>0 spot	14	19	11	15
soit en %	51,9%	79,2%	45,8%	55,6%
> seuil établi +2DS	5	9	7	5
soit en %	18,5%	37,5%	29,2%	18,5%
<b>&gt;Seuil établi +3DS</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>5</b>
<b>soit en %</b>	<b>18,5%</b>	<b>29,2%</b>	<b>25,0%</b>	<b>18,5%</b>

Tableau 9 : résultats interprétés avec le seuil de positivité préalablement établi avec le groupe contrôle

	Patients	Soit en %
Négatifs	14	51,9%
Positifs ≥ 1 autoantigène	13	48,1%
Positifs ≥ 2 autoantigènes	7	25,9%
Positifs ≥ 3 autoantigènes	3	11,1%
Positifs ≥ 4 autoantigènes	0	0,0%

Tableau 10 : réactivité simultanée dans le groupe patients (en utilisant le seuil +3DS)

### 2.3 L'expression des résultats par rapport au contrôle négatif individuel : le «seuil technique de détection»

Plusieurs études expriment les résultats de l'ELISPOT en utilisant le seuil technique, établi pour chaque analyse grâce au contrôle négatif. Ainsi, il était important d'exprimer nos résultats de la même façon dans un souci d'homogénéité.

Le seuil de positivité individuel était calculé pour chaque patient, et défini par la moyenne du contrôle négatif (milieu AIM V + IL7 seuls) majorée de 3, 4 ou 5 écarts-types.

Au total, en utilisant le seuil de 3 écarts-types, 11 patients étaient positifs vis-à-vis d'au moins un antigène, soit 40,7% : 5 pour GAD, 4 pour IA2, 6 pour ZnT8 et 2 pour l'insuline (*tableau 11* ; la réactivité simultanée est résumée dans le *tableau 12*).

Patients	GAD	IA2	ZnT8	Insuline	Basal	Basal+3DS	Basal+4DS	Basal+5DS
1	5	10,5	3,5	4,5	3	7,2	8,6	10,1
2	23	15,5	1	20,5	14	18,6	20,1	21,7
3	4,5	3,5	3	1,5	3,5	9,7	11,8	13,9
4	1	1,5	3,5	1,5	0	1,5	2,0	2,5
5	9	7,5	6,5	12	8,75	16,6	19,3	21,9
6	17	23,5	8,5	11	18	35,7	41,6	47,5
7	3	0,5	0	0,5	0,25	1,8	2,3	2,8
8	1,5	2,5	2,5	1,5	1	3,5	4,3	5,1
9	0	0	0	0,5	0,5	2,6	3,3	4,1
10	5	10	8	7	7	15,0	17,6	20,3
11	0	0	0	2	0,5	2,2	2,8	3,4
12	9,5	46	29	40,5	11,5	13,6	14,3	15,1
13	3,5	2,5	3,5	3	1	3,1	3,8	4,6
14	42		27	50	43,5	54,1	57,7	61,2
15	0		0	1,5	1,5	7,9	10,0	12,1
16	0	1	0,5	0,5	0,5	2,2	2,8	3,4
17	1			0,5	1	3,1	3,8	4,5
18	3	0,5		1	0	1,7	2,3	2,9
19	2	3,5	1,5	2,5	1	2,5	3,0	3,5
20	0	2,5	2,5	1	0,5	2,0	2,5	3,0
21	4,5	6,5	1	3	3	9,5	11,6	13,8
22	0,5	1,5		0,5	0,5	2,6	3,3	4,0
23	76,5	56	35	66,5	47,25	96,8	113,3	129,9
24	3	0	0,5	3	0,75	3,6	4,6	5,5
25	0	0,5	1,5	0	0	1,7	2,3	2,9
26	7,5	11,5	13,5	8	9	13,2	14,6	16,1
27	13	3	8	1	1	3,1	3,8	4,6

Tableau 11 : résultats du groupe patients interprétés avec un seuil de positivité défini comme la moyenne du contrôle négatif majorée de 3, 4 ou 5 écarts-types, valeurs brutes (nombre de spots par puits, sans soustraction du bruit de fond)

	Patients	Soit en %
Négatifs	16	59,3%
Positifs ≥ 1 autoantigène	11	40,7%
Positifs ≥ 2 autoantigènes	5	18,5%
Positifs ≥ 3 autoantigènes	1	3,7%
Positifs ≥ 4 autoantigènes	0	0,0%

Tableau 12 : réactivité simultanée dans le groupe patients (en utilisant le seuil Basal+3DS)

### 3) La relation entre l'ELISPOT et les autoanticorps

Pour l'étude de la relation entre l'ELISPOT et les autoanticorps, nous avons choisis d'utiliser nos résultats interprétés grâce au seuil établi à l'aide du groupe contrôle.

Les patients positifs vis-à-vis de l'antigène IA2 présentaient également les autoanticorps correspondants (taux de concordance de 100%). En revanche, les patients positifs pour GAD, ZnT8 ou l'insuline en ELISPOT n'avaient pas systématiquement les autoanticorps anti-GAD, anti-ZnT8 et anti-insuline correspondants (taux de concordance respectivement de 80%, 17% et 40%) (*tableau 13*).

	GAD	IA2	ZnT8	Insuline
ELISPOT positifs	5	7	6	5
Auto-anticorps positifs	18	16	5	8
Taux de concordance de l'ELISPOT	80%	100%	17%	40%

*Tableau 13 : concordance entre l'ELISPOT diabète et les autoanticorps*

L'existence d'une relation entre l'ELISPOT et les auto-anticorps a été recherchée par le calcul du coefficient de corrélation de Bravais-Pearson (*tableau 14*) : aucune corrélation n'était retrouvée ( $p > 0,05$ ).

	Coefficient de corrélation	p
GAD	0,21	0,31
IA2	0,1	0,65
ZnT8	0,33	0,14
Insuline	-0,09	0,70

*Tableau 14 : relation entre l'ELISPOT diabète et les autoanticorps : coefficient de Bravais-Pearson*

## DISCUSSION

### 1) Les autoanticorps anti-cellules bêta dans une population pédiatrique

Dans la littérature existante, peu d'études recensent et évaluent la présence des autoanticorps du diabète de type 1 au sein de populations similaires à la nôtre. En effet, nombre de grandes cohortes sont de nature hétérogène, à l'instar de BABYDIAB. Elles sont constituées de sujets diabétiques de tous âges, ayant été inclus à divers moments, à savoir soit au diagnostic, soit au cours du suivi. Pour cette raison, et afin de mieux évaluer et confronter nos résultats, nous avons sélectionné quatre études (*tableau 15*) dont les populations sont relativement comparables à celle que nous étudions : il s'agit d'enfants ou de jeunes adultes, tous inclus au moment du diagnostic.

Etude	Population				Auto-anticorps				
	Nombre	Age moyen en années	Age médian (intervalle)	sex-ratio	GAD	IA2	ZnT8	Insuline	ICA
Nos résultats	27	7,8	8 (0,9-15)	0,93	69%	62%	20%	35%	100%
Enée et al., 2012(100)	36	7,9*	8 (2-15)	0,8	72%	58%	43%	30%	89%
Wenzlau et al., 2007(101)	277	12,1	(1-46)		68%	72%	63%	55%	
Juusola et al., 2016(102)	723			1,2			73%		
Vermeulen et al., 2011(103)	655		15 (9-26)	1,4	75%	57%	58% (65%**)	51%	

*Tableau 15 : comparaison des résultats des auto-anticorps avec ceux d'autres études ayant des critères d'inclusion comparables (\*calculée avec les données brutes ; \*\* dans le sous-groupe 0-14 ans)*

Notre population de 27 enfants montre une positivité pour les autoanticorps anti-GAD, anti-IA2 et anti-insuline proche des proportions habituellement décrites dans la littérature.

En revanche, seuls 20% des enfants étudiés possèdent des autoanticorps anti-ZnT8, ce qui est très inférieur à ce qui est retrouvé habituellement au sein de populations pédiatriques (avec 43 à 73% de positivité).

Cette différence tient probablement à la taille réduite de notre échantillon, qui ne peut être pleinement représentatif de la population étudiée. La littérature existante concernant le transporteur du zinc ZnT8, dernier autoantigène découvert, montre que les anticorps anti-ZnT8 prédominent normalement chez les enfants, avec un pic à la fin de l'adolescence, entre 12 et 16 ans(101,104). Ceci semble confirmer la meilleure représentativité théorique des quatre études, en comparaison à la nôtre.

## 2) L'ELISPOT diabète dans une population pédiatrique

Pour toutes les comparaisons qui vont suivre, nous avons choisi d'utiliser nos résultats exprimés en fonction du seuil établi grâce au groupe contrôle. En effet, l'utilisation du seuil technique, se basant sur la moyenne du contrôle négatif de chaque analyse majorée de trois écarts-types, est peu pertinente dans notre cas. La population pédiatrique implique des prélèvements en faible quantité, et donc un nombre de cellules après isolement limité. De fait, les puits dévolus au contrôle négatif étaient souvent au nombre de deux, ce qui n'est pas adapté au calcul d'une moyenne et d'un écart-type ayant une valeur représentative.

Parmi nos 27 patients, 13 présentent une réponse lymphocytaire T vis-à-vis d'au moins un antigène, soit 48,1%. Plus exactement, 5 sont positifs pour GAD (soit 18,5%), 7 pour IA2 (soit 29,2%), 6 pour ZnT8 (soit 25%) et 5 pour l'insuline (soit 18,5%).

La plupart des tests ELISPOT que l'on retrouve dans la littérature sont réalisés chez des patients adultes, diabétiques depuis une durée variable, contrairement à notre étude menée sur une population pédiatrique testée au moment du diagnostic.

Une considération doit être apportée au fait qu'une grande partie des précédentes études s'appuie sur une sélection de peptides représentant les épitopes immunodominants connus (*tableau 16*). Les pools de peptides que nous avons utilisés contiennent bien ces mêmes épitopes.

Etude	Population			Peptides ou Pools	ELISPOT				
	Nombre	Type	Inclusion au diagnostic		GAD	IA2	ZnT8	Insuline	Positif $\geq 1$ auto-antigène
Nos résultats	27	Pédiatrique	Oui	Pools	18,5%	29%	25%	18,5%	48%
Mallone et al., 2007(105)	22	Adulte	Oui	Peptides	50%			73%	
Martinuzzi et al., 2008(106)	15	Adulte	Oui	Peptides	67%	27%		60%	
Kotani et al., 2002(107)	33	Adulte	Non	Forme soluble	67%				
Dang et al., 2011(108)	35	Mixte	Oui	Peptides *			69%		
Nagata et al., 2004(109)	24	Mixte	Non	Peptides	33%				
Enée et al., 2012(100)	36	Pédiatrique	Oui	Peptides			81%		

*Tableau 16 : comparaison des résultats de l'ELISPOT diabète avec ceux d'autres études comparables (\*23 pools de 2 peptides pour ZnT8)*

On observe que la réactivité anti-GAD est bien supérieure chez les adultes - en moyenne 60% de patients positifs, par rapport aux populations mixtes ou pédiatriques. Seulement 15% des enfants de notre population présentent une réactivité anti-GAD, ce qui semble présenter une cohérence avec les résultats retrouvés dans des populations mixtes (de l'ordre de 30% de positivité), bien que cette interprétation soit dubitable, au vu de la taille réduite des échantillons.

Les rares études sur les cellules T anti-IA2, et portant sur des adultes, montrent un pourcentage de réactivité proche de 30%, similaire à nos résultats.

Concernant ZnT8, seulement 6 patients sont positifs, soit 25%, ce qui est bien inférieur aux données de la littérature, variant de 69% de positivité pour une population mixte à 81% chez les enfants. Ce faible pourcentage de positivité en ELISPOT est à mettre en parallèle avec nos résultats d'auto-anticorps également bien inférieurs aux données existantes. Comme expliqué plus haut, il est probable que cette différence soit liée au manque de représentativité de notre échantillon statistique.

La plupart des ELISPOT sont réalisés en utilisant des peptides de la prépro-insuline ou de la pro-insuline. Ces peptides sont également incluses dans notre pool, puisqu'ils composent pour partie la molécule d'insuline, ce qui permet une comparabilité des résultats.

Notre ELISPOT nous amène à observer que peu de patients montrent une réactivité anti-insuline, comparativement à ce qui est usuellement décrit dans la littérature. Cela dit, aucune étude n'a été réalisée sur une population exclusivement pédiatrique.

### 3) Une approche technique de l'ELISPOT

Les fréquences des réponses lymphocytaires vis-à-vis des autoantigènes du diabète que nous observons sont relativement faibles au regard de ce qui est établi dans le domaine de la virologie, où l'ELISPOT est particulièrement utilisé - notamment pour le suivi des réponses anti-CMV ou EBV chez les patients transplantés.

En effet, des résultats de l'ordre de plusieurs centaines voire milliers de SFC/million de PBMC sont fréquemment retrouvés, notamment vis-à-vis des peptides immuno-dominants comme PP65.

Etude	Médianes des fréquences des réponses, en SFC/million de PBMC			
	GAD	IA2	ZnT8	Insuline
Nos résultats	1,25* (0-58,5)	4* (0-69)	0* (0-35)	1,25* (0-58)
Martinuzzi et al., 2008(106)	13** (0-820,5)	5** (0-720,5)		7,2** (0-832,7)
Mallone et al., 2007(105)	2,8** (0-820,5)			10,5** (0-832,7)
Dang et al., 2011(108)			81 (18-689)	

Tableau 17 : comparaison des fréquences des réponses lymphocytaires dans le diabète de type 1 (\* résultats exprimés en SFC/million de CD3+ ; \*\*calculé avec les données brutes)

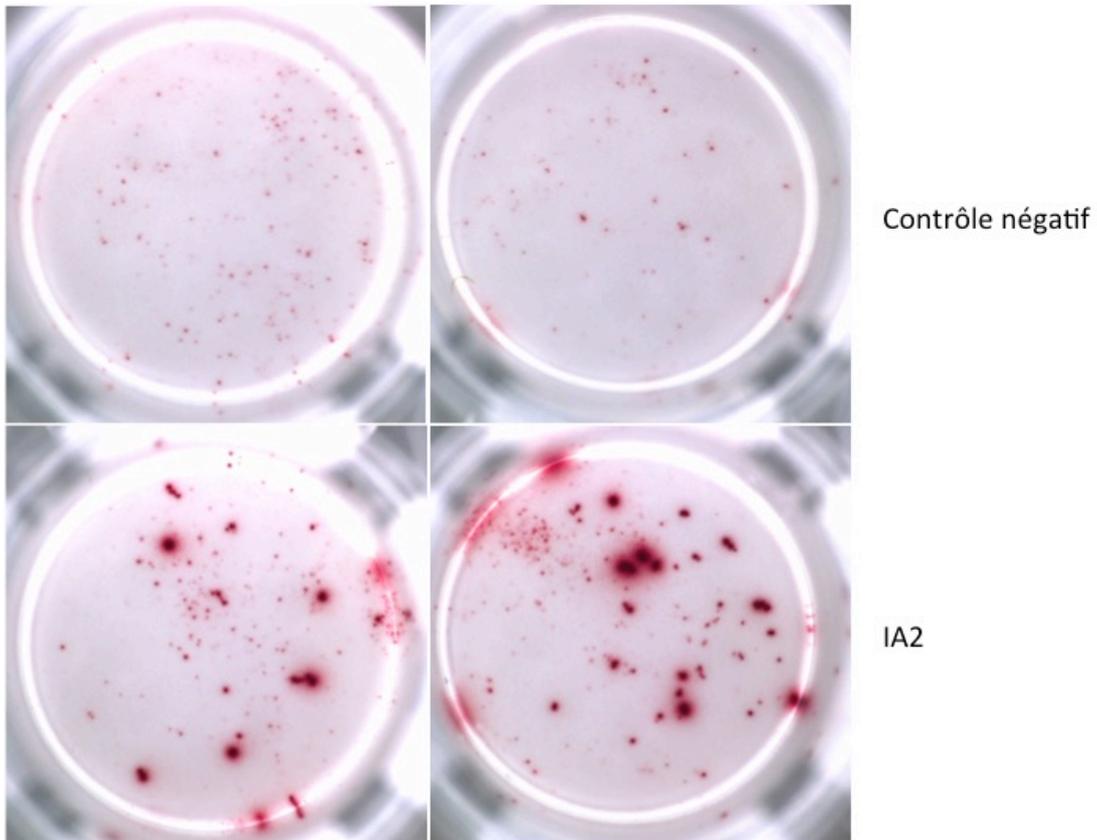
En revanche, les données de la littérature (tableau 17) sur l'amplitude des réponses lymphocytaires dans le diabète de type 1 semblent être en accord avec nos résultats : les réponses sont généralement faibles, inférieures à 100 SFC/million de PBMC.

Les réponses importantes sont fréquemment associées à un bruit de fond élevé. Ce dernier témoigne d'une réponse spontanée non spécifique, ce qui nous amène à relativiser l'évaluation quantitative des réponses ainsi obtenues vis-à-vis des antigènes testés.

On notera que nos résultats sont exprimés en SFC/million de lymphocytes T. Les réponses obtenues sont, de ce fait, surestimées par rapport aux résultats exprimés en SFC/million de PBMC. Toutefois, comme les lymphocytes T représentent généralement 70 à 80% des PBMC, l'ordre de grandeur de nos résultats reste comparable à celui des autres études.

Pour finir, il convient de mentionner que les paramètres utilisés (à savoir la taille et l'intensité) lors de la définition d'un spot ont un effet direct sur le nombre final de spots dans un puits. Ceci peut donc conduire à des différences importantes lors du compte des spots.

Comparativement à ce qui est observé avec des ELISPOT viraux, dont nous avons une grande expérience dans notre laboratoire, les spots de l'ELISPOT diabète semblent de taille supérieure et plus intenses (figure 21). Le réglage des paramètres susmentionnés reste à la discrétion de l'expérimentateur, ce qui complexifie la comparaison des valeurs absolues des résultats issus de la littérature.



*Figure 21 : illustration de la différence de taille et d'intensité des spots entre le contrôle négatif et un antigène donné*

#### 4) L'intérêt discutable des pools de peptides

En principe, les pools de peptides présentent de nombreux avantages par rapport aux peptides restreints :

⇒ Peptides restreints :

- Le test se limite à la zone d'intérêt choisie de la molécule (par exemple, à un épitope connu) avec la restriction HLA que cela implique
- Il est indispensable de mettre en œuvre un test par peptide, ce qui nécessite une quantité de cellules importante, afin de tester de grandes molécules

⇒ Pools de peptides :

- Les peptides sont représentatifs d'un antigène entier, ce qui signifie que l'ensemble de la protéine est représenté avec des peptides de taille optimale pour la stimulation des lymphocytes T CD4+ et CD8+
- Les peptides chevauchants permettent de couvrir tous les registres de présentation peptidique possibles, sans restriction HLA, et tous les patients peuvent être testés sans distinction

Dans la pratique, les pools de peptides n'apportent pas les bénéfices escomptés par rapport à l'utilisation de peptides uniques, hormis le fait néanmoins important de pouvoir tester exhaustivement tous les patients, indépendamment de la restriction HLA. La positivité observée en utilisant des pools de peptides n'est pas meilleure que celle constatée avec des peptides restreints bien choisis.

De par ses caractéristiques, notre ELISPOT diabète détecte normalement à la fois les lymphocytes T CD4+ et CD8+.

De manière générale, l'ELISPOT est souvent utilisé pour la détection de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ spécifiques, en utilisant des peptides restreints (CMH de classe I).

Cependant, il a été observé que les spots ainsi formés n'étaient pas uniquement des lymphocytes T CD8+(110). Au contraire, chez certains patients, les lymphocytes T auxiliaires CD4+ pouvaient également répondre à cette stimulation, venant ainsi fausser l'évaluation du nombre de lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'antigène (*figure 22*).

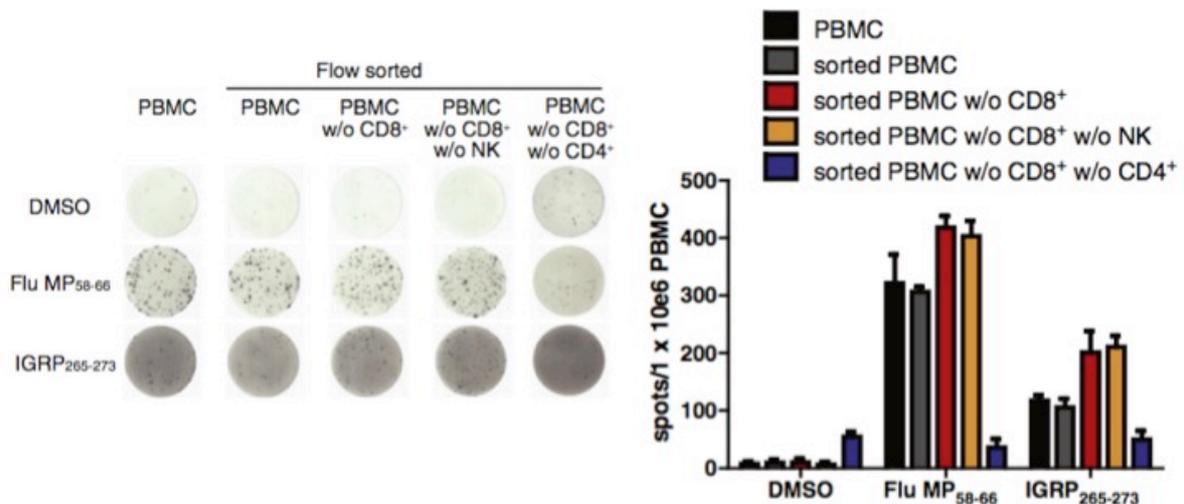


Figure 22 : exemple d'un patient dont les réponses sont constituées essentiellement de lymphocytes T CD4+. Fuchs et al. 2015.

Notre étude est ainsi possiblement comparable aux ELISPOT détectant spécifiquement les lymphocytes T CD8+.

Une stimulation réalisée avec un pool de peptides, donc un plus grand nombre de peptides, aurait pu conduire à l'obtention de meilleures réponses, à la fois en termes de nombre de patients positifs que de fréquence.

Or, contrairement à nos attentes, nous n'avons pas observé une amélioration des réponses obtenues avec cette méthode. Pour expliquer cet état de fait, nous pouvons avancer les hypothèses suivantes :

- Etant donné le nombre limité de peptides immunodominants in vivo, il est fort probable que la plupart d'entre eux soient reconnus par les lymphocytes T CD8+ (voir ci-après).
- Le choix de la longueur des peptides, à savoir 15 mers, pourrait impliquer une mauvaise présentation des peptides immunodominants. Cette hypothèse est cependant infirmée par les données disponibles en virologie. La longueur de 15 mers permet de stimuler à la fois les CD4+ et les CD8+ (il existe probablement un raccourcissement des extrémités dans les vésicules de recyclage avant le chargement sur la molécule CMH).
- Il est possible qu'une compétition entre les peptides existe au sein du pool.

- Enfin, l'affinité plus faible des lymphocytes T autoréactifs comparativement aux lymphocytes spécifiques d'antigènes exogènes, infectieux notamment, pourrait limiter l'avidité de l'interaction HLA/peptide/TCR et la probabilité d'une activation lymphocytaire complète lors du test, du fait d'une concentration insuffisante du peptide reconnu au sein du pool et/ou d'une compétition peptidique. Les fréquences modestes de lymphocytes autoréactifs identifiés dans nos conditions pourraient donc constituer le reflet de leur faible affinité. Il est d'ailleurs possible que les lymphocytes autoréactifs impliqués dans le processus pathogène et de haute affinité ne soient que très faiblement représentés en périphérie du fait d'une localisation préférentielle au sein du tissu cible du processus auto-immun.

La combinaison de ces multiples facteurs expliquerait ainsi qu'il n'y ait pas d'avantage réel à l'utilisation de pools, par rapport à des peptides choisis.

De nombreuses études utilisent des peptides HLA A2 restreints pour étudier les réponses des lymphocytes T CD8+. Lorsque l'on étudie uniquement les résultats de notre étude sur les patients HLA A2+, on observe une réactivité vis-à-vis de GAD chez 3 d'entre eux (soit 18,8%), de IA2 et ZnT8 chez 5 d'entre eux (soit respectivement 33,3% et 35,7%), et enfin de l'insuline chez 4 d'entre eux (25%)(tableau 18).

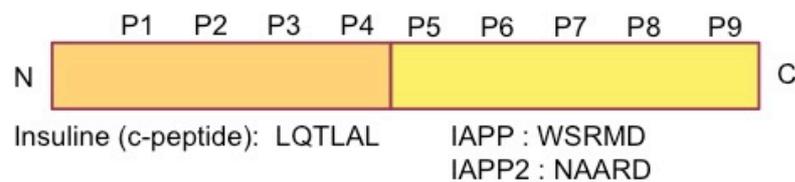
	<b>GAD</b>	<b>IA2</b>	<b>ZnT8</b>	<b>Insuline</b>
Tous les patients	27	24	24	27
>Seuil établi +3DS	5	7	6	5
soit en %	<b>18,5%</b>	<b>29,2%</b>	<b>25,0%</b>	<b>18,5%</b>
<b>Patients HLA A2+</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>16</b>
<b>&gt;Seuil établi +3DS</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
<b>soit en %</b>	<b>18,8%</b>	<b>33,3%</b>	<b>35,7%</b>	<b>25,0%</b>
Patients HLA A2-	6	5	6	6
>Seuil établi +3DS	1	1	1	1
soit en %	<b>16,7%</b>	<b>20,0%</b>	<b>16,7%</b>	<b>16,7%</b>

Tableau 18 : réactivités chez les patients HLA A2+ et HLA A2-

Bien que les résultats semblent montrer une plus grande positivité chez les patients HLA A2+ comparativement au groupe HLA A2-, ces différences ne sont pas significatives (conformément aux observations du test non paramétrique de Mann et Whitney, à savoir  $p=0,98$ ,  $0,27$ ,  $0,51$  et  $0,29$  respectivement pour GAD, IA2, ZnT8 et insuline).

D'autres hypothèses, plus générales, peuvent expliquer ces difficultés, à savoir d'une part l'affinité des lymphocytes T autoréactifs, ou d'autre part les différences existant entre les peptides de synthèse et les peptides immuno-dominants produits in vivo.

Il a ainsi été démontré que des lymphocytes T auxiliaires CD4+ reconnaissent des épitopes formés par la fusion de peptides différents (*figure 24*), chez la souris NOD ainsi que chez l'homme(111). Ces peptides hybrides présentent une antigénicité plus importante que celle des peptides pris séparément, la concentration d'antigène nécessaire à la détection d'une réponse lymphocytaire étant largement inférieure.



*Figure 23 : exemples de peptides hybrides*

Ainsi, la stimulation imparfaite par des peptides reconnus partiellement par le TCR des lymphocytes T pourrait expliquer les réponses faibles obtenues en ELISPOT.

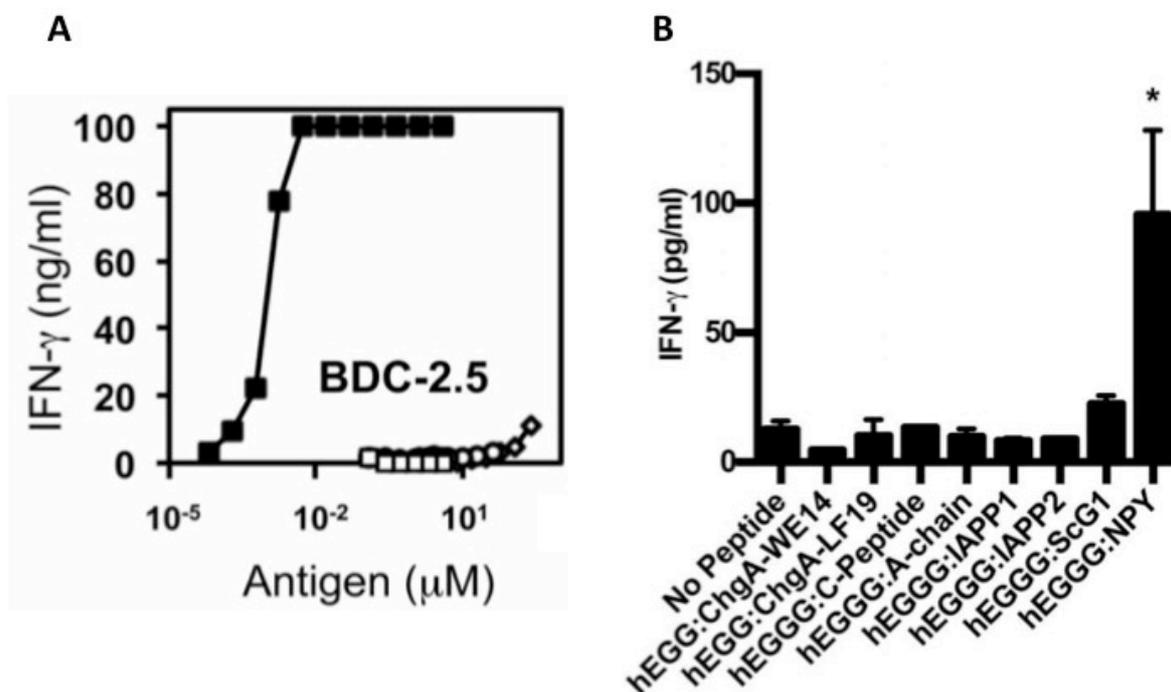


Figure 24 : A : production d'interféron gamma en réponse à un antigène, chez la souris NOD ; comparaison des réponses en fonction de la concentration d'antigène : peptide hybride (carrés noirs) et peptide non modifié (carrés blancs). B : identification d'un peptide hybride chez l'homme : fusion d'un fragment du peptide C et du neuropeptide Y. Delong et al. 2016.

Les peptides hybrides in vivo peuvent être le fruit d'une réaction secondaire au niveau des granules de sécrétion des cellules bêta, se trouvant favorisée par la présence de nombreux produits de clivage et par une concentration importante de peptides différents. L'identification de ces peptides, possiblement à l'origine de la rupture de tolérance initiale, constitue un défi majeur pour le diabète, comme pour d'autres maladies auto-immunes.

## 5) Un zoom sur la réponse spécifique de l'autoantigène ZnT8 dans une population pédiatrique

Les anticorps anti-ZnT8 sont considérés comme des marqueurs indépendants du diabète de type 1. Leur présence est corrélée avec l'âge du patient au moment du diagnostic, culmine au diagnostic, pour décroître par la suite(112).

Dans notre population, la proportion de patients avec des auto-anticorps anti-ZnT8 est relativement faible par rapport à ce qui est usuellement décrit dans la littérature chez les enfants. Cependant, des résultats similaires sont retrouvés pour l'ELISPOT, avec peu de patients présentant une réactivité anti-ZnT8.

Cette observation trouve probablement son explication dans la taille réduite de notre population, qui ne permettrait pas d'obtenir de chiffres pleinement représentatifs de l'ensemble de la population diabétique, en particulier pour les anticorps.

Parallèlement, en ce qui concerne les réponses lymphocytaires, la plupart des études sont réalisées sur de faibles échantillons et sont sujettes au même biais.

## 6) L'avenir des tests de détection des lymphocytes T autoréactifs

Les biomarqueurs, que ce soit pour la prédiction du diabète ou le suivi et l'évaluation des immuno-interventions, font l'objet aujourd'hui d'un important développement et sont fréquemment comparés et réévalués(113). Parallèlement, de nouvelles voies prometteuses sont régulièrement découvertes.

Par exemple, l'étude des transcriptomes des lymphocytes T cytotoxiques CD8+, retrouvées chez les patients diabétiques comme chez des sujets sains, a permis de montrer la diminution de certains éléments de la voie extrinsèque de l'apoptose (systèmes Fas/Fas-Ligand et TRAIL-R2/TRAIL) dans les cellules des malades. Ceci confirme l'hypothèse d'une prolifération anormale des lymphocytes autoréactifs chez les patients par un échec d'activation de l'apoptose de ces cellules(114).

Des techniques existent également pour évaluer la masse de cellules bêta fonctionnelles et mesurer l'inflammation locale. Par exemple, chez la souris NOD, le marquage magnétique des cellules T permet de visualiser en temps réel leur recrutement au niveau pancréatique(115). Chez l'homme, grâce à des nanoparticules magnétiques, l'inflammation est retrouvée au niveau du pancréas(116).

Plus récemment, la détection dans le sérum de copies d'ADN déméthylées circulantes issues spécifiquement de la cellule bêta montre une augmentation du nombre de copies, chez la souris mais aussi chez le patient diabétique(117).

A l'heure actuelle, parmi les différents biomarqueurs, les autoanticorps du diabète restent les plus prédictifs de la maladie. Plus encore, l'étude des isotypes de ces anticorps met en évidence des profils particuliers associés à la variabilité de la progression vers la maladie. Les sujets avec certains isotypes n'évolueront pas vers le diabète(118).

Cependant, la place de tous ces biomarqueurs, y compris la détection des lymphocytes T autoréactifs dans le sang périphérique, reste à définir. L'hétérogénéité des réponses aux différentes immuno-interventions et la nécessité de pouvoir prédire la maladie impose de continuer à développer et identifier ces biomarqueurs.

## Conclusion

---

Les résultats observés lors de l'ELISPOT diabète présentent des similitudes avec ce qui est couramment rapporté dans la littérature. Seule la réactivité anti-ZnT8 -tout comme la positivité des auto-anticorps correspondants- apparaît en-deçà des valeurs habituellement décrites. La poursuite de notre étude, dans la perspective d'augmenter la taille de l'échantillon, permettrait probablement d'obtenir des données chiffrées plus représentatives de la population diabétique prise dans son intégralité, notamment en ce qui concerne ZnT8.

En l'état, eu égard aux faibles niveaux des réponses identifiées, la technique de l'ELISPOT apparaît comme encore imparfaite. Bien que le test soit techniquement mature -ce que son utilisation dans d'autres domaines d'application semble prouver- le choix de la nature des antigènes utilisés constitue une piste d'amélioration digne d'intérêt.

En effet, les pools de peptides n'ont pas conduit à l'obtention de meilleures réponses, à la fois en termes de nombre de patients positifs que de fréquences lymphocytaires par rapport aux peptides seuls. Cette observation pourrait s'expliquer par la nature-même du pool, comparativement aux peptides seuls, qui impliquerait une diminution de l'avidité relative des interactions HLA/peptide/TCR du fait d'une faible affinité des lymphocytes T autoréactifs circulants.

En outre, la question de la nature des épitopes actifs in vivo reste entière. La possibilité d'identifier les peptides hybrides constitue un enjeu actuel et un défi majeur, qui nous permettrait, d'une part, de revisiter et d'actualiser la nature des réponses lymphocytaires dans le diabète, et d'autre part, de faire de l'ELISPOT un outil incontournable pour suivre et évaluer immunologiquement l'efficacité des immunothérapies.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Kumar D, Chernenko S, Moussa G, Cobos I, Manuel O, Preiksaitis J, et al. Cell-Mediated Immunity to Predict Cytomegalovirus Disease in High-Risk Solid Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant.* mai 2009;9(5):1214-22.
2. Schachtner T, Müller K, Stein M, Diezemann C, Sefrin A, Babel N, et al. BK Virus-Specific Immunity Kinetics: A Predictor of Recovery From Polyomavirus BK-Associated Nephropathy: BKV-Specific Immunity Kinetics. *Am J Transplant.* nov 2011;11(11):2443-52.
3. Bestard O, Crespo E, Stein M, Lúcia M, Roelen DL, de Vaal YJ, et al. Cross-validation of IFN- $\gamma$  Elispot assay for measuring alloreactive memory/effector T cell responses in renal transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* juill 2013;13(7):1880-90.
4. Tischer S, Dieks D, Sukdolak C, Bunse C, Figueiredo C, Immenschuh S, et al. Evaluation of suitable target antigens and immunoassays for high-accuracy immune monitoring of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus-specific T cells as targets of interest in immunotherapeutic approaches. *J Immunol Methods.* juin 2014;408:101-13.
5. Mallone R, Martinuzzi E, Blancou P, Novelli G, Afonso G, Dolz M, et al. CD8+ T-Cell Responses Identify -Cell Autoimmunity in Human Type 1 Diabetes. *Diabetes.* 1 mars 2007;56(3):613-21.
6. Dang M, Rockell J, Wagner R, Wenzlau JM, Yu L, Hutton JC, et al. Human Type 1 Diabetes Is Associated with T Cell Autoimmunity to Zinc Transporter 8. *J Immunol.* 15 mai 2011;186(10):6056-63.
7. Martinuzzi E, Novelli G, Scotto M, Blancou P, Bach J-M, Chaillous L, et al. The Frequency and Immunodominance of Islet-Specific CD8+ T-cell Responses Change after Type 1 Diabetes Diagnosis and Treatment. *Diabetes.* 1 mai 2008;57(5):1312-20.
8. Enee E, Kratzer R, Arnoux J-B, Barilleau E, Hamel Y, Marchi C, et al. ZnT8 Is a Major CD8+ T Cell-Recognized Autoantigen in Pediatric Type 1 Diabetes. *Diabetes.* 1 juill 2012;61(7):1779-84.
9. Krischer JP, Cuthbertson DD, Greenbaum C. Male sex increases the risk of autoimmunity but not type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2004;27(8):1985-1990.
10. Weets I, Van Autreve J, Van der Auwera BJ, Schuit FC, Du Caju MV, Decochez K, et al. Male-to-female excess in diabetes diagnosed in early adulthood is not specific for the immune-mediated form nor is it HLA-DQ restricted: possible relation to increased body mass index. *Diabetologia.* janv 2001;44(1):40-7.
11. Patterson C, Guariguata L, Dahlquist G, Soltész G, Ogle G, Silink M. Diabetes in the young - a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* févr 2014;103(2):161-75.
12. Vandewalle CL, Coeckelberghs MI, De Leeuw IH, Du Caju MV, Schuit FC, Pipeleers DG, et al. Epidemiology, clinical aspects, and biology of IDDM patients under age 40 years. Comparison of data from Antwerp with complete ascertainment with data from Belgium with 40% ascertainment. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetes Care.* oct 1997;20(10):1556-61.
13. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* sept 2010;39(3):481-97.
14. Bodansky HJ, Staines A, Stephenson C, Haigh D, Cartwright R. Evidence for an environmental effect in the aetiology of insulin dependent diabetes in a transmigratory population. *Bmj.* 1992;304(6833):1020-1022.
15. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 18 nov 1989;299(6710):1259-60.

16. Bach J-F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*. 19 sept 2002;347(12):911-20.
17. Thunander M, Petersson C, Jonzon K, Fornander J, Ossiansson B, Torn C, et al. Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults and children in Kronoberg, Sweden. *Diabetes Res Clin Pract*. nov 2008;82(2):247-55.
18. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G, EURODIAB Study 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 Lond Engl*. 13 juin 2009;373(9680):2027-33.
19. Group EAS, others. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *The Lancet*. 2000;355(9207):873-876.
20. Soltesz G, Patterson CC, Dahlquist G. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence—what can we learn from epidemiology? *Pediatr Diabetes*. 2007;8(s6):6-14.
21. The DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med*. août 2006;23(8):857-66.
22. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. févr 2009;155(2):173-81.
23. Lampeter EF, Homberg M, Quabeck K, Schaefer UW, Wernet P, Bertrams J, et al. Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. *Lancet Lond Engl*. 15 mai 1993;341(8855):1243-4.
24. Daniel D, Gill RG, Schloot N, Wegmann D. Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur J Immunol*. 1 avr 1995;25(4):1056-62.
25. Zechel MA, Chaturvedi P, Singh B. Characterization of immunodominant peptide determinants of IDDM-associated autoantigens in the NOD mouse. *Res Immunol*. juin 1997;148(5):338-48.
26. Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1992;89(1):283.
27. Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature*. 4 nov 1993;366(6450):72-5.
28. Lieberman SM, Evans AM, Han B, Takaki T, Vinnitskaya Y, Caldwell JA, et al. Identification of the  $\beta$  cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8<sup>+</sup> T cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 juill 2003;100(14):8384-8.
29. Chatenoud L, Thervet E, Primo J, Bach J-F. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci*. 1994;91(1):123-127.
30. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, Mathieu C, Kaufman L, Hale G, et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005;352(25):2598-2608.
31. Fajardy I, Levy-Marchal C, Gu XF, Krishnamoorthy R, Elion J, Czernichow P. [Respective weight of genotypes DQA1 and DQB1 associated with insulin-dependent diabetes in French children]. *Diabete Metab*. août 1992;18(4):298-305.
32. Frohnert BI, Laimighofer M, Krumsiek J, Theis FJ, Winkler C, Norris JM, et al. Prediction of type 1 diabetes using a genetic risk model in the Diabetes Autoimmunity Study in the Young. *Pediatr Diabetes*. 11 juill 2017;
33. Kondrashova A, Reunanen A, Romanov A, Karvonen A, Viskari H, Vesikari T, et al. A six-fold gradient in the incidence of type 1 diabetes at the eastern border of Finland. *Ann Med*. 2005;37(1):67-72.

34. Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med.* 24 mai 1979;300(21):1173-9.
35. Mathieu C, Laureys J, Sobis H, Vandeputte M, Waer M, Bouillon R. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 prevents insulinitis in NOD mice. *Diabetes.* nov 1992;41(11):1491-5.
36. Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouillon R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Diabetologia.* juin 1994;37(6):552-8.
37. Penna G, Adorini L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 mars 2000;164(5):2405-11.
38. Janner M, Ballinari P, Mullis PE, Flück CE. High prevalence of vitamin D deficiency in children and adolescents with type 1 diabetes. *Swiss Med Wkly.* 3 sept 2010;140:w13091.
39. Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child.* juin 2008;93(6):512-7.
40. Simpson M, Brady H, Yin X, Seifert J, Barriga K, Hoffman M, et al. No association of vitamin D intake or 25-hydroxyvitamin D levels in childhood with risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetologia.* nov 2011;54(11):2779-88.
41. Knip M, Virtanen SM, Becker D, Dupré J, Krischer JP, Åkerblom HK. Early feeding and risk of type 1 diabetes: experiences from the Trial to Reduce Insulin-dependent diabetes mellitus in the Genetically at Risk (TRIGR)123456. *Am J Clin Nutr.* déc 2011;94(6 Suppl):1814S-1820S.
42. Aranda P, Sanchez L, Perez MD, Ena JM, Calvo M. Insulin in bovine colostrum and milk: evolution throughout lactation and binding to caseins. *J Dairy Sci.* déc 1991;74(12):4320-5.
43. Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. The « perfect storm » for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes.* oct 2008;57(10):2555-62.
44. Sun J, Furio L, Mecheri R, van der Does AM, Lundeberg E, Saveanu L, et al. Pancreatic  $\beta$ -Cells Limit Autoimmune Diabetes via an Immunoregulatory Antimicrobial Peptide Expressed under the Influence of the Gut Microbiota. *Immunity.* août 2015;43(2):304-17.
45. Kostic AD, Gevers D, Siljander H, Vatanen T, Hyötyläinen T, Hämäläinen A-M, et al. The Dynamics of the Human Infant Gut Microbiome in Development and in Progression towards Type 1 Diabetes. *Cell Host Microbe.* 11 févr 2015;17(2):260-73.
46. Störling J, Pociot F. Type 1 Diabetes Candidate Genes Linked to Pancreatic Islet Cell Inflammation and Beta-Cell Apoptosis. *Genes.* 16 févr 2017;8(2).
47. You S, Belghith M, Cobbold S, Alyanakian M-A, Gouarin C, Barriot S, et al. Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells. *Diabetes.* mai 2005;54(5):1415-22.
48. Coppieters KT, Dotta F, Amirian N, Campbell PD, Kay TWH, Atkinson MA, et al. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *J Exp Med.* 16 janv 2012;209(1):51-60.
49. Boitard C, Debray-Sachs M, Pouplard A, Assan R, Hamburger J. Lymphocytes from diabetics suppress insulin release in vitro. *Diabetologia.* juill 1981;21(1):41-6.
50. Makino S, Kunitomo K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu.* janv 1980;29(1):1-13.
51. Harada M, Makino S. Suppression of overt diabetes in NOD mice by anti-thymocyte serum or anti-Thy 1, 2 antibody. *Jikken Dobutsu.* oct 1986;35(4):501-4.
52. Hayward AR, Shreiber M. Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic

mice reduces the incidence of insulinitis and diabetes. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 sept 1989;143(5):1555-9.

53. Matsumoto M, Yagi H, Kunimoto K, Kawaguchi J, Makino S, Harada M. Transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to NOD athymic nude mice: the roles of T cell subsets in the pathogenesis. *Cell Immunol*. 15 avr 1993;148(1):189-97.

54. OGAWA M, MURAYAMA T, HASEGAWA T, KANAYA T, KOBAYASHI F, TOCHINO Y, et al. The inhibitory effect of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in non-obese diabetes (NOD) mice. *Biomed Res*. 1985;6(2):103-105.

55. Kuttler B, Mathieu C, Bulfone-Paus S, Bouillon R, Diamantstein T, Hahn HJ. Prevention of islet graft destruction in diabetic mice and rats by temporary anti-IL-2 receptor therapy: comparison of different strategies. *Transplant Proc*. déc 1998;30(8):4140-2.

56. Hänninen A, Jaakkola I, Jalkanen S. Mucosal addressin is required for the development of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 1998;160(12):6018-6025.

57. Arvan P, Pietropaolo M, Ostrov D, Rhodes CJ. Islet Autoantigens: Structure, Function, Localization, and Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1 août 2012;2(8):a007658-a007658.

58. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol*. avr 2009;5(4):219-26.

59. Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Helqvist S, Andersen HU, Pociot F, Reimers JJ, et al. On the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia*. sept 1994;37 Suppl 2:S82-89.

60. Berchtold LA, Prause M, Størling J, Mandrup-Poulsen T. Cytokines and Pancreatic  $\beta$ -Cell Apoptosis. *Adv Clin Chem*. 2016;75:99-158.

61. Thomas HE, Trapani JA, Kay TWH. The role of perforin and granzymes in diabetes. *Cell Death Differ*. avr 2010;17(4):577-85.

62. Daniel D, Gill RG, Schloot N, Wegmann D. Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur J Immunol*. avr 1995;25(4):1056-62.

63. Vafiadis P, Ounissi-Benkalha H, Palumbo M, Grabs R, Rousseau M, Goodyer CG, et al. 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*. août 2001;86(8):3705-10.

64. Hassainya Y, Garcia-Pons F, Kratzer R, Lindo V, Greer F, Lemonnier FA, et al. Identification of naturally processed HLA-A2—restricted proinsulin epitopes by reverse immunology. *Diabetes*. 2005;54(7):2053-2059.

65. Thébault-Baumont K, Dubois-Laforgue D, Krief P, Briand J-P, Halbout P, Vallon-Geoffroy K, et al. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2—deficient NOD mice. *J Clin Invest*. 15 mars 2003;111(6):851-7.

66. Moriyama H, Abiru N, Paronen J, Sikora K, Liu E, Miao D, et al. Evidence for a primary islet autoantigen (preproinsulin 1) for insulinitis and diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(18):10376-10381.

67. Baekkeskov S, Lernmark A. Rodent islet cell antigens recognized by antibodies in sera from diabetic patients. *Acta Biol Med Ger*. 1982;41(12):1111-5.

68. Wendt A, Birnir B, Buschard K, Gromada J, Salehi A, Sewing S, et al. Glucose inhibition of glucagon secretion from rat  $\alpha$ -cells is mediated by GABA released from neighboring  $\beta$ -cells. *Diabetes*. 2004;53(4):1038-1045.

69. Kash SF, Condie BG, Baekkeskov S. Glutamate decarboxylase and GABA in pancreatic islets: lessons from knock-out mice. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab*. mai 1999;31(5):340-4.

70. Fenalti G, Buckle AM. Structural biology of the GAD autoantigen. *Autoimmun Rev*. janv 2010;9(3):148-52.

71. Cai T, Hirai H, Zhang G, Zhang M, Takahashi N, Kasai H, et al. Deletion of Ia-2 and/or Ia-2 $\beta$  in mice decreases insulin secretion by reducing the number of dense core vesicles. *Diabetologia*. sept 2011;54(9):2347-57.
72. Wijesekara N, Chimienti F, Wheeler MB. Zinc, a regulator of islet function and glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab*. nov 2009;11 Suppl 4:202-14.
73. Wijesekara N, Dai FF, Hardy AB, Giglou PR, Bhattacharjee A, Koshkin V, et al. Beta cell-specific Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion. *Diabetologia*. août 2010;53(8):1656-68.
74. Stadinski BD, Delong T, Reisdorph N, Reisdorph R, Powell RL, Armstrong M, et al. Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes. *Nat Immunol*. mars 2010;11(3):225-31.
75. Baker RL, Bradley B, Wiles TA, Lindsay RS, Barbour G, Delong T, et al. Cutting Edge: Nonobese Diabetic Mice Deficient in Chromogranin A Are Protected from Autoimmune Diabetes. *J Immunol*. 1 janv 2016;196(1):39-43.
76. Lieberman SM, Evans AM, Han B, Takaki T, Vinnitskaya Y, Caldwell JA, et al. Identification of the  $\beta$  cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(14):8384–8388.
77. Wang Y, Martin CC, Oeser JK, Sarkar S, McGuinness OP, Hutton JC, et al. Deletion of the gene encoding the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein autoantigen results in a mild metabolic phenotype. *Diabetologia*. 2 mars 2007;50(4):774-8.
78. Kahn SE, D'Alessio DA, Schwartz MW, Fujimoto WY, Ensink JW, Taborsky GJ, et al. Evidence of cosecretion of islet amyloid polypeptide and insulin by  $\beta$ -cells. *Diabetes*. 1990;39(5):634–638.
79. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet Lond Engl*. 30 nov 1974;2(7892):1279-83.
80. Wong FS, Wen LI, Tang M, Ramanathan M, Visintin I, Daugherty J, et al. Investigation of the role of B-cells in type 1 diabetes in the NOD mouse. *Diabetes*. 2004;53(10):2581–2587.
81. Riley WJ, Maclaren NK, Krischer J, Spillar RP, Silverstein JH, Schatz DA, et al. A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med*. 25 oct 1990;323(17):1167-72.
82. The European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT) Group, Bingley PJ, Gale EAM. Progression to type 1 diabetes in islet cell antibody-positive relatives in the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial: the role of additional immune, genetic and metabolic markers of risk. *Diabetologia*. mai 2006;49(5):881-90.
83. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(43):17040–17045.
84. Rewers M, Norris JM, Eisenbarth GS, Erlich HA, Beaty B, Klingensmith G, et al. Beta-cell autoantibodies in infants and toddlers without IDDM relatives: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *J Autoimmun*. juin 1996;9(3):405-10.
85. Achenbach P, Lampasona V, Landherr U, Koczwara K, Krause S, Grallert H, et al. Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia*. sept 2009;52(9):1881-8.
86. Enee E, Kratzer R, Arnoux J-B, Barilleau E, Hamel Y, Marchi C, et al. ZnT8 Is a Major CD8+ T Cell-Recognized Autoantigen in Pediatric Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 1 juill 2012;61(7):1779-84.
87. Keymeulen B, Walter M, Mathieu C, Kaufman L, Gorus F, Hilbrands R, et al. 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*. avr

2010;53(4):614-23.

88. Herold KC, Gitelman SE, Masharani U, Hagopian W, Bisikirska B, Donaldson D, et al. A Single Course of Anti-CD3 Monoclonal Antibody hOKT3 $\gamma$ 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*. juin 2005;54(6):1763-9.
89. Ogg GS, McMichael AJ. HLA-peptide tetrameric complexes. *Curr Opin Immunol*. août 1998;10(4):393-6.
90. Davis MM, Altman JD, Newell EW. Interrogating the repertoire: broadening the scope of peptide-MHC multimer analysis. *Nat Rev Immunol*. 15 juill 2011;11(8):551-8.
91. Öling V, Marttila J, Ilonen J, Kwok WW, Nepom G, Knip M, et al. GAD65- and proinsulin-specific CD4+ T-cells detected by MHC class II tetramers in peripheral blood of type 1 diabetes patients and at-risk subjects. *J Autoimmun*. 1 nov 2005;25(3):235-43.
92. Serreze DV, Leiter EH. Tracking autoimmune T cells in diabetes. *J Clin Invest*. 15 sept 2003;112(6):826-8.
93. Czerkinsky C, Andersson G, Ekre HP, Nilsson LA, Klareskog L, Ouchterlony O. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J Immunol Methods*. 25 mai 1988;110(1):29-36.
94. Martinuzzi E, Scotto M, Enée E, Brezar V, Ribeil J-A, van Endert P, et al. Serum-free culture medium and IL-7 costimulation increase the sensitivity of ELISpot detection. *J Immunol Methods*. 20 avr 2008;333(1-2):61-70.
95. Bestard O, Crespo E, Stein M, Lucia M, Roelen DL, de Vaal YJ, et al. Cross-Validation of IFN- $\gamma$  Elispot Assay for Measuring Alloreactive Memory/Effector T Cell Responses in Renal Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2013;13(7):1880–1890.
96. Tischer S, Dieks D, Sukdolak C, Bunse C, Figueiredo C, Immenschuh S, et al. Evaluation of suitable target antigens and immunoassays for high-accuracy immune monitoring of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus-specific T cells as targets of interest in immunotherapeutic approaches. *J Immunol Methods*. juin 2014;408:101-13.
97. Kiecker F, Streitz M, Ay B, Cherepnev G, Volk H-D, Volkmer-Engert R, et al. Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides—what kind of peptide for which purpose? *Hum Immunol*. mai 2004;65(5):523-36.
98. Draenert R, Altfeld M, Brander C, Basgoz N, Corcoran C, Wurcel AG, et al. Comparison of overlapping peptide sets for detection of antiviral CD8 and CD4 T cell responses. *J Immunol Methods*. avr 2003;275(1-2):19-29.
99. Maecker HT, Dunn HS, Suni MA, Khatamzas E, Pitcher CJ, Bunde T, et al. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1 sept 2001;255(1-2):27-40.
100. Enée É, Kratzer R, Arnoux J-B, Barilleau E, Hamel Y, Marchi C, et al. ZnT8 is a major CD8+ T cell-recognized autoantigen in pediatric type 1 diabetes. *Diabetes*. juill 2012;61(7):1779-84.
101. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 oct 2007;104(43):17040-5.
102. Juusola M, Parkkola A, Härkönen T, Siljander H, Ilonen J, Åkerblom HK, et al. Positivity for Zinc Transporter 8 Autoantibodies at Diagnosis Is Subsequently Associated With Reduced  $\beta$ -Cell Function and Higher Exogenous Insulin Requirement in Children and Adolescents With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. janv 2016;39(1):118-21.
103. Vermeulen I, Weets I, Asanghanwa M, Ruige J, Van Gaal L, Mathieu C, et al. Contribution of Antibodies Against IA-2 $\beta$  and Zinc Transporter 8 to Classification of Diabetes Diagnosed Under 40 Years of Age. *Diabetes Care*. août 2011;34(8):1760-5.
104. Wenzlau JM, Liu Y, Yu L, Moua O, Fowler KT, Rangasamy S, et al. A Common

- Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphism in the SLC30A8 Gene Determines ZnT8 Autoantibody Specificity in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 1 oct 2008;57(10):2693-7.
105. Mallone R, Martinuzzi E, Blancou P, Novelli G, Afonso G, Dolz M, et al. CD8+ T-Cell Responses Identify  $\beta$ -Cell Autoimmunity in Human Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 1 mars 2007;56(3):613-21.
106. Martinuzzi E, Novelli G, Scotto M, Blancou P, Bach J-M, Chaillous L, et al. The Frequency and Immunodominance of Islet-Specific CD8+ T-cell Responses Change after Type 1 Diabetes Diagnosis and Treatment. *Diabetes*. 1 mai 2008;57(5):1312-20.
107. Kotani R, Nagata M, Moriyama H, Nakayama M, Yamada K, Chowdhury SA, et al. Detection of GAD65-reactive T-Cells in type 1 diabetes by immunoglobulin-free ELISPOT assays. *Diabetes Care*. août 2002;25(8):1390-7.
108. Dang M, Rockell J, Wagner R, Wenzlau JM, Yu L, Hutton JC, et al. Human Type 1 Diabetes Is Associated with T Cell Autoimmunity to Zinc Transporter 8. *J Immunol*. 15 mai 2011;186(10):6056-63.
109. Nagata M, Kotani R, Moriyama H, Yokono K, Roep BO, Peakman M. Detection of Autoreactive T Cells in Type 1 Diabetes Using Coded Autoantigens and an Immunoglobulin-Free Cytokine ELISPOT Assay: Report from the Fourth Immunology of Diabetes Society T Cell Workshop. *Ann N Y Acad Sci*. déc 2004;1037(1):10-5.
110. Fuchs YF, Jainta GW, Kohn D, Wilhelm C, Weigelt M, Karasinsky A, et al. Vagaries of the ELISpot assay: Specific detection of antigen responsive cells requires purified CD8+ T cells and MHC class I expressing antigen presenting cell lines. *Clin Immunol*. avr 2015;157(2):216-25.
111. Delong T, Wiles TA, Baker RL, Bradley B, Barbour G, Reisdorph R, et al. Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion. *Science*. 2016;351(6274):711–714.
112. Howson JMM, Krause S, Stevens H, Smyth DJ, Wenzlau JM, Bonifacio E, et al. Genetic association of zinc transporter 8 (ZnT8) autoantibodies in type 1 diabetes cases. *Diabetologia*. juill 2012;55(7):1978-84.
113. Tooley JE, Herold KC. Biomarkers in type 1 diabetes: application to the clinical trial setting. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014;21(4):287.
114. De Jong VM, Van Der Slik AR, Laban S, van't Slot R, Koeleman BPC, Zaldumbide A, et al. Survival of autoreactive T lymphocytes by microRNA-mediated regulation of apoptosis through TRAIL and Fas in type 1 diabetes. *Genes Immun*. 2016;17(6):342–348.
115. Moore A, Grimm J, Han B, Santamaria P. Tracking the recruitment of diabetogenic CD8+ T-cells to the pancreas in real time. *Diabetes*. juin 2004;53(6):1459-66.
116. Gaglia JL, Guimaraes AR, Harisinghani M, Turvey SE, Jackson R, Benoist C, et al. Noninvasive imaging of pancreatic islet inflammation in type 1A diabetes patients. *J Clin Invest*. janv 2011;121(1):442-5.
117. Akirav EM, Lebastchi J, Galvan EM, Henegariu O, Akirav M, Ablamunits V, et al. Detection of  $\beta$  cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 nov 2011;108(47):19018-23.
118. Knip M, Siljander H, Ilonen J, Simell O, Veijola R. Role of humoral beta-cell autoimmunity in type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. juill 2016;17:17-24.

## Annexes

**Volume de sang veineux à prélever** (et volume maximal de sang pouvant être prélevé chez des patients de moins de 14 ans \* selon GARZA Diana, BECAN-MCBRIDE Kathleen. Phlebotomy Handbook, Third Edition, Appleton & Lange, Connecticut, 1993, p419)

Poids (kg)	Prélèvements pour ELISPOT		Pour information *	
	Quantité optimale par ponction (ml)	Types de tubes héparinés à utiliser (bouchon vert)	Quantité maximale par ponction (ml)	Quantité maximale totale prélevée pendant un mois ou moins (ml)
9.5-11.4	7	1 tube 7 ml	10	70
11.8-13.6	7	1 tube 7 ml	10	80
14.1-15.9	7	1 tube 7 ml	10	100
16.4-18.2	7	1 tube 7 ml	10	130
18.6-20.5	14	2 tubes 7 ml	20	140
20.9-22.7	14	2 tubes 7 ml	20	160
23.2-25.0	14	2 tubes 7 ml	20	180
25.5-27.3	14	2 tubes 7 ml	20	200
27.7-29.5	14	2 tubes 7 ml	25	220
30.0-31.8	14	2 tubes 7 ml	30	240
32.3-34.1	14	2 tubes 7 ml	30	250
34.5-36.4	14	2 tubes 7 ml	30	270
36.8-38.6	14	2 tubes 7 ml	30	290
39.1-40.9	14	2 tubes 7 ml	30	310
41.4-43.2	14	2 tubes 7 ml	30	330
43.6-45.5	14	2 tubes 7 ml	30	350

**Pools de peptides ZnT8** : peptides fabriqués individuellement à façon par la société

Sigma : 90 peptides de 15 mer avec un overlap de 11 acides aminés

<b>Peptide</b>	<b>Séquence</b>	<b>Peptide</b>	<b>Séquence</b>
Znt8-1	MEFLERTYLVNDKAA	Znt8-46	VSSCAVAANIVLTVV
Znt8-2	ERTYLVNDKAAKMYA	Znt8-47	AVAANIVLTVVLHQR
Znt8-3	LVNDKAAKMYAFTLE	Znt8-48	NIVLTVVLHQRCLGH
Znt8-4	KAAKMYAFTLESVEL	Znt8-49	TVVLHQRCLGHNHKE
Znt8-5	MYAFTLESVELQQKP	Znt8-50	HQRCLGHNHKEVQAN
Znt8-6	TLESVELQQKPVNKD	Znt8-51	LGHNHKEVQANASVR
Znt8-7	VELQQKPVNKDQCPR	Znt8-52	HKEVQANASVRAAFV
Znt8-8	QKPVNKDQCPRERPE	Znt8-53	QANASVRAAFVHALG
Znt8-9	NKDQCPRERPEELES	Znt8-54	SVRAAFVHALGDLFQ
Znt8-10	QPRERPEELESGGMY	Znt8-55	AFVHALGDLFQISISV
Znt8-11	RPEELESGGMYHCHS	Znt8-56	ALGDLFQISISVLISA
Znt8-12	LESGGMYHCHSGSKP	Znt8-57	LFQISISVLISALIIY
Znt8-13	GMYHCHSGSKPTEKG	Znt8-58	ISVLISALIIYFKPE
Znt8-14	CHSGSKPTEKGANEY	Znt8-59	ISALIIYFKPEYKIA
Znt8-15	SKPTEKGANEYAYAK	Znt8-60	IYFKPEYKIADPIC
Znt8-16	EKGANEYAYAKWKLC	Znt8-61	KPEYKIADPICTFIF
Znt8-17	NEYAYAKWKLCSASA	Znt8-62	KIADPICTFIFSILV
Znt8-18	YAKWKLCSASAICFI	Znt8-63	PICTFIFSILVLAST
Znt8-19	KLCSASAICFIFMIA	Znt8-64	FIFSILVLASTITIL
Znt8-20	ASAICFIFMIAEVVG	Znt8-65	ILVLASTITILKDFS
Znt8-21	CFIFMIAEVVGGHIA	Znt8-66	ASTITILKDFSILLM
Znt8-22	MIAEVVGGHIAGSLA	Znt8-67	TILKDFSILLMEGVP
Znt8-23	VVGGHIAGSLAVVTD	Znt8-68	DFSILLMEGVPKSLN
Znt8-24	HIAGSLAVVTDAAHL	Znt8-69	LLMEGVPKSLNYSV
Znt8-25	SLAVVTDAAHLLIDL	Znt8-70	GVPKSLNYSVVKELI
Znt8-26	VTDAHLLIDLTSFL	Znt8-71	SLNYSVVKELILAVD
Znt8-27	AHLLIDLTSFLSLF	Znt8-72	SGVKELILAVDGVLS
Znt8-28	IDLTSFLSLFSLWL	Znt8-73	ELILAVDGVLSVHSL
Znt8-29	SFLSLFSLWLSSKP	Znt8-74	AVDGVLSVHSLHIWS
Znt8-30	SLFSLWLSSKPPSKR	Znt8-75	VLSVHSLHIWSLTMN
Znt8-31	LWLSSKPPSKRLTFG	Znt8-76	HSLHIWSLTMNQVIL
Znt8-32	SKPPSKRLTFGWHRA	Znt8-77	IWSLTMNQVILSAHV
Znt8-33	SKRLTFGWHRAEILG	Znt8-78	TMNQVILSAHVATAA
Znt8-34	TFGWHRAEILGALLS	Znt8-79	VILSAHVATAASRDS
Znt8-35	HRAEILGALLSILCI	Znt8-80	AHVATAASRDSQVVR
Znt8-36	ILGALLSILCIWVVT	Znt8-81	TAASRDSQVVRREIA
Znt8-37	LLSILCIWVVTGVLV	Znt8-82	RDSQVVRREIAKALS
Znt8-38	LCIWVVTGVLVYLAC	Znt8-83	VVRREIAKALSKSFT
Znt8-39	VVTGVLVYLACERLL	Znt8-84	EIAKALSKSFTMHSL
Znt8-40	VLVYLACERLLYPDY	Znt8-85	ALSKSFTMHSLTIQM
Znt8-41	LACERLLYPDYQIQA	Znt8-86	SFTMHSLTIQMESPV
Znt8-42	RLLYPDYQIQATVMI	Znt8-87	HSLTIQMESPVDQDP
Znt8-43	PDYQIQATVMIIIVSS	Znt8-88	IQMESPVDQDPDCLF
Znt8-44	IQATVMIIIVSSCAVA	Znt8-89	SPVDQDPDCLFCEDP
Znt8-45	VMIIVSSCAVAANIV	Znt8-90	QDPDCLFCEDPCD

## Quantification des lymphocytes T autoréactifs circulants au cours du diabète insulino-dépendant

La détection fiable des lymphocytes T autoréactifs circulants chez les patients diabétiques reste un défi majeur d'actualité, pour fournir un marqueur immunologique utile à une meilleure évaluation des thérapies d'immuno-intervention chez les patients diabétiques, mais également à l'établissement de profils de réactivité d'intérêt diagnostique chez les patients à risque de développer un diabète de type 1. La plupart des études décrites dans la littérature concernent une population adulte et se basent sur l'utilisation de peptides immuno-dominants choisis, restreignant les tests à certains patients.

Le test ELISPOT est réalisé chez des enfants diabétiques de type 1, au moment du diagnostic. Les antigènes utilisés sont des pools de peptides chevauchants (commerciaux pour GAD, IA2 et insuline ; produit à façon pour ZnT8) permettant de tester tous les enfants, et ce sans restriction HLA. Les résultats sont assez proches de ceux de la littérature concernant les réactivités anti-GAD, IA2 et insuline, avec des réponses faibles en fréquence. En revanche, la réactivité anti-ZnT8 est nettement inférieure à ce qui est habituellement décrit, tout comme la positivité des autoanticorps anti-ZnT8 ; ce qui peut être lié à un biais statistique dû au faible effectif de notre population.

L'utilisation des pools de peptides ne montre pas de supériorité par rapport à celle de peptides restreints. Elle ne permet pas l'obtention de meilleures réponses, à la fois en termes de fréquence et de nombre de patients positifs. L'amélioration du test de l'ELISPOT, bien que mature techniquement, passerait par l'identification et l'utilisation de peptides hybrides, plus proches des épitopes actifs in vivo.

Mots clés : Immunologie, Pédiatrie, Diabète type 1, Lymphocytes T autoréactifs, ELISPOT, Interféron gamma, Autoantigènes

## Detecting autoreactive T cells in type 1 diabetes using the cytokine ELISPOT assay

The ability to reliably detect autoreactive T cells in type 1 diabetes still constitutes a major challenge. In fact, relevant biological markers are still crucially needed in order to better assess immunotherapies, but also to improve prediction of type 1 diabetes in patients flagged as being at risk for the disease. Most existing studies in the field have been conducted so far in the adult population on the basis of the knowledge of HLA-restricted immunodominant epitopes targeted by T cells.

The ELISPOT assay evaluated in this study was performed in a paediatric population, at the time of type 1 diabetes diagnosis. Autoantigens used for autoreactive T cell enumeration were overlapping peptide pools (commercial pools for GAD, IA2 and insulin; custom peptide library for ZnT8), which made it possible to test all included children, independently of HLA restriction.

Low frequencies of GAD-, IA2- and insulin-specific T cells were identified, as previously reported by others. By contrast, both frequencies of ZnT8-specific T cells and ZnT8 antibody titer were clearly lower than what has been described, which could be due to a statistical bias, linked to the small size of our sample.

Using overlapping peptide pools, rather than HLA restricted epitopes, does not seem to improve the detection of autoreactive T cells. The frequency of these autoreactive T cells appears low, as well as the number of positive patients. The ELISPOT assay, which is basically technically mature, could however be improved based on the recent identification of immunogenic hybrid fusion peptides both in the NOD mouse model of type 1 diabetes and in diabetic patients.

Keywords : Immunology, Pediatrics, Type 1 diabetes, Autoreactive T cells, Interferon-gamma, ELISPOT, Autoantigens

**Université Paris Descartes**  
**Faculté de Médecine Paris Descartes**  
**15, rue de l'École de Médecine**  
**75270 Paris cedex 06**