

NOUVELLES APPROCHES DU DIAGNOSTIC ET DE LA PATHOGÉNIE DU DIABÈTE DE TYPE 1 *

V. GEENEN¹

Correspondance : Pr. V. Geenen, Service d'Endocrinologie,
CHU de Liège, Domaine du Sart Tilman, 4000 Liège

INTRODUCTION

Les recherches menées depuis les travaux pionniers de feu notre collègue Willy Gepts en 1965 (1) ont établi que le diabète de type 1 (appelé autrefois diabète juvénile, ou encore diabète insulino-dépendant) résulte d'un processus auto-immun sélectif entraînant une inflammation (insulite), puis une destruction des cellules β insulino-sécrétrices des îlots de Langerhans pancréatiques (2). Le diabète de type 1 représente environ 15 % de tous les diabètes sucrés et sa prévalence moyenne en Europe est de 1 sur 400 individus. Son incidence en Belgique est de ± 8 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes, et cette incidence est cinq à six fois plus élevée dans les pays scandinaves. L'âge du pic d'incidence se situe dans la tranche de 10 à 14 ans.

1. L'apparition d'un diabète de type 1 nécessite l'intervention de trois types de facteurs: la réponse auto-immune sélective des cellules β résulte d'une perte ou d'une absence de la tolérance naturelle du système immunitaire vis-à-vis de ces cellules,
2. une prédisposition individuelle est déterminée par la balance entre allèles génétiques de susceptibilité et de protection vis-à-vis du diabète de type 1,
3. l'absence de complète concordance de la maladie (celle-ci est de ± 40 %) chez les jumeaux homozygotes, l'augmentation de l'incidence du diabète de type 1 relevée au cours des dernières années, le gradient Nord-Sud de cette incidence, ainsi que la fréquence plus élevée de son apparition entre octobre et mars constituent autant d'arguments pour une influence exercée par l'environnement (virus, alimentation, stress...) sur l'apparition de cette maladie.

PARAMÈTRES DE LA RÉPONSE AUTO-IMMUNE DIABÉTOGÈNE

Les trois auto-antigènes majeurs du diabète de type 1 sont l'insuline, l'isoforme de 65kDa de la décarboxylase de l'acide glutamique (GAD65), et la tyrosine-phosphatase IA-2 (3). Il convient de souligner que l'insuline est le seul auto-antigène spécifique de la cellule β . Les auto-anticorps anti-insuline, GAD65 et IA-2 ont une valeur diagnostique indéniable en tant que marqueurs de la réaction auto-immune dirigée contre les cellules β . Plus de 90% des diabétiques récents possèdent des anticorps contre un ou plusieurs auto-antigènes. Leur valeur prédictive est aussi reconnue et ces auto-anticorps peuvent être détectés plusieurs années avant l'apparition des signes cliniques de la maladie. La présence d'auto-anticorps contre plusieurs antigènes a plus de valeur qu'un titre élevé d'anticorps contre un seul auto-antigène. Ainsi, si un individu possède les trois types d'auto-anticorps, il présente un risque 80 fois plus élevé de développer un diabète de type 1. La combinaison d'allèles HLA de susceptibilité (voir plus loin) et d'auto-anticorps accroît encore cette valeur prédictive. Cette dernière est très utile pour les protocoles d'études cliniques de prévention du diabète de type 1 étant donné sa faible prévalence (4).

Il est admis aujourd'hui que la valeur pathogène des auto-anticorps du diabète de type 1 est faible, et que les agents effecteurs de la destruc-

¹ Directeur de la Recherche au FNRS et du Centre d'Immunologie de Liège (CIL), professeur d'Embryologie à l'ULg, chef de Clinique en Endocrinologie au CHU de Liège.

* Présentation lors de la première séance du DES interuniversitaire d'Endocrinologie le 19 décembre 2003 aux Cliniques Universitaires Saint-Luc, Service d'Endocrinologie et Nutrition.

tion des cellules β sont surtout les lymphocytes T CD4+ et CD8+. L'étude de la réponse immunitaire cellulaire se heurte toutefois à l'extrême difficulté d'identifier les cellules T dirigées contre les épitopes des auto-antigènes liés au diabète de type 1. En effet, ces cellules T auto-réactives ne représentent qu'un pourcentage très faible des cellules T périphériques. L'utilisation de techniques d'immuno-analyses plus sensibles (Elispots, tétramères d'épitopes T complexés avec des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité [CMH] de classe I et II) devraient conduire à des progrès importants dans l'étude de la réponse cellulaire T impliquée dans le diabète de type 1.

RÔLE DU THYMUS DANS L'ÉTABLISSEMENT DE LA TOLÉRANCE CENTRALE À LA FAMILLE DE L'INSULINE

Le thymus est le seul organe lymphoïde responsable de la génération d'une diversité de cellules T à la fois tolérantes aux antigènes du soi et compétentes vis-à-vis des antigènes infectieux. Le thymus assure cette fonction tolérogène centrale par l'élimination (délétion clonale) ou l'arrêt du développement des cellules T réactives au soi émergeant au cours de la recombinaison aléatoire des segments de gènes codant pour les parties variables du récepteur à l'antigène (TCR). Ce processus fondamental pour l'intégrité de l'organisme résulte de la présentation dans le thymus d'antigènes du soi par les protéines du CMH. Le « filtrage » exercé par le thymus est très puissant car, sur cent progéniteurs T migrant dans cet organe depuis les foyers d'hématopoïèse primitive (foie fœtal, puis moelle osseuse), deux lymphocytes T seulement le quitteront dans un état de tolérance et de compétence vis-à-vis du non soi. De plus, le thymus assure la génération de cellules T « régulatrices » (Tr), spécifiques d'antigènes du soi, capables d'inactiver en périphérie les cellules T self-réactives ayant échappé au filtre thymique (5). Les recherches que nous menons depuis 1986 ont établi qu'un répertoire de gènes apparentés à différentes familles neuroendocrines est transcrit dans le compartiment stromal (non lymphocytaire) du thymus. Les précurseurs

encodés par ces gènes exercent un double rôle dans la différenciation selon leur mode d'apprêtement (« processing »). Comme source de ligands neuroendocrines classiques, ils interviennent dans la régulation du développement des lymphocytes T. Les mêmes précurseurs sont aussi la source d'antigènes du soi neuroendocrine qui, après présentation par les protéines thymiques du CMH, peuvent conduire à la délétion par apoptose (ou à l'inactivation) des cellules T réactives au soi émergeant au hasard de la recombinaison dans le thymus des segments variables du TCR (fig. 1). La nature du soi neuroendocrine correspond au membre dominant d'une famille présenté dans le thymus et, de manière générale, aux séquences peptidiques de cette famille les plus conservées au cours de son évolution (6-8).

Nous avons lancé en 1993 un programme de recherches destiné à explorer une nouvelle hypothèse selon laquelle les cellules T seraient éduquées à reconnaître et à tolérer la famille de l'insuline au cours de leur différenciation dans le thymus. Le facteur de croissance apparenté à l'insuline de type 2 (IGF-2) a été identifié comme le membre dominant de la famille de l'insuline exprimé dans l'épithélium thymique de différentes espèces, y compris chez l'homme. Depuis lors, les travaux menés à Liège et par différentes équipes ont montré que tous les gènes de la famille de l'insuline (*INS*, *IGF1* et *IGF2*) sont transcrits dans le thymus selon une topographie cellulaire précise et une hiérarchie dans leur niveau d'expression: *IGF2* (épithélium thymique sous-capsulaire, cortical et médullaire) > *IGF1* (macrophages thymiques) >> *INS* (épithélium thymique de la médulla) (9-12). Comme la tolérance à une protéine est proportionnelle à son niveau d'expression dans le thymus (13), cette hiérarchie permet d'expliquer le pouvoir immunogène important de l'insuline (et des épitopes dérivés de cette dernière), la prévalence élevée d'auto-anticorps et de cellules T anti-insuline dans la population générale, et aussi pourquoi la tolérance à l'IGF-2 est si difficile à briser lors d'immunisation active avec cette protéine. Malgré son faible niveau d'expression dans le thymus, *INS* contribue néanmoins à la tolérance des cellules β puisqu'il a été récemment montré que le diabète apparaît plus vite chez des souris NOD croisées avec des souris *Ins2^{-/-}* (14).

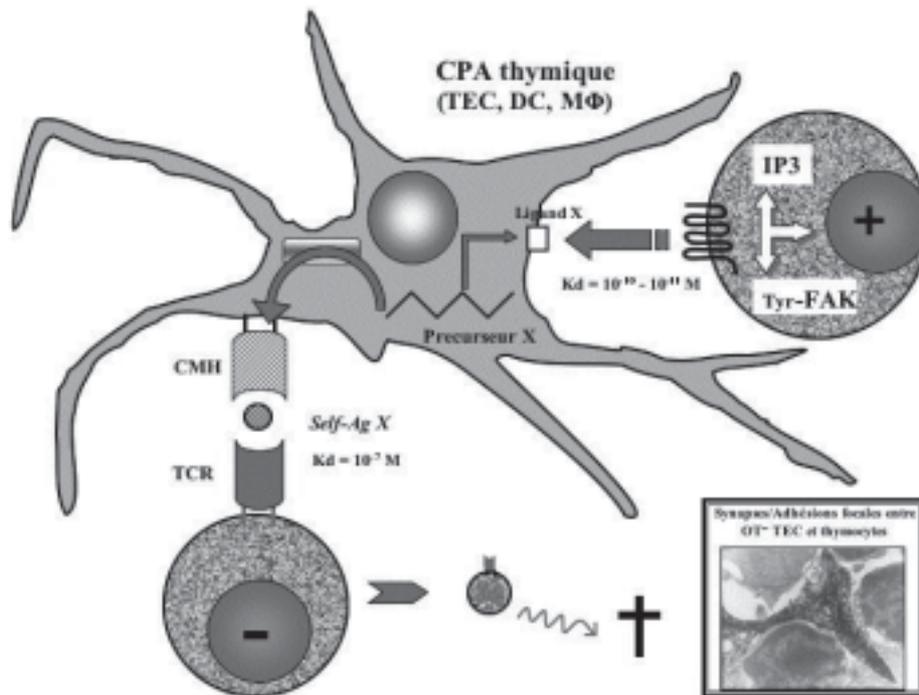


Figure 1 — Le double rôle exercé dans le thymus par les gènes/précurseurs des antigènes du soi neuroendocrine.

Les précurseurs encodés par les gènes neuroendocrines sont la source de deux types différents d'interactions avec les cellules T immatures. (1) Ils sont la source de *ligands*, qui ne sont pas sécrétés mais ciblés à la surface externe de la membrane plasmique de cellules thymiques présentatrices d'antigènes (CPA : cellules épithéliales thymiques [TEC], cellules dendritiques [DC] et macrophages [MF]). Ces ligands se lient à des récepteurs neuroendocrines des cellules T ce qui aboutit à l'activation de voies transductrices comme une augmentation des triphosphates d'inositol (IP3) et la phosphorylation de kinases de l'adhésion focale (FAK). (2) Les mêmes précurseurs subissent un apprêtement en *antigènes du soi* qui sont présentés par, ou en association, avec les protéines thymiques du CMH. Cette présentation conduira à la délétion clonale ou à l'arrêt du développement des lymphocytes T exprimant un TCR dirigé contre les différentes associations CMH-antigènes du soi neuroendocrine.

ORIGINE DU DÉVELOPPEMENT DE L'AUTO-IMMUNITÉ DIABÉTOGÈNE : RUPTURE DE TOLÉRANCE PÉRIPHÉRIQUE OU ABSENCE DE TOLÉRANCE CENTRALE ?

Malgré l'identification des trois auto-antigènes majeurs impliqués dans le diabète de type 1, l'origine de la réponse auto-immune sélective de la cellule β demeure une énigme. Pendant longtemps, l'idée fut que cette réponse dépendait d'une rupture de la tolérance périphérique du système immunitaire vis-à-vis des auto-antigènes β . Cette rupture pouvait résulter d'un phénomène de « mimétisme moléculaire » entre une séquence d'une protéine virale et celle d'un auto-antigène de la cellule β . Un autre mécanisme impliqué était l'effet « bystander », c'est-à-dire une infection des cellules β par un virus à tropisme particulier pour ces dernières, suivie de leur lyse et de la libération d'auto-antigènes susceptibles d'activer des cellules T in-

tolérantes vis-à-vis de ces auto-antigènes. Ces mécanismes reposaient sur un postulat de base, à savoir que les auto-antigènes de la cellule β étaient séquestrés vis-à-vis des cellules T au cours de l'établissement de la tolérance centrale pendant leur différenciation dans le thymus. Cette conception d'une séparation topographique entre cellules β et cellules T en développement dans le thymus a aujourd'hui disparu depuis qu'il a été démontré que le parenchyme thymique est le siège de la transcription de gènes apparentés à plusieurs familles neuroendocrines et de gènes encodant des précurseurs d'antigènes tissulaires périphériques.

L'étape suivante fut de vérifier l'hypothèse que le développement d'une réponse auto-immune spécifique de la cellule β résulterait d'une *dysfonction thymique* dans l'induction de la tolérance centrale vis-à-vis de cette population cellulaire. Cette hypothèse avait déjà été avancée par Burnet il y a de nombreuses années (15), et s'appuyait depuis lors sur une série d'arguments ex-

périmentaux. Une thymectomie néonatale prévient l'apparition du diabète auto-immun chez le rat BB, un des deux modèles animaux avec la souris NOD du diabète de type 1 humain (16). La greffe de thymus ou même d'épithélium thymique de la souris NOD induit une insulite et une sialite chez les souris receveuses (17, 18). La transcription des gènes de la famille de l'insuline a été étudiée dans le thymus de rats BB susceptibles (BBDP) ou résistants (BBDR) au diabète. Les transcrits de *Ins* et d'*Igf1* ont été détectés dans tous les thymus de rats BBDP et BBDR. En ce qui concerne l'*Igf2*, ses transcrits ont été détectés dans tous les thymus de rats BBDR, mais ils étaient absents dans le thymus de plus de 80 % des rats BBDP étudiés, en étroite concordance avec l'incidence du diabète chez les rats BBDP (86 %). Ce déficit de transcription d'*Igf2* était spécifique du thymus car les ARN messagers d'*Igf2* étaient détectés dans le foie et le cerveau des rats BBDP (19, 20). Aujourd'hui, de plus en plus d'observations accréditent ce nouveau concept que le développement de la réponse auto-immune diabétogène résulte d'une dysfonction thymique et d'une absence d'installation de la tolérance centrale vis-à-vis de la cellule β au cours du développement intra-thymique des lymphocytes T (21-25).

FACTEURS GÉNÉTIQUES

Le « balayage » du génome humain du génome humain a permis d'identifier au moins dix-huit loci génétiques (*IDDM1* à *IDDM18*) en étroite association avec le diabète de type 1 (26, 27).

IDDM1 est le locus le plus fortement associé et correspond au locus du CMH *HLA-DQB*. La fonction essentielle des molécules HLA de classe I et de classe II est de présenter les épitopes antigéniques, respectivement aux cellules CD8 et CD4. C'est ce que l'on appelle la restriction antigénique par le CMH. Les allèles de susceptibilité majeure au diabète de type 1 de cette région sont **HLA-DQ8** (combinaison d'une chaîne α encodée par *DQA1*0301* et d'une chaîne β encodée par *DQB1*0302*) et **HLA-DQ2** (combinaison *DQA1*0501* et *DQB1*0201*). En théorie, les protéines HLA de classe I présentent des antigènes dérivés de protéines endogènes, tandis que les molécules de classe II présentent des antigènes dérivés de protéines exogènes, notamment infectieuses. C'est pourquoi il fut longtemps difficile d'ex-

pliquer la relation entre une protéine endogène comme l'insuline et la susceptibilité majeure au diabète de type 1 située dans la région du CMH de classe II. Toutefois, ce problème a été résolu lorsque les dernières études du regretté Don Wiley (Harvard) ont montré par cristallographie qu'un épitope dominant de l'insuline (la séquence Ins B9-23) est capable de se loger dans la poche de présentation des molécules DQ8 et DQ2.

Le locus *IDDM2* est situé hors du CMH/HLA et correspond à une zone de polymorphisme important appelée VNTR (pour « variable number of tandem repeats »). On distingue ainsi les allèles VNTR de classe I courts formés de 20-63 répétitions de 14-15 paires de bases, les VNTR de classe II intermédiaires formés de 64-139 répétitions, et les VNTR de classe III longs formés de 140-210 répétitions. Les allèles de classe I sont associés à une susceptibilité accrue vis-à-vis du diabète de type 1, tandis que les allèles de classe III confèrent une protection vis-à-vis de la maladie. VNTR est situé en amont des gènes *INS* et *IGF2* dont il contrôlerait l'expression. Des études ont montré une corrélation positive entre la présence chez le fœtus humain d'allèles VNTR de classe III et les taux élevés de transcrits de *INS* dans leur thymus (28). Il n'existe toutefois aucune évidence expérimentale d'une corrélation chez l'homme entre la classe de VNTR et la tolérance à l'insuline.

FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

L'influence de l'environnement dans la pathogénie du diabète de type 1 repose essentiellement sur des études épidémiologiques. Ces dernières ont soulevé la possibilité que l'allaitement maternel conférerait un certain degré de protection vis-à-vis de la maladie par rapport aux enfants nourris plus tôt aux laits synthétiques ou au lait de vache.

La majorité des recherches dans ce domaine mettent l'accent sur le rôle exercé par des *infections virales* sur le déclenchement de la maladie. L'infection congénitale par le virus de la rubéole conduit à un pourcentage élevé (de 30 à 40 %) de diabète de type 1 plus tard dans la vie (29). Des études épidémiologiques de plus en plus nombreuses impliquent également les *entérovirus* et, en particulier, le *virus Coxsackie B4* (CVB4) comme agent responsable d'un pourcentage significatif de

diabète de type 1 dans les pays scandinaves. CVB4 est capable d'infecter de manière persistante les cellules β dont la lyse secondaire aboutirait à la libération d'auto-antigènes spécifiques de cette cellule avec activation de cellules T auto-réactives (effet « bystander »). En collaboration avec Didier Hober (Département de Microbiologie, CHRU de Lille), nous avons montré que CVB4 peut infecter directement le thymus humain au cours de la phase de virémie (30). Nous recherchons maintenant si cette infection thymique interfère avec les mécanismes responsables de la tolérance centrale vis-à-vis des cellules β des îlots de Langerhans.

EST-IL POSSIBLE DE PRÉVENIR/ GUÉRIR LE DIABÈTE DE TYPE 1 ?

Vu l'impossibilité d'agir sur les constituants génétiques d'un individu et la plupart des agents environnementaux (sauf peut-être un jour via une vaccination contre CVB4), les recherches actuelles privilégient une approche immunomodulatrice visant à contrôler spécifiquement la réponse auto-immune diabétogène sans perturber les fonctions immunitaires générales (31). Idéalement, cette approche pourrait être combinée à une inhibition de l'apoptose des cellules β déclenchée par le processus auto-immun, et à une régénération des cellules β détruites au moyen de facteurs de croissance/différenciation adéquats. Même en cas de transplantation de cellules β allogéniques, xénogéniques, ou issues de cellules souches (adultes ou embryonnaires) différenciées en cellules β , le contrôle du processus auto-immun sélectivement dirigé contre les cellules insulino-sécrétrices est une nécessité absolue tant pour la prévention que pour la guérison du diabète de type 1.

Selon les données physiopathologiques actuelles, un tel contrôle pourrait être obtenu par une « (re)programmation » de la tolérance des cellules β au moyen des propriétés tolérogènes puissantes du thymus et, plus particulièrement, du répertoire thymique des self-antigènes neuroendocrines. Dans cette perspective, nous avons étudié le profil de sécrétion de cytokines provoqué par la présentation de la séquence B9-23 de l'insuline (Ins B9-23), auto-antigène majeur du diabète de type 1, et de la séquence homologue de l'IGF-2 (IGF-2 B11-25), self-antigène thymique dominant de la famille de l'insuline. Cette étude a été réalisée au moyen de cultures de cellules mononucléées sanguines (PBMCs)

purifiées à partir de seize adolescents diabétiques de type 1, porteurs de l'allèle DQ8. Les contrôles étaient des patients diabétiques de type 1 non-DQ8, et des personnes apparentées DQ8+ non-diabétiques. Nous avons vérifié dans un premier temps que les séquences Ins B9-23 et IGF-2 B11-25 présentent la même affinité et entrent en parfaite compétition pour la liaison à la molécule HLA-DQ8, allèle de susceptibilité majeure au diabète de type 1. Par la technique d'Elispot (calcul du nombre de cellules sécrétant une cytokine précise), nous avons observé que, par rapport à Ins B9-23, la présentation d'IGF-2 B11-25 induit un profil tolérogène caractérisé par une sécrétion accrue d'IL-10 (cytokine suppressive et régulatrice puissante), une augmentation significative du rapport IL-10/IFN-g, et une très nette diminution de la sécrétion d'IL-4 (cytokine responsable de la stimulation de la réponse humorale B) (32). Par rapport à l'insuline qui, selon plusieurs études, est très immunogène et ne possède aucun pouvoir tolérogène (33, 34), l'IGF-2 — et les épitopes dérivés — constitue donc un choix approprié pour une approche tolérogène innovatrice associant à la fois une compétition au niveau de la poche de présentation des protéines du CMH associées au diabète de type 1, et une réponse régulatrice/suppressive en aval de cette présentation (fig. 2). Un nouveau type de vaccin « négatif » ou tolérogène efficace contre le diabète de type 1 pourrait ainsi combiner les épitopes dominants d'IGF-2 (homologue thymique de l'insuline), de GAD67 (isoforme thymique homologue de GAD65), et de la protéine issue de l'épissage alternatif de *IA2* spécifique du thymus.

Poursuivre la caractérisation du répertoire thymique des gènes encodant les antigènes du soi neuroendocrine et tissulaires périphériques, étudier leur influence sur la génération des cellules Tr et leur utilisation dans une nouvelle approche tolérogène, comprendre les facteurs impliqués dans le contrôle de leur expression dans le thymus et de la différenciation des cellules épithéliales thymiques, tels sont les objectifs du Projet Intégré FP6 Euro-Thymaïde qui vient d'être lancé avec le soutien de la Commission européenne. Ce programme, basé sur notre connaissance de la fonction tolérogène puissante exercée par le thymus, devrait déboucher à court terme sur de nouvelles méthodes de diagnostic et de traitement des maladies auto-immunes qui constituent le tribut payé par l'espèce humaine en échange de l'efficacité et de la complexité de ses défenses immunitaires.

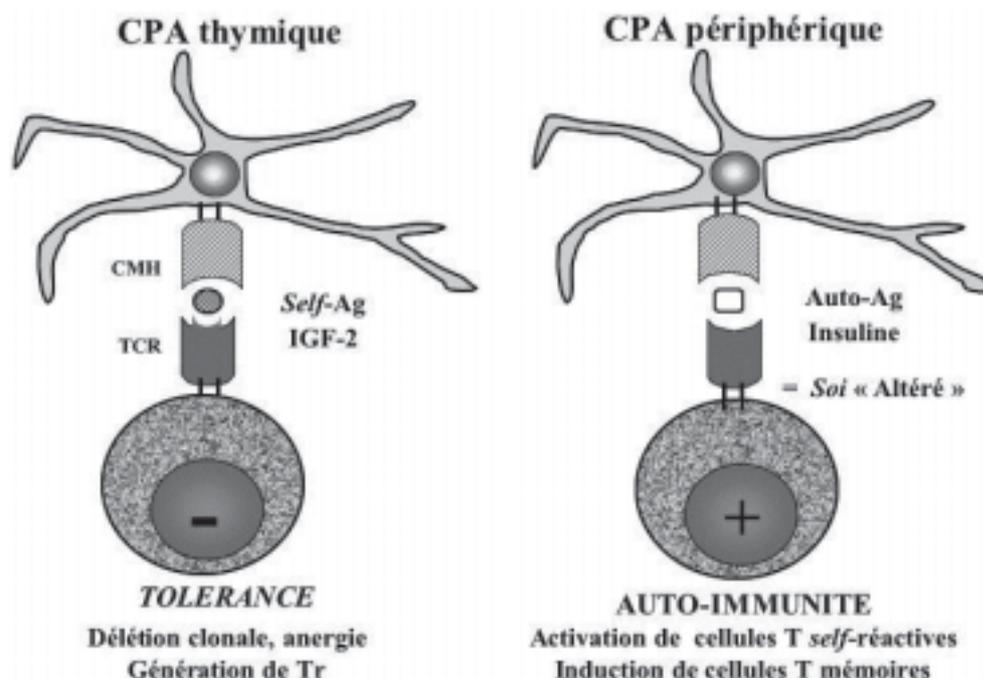


Figure 2 — Opposition des réponses immunitaires évoquées par la présentation de l'insuline vs. celle de l'IGF-2 en tant que précurseur d'antigènes du soi.

L'insuline est un auto-antigène majeur et le plus spécifique de la cellule β ciblée par la réponse auto-immune diabétogène. L'insuline est homologue mais non identique à l'IGF-2, et elle peut donc être considérée comme le soi « altéré » en regard de l'IGF-2. La séquence Ins B9-23 et la séquence homologue IGF-2 B11-25 se lient avec la même affinité à DQ8, un allèle HLA de classe II qui confère une susceptibilité majeure au diabète de type 1. La présentation de la séquence IGF-2 B11-25 aux PBMCs de patients DQ8+ diabétiques de type 1 produit un profil de sécrétion en cytokines de type régulateur/suppressif. Par cette double action (compétition pour une liaison à une protéine CMH de susceptibilité et réponse T tolérogène/régulatrice en aval), les séquences d'IGF-2 homologues des séquences auto-antigéniques de l'insuline peuvent servir de base à une nouvelle type d'approche immunothérapeutique pour la prévention du diabète de type 1.

Remerciements

Nos travaux de recherche sont soutenus par le Fonds Spécial de Recherche de l'UILg, la Fondation Léon Fredericq (Faculté de Médecine de Liège), le FNRS, la Fédération Belge contre le Cancer, la Fondation Vaugrenier pour la Recherche en Tolérance (Genève), l'European Association for the Study of Diabetes (EASD, Düsseldorf), et le Projet Intégré FP6 Euro-Thymaïde de l'Union Européenne.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gepts W: Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*. 1965 ; **14** : 619-633.
- Gale EAM : The discovery of type 1 diabetes. *Diabetes* 2001 ; **50** : 217-226.
- Notkins AL, Lernmark A : Autoimmune type 1 diabetes : resolved and unresolved issues. *J Clin Invest*. 2001 ; **108** : 1247-1252.
- Gottlieb PA, Eisenbarth GS : Diagnosis and treatment of pre-insulin dependent diabetes. *Annu Rev Med*. 1998 ; **49** : 391-405.
- Geenen V, Brilot F, Hansenne I, Renard C, Martens H. Thymus and T cells. Dans : *Encyclopedia of Neuroscience 3rd Edition*, Adelman G, Smith BH (eds), Elsevier New York, sous presse.
- Geenen V. *La Communication Cryptocrine Intrathymique et la Tolérance Immunitaire Centrale au Soi Neuroendocrine*. Thèse d'Agrégation de l'Enseignement supérieur, Université de Liège, 1995.
- Geenen V, Goxe B, Martens H, Vandersmissen E, Vanneste Y, Achour I et al. : Cryptocrine signaling in the thymus network and T cell education to neuroendocrine self-antigens. *J Mol Med*. 1995 ; **73** : 449-455.
- Martens H, Goxe B, Geenen V : The thymic repertoire of neuroendocrine self-peptides : implications in T-cell life and death. *Immunology Today*. 1996 ; **17** : 312-317.
- Geenen V, Lefèbvre PJ : The intrathymic expression of insulin-related genes : implications for pathophysiology and prevention of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Rev*. 1998 ; **14** : 95-103.
- Farr AG, Rudensky A : Medullary thymic epithelium : a mosaic of epithelial self ? *J Exp Med*. 1998 ; **188** : 1-4.
- Klein L, Kyewski B : « Promiscuous » expression of tissue antigens in the thymus : a key to T-cell tolerance and autoimmunity ? *J Mol Med*. 2000 ; **78** : 483-494.
- Geenen V : The thymic insulin-like growth factor axis : involvement in physiology and disease. *Horm Metab Res*. 2003 ; **35** : 656-663.
- Egwuagu CE, Charukamnoetkanok P, Gery I : Thymic expression of autoantigens correlates with resistance to autoimmune disease. *J Immunol*. 1997 ; **159** : 3109-3112.
- Thebault-Baumont K, Dubois-Laforgue D, Krief P, Briand JP, Halbout P, Vallon-Geoffroy K et al. : Acceleration of type 1 diabetes in proinsulin 2 deficient mice. *J Clin Invest*. 2003 ; **111** : 851-857.

15. Burnet FM : A reassessment of the « forbidden clone hypothesis » of autoimmune diseases. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1973 ; **50** : 1-9.
16. Like AA, Kislaukis E, Williams RM, Rossini AA : Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB:W rat. *Science.* 1982 ; **216** : 644-646.
17. Georgiou HM, Mandel TE: Induction of insulinitis in athymic (nude) mice. The effect of NOD thymus and pancreas transplantation. *Diabetes.* 1995 ; **44** : 49-59.
18. Thomas-Vaslin V, Damotte D, Coltey M, Le Douarin NM, Coutinho A, Salaün J : Abnormal T cell selection on NOD thymic epithelium is sufficient to induce autoimmune manifestations in C57BL/6 athymic nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 ; **94** : 4598-4603.
19. Kecha O, Brilot F, Martens H, Franchimont N, Greimers R, Defresne MP, Winkler R, Geenen V : Involvement of insulin-like growth factors in early T cell development : a study using fetal thymic organ cultures. *Endocrinology.* 2000 ; **141** : 1209-1217.
20. Kecha-Kamoun O, Achour I, Martens H, Collette J, Lefèbvre PJ, Greiner DL, Geenen V : Thymic expression of insulin-related genes in an animal model of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetes/Metab Res Rev.* 2001 ; **17** : 146-152.
21. Geenen V, Kecha O, Brilot F, Martens H, Lefèbvre P : Le rôle du thymus dans la physiopathologie du diabète de type 1. *Bull Acad Royale Médecine.* 2000 ; **155** : 237-244.
22. Kamradt T, Mitchison NA: Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med.* 2001 ; **344** : 655-664.
23. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ et al. : Projection of an immunological self shadow in the thymus by the Aire protein. *Science.* 2002 ; **298** : 1395-1301.
24. Pitkänen J, Peterson P : Autoimmune regulator : from loss of function to autoimmunity. *Genes and Immunity.* 2003 ; **4** : 12-21.
25. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC : Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol.* 2003 ; **4** : 350-354.
26. Todd JA : Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 ; **92** : 8560-8565.
27. Redondo MJ, Eisenbarth GS : Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes and associated disorders. *Diabetologia.* 2002 ; **45** : 605-622.
28. Pugliese A, Miceli D : The insulin gene in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2002 ; **18** : 13-25.
29. Zinkernagel RM : Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmune diseases. *N Engl J Med.* 2001 ; **345** : 1331-1335.
30. Brilot F, Chehadeh W, Charlet-Renard C, Martens H, Geenen V, Hober D: Persistent infection of human thymic epithelial cells by coxsackievirus B4. *J Virol* 2002 ; **76** : 5260-5265.
31. Masteller EL, Bluestone JA: Immunotherapy of insulin-dependent diabetes. *Curr Opin Immunol.* 2002 ; **14** : 652-659.
32. Geenen V, Brilot F, Hansenne I, Louis C, Martens H, Wücherpfennig K, Gorus F : Thymus tolerance dysfunction in the development of the autoimmune diabetogenic response: a way for a novel type of vaccine/immunotherapy. *Diabetologia.* 2003 ; **46** (Suppl. 2) : A10, abstract 22.
33. DPT-Type 1 diabetes Study Group: Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2002 ; **346** : 1685-1691.
34. Liu E, Moriyama H, Abiru N, Miao D, Yu L, Taylor RM et al. : Anti-peptide antibodies and fatal anaphylaxis in NOD mice in response to insulin self-peptides B : 9-23 and B : 13-23. *J Clin Invest.* 2002 ; **110** : 1021-1027.