

Université de Montréal

**Étude de protection conférée par vaccination ADN  
dans un modèle murin d'hépatite auto-immune**

par

Catherine Habel

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de M.Sc.

en Microbiologie et Immunologie

Août, 2013

© Catherine Habel, 2013

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude de protection conférée par vaccination ADN  
dans un modèle murin d'hépatite auto-immune

Présenté par :  
Catherine Habel

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Ali Ahmad, président-rapporteur  
Dr Fernando Alvarez, directeur de recherche  
Dre Carolina Alfieri, membre du jury

## Résumé en français et mots-clés

La vaccination ADN à l'aide de plasmides codant pour des autoantigènes s'est avérée efficace dans la protection contre plusieurs maladies auto-immunes. Le but de ce mémoire était dans un premier temps d'établir si un protocole de vaccination ADN composé de 3 injections de pCMV-CTLA-4-NP et de pVR-IL-12 à deux semaines d'intervalle avait un effet protecteur contre le développement d'une hépatite auto-immune chez la souris TTR-NP, un modèle murin transgénique de la maladie et précédemment développé au laboratoire. Dans un deuxième temps, le but était d'élucider, le cas échéant, les mécanismes sous-tendant la protection conférée par la vaccination ADN. Les hypothèses initiales étaient qu'une protection allait effectivement être conférée par la vaccination ADN et que celle-ci pouvait être attribuable à une déviation de la réponse typiquement Th1 de la maladie vers une réponse Th2, à un épuisement des cellules immunitaires et/ou à l'activation et à l'induction de prolifération de cellules régulatrices.

Les résultats montrent que la vaccination ADN induit une protection transitoire contre le développement d'infiltrations lymphocytaires au foie. Cette protection se ferait via un épuisement des cellules CD4+, CD8+ et CD19+ se retrouvant à la rate et exprimant PD-1 dans une plus forte proportion à 3 mois, et ne serait médiée ni par les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+FoxP3+, ni par les cellules CD8+FoxP3+. Une déviation de la réponse Th1 vers une réponse Th2 demeure une explication supplémentaire plausible à la protection conférée mais nécessiterait une caractérisation en situation plus physiologique avant de pouvoir inférer sur son implication réelle. La vaccination ADN n'influe ni sur la présence d'autoanticorps, ni sur les niveaux d'alanine aminotransférase, deux marqueurs de la maladie.

**Mots-clés** : hépatite auto-immune, vaccination ADN, auto-immunité, bris de tolérance, foie

## **Abstract and key words**

DNA immunizations were proven effective in a range of autoimmune diseases. The first goal of this master's thesis was thus to evaluate if a protocol of 3 intramuscular plasmidic injections of pCMV-CTLA4-NP and pVR-IL-12, at 2 weeks apart, would protect TTR-NP mice, a transgenic murine model previously developed in the laboratory, against the development of an autoimmune hepatitis. The second goal was, if the protection was indeed conferred by DNA vaccination, to elucidate the mechanisms underlying this effect. The initial hypotheses were that DNA vaccination would indeed elicit a protection against autoimmune hepatitis, and that this could be attributed to a skew from the typical Th1 response to a more tolerogenic Th2 response, to the exhaustion of the immune cells and/or to the activation and the proliferation of regulatory T cells.

Results show that DNA vaccination induces a transient protection against lymphocytic infiltrates in the liver. This protection is thought to be caused by the exhaustion of the CD4+, CD8+ and CD19+ cells found in the spleen and expressing PD-1 in greater proportion at 3 months, and not to be mediated by CD4+CD25+FoxP3+ or CD8+FoxP3+ regulatory T cells. An immunomodulation from a Th1 to a Th2 response could still be a plausible explanation by the protection conferred by the DNA vaccination, but additional experimentations in a more physiological setting would be necessary to infer on its real implication. DNA vaccination had no effect on autoantibodies or on alanine aminotransferase levels, which are two biological markers of the disease.

**Keywords** : autoimmune hepatitis, DNA vaccination, autoimmunity, tolerance break, liver

## Table des matières

<b>Résumé en français et mots-clés .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract and key words .....</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>x</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction .....</b>	<b>1</b>
1.1 Systèmes immunitaires inné et acquis .....	1
1.2 Cellules NK.....	3
1.3 Lymphocytes B .....	4
1.3 Lymphocytes T .....	5
1.3.1 Lymphocytes T auxiliaires.....	6
1.3.1.1 Généralités .....	6
1.3.1.2 Lignées Th1 et Th2 .....	6
1.3.1.3 Interleukine 2 .....	7
1.3.1.4 Interleukine 4 .....	7
1.3.1.5 Interleukine 10 .....	8
1.3.1.6 Interleukine 12 .....	9
1.3.1.7 Interféron gamma.....	10
1.3.2 Lymphocytes T cytotoxiques.....	10
1.3.3 Lymphocytes T régulateurs.....	11
1.3.4 Cellules NKT .....	12
1.4 Tolérance des cellules T .....	13
1.4.1 Tolérance centrale .....	13
1.4.2 Tolérance périphérique.....	13
1.4.2.1 Facteurs intrinsèques.....	14
1.4.2.2 Facteurs extrinsèques .....	14
1.5 Épuisement cellulaire .....	15
1.5.1 Programmed-death 1 .....	15
1.6 Foie.....	16

1.6.1 Généralités .....	16
1.6.2 Immunologie hépatique.....	17
1.7 Hépatite auto-immune.....	19
1.7.1 Historique.....	19
1.7.2 Caractéristiques biochimiques, cliniques et génétiques.....	20
1.7.3 Histologie.....	22
1.7.4 Pathogenèse.....	22
1.7.5 Types.....	23
1.7.6 Thérapies.....	25
1.7.7 Modèles murins.....	26
1.7.7.1 Souris S-100.....	26
1.7.7.2 Concanavaline A.....	26
1.7.7.3 Souris IFN $\gamma$ .....	27
1.7.7.4 Souris Alb-GP-33.....	28
1.7.7.5 Souris invalidée pour le TGF- $\beta$ 1.....	29
1.7.7.6 Souris TTR-NP.....	29
1.7.7.7 Xénoimmunisation avec les autoantigènes humains de l'HAI de type 2.....	30
1.7.7.8 Modèle Alb-HA/CL4-TCR.....	31
1.8 Adénovirus.....	32
1.9 Vaccination ADN.....	34
1.10 Hypothèse et objectifs.....	36
1.10.1 Justification rationnelle.....	36
1.10.2 Hypothèses.....	37
1.10.3 Objectifs.....	37
<b>Chapitre 2 : Méthodologie.....</b>	<b>38</b>
2.1 Modèle murin.....	38
2.1.1 Groupes murins.....	38
2.1.2 Injections.....	39
2.1.2.1 Production de plasmides pCMV-contrôle.....	39
2.1.2.2 Production de plasmides pCMV-CTLA4-NP.....	39
2.1.2.3 Production de plasmides pVR-IL-12.....	40

2.1.2.4 Injections intraveineuses .....	40
2.1.2.5 Injections intramusculaires .....	40
2.1.3 Temps de sacrifices .....	40
2.2 Tests sanguins .....	41
2.2.1 Prélèvements .....	41
2.2.2 Dosage des transaminases .....	41
2.2.3 Caractérisation des anticorps.....	42
2.2.3.1 Production de NP-GST .....	42
2.2.3.2 Titration des anticorps.....	43
2.2.3.3 Détermination des isotypes .....	43
2.3.3.4 Préparation de fractions cytosoliques et microsomales de foies.....	44
2.3.3.5 Immunobuvardages de type Western.....	44
2.3 Isolation des lymphocytes.....	45
2.3.1 Sacrifice des souris.....	45
2.3.2 Lymphocytes de la rate .....	45
2.3.3 Lymphocytes du foie.....	45
2.4 Histologie .....	46
2.5 Tests sur les lymphocytes .....	46
2.5.1 Test de cytotoxicité .....	46
2.5.2 Tests de prolifération.....	47
2.5.3 Caractérisation de la balance Th1/Th2.....	47
2.5.4 Détection de lymphocytes T régulateurs.....	48
2.5.5 Caractérisation du niveau d'épuisement des cellules.....	48
2.6 Analyses statistiques et figures .....	48
<b>Chapitre 3 : Résultats .....</b>	<b>49</b>
3.1 Effet de la vaccination ADN sur le développement d'HAI en modèle murin .....	49
3.1.1 Variation des niveaux d'ALT sériques .....	49
3.1.2 Influence sur la production d'autoanticorps.....	50
3.1.3 Variation des scores histologiques.....	52
3.4 Impact de la vaccination ADN sur la réponse immunitaire .....	55
3.4.1 Analyse des cytokines IL-2, IL-4, IL-10 et IFN $\gamma$ .....	55

3.4.2 Analyse du niveau d'épuisement des cellules.....	59
3.4.3 Analyse des lymphocytes T régulateurs.....	62
<b>Chapitre 4 : Discussion.....</b>	<b>65</b>
4.1 Impact de l'injection d'AdA4-NP IV à J0 sur le développement d'HAI en modèle murin.....	65
4.1.1 La vaccination ADN n'influence ni la production d'autoanticorps, ni les niveaux d'ALT sériques.....	67
4.1.2 La vaccination ADN induit une protection temporaire contre le développement d'une HAI.....	69
4.2 Impact de la vaccination ADN sur la réponse immunitaire.....	69
4.2.1 La vaccination ADN influence la capacité de production d'IL-2, d'IL-4, d'IL-10 et d'IFN $\gamma$ des cellules CD4+.....	70
4.2.2 La vaccination ADN influence négativement la capacité des cellules B, T non NKT et NKT hépatiques à produire de l'IL-10 et positivement la capacité des cellules CD8+ à produire de l'IFN $\gamma$ à 8 mois.....	71
4.2.3 La vaccination ADN influence l'expression de PD-1 par les cellules CD4+, CD8+ et CD19+.....	72
4.2.4 La vaccination ADN n'a pas d'impact significatif sur les cellules CD4+CD25+FoxP3+ mais a un impact sur la proportion de cellules CD8+ exprimant FoxP3.....	73
<b>Chapitre 5 : Conclusion et perspectives.....</b>	<b>74</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> Système de pointage révisé de l'IAIHG pour le diagnostic de l'HAI.....	21
<b>Tableau 2</b> Protocoles de vaccination ADN appliqués avec succès à des maladies auto-immunes .....	35
<b>Tableau 3</b> Groupes murins selon les injections réalisées et le temps de sacrifice post-injection IV .....	38

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> Hématopoïèse des cellules conventionnelles du système immunitaire. ....	2
<b>Figure 2</b> Populations lymphoïdes hépatiques et sanguines chez l'humain .....	17
<b>Figure 3</b> Représentation schématique de sinusoides hépatiques.....	19
<b>Figure 4</b> Représentation schématique de l'AdV5 et de ses principaux éléments.....	33
<b>Figure 5</b> Protocole d'injection et de sacrifice des souris TTR-NP.....	41
<b>Figure 6</b> Niveaux d'ALT des souris traitées ou non par vaccination ADN .....	50
<b>Figure 7</b> Titres d'autoanticorps des souris avec ou sans traitement par vaccination ADN.	51
<b>Figure 8</b> Isotypes des autoanticorps des souris avec ou sans traitement à 3 mois .....	52
<b>Figure 9</b> Manifestations histologiques dans le foie des souris avec et sans vaccination ADN à 3 mois .....	53
<b>Figure 10</b> Histologies hépatiques médianes des souris avec et sans vaccination ADN à 8 mois.....	54
<b>Figure 11</b> Scores histologiques hépatiques des souris avec ou sans vaccination ADN. ....	55
<b>Figure 12</b> Production cytokinique des cellules CD4+ hépatiques et spléniques.....	56
<b>Figure 13</b> Proportion de cellules CD4+ hépatiques et spléniques produisant de l'IL-2, de l'IL-4, de l'IL-10 ou de l'IFN $\gamma$ après une stimulation à la PMA chez des souris non traitées, traitées ou ayant reçu un traitement sans pVR-IL-12, à 3 mois .....	57
<b>Figure 14</b> Production d'IL-10 par des cellules B, T non NKT, NKT, T cytotoxiques et NK hépatiques et spléniques à 8 mois .....	58
<b>Figure 15</b> Capacité de production d'IFN $\gamma$ par les cellules CD8+ spléniques et hépatiques à 8 mois.....	59
<b>Figure 16</b> Proportion de cellules CD8+ hépatiques et spléniques exprimant PD-1 chez des souris avec ou sans vaccination ADN après 3 et 8 mois.....	61
<b>Figure 17</b> Proportion de cellules CD4+ hépatiques et spléniques exprimant PD-1 chez des souris avec ou sans vaccination ADN après 3 et 8 mois.....	61
<b>Figure 18</b> Proportion de cellules CD19+ hépatiques et spléniques exprimant PD-1 chez des souris avec ou sans vaccination ADN après 3 mois.....	62

<b>Figure 19</b> Proportion de cellules CD4+ hépatiques et spléniques exprimant CD25 et FoxP3 à 3 et 8 mois chez des souris avec ou sans vaccination ADN.....	63
<b>Figure 20</b> Proportion de cellules CD8+ hépatiques et spléniques exprimant FoxP3 à 3 et 8 mois chez des souris avec ou sans vaccination ADN .....	64

## Liste des abréviations

7-AAD	7-amino-actinomycine D
$\alpha$ GalCer	$\alpha$ -galactosylcéramide
ACF	adjuvant complet de Freund
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	séquence codante d'acide désoxyribonucléique
Ad-CTLA4-NP	vecteur adénoviral codant pour la portion sécrétoire de CTLA4 et pour la nucléoprotéine du LCMV
AdV	adénovirus
Alb	albumine
ALT	alanine aminotransférase
AMA	anticorps anti-mitochondriaux (Anti-Mitochondrial Antibody)
ANA	anticorps anti-noyaux
APC	allophycocyanine
AR	arthrite rhumatoïde
ARN	acide ribonucléique
ASGPR	récepteur de l'asialoglycoprotéine (Asialoglycoprotein Receptor)
AST	aspartate aminotransférase
BFA	bréfeldine A
CAR	récepteur de l'adénovirus Coxsackie (Coxsackie adenovirus receptor)
cCET	cellule épithéliale thymique corticale
CD	cellule dendritique
CDx	cluster de différenciation numéro x
CET	cellule épithéliale thymique
CESH	cellule endothéliale des sinusoides hépatiques
CFSE	carboxyfluorescéine succinimidyl ester
CK	cellule de Kupffer
CL4-TCR	souris dont les T CD8 <sup>+</sup> possèdent un RCT spécifique pour l'HA
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité

CMV	cytomégalo­virus
CPA	cellule pré­sen­ta­trice d'anti­gène
CTLA(-)4	anti­gène de lymphocyte T cyto­toxique 4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)
CYP2D6	cytochrome P450 2D6
DPBS	saline tam­pon­née au phos­phate de Dulbecco (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
DT1	diabète de type 1
EAE	encé­phalite auto-immune expé­ri­men­ta­le
FITC	iso­thio­cy­a­nate de fluo­res­céine (Fluorescein Isothiocyanate)
FoxP3	Forkhead box P3
FTCD	formi­mi­no­trans­férase cyclo­dé­ami­nase
GAD65	dé­car­boxy­lase 65 de l'acide glu­ta­mi­que (Glutamic Acid Decarboxylase 65)
GP	glyco­pro­téine
HA	hé­ma­g­g­lu­ti­nine de l'influenza
HAI	hé­pa­tite auto-immune
HCV	vi­rus de l'hé­pa­tite C (Hepatitis C Virus)
HDV	vi­rus de l'hé­pa­tite D (Hepatitis D Virus)
Hsp	pro­téine de choc ther­mique (Heat Shock Protein)
IAIHG	International Autoimmune Hepatitis Group
IFN	interféron
Ig	immu­no­g­lo­bu­line
IL	inter­leu­kine
ILI	in­fil­tra­tions lymphocytaires intralo­bu­laires
ILP	in­fil­tra­tions lymphocytaires por­tales
IL-xR	ré­cep­teur de l'IL-x
IM	in­tra­mus­cu­laire
IP	in­tra­pé­ri­to­néal (e)
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thio­g­alac­to­py­ra­no­side

iTreg	lymphocyte T régulateur induit
IV	intraveineux (se)
Jx	jour x
kDa	kiloDalton
KIR	Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor
LB	Luria-Bertani
LC1	cytosol hépatique de type 1 (Liver Cytosol type 1)
LCMV	virus de la chorioméningite lymphocytaire murine
LÉD	lupus érythémateux disséminé
LKM1	microsomes du foie et des reins de type 1 (Liver-Kidney Microsomal type 1)
LP	hépatique et pancréatique (Liver Pancreas)
LPS	lipopolysaccharide
CESH	cellule endothéliale des sinusoides hépatiques
Mx	mois x
MAI	maladie auto-immune
mCD	cellule dendritique myéloïde
mCET	cellule épithéliale thymique médullaire
MMAP	motif moléculaire associé aux pathogènes
MOG	glycoprotéine d'oligodendrocytes de la myéline (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein)
NK	cellule tueuse (Natural Killer cell)
NKp46	protéine de 46 kDa des cellules NK
NKT	cellule T tueuse (Natural Killer T cell)
NP	nucléoprotéine du LCMV
NP-GST	nucléoprotéine du LCMV couplée à la S-transférase du glutathion
PBM	protéine basique de la myéline
pCD	cellule dendritique plasmacytoïde
pCMV-CTLA4-NP	plasmide avec promoteur CMV et codant pour la portion sécrétoire de CTLA-4 et pour la nucléoprotéine du LCMV

PD-1	mort cellulaire programmée 1 (Programmed-Death 1)
PE	phycoérythrine
PEACDE	polyendocrinopathie auto-immune – candidose – dystrophie ectodermique
PerCP-Cy5.5	protéine de la péricidine chlorophylle – cyanine 5.5 (Peridinin Chlorophyll Protein – Cyanine 5.5)
pfu	unité formatrice de plaque (Plaque Forming Unit)
PLP	protéine protéolipidique (Proteolipid Protein)
PMA	phorbol 12-myristate 13-acétate
PSN	pénicilline-streptomycine-néomycine
pVr-IL-12	plasmide codant pour l'IL-12
RCT	récepteur des cellules T
RLTC	récepteur de lectines de type C
RNC	récepteur naturel de cytotoxicité
RPMI	milieu de culture du Roswell Park Memorial Institute
RPMIc	milieu de culture du Roswell Park Memorial Institute complet (avec 10% de SFV, PSN Antibiotic Mixture à une dilution de 1X et du $\beta$ -mercaptoéthanol)
RRM	récepteur de reconnaissance de motifs
RTN	récepteur de type NOD
RTR	récepteur de type RIG
RTT	récepteur de type Toll
S-100	surnageant d'homogénats de foies syngéniques centrifugés à 100 000 g
SFV	sérum foetal de veau
SLA	antigène soluble du foie (Soluble Liver Antigen)
SMA	anticorps anti-muscles lisses (Smooth Muscle Antibody)
SP	sclérose en plaques
TBST	saline tamponnée au Tris avec Tween (Tris-Buffered Saline + Tween)
TGF	facteur de croissance transformant (Transforming Growth Factor)
Th	lymphocyte T auxiliaire (T Helper)

TNF	facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor)
Treg	lymphocyte T régulateur
TTR	promoteur de la transthyrétine
TTR-NP	promoteur de la transthyrétine-nucléoprotéine du LCMV

À ceux qui se reconnaîtront, et aux autres aussi,  
mais avant tout à mon frère.

## Remerciements

Il y a tellement de personnes de Sainte-Justine que je voudrais remercier ici que je vais forcément oublier d'en mentionner si je tente de les nommer toutes. Permettez-moi donc de rester plus générale et de tous vous remercier en groupe, que vous ayez été des membres du laboratoire, des collègues de recherche ou des membres du personnel : par votre présence et vos conseils, vous avez contribué à faire de mon passage à Sainte-Justine une expérience enrichissante.

Il y a cependant des personnes que je ne pourrais ne pas nommer. En premier lieu mon directeur de recherche, Dr Alvarez. Pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, certes, mais aussi pour son intégrité, sa joie de vivre et son professionnalisme qui continueront à être une source d'inspiration pour le reste de mon parcours. Un merci tout spécial également à Kathie Béland, véritable chef d'orchestre du laboratoire : il y a tellement de choses pour lesquelles te remercier que ne serait-ce que le début de la liste sortirait déjà des limites de cette page! Je vais donc résumer en disant merci pour tout, même si ça me semble un peu faible pour tout le travail que tu fais. Merci également à Gabriel Marceau pour tes conseils et tes réponses à toutes mes questions, surtout que je sais que j'ai tout particulièrement eu tendance à en avoir quand tu étais occupé. Merci également à Pascal Lapierre pour toutes tes explications en début de parcours et à Roland Yang ainsi qu'à Sara Bourbonnais pour votre soutien inter-maîtrises. Et, comme je l'ai mentionné avant, merci à toutes les autres personnes que j'ai pu côtoyer au laboratoire, vous avez tous contribué à créer une dynamique de travail intéressante et motivante.

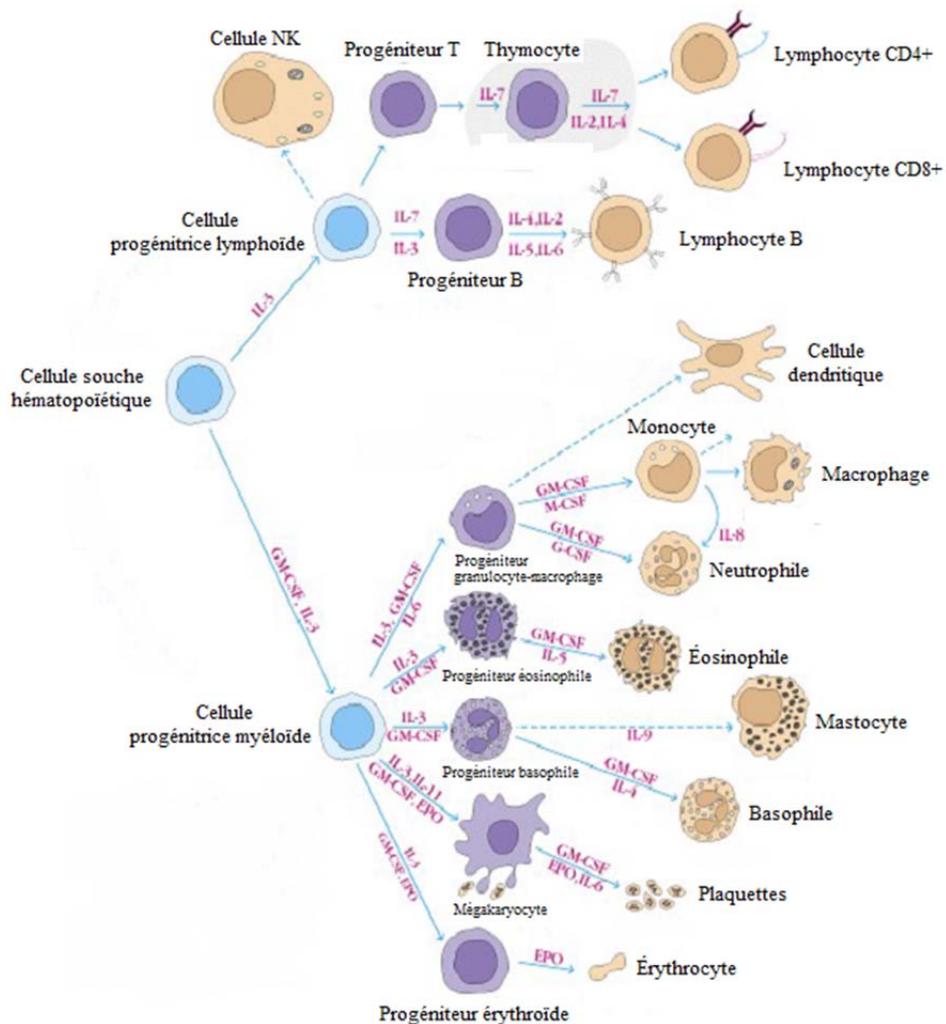
Merci également à ma famille, qui continue à m'appuyer tout au long de mon parcours universitaire malgré sa sinuosité. Merci à tous ceux qui ont été touchés de près ou de loin par la rédaction de ce mémoire : merci d'avoir supporté mes rebuffades pour cause d'écriture ainsi que mes (quelques, il faut le dire) sautes d'humeur. Et pour finir, un merci tout spécial à ceux et celles qui m'auront aidée pour la correction de ce mémoire. Si, vous qui lisez ces remerciements, poussez un soupir de soulagement à la fin de la dernière page de ce mémoire, dites-vous qu'eux l'auront lu, relu et rere lu. Minimum. Alors, vraiment, respect et gratitude.

# Chapitre 1 : Introduction

## 1.1 Systèmes immunitaires inné et acquis

Constamment éprouvé par des éléments externes, le corps se doit de pouvoir se protéger lorsque ces éléments s'avèrent pathogènes ou potentiellement délétères, sans pour autant devenir nuisible aux cellules du soi ou aux éléments ne présentant aucun danger. Deux types de défenses ont évolué pour répondre à ce besoin : l'immunité innée et l'immunité acquise. Bien qu'elles proviennent des mêmes cellules souches issues de la moelle osseuse, ces deux réponses se distinguent autant par leur rapidité et leurs mécanismes d'action que par les cellules matures qui les composent (voir figure 1).

L'immunité innée est médiée par les cellules issues de progéniteurs myéloïdes ainsi que par les cellules NK issues de progéniteurs lymphoïdes. Ces cellules sont les premières à se rendre au site d'une agression mécanique ou pathogénique et produisent diverses cytokines pro-inflammatoires afin de rapidement éliminer ou circonscrire le danger et de signaler sa présence aux autres cellules du système immunitaire<sup>4</sup>. Les cellules de l'immunité innée reconnaissent les éléments pathogéniques via des récepteurs appelés « récepteurs de reconnaissance de motifs (RRM) » et lient des motifs structuraux conservés appelés « motifs moléculaires associés aux pathogènes (MMAAP) »<sup>27</sup>. Les MMAAP comprennent entre autres les récepteurs de type Toll (RTT), les récepteurs de type RIG-1 (RTR), les récepteurs de type NOD (RTN) et les récepteurs de lectines de type C (RLTC). Les RTT, présents à la surface membranaire et dans les endosomes, reconnaissent divers éléments bactériens tels les lipopolysaccharides (LPS) ou les flagellines et divers éléments viraux selon leur type<sup>28</sup>. Les RTR sont localisés dans le cytoplasme et reconnaissent la présence d'ADN ou d'ARN d'origine virale<sup>28</sup>. Les RTN forment une famille composée de plus de 20 membres reconnaissant divers éléments pathogéniques intracellulaires<sup>28</sup>. Les RLTC, quant à eux, reconnaissent surtout des motifs d'origines fongiques et bactériennes<sup>28</sup>.



**Figure 1 Hématopoïèse des cellules conventionnelles du système immunitaire.** Les cellules souches hématopoïétiques issues de la moelle osseuse se divisent en progéniteurs des lignées lymphoïdes et myéloïdes et sont à l'origine de toutes les cellules de l'immunité innée et acquise. Adapté de <sup>4,5</sup>.

L'immunité innée fait également appel au système du complément, qui facilite la phagocytose par opsonisation des pathogènes, aide au recrutement de cellules immunitaires via ses propriétés chémoattractantes, et est capable d'induire la lyse cellulaire par la formation de pores sur la membrane plasmique<sup>4</sup>.

L'immunité acquise (ou adaptative) permet une réponse rapide et spécifique envers des éléments pathogènes préalablement rencontrés. Elle est basée sur la présentation d'antigènes par des cellules présentatrices (CPA) et par les cellules T auxiliaires (Th pour « T Helper »). Elle est constituée d'une voie cytotoxique médiée par les cellules T CD8+ et d'une voie humorale médiée par les cellules B. Ces deux voies possèdent des cellules effectrices, permettant une réponse immédiate, et des cellules mémoires, permettant une réponse ultérieure envers un antigène donné. La spécificité de l'immunité acquise vient cependant au coût d'une réaction plus lente que l'immunité innée, surtout lors d'une première rencontre avec un élément pathogène. Elle possède également un plus lourd coût cellulaire en nécessitant une sélection pour ne garder que des cellules fonctionnelles et ne reconnaissant que des antigènes exogènes<sup>4</sup>.

Les cellules NKT, pour leur part, sont à cheval entre l'immunité innée et l'immunité acquise en possédant des capacités propres à ces 2 voies<sup>29</sup>.

## 1.2 Cellules NK

Les cellules NK (pour Natural Killer) ont été décrites dans un premier temps comme étant un nouveau type lymphocytaire ayant une activité cytotoxique et n'étant ni B ni T<sup>30-33</sup>. De fait, les cellules NK proviennent d'un progéniteur lymphoïde mais font partie du système immunitaire inné. Elles sont impliquées dans les réponses antivirales et antitumorales ainsi que dans la protection contre les bactéries et les pathogènes intracellulaires et réalisent cette défense via leurs fonctions cytotoxiques en relâchant des granules de perforine ou de granzyme<sup>34</sup> ou via leurs fonctions de production de cytokines, notamment l'interféron gamma (IFN $\gamma$ )<sup>35</sup>. Elles sont capables d'effectuer leurs fonctions lytiques sans stimulation préalable par un antigène<sup>36</sup>.

On définit le stade de maturation des cellules NK selon qu'elles soient « éduquées » (possédant une pleine capacité de réponse) ou non<sup>37</sup>. Cette éducation serait régulée via des récepteurs du CMH de classe I puisque les cellules NK déficientes pour ces récepteurs demeurent hyporépondantes<sup>38, 39</sup>. Ces récepteurs, pouvant avoir des fonctions inhibitrices ou activatrices, se répartissent en plusieurs familles, dont les KIR (pour Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor), présents chez les primates mais non fonctionnels chez les

rongeurs, les Ly49, présents chez les rongeurs mais non chez les primates, et les CD94-NKG2, présents chez les rongeurs et chez les primates<sup>40-43</sup> (une liste des récepteurs inhibiteurs et activateurs des cellules NK humaines et murines peut être trouvée en<sup>42</sup>).

Le récepteur NKp46<sup>44</sup>, fait partie du groupe des récepteurs naturels de cytotoxicité (RNC) spécifiques aux cellules NK<sup>45, 46</sup> et est considéré comme le récepteur principal pour leur fonction lytique<sup>47</sup>. Le groupe des RNC comprend également les récepteurs NKp30<sup>48</sup> et NKp44<sup>49</sup>. NKp30 et NKp46 sont ubiquitairement présents à la surface des cellules NK, qu'elles soient activées ou non<sup>44</sup>, alors que NKp44 n'est présent que sur les cellules NK activées<sup>46</sup>. Les cellules NK possèdent également des récepteurs inhibiteurs et leur activité est médiée par l'intégration des signaux provenant des récepteurs inhibiteurs et activateurs. Elles ont également un rôle de régulation dans l'immunité acquise soit par interaction directe, soit par relâche de cytokines.

Une des hypothèses actuelles est que les cellules NK pourraient être impliquées dans la protection contre certaines pathologies auto-immunes, une diminution de leur nombre ayant été observée notamment lors de sclérose en plaques (SP)<sup>50</sup>, de lupus érythémateux disséminé (LÉD)<sup>51</sup> et de diabète de type 1 (DT1)<sup>52</sup>.

### 1.3 Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont des cellules dont l'hématopoïèse ainsi que la maturation s'effectuent toutes deux dans la moelle osseuse<sup>4</sup>. En période fœtale, ils sont également générés par le foie<sup>4</sup>. Les lymphocytes B passent par une phase de sélection négative où les cellules liant des composants du soi sont éliminées<sup>53</sup>. Ils expriment à leur surface des récepteurs des cellules B (RCB) liant leur antigène via 2 immunoglobulines transmembranaires identiques (appelées chaînes lourdes) et 2 immunoglobulines plus courtes identiques entre elles (appelées chaînes légères<sup>4</sup>). La structure des domaines constants des chaînes lourdes différencie les cellules B en 5 isotypes : IgD, IgM, IgG, IgA et IgE<sup>4</sup>. Les IgG peuvent être divisées en 4 sous-classes qui peuvent elles-mêmes être sous-divisées et les IgA peuvent être divisées en 2 sous-classes<sup>4</sup>. Les RCB sont associés avec les composantes de signalisation  $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$ <sup>54</sup>. Bien qu'il ait longtemps été considéré que les lymphocytes B avaient une activité dépendante des RCB et d'autres qui en étaient

indépendantes, il apparaît maintenant qu'une stimulation via les RCB soit nécessaire à leur survie et que toute action des cellules B en serait par conséquent indirectement dépendante<sup>55-57</sup>. Une liaison antigénique multivalente est nécessaire pour induire une signalisation antigène-dépendante par les RCB<sup>58, 59</sup>; le CD19 exprimé par les cellules B a un rôle dans l'amplification de ce signal<sup>60</sup>.

Le dernier stade effecteur des cellules B est la cellule plasmacytoïde, qui est issue de cellules B ayant rencontré leur antigène via les RCB et qui peut sécréter des anticorps<sup>53</sup>. Les lymphocytes B sont également des ces CPA non professionnelles et peuvent présenter des antigènes via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) II<sup>61, 62</sup>.

De récentes études montrent que les cellules B pourraient être impliquées dans le maintien de maladies auto-immunes (MAI) médiées par les lymphocytes T puisque leur déplétion s'avère être une thérapie efficace entre autres contre la SP<sup>63</sup>, le DT1<sup>64</sup> et l'arthrite rhumatoïde (AR)<sup>65</sup>. Cette contribution serait indépendante de la production d'anticorps puisque l'efficacité du traitement ne corrèle pas nécessairement avec une diminution des taux d'autoanticorps<sup>66, 67</sup>. Certaines cellules B pourraient également avoir un rôle régulateur, notamment via leur capacité à sécréter de l'interleukine (IL)-10<sup>68, 69</sup>.

### 1.3 Lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des cellules du système immunitaire acquis pouvant être classées en cellules T conventionnelles et non conventionnelles. Tous les lymphocytes T expriment des récepteurs des cellules T (RCT) formés de 2 chaînes membres de la superfamille des immunoglobulines<sup>4</sup>. Les cellules conventionnelles expriment des RCT formés d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  et comptent pour 90-99% des cellules T du sang périphérique alors que les cellules non conventionnelles expriment des RCT formés d'une chaîne  $\gamma$  et d'une chaîne  $\delta$  et comptent pour 1-10%<sup>4</sup>. La diversité des RCT est générée par un réarrangement des segments géniques V et J chez les cellules conventionnelles et des segments géniques V, D et J chez les cellules non conventionnelles<sup>4</sup>.

Les RCT des cellules T conventionnelles et non conventionnelles sont associés à la membrane avec CD3 $\epsilon$ , un dimère de chaînes polypeptidiques participant à la transduction du signal initié par la liaison des RCT avec leur antigène<sup>4</sup>.

### 1.3.1 Lymphocytes T auxiliaires

#### 1.3.1.1 Généralités

Les lymphocytes T auxiliaires (Th pour T Helper) sont des cellules conventionnelles exprimant CD4. Elles ont été classées en différentes catégories selon les cytokines qu'elles produisent, puis selon le facteur de transcription propre au développement de leur lignée. Une de ces premières classifications à être établies fut la différenciation en cellules de types 1 (Th1) et 2 (Th2)<sup>70</sup>. D'autres lignées de lymphocytes T auxiliaires ont été découvertes depuis lors et il a été démontré qu'il existe une certaine plasticité chez ces cellules permettant à celles déjà différenciées dans une lignée d'exprimer des cytokines propres à une autre lignée dans certaines circonstances (revu en <sup>71</sup>).

#### 1.3.1.2 Lignées Th1 et Th2

Il est connu que la présence d'IL-12 induit une différenciation vers la lignée Th1<sup>72</sup>, tout comme la présence d'interférons de type I chez l'humain<sup>73</sup>, mais non chez la souris<sup>74</sup>. Les cellules Th1 sont impliquées dans la défense contre les pathogènes intracellulaires et produisent notamment de l'IL-2 et de l'IFN $\gamma$ <sup>70</sup>. Les lymphocytes Th1 peuvent induire la production d'anticorps IgM, IgG2a et IgG3<sup>75</sup>.

Le facteur initiant un engagement vers la lignée Th2 est encore inconnu : bien que la présence d'IL-4 ait longtemps été considérée comme celle induisant la lignée Th2 étant donné ses capacités *in vitro*<sup>76</sup>, des résultats plus récents démentent son implication systématique<sup>77</sup>, même si certaines infections semblent cependant nécessiter la présence d'IL-4 afin d'éliciter une réponse Th2 efficace<sup>78</sup>. Une étude récente montre que Stat5 et GATA3 seraient nécessaires au développement de la lignée Th2<sup>79</sup>. Les cellules Th2 sont impliquées dans la défense contre les pathogènes extracellulaires et produisent entre autres de l'IL-4<sup>70</sup> et de l'IL-10<sup>80</sup>. Tout comme pour les cellules de la lignée Th1, les cellules Th2

peuvent induire la production d'anticorps d'isotypes IgM et IgG3 par les lymphocytes B, en plus de promouvoir la production d'IgG1<sup>75</sup>.

### 1.3.1.3 Interleukine 2

Incluant la séquence de signalisation, l'interleukine-2 (IL-2) humaine est un polypeptide monomérique de 153 acides aminés<sup>81</sup> alors que l'IL-2 murine est un polypeptide de 169 acides aminés<sup>82, 83</sup> qui se retrouve le plus souvent sous forme dimérique<sup>84</sup>. Les IL-2 murine et humaine partagent 70% d'homologie au niveau de leur séquence nucléotidique<sup>83</sup>.

L'IL-2 est majoritairement produite par les lymphocytes T CD4+ activés, mais également par les lymphocytes T CD8+ et les cellules dendritiques (CD) activés ainsi que par les cellules NK et NKT (revu en <sup>85</sup>). Seules trois classes de cellules expriment les trois sous-unités du récepteur de l'IL-2 (IL-2R) : les lymphocytes T régulateurs ainsi que les lymphocytes T CD4+ ou CD8+<sup>85</sup>. L'IL-2 possède de multiples rôles, antinomiques, étant pro- ou anti-inflammatoire selon le contexte. Notamment, elle soutient l'expansion clonale des lymphocytes T CD8+<sup>86</sup>, est impliquée dans le développement de lymphocytes T mémoires<sup>87</sup> ainsi que dans la différenciation des cellules T effectrices<sup>88, 89</sup>, permet la production thymique de cellules T régulatrices<sup>90</sup> et promeut leur homéostasie<sup>91</sup> et influe sur la contraction des réponses immunitaires<sup>91</sup>. Bien qu'elle soit nécessaire au développement d'une réponse T *in vitro*, il ne semble pas que ce soit le cas *in vivo* puisqu'il a été démontré que des souris déficientes en IL-2 ou en IL-2R sont en mesure de monter une réponse immunitaire efficace<sup>92</sup>. Plusieurs expériences ont démontré que les souris n'exprimant pas l'IL-2 ou l'IL-2R développent dès les premières semaines de vie des atteintes auto-immunes<sup>85</sup>.

### 1.3.1.4 Interleukine 4

Identifiée pour la première fois en 1982 comme facteur de croissance des cellules B puis comme facteur stimulant les cellules B, l'interleukine-4 (IL-4) est une glycoprotéine se retrouvant naturellement à l'état monomérique<sup>93</sup>. Principalement produite par les lymphocytes T CD4+<sup>94</sup> de type Th2<sup>70</sup>, l'IL-4 agit sur les cellules B et T, les macrophages, les précurseurs hématopoïétiques et les cellules stromales<sup>93</sup>. Chez les cellules B, elle est

notamment impliquée dans la croissance cellulaire<sup>95</sup>, dans l'induction ou dans l'augmentation de l'expression de CMH II<sup>96</sup>, dans la promotion de la réponse antigénique<sup>97</sup>, dans la commutation de classe en induisant la production d'IgE<sup>98</sup> ainsi que d'IgG1<sup>99</sup>, en plus d'auto-entretenir ses effets en augmentant le nombre de ses récepteurs à la surface cellulaire<sup>100</sup>.

L'IL-4 agit également comme stimulant ou comme costimulant de croissance chez les cellules T ainsi que chez les cellules mastocytaires, en plus d'induire par costimulation la prolifération de cellules hématopoïétiques (revu en <sup>101</sup>). Elle est de plus impliquée dans le maintien des fonctions effectrices des cellules Th2 mucoales<sup>102</sup>.

### 1.3.1.5 Interleukine 10

Décrite en 1989 comme « facteur inhibant la production de cytokines par des clones Th1 »<sup>103</sup>, il a par la suite été démontré que l'IL-10 agissait également sur un registre étendu de cellules T, B et NK, ainsi que sur des cellules de la lignée myéloïde (revu en <sup>104</sup>). Les quelques 178 acides aminés des séquences des IL-10 murines et humaines partagent une identité d'environ 73%<sup>105, 106</sup> et adoptent des structures dimériques similaires à l'IFN $\gamma$ <sup>107, 108</sup>. L'IL-10 peut être produite par les cellules T, B et NK, les CD4, les macrophages, les mastocytes, les éosinophiles et les neutrophiles (revu en <sup>109</sup>) et différents mécanismes sont responsables de son expression selon la cellule productrice. Il semblerait cependant qu'elle soit constitutivement transcrite dans plusieurs types cellulaires<sup>110</sup>, en forte corrélation avec l'activation d'ERK, de la voie MAPK<sup>111, 112</sup>, bien que cette voie ne soit pas la seule impliquée<sup>113</sup>.

L'IL-10 inhibe la production des principales cytokines et chémokines pro-inflammatoires par les monocytes et les macrophages et augmente la production de leurs antagonistes en plus de s'auto-inhiber (revu en <sup>104</sup>). Elle exerce une activité inhibitrice sur les CD pro-inflammatoires, induit l'apoptose des CD plasmacytoïdes<sup>114</sup> et induit les cellules T anti-inflammatoires via les CD tolérogéniques<sup>115</sup>. L'expression de CMH II<sup>116</sup> ainsi que l'expression de la protéine anti-apoptotique bcl-2 et la capacité de prolifération<sup>117</sup> sont augmentées chez les cellules B par l'IL-10 mais la plupart des études tendent à démontrer un rôle limité de l'IL-10 sur les fonctions des cellules B<sup>104</sup>. À cause de ses effets

inhibiteurs sur les CPA, l'IL-10 entraîne indirectement une diminution de prolifération et de production de cytokines chez les cellules T CD4<sup>+</sup><sup>118, 119</sup>. Des effets antinomiques ont été observés chez les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> : de façon directe, l'IL-10, en combinaison avec de faibles doses d'IL-2, augmente la prolifération des T CD8<sup>+</sup> activées, alors que de façon indirecte, elle contribue à leur anergie via son action inhibitrice sur les CPA<sup>120</sup>.

Une augmentation de production d'IL-10 corrèle avec une rémission chez des modèles murins de maladies auto-immunes associées aux lymphocytes T<sup>121</sup> alors qu'elle corrèle avec une exacerbation du LÉD, une maladie associée aux lymphocytes B<sup>122</sup>. L'administration d'IL-10 mène quant à elle à des résultats contradictoires semblant indiquer l'importance du moment d'expression de la cytokine pour l'obtention d'une immunomodulation tolérogénique<sup>104</sup>.

### 1.3.1.6 Interleukine 12

Originellement identifiée comme « natural killer cell stimulatory factor »<sup>123</sup> et comme « cytotoxic lymphocyte maturation factor »<sup>124</sup>, l'IL-12 est un hétérodimère principalement produit par les cellules phagocytaires du système immunitaire inné, majoritairement les macrophages<sup>125</sup>, en réponse à une stimulation bactérienne ou parasitaire, et dans une moindre mesure par les cellules B<sup>126, 127</sup>. L'IL-12 est formée de deux protéines glycosylées, p40 et p35, liées de façon covalente<sup>123</sup> : incluant sa séquence signal de 22 acides aminés, p40 est une protéine de 328 acides aminés alors que p35 est une protéine de 219 acides aminés<sup>124</sup>. Le gène codant pour la p40 murine possède 70% d'homologie avec sa contrepartie humaine, alors que ce rapport est de 60% pour le gène de p35<sup>128</sup>. L'IL-12 murine est active sur les cellules humaines et murines, alors que l'inverse n'est pas vrai pour son homologue humaine<sup>128</sup>.

L'IL-12 induit la différenciation des cellules CD4<sup>+</sup> Th0 en cellules Th1 et cause une importante production d'IFN $\gamma$  par les cellules CD4<sup>+</sup> Th1 et par les cellules CD8<sup>+</sup><sup>72</sup>. Elle augmente également la formation de synapses immunologiques chez les lymphocytes T cytotoxiques et permet une réponse immunitaire efficace suite à une présentation peptidique de faible affinité, ce notamment avec des peptides du soi<sup>129</sup>.

### 1.3.1.7 Interféron gamma

Découvert en 1965<sup>130</sup>, ce troisième membre de la famille des IFNs et seul représentant des IFNs de type 2 possède principalement une fonction immunomodulatrice, en opposition avec la fonction majoritairement antivirale des IFNs de type 1 (IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ )<sup>131, 132</sup>. L'IFN $\gamma$  n'est produit que par les lymphocytes T ainsi que par les cellules NK<sup>132</sup> et se trouve très majoritairement sous forme homodimérique<sup>133, 134</sup>, la seule qui soit biologiquement active<sup>134</sup>. Les IFN $\gamma$  murins et humains partagent une homologie d'environ 60% au niveau de l'ADNc et d'environ 40% au niveau de la séquence des acides aminés<sup>135</sup>.

Chez les lymphocytes T, l'IFN $\gamma$  est produit par toutes les cellules CD8+ et, chez les cellules CD4+, par les cellules T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>0 (revu en <sup>132</sup>). Son expression génique peut être modulée à la hausse par l'IL-12<sup>124</sup> et inhibée de façon indirecte par l'IL-10<sup>105</sup>. L'IFN $\gamma$  produit suite à une stimulation *in vitro* n'étant pas significativement utilisé par les cellules, il est possible de le détecter en milieu cellulaire longtemps après la fin de la réponse<sup>136</sup>.

### 1.3.2 Lymphocytes T cytotoxiques

Tout comme les lymphocytes Th, les T cytotoxiques doivent passer par les étapes de sélection négative et de sélection positive afin de limiter la circulation de clones autoréactifs. Les cellules T CD8+ exercent leur activité cytotoxique en milieu inflammatoire suite à une présentation antigénique par les CMH I à leurs RCT<sup>137</sup>. Les T cytotoxiques sont le plus souvent associés à une défense contre les pathogènes intracellulaires, ceux-ci induisant majoritairement une présentation par les CMH I<sup>137</sup>. Ils peuvent cependant également être dirigés contre des pathogènes extracellulaires suite à un phénomène dit de « présentation croisée », qui implique la présentation par des CMH I d'antigènes normalement présentés par des CMH II<sup>138</sup>.

Une costimulation via CD40 et CD28 ainsi qu'une aide des lymphocytes CD4+ Th1 est la plupart du temps nécessaire à l'activation des CD8+ cytotoxiques<sup>139</sup>. Les lymphocytes T cytotoxiques activés produisent entre autres de l'IL-2, de l'IFN $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ , des cytokines pro-inflammatoires, en plus de posséder une activité cytolytique médiée par la sécrétion de Fas et de perforine<sup>139</sup>.

### 1.3.3 Lymphocytes T régulateurs

Dès la fin des années 60, des études ont démontré que des cellules T de souris tolérogéniques pour un antigène exogène donné pouvaient supprimer la production d'anticorps spécifiques de cet antigène chez des souris receveuses après transfert adoptif<sup>140</sup>. Des études subséquentes ont démontré que seules des reconstitutions immunitaires à partir de populations enrichies en cellules aujourd'hui reconnues comme étant des CD4+ arrivaient à inhiber complètement l'apparition de pathologies alors que les populations enrichies en cellules aujourd'hui connues comme étant des CD8+ n'y parvenaient pas<sup>141</sup>. Quelques 10 ans plus tard, une sous-population des cellules T CD4+ exprimant également la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 (CD25) a été identifiée comme étant à l'origine de la fonction suppressive préalablement observée<sup>142</sup>. Le facteur de transcription « Forkhead Box P3 » (FoxP3) a par la suite été identifié comme étant propre à ces lymphocytes T régulateurs (Tregs)<sup>143, 144</sup>.

Les Tregs peuvent directement supprimer l'activation, la prolifération ainsi que les fonctions effectrices de plusieurs cellules dont les lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques, les cellules NK et NKT, les lymphocytes B et les cellules dendritiques<sup>145</sup>. Les Tregs dits « naturels » ont une origine thymique et se développent en situation physiologique<sup>146, 147</sup> alors que les Tregs dits « induits » sont produits artificiellement<sup>143</sup>, notamment *in vitro* à l'aide de cellules CD4+ stimulées avec du TGF- $\beta$  ou de l'acide rétinoïque<sup>148</sup> ou *in vivo* par l'injection sous-immunogénique d'un ligand ayant une forte affinité pour le RCT de cellules T naïves, le tout dans des conditions évitant l'activation des APC<sup>149</sup>.

Les Tregs exercent un rôle direct dans la prévention de l'auto-immunité en limitant la réaction des clones autoréactifs ayant pu échapper à la sélection négative. Il a été démontré qu'une déplétion périphérique des Tregs ou un défaut de FoxP3 entraîne l'apparition d'auto-immunité chez des modèles murins<sup>147, 150, 151</sup>. Chez l'humain, un défaut génétique lié au facteur de transcription FoxP3 entraîne des auto-immunités multiples connues sous le terme de « syndrome d'immunodéficience, de polyendocrinopathies et d'entéropathies liées au chromosome X »<sup>152, 153</sup>.

### 1.3.4 Cellules NKT

Les cellules NKT sont des lymphocytes T non conventionnels possédant des récepteurs généralement associés aux cellules NK<sup>29</sup>, dont les KIR et Ly49<sup>154</sup> et reconnaissant des antigènes lipidiques liés à des molécules CD1d, qui sont structurellement proches des CMH I<sup>29, 155</sup>. Ces antigènes lipidiques peuvent être d'origine pathogène ou endogène durant une réponse inflammatoire<sup>156, 157</sup>. Elles possèdent des RCT dont la structure les définit en 2 types : le type I (ou invariable, iNKT) exprime un RCT invariable formé de V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 chez la souris et de V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 chez les humains tandis que le type II (ou variable, vNKT) exprime un RCT variable<sup>29, 158, 159</sup>. Elles ont un développement thymique<sup>160</sup> et passent par une phase de sélection positive<sup>161</sup>. Tout comme pour les cellules NK, les NKT peuvent sécréter des cytokines pro- et anti-inflammatoires, et contribuent donc également à réguler la réponse immunitaire des autres cellules<sup>29</sup>.

Les cellules iNKT, qui composent plus de 80% des NKT totales chez l'humain et chez la souris<sup>158, 162</sup>, sont les plus caractérisées et les plus étudiées à ce jour. Elles nécessitent un transport endosomal de CD1d et des fonctions lysosomales intactes par les cellules présentatrices alors que les vNKT nécessitent le plus souvent une présentation via des CD1d possédant des queues écourtées et défectueux pour le transport lysosomal<sup>163</sup>. Les premiers ligands connus des iNKT ont été un  $\alpha$ -galactosylcéramide dérivé d'éponges marines<sup>164, 165</sup>, puis des  $\alpha$ -glucuronycéramides microbiens similaires<sup>166, 167</sup>. Le premier ligand a été légèrement modifié pour en faire le produit communément appelé  $\alpha$ GalCer<sup>168</sup> et utilisé pour former les premiers tétramères spécifiques aux NKT murines et humaines. L'utilisation de l' $\alpha$ GalCer a permis d'émettre les premières hypothèses quant à la spécificité des cellules NKT pour les antigènes lipidiques<sup>29</sup>.

Chez la souris, les iNKT forment 0,5% des lymphocytes T du sang et des ganglions périphériques et elles représentent environ 2,5% des cellules T des ganglions spléniques, mésentériques et pancréatiques. C'est cependant dans le foie qu'elles ont la concentration la plus élevée, en comptant pour jusqu'à 30% des cellules T<sup>29</sup>. L'expression de CXCL16 par les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques (CESH) serait impliquée dans leur survie via une interaction avec CXCR6<sup>169</sup>.

## 1.4 Tolérance des cellules T

Bien que les lymphocytes T soient incontestablement un redoutable atout dans la défense contre les pathogènes, il n'en demeure pas moins qu'ils peuvent être une arme à double tranchant et se doivent par conséquent d'être finement contrôlés afin qu'ils ne s'attaquent pas aux cellules saines du soi. Deux mécanismes assurent ce contrôle : la tolérance centrale ainsi que la tolérance périphérique<sup>170</sup>.

### 1.4.1 Tolérance centrale

Après avoir passé les premières phases de sélection, la sélection bêta<sup>171</sup> puis la sélection positive<sup>172</sup>, les quelques 5 à 10% de thymocytes restants entrent dans une nouvelle phase de sélection, la sélection négative, qui élimine les cellules réagissant aux antigènes du soi<sup>173-175</sup>. Ces antigènes peuvent être présentés aux thymocytes par différentes CPA : les cellules épithéliales thymiques (CET) médullaires (mCET) et corticales (cCET), les cellules dendritiques (CD) thymiques, les macrophages ainsi que les cellules B thymiques<sup>170</sup>. Les CET ont la propriété d'exprimer des antigènes normalement restreints à certains tissus de l'organisme, une capacité nommée « promiscuous genetic expression »<sup>176</sup>. Cette capacité est notamment due au facteur de régulation de transcription Aire (pour autoimmune regulator)<sup>177, 178</sup>, qui est exprimé au thymus, principalement dans les mCET mais également dans une moindre proportion dans les CD thymiques<sup>179</sup>.

La sélection négative n'est cependant pas toujours entièrement efficace, et des clones autoréactifs peuvent être relâchés dans la circulation, normalement sans conséquence dommageable grâce aux autres mécanismes de contrôle<sup>170, 180, 181</sup>.

### 1.4.2 Tolérance périphérique

Il a été démontré que des clones autoréactifs, pour la plupart de faible affinité pour leur autoantigène, échappent régulièrement au contrôle de la tolérance centrale<sup>182</sup>. La tolérance périphérique permet d'éviter une réponse auto-immunitaire lorsque ces cellules quittent le thymus, et ce par des moyens intrinsèques et extrinsèques aux lymphocytes. Les moyens intrinsèques comprennent l'ignorance et l'anergie alors que les extrinsèques impliquent une modulation de la réponse immunitaire par des cellules tierces.

### 1.4.2.1 Facteurs intrinsèques

La présence de clones autoréactifs en circulation ne garantit pas qu'ils rencontreront leurs autoantigènes, ceux-ci pouvant par exemple se retrouver dans des sites immunoprivilégiés, en séquestration intracellulaire ou trop faiblement exprimés en surface pour permettre l'activation des lymphocytes<sup>183</sup>, d'où la notion d' « ignorance »<sup>184</sup>.

L'anergie est un état d'inactivation fonctionnelle généralement considéré comme irréversible<sup>185</sup>. Il peut être causé soit par manque de signaux de costimulation via CD28<sup>186-189</sup>, soit par des signaux inhibiteurs via l'antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA4)<sup>190, 191</sup> ou via le récepteur de mort cellulaire programmée (PD-1)<sup>191</sup>. Des études ont montré qu'en absence de signaux de danger, les cellules dendritiques immatures induisent l'anergie des cellules T auxquels elles présentent des antigènes<sup>191-193</sup>. La présentation antigénique par des cellules dendritiques tolérogéniques matures, exprimant de hauts taux de CCR7 et de CMHII, entraîne également l'anergie des cellules T<sup>194, 195</sup>.

### 1.4.2.2 Facteurs extrinsèques

Certaines cellules ayant une spécificité pour des autoantigènes peuvent se différencier en cellules régulatrices telles les CD8+ suppressives<sup>140, 196, 197</sup>, les Tregs<sup>198-201</sup> ainsi que les cellules B régulatrices<sup>68, 202</sup>. Ces cellules permettent le maintien d'une tolérance active en périphérie en étant capables d'effectuer leur fonction en présence des antigènes à l'origine de la réaction immunitaire.

Le milieu cytokinique permet également une régulation extrinsèque indirecte en agissant sur des cellules qui ont une action directe sur les lymphocytes T. Un exemple de ce type de régulation serait le cas précédemment mentionné des cellules dendritiques pouvant être tolérogéniques ou activatrices selon le profil cytokinique les entourant. Les cellules NKT ont la possibilité d'entre autres sécréter de l'IL-4 et de l'IFN $\gamma$  et pourraient par conséquent contribuer à moduler la réponse vers un profil plus tolérogénique ou plus cytotoxique<sup>29, 203</sup>. Des études ont démontré qu'une modulation de leur activité pouvait notamment prévenir l'apparition de certaines atteintes auto-immunes telles le diabète<sup>204</sup>, l'AR<sup>205</sup> ou l'EAE<sup>206, 207</sup>.

## 1.5 Épuisement cellulaire

Décrit pour la première fois en 1993<sup>208</sup>, l'épuisement est un état différent de l'anergie<sup>209</sup> qui se traduit principalement chez les cellules par la perte progressive des fonctions effectrices et par l'expression de récepteurs inhibiteurs. Cet état permet la contraction de la réponse immunitaire après sa phase effectrice et nécessite un contrôle rigoureux : déclenché trop hâtivement, il peut mener à la chronicité de certaines infections virales<sup>208, 210</sup> et trop tardivement, il peut mener à des immunopathologies, et notamment à des atteintes auto-immunes<sup>211, 212</sup>.

L'épuisement des cellules T CD8+ se traduit par la perte hiérarchique des fonctions effectrices. La production d'IL-2 et de granzyme B ainsi que la capacité à proliférer sont les premières fonctions à être inhibées, suivies par la production de TNF- $\alpha$  puis par la production d'IFN $\gamma$  (revu en <sup>213, 214</sup>). Généralement réversible, cet état peut cependant mener à la délétion des cellules lorsque prolongé<sup>210</sup>.

### 1.5.1 Programmed-death 1

La protéine transmembranaire de mort cellulaire programmée 1 (PD-1) est un des principaux récepteurs inhibiteurs exprimés par les cellules en épuisement<sup>215</sup>. Identifiée en 1992 par Ishida et al.<sup>216</sup>, ce récepteur partage 23% d'homologie avec la séquence en acides aminés du récepteur négatif de costimulation CTLA-4 mais, à l'instar de ce dernier, se trouve sous forme monomérique à la surface cellulaire<sup>217, 218</sup>. PD-1 peut être exprimée à la surface des cellules T, B et dendritiques myéloïdes<sup>219</sup> et possède deux ligands, les protéines transmembranaires PD-L1 et PD-L2<sup>220, 221</sup>. PD-L1 est exprimé de façon constitutive sur les cellules T et B, les macrophages ainsi que sur les CD et a été détecté dans d'autres cellules non-lymphoïdes alors que PD-L2 n'est exprimé que par les macrophages activés ainsi que par les CD (revu en <sup>222</sup>).

Divers modèles murins ont démontré qu'une déficience en PD-1 provoque l'apparition de maladies auto-immunes découlant d'une suractivation du système immunitaire et variant selon la souche de souris<sup>211, 212</sup>.

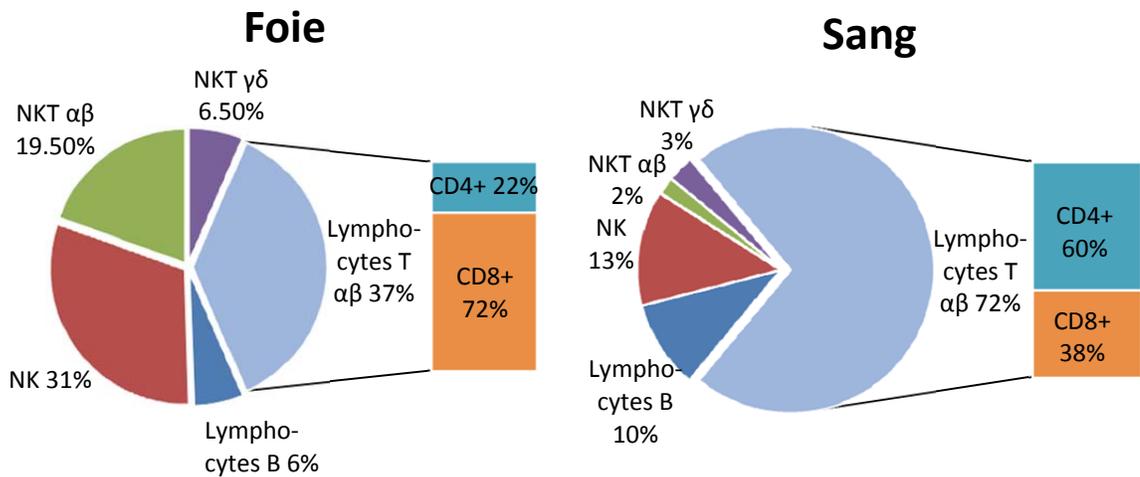
## 1.6 Foie

### 1.6.1 Généralités

Situé entre les circulations portale et systémique, le foie est constamment exposé à des antigènes alimentaires et à des endotoxines en provenance du tractus gastro-intestinal. De cette situation découle un impératif immunogénique dichotomique : le foie se doit de maintenir une réponse tolérogénique envers les antigènes exogènes ne posant aucun danger, tout en étant capable d'éliciter une réponse immunologique efficace contre ceux-ci en cas de menace.

Les cellules immunitaires des foies humains et murins se composent majoritairement de cellules du système immunitaire inné<sup>223</sup> (figure 2 et figure 3). Les lymphocytes hépatiques se composent de cellules lymphoïdes conventionnelles et non conventionnelles<sup>224</sup> : ces dernières sont présentes en proportion relativement élevée dans le foie comparé aux lymphocytes des autres organes et de la circulation sanguine et soulignent le caractère immunologique unique de cet organe (Figure 2).

Les cellules résidentes capables de présenter des antigènes aux cellules du système immunitaire acquis sont les CD, les cellules de Kupffer (CK), les cellules stellaires (ou cellules d'Ito), les hépatocytes et les CESH<sup>225</sup> (Figure 3) : les propriétés tolérogéniques du foie en état physiologique sont en grande partie attribuables à une déficience de ces cellules à fournir des signaux de costimulation aux lymphocytes T et nécessaires à leur activation lors d'une présentation antigénique et/ou à leur production de médiateurs anti-inflammatoires.



**Figure 2 Populations lymphoïdes hépatiques et sanguines chez l'humain.** Les différences populationnelles montrent clairement le caractère immunologique unique du foie, qui possède une plus grande proportion de cellules du système immunitaire inné et de cellules dont le répertoire immunitaire est restreint que ce qui est normalement retrouvé dans la circulation sanguine. Adapté de <sup>23</sup>.

### 1.6.2 Immunologie hépatique

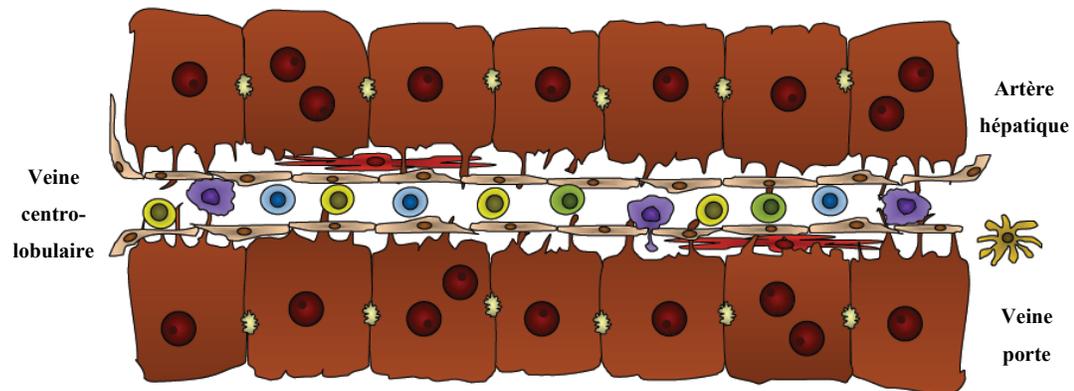
La stimulation constante des CK par les lipopolysaccharides (LPS) bactériens et les différents antigènes alimentaires entraîne chez ces cellules une relâche de TNF- $\alpha$ , d'IL-10, de TGF- $\beta$ , d'oxyde nitrique et de prostaglandines E2 qui diminuent l'activation des cellules CD4+ par les cellules présentatrices d'antigènes<sup>226-229</sup>, ainsi qu'une production moindre d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ <sup>226</sup>. En présence d'éléments plus pathogéniques, les CK sont cependant capables d'activer efficacement des lymphocytes T et de relâcher des quantités accrues de cytokines pro-inflammatoires<sup>230</sup>.

Les CESH, tout comme les CD, semblent être dans un état immature en situation physiologique et induisent une immunomodulation des lymphocytes T auxiliaires *in vitro* en limitant l'expansion et la production d'IFN- $\gamma$  des cellules Th1 et en promouvant l'expansion et la production d'IL-4 des Th2<sup>231</sup>.

Les CD plasmacytoïdes (pCD) du foie sont des cellules résidentes<sup>232</sup> alors que les CD myéloïdes (mCD) peuvent migrer vers des tissus lymphatiques<sup>233</sup>. En condition physiologique, la plupart des CD possèdent un phénotype immature, probablement causé par la présence des hauts taux constitutifs d'IL-10 et de TGF- $\beta$  hépatiques. Ces CD inactivées pourraient être partiellement responsables de la tolérogénicité du foie en inhibant, via CTLA4 et PD-1, la prolifération et la production de cytokines des lymphocytes cytotoxiques activés<sup>191</sup> et en n'exprimant que peu de CMH I/II et de molécules de costimulation<sup>234</sup>.

Les cellules stellaires stockent environ 80% des réserves corporelles de vitamine A<sup>235</sup> et peuvent efficacement présenter des peptides aux lymphocytes T CD4+ et CD8+<sup>236</sup>. Elles peuvent également présenter des antigènes aux cellules NKT et promouvoir la prolifération homéostatique de celles-ci via leur production d'IL-15<sup>236</sup>. En réponse à un stress cellulaire, les cellules stellaires se différencient en myofibroblastes produisant de la matrice extracellulaire, ce qui leur confère un rôle dans le développement de fibroses et de cirrhoses<sup>237</sup>. Une stimulation par ces cellules peut entraîner des réponses pro- ou anti-inflammatoires selon le contexte<sup>236, 238, 239</sup>.

Bien que les hépatocytes puissent activer les lymphocytes cytotoxiques par leur expression constitutive du CMH I et les lymphocytes auxiliaires naïfs par leur expression de CMH II en conditions inflammatoires via les fenestrations des sinusoides<sup>240</sup>, cette stimulation résulte le plus souvent en tolérance de la part des lymphocytes T CD8+ par manque de signaux de costimulation et par une réponse Th2 de la part des T CD4+<sup>241</sup>. La présentation antigénique par les hépatocytes peut également entraîner une immunomodulation des cellules déjà dédiées à une réponse Th1 en limitant leur production d'IFN- $\gamma$ <sup>241</sup>. Toutes les protéines de phase aiguë ainsi que la plupart des composants du complément sont également synthétisés dans le foie, principalement par les hépatocytes<sup>242</sup>.



**Figure 3 Représentation schématique de sinusoié hépatiques.** Les CESH (beige), fenestrées, forment des capillaires reliant l'artère hépatique et la veine porte à la veine centrolobulaire. Les cellules stellaires (rouge) résident dans l'espace de Disse situé entre les capillaires et les hépatocytes (brun). Les lymphocytes T (bleu), les cellules NK (jaune) ainsi que les cellules NKT (vert) peuvent interagir avec les CESH, les cellules de Kupffer (violet) ainsi qu'avec des prolongements des hépatocytes sortant via les fenestrations endothéliales. Issu de <sup>23</sup>.

## 1.7 Hépatite auto-immune

### 1.7.1 Historique

Appelée dans un premier temps « hépatite chronique » par Kelsall en 1947<sup>243</sup> et décrite par Waldenström en 1950<sup>244</sup> et par Kunkel en 1956<sup>245</sup> comme étant une cirrhose hépatique chronique affectant surtout les jeunes femmes, l'hépatite auto-immune (HAI) a par la suite été connue sous le terme d'« hépatite lupoïde » dû à la présence chez les patients atteints de cellules avec un facteur antinucléaire préalablement observées chez des patients atteints de LÉD<sup>246</sup>. La maladie s'avérant distincte du LÉD, elle acquit son appellation actuelle d'« hépatite auto-immune » en 1965<sup>247</sup>.

### 1.7.2 Caractéristiques biochimiques, cliniques et génétiques

L'HAI consiste en un bris de tolérance immunitaire envers des autoantigènes hépatiques menant à une destruction progressive du parenchyme hépatique<sup>248</sup>. Cette maladie chronique se caractérise par une hypergammaglobulinémie, la présence d'autoanticorps circulants mais non pathogéniques, une forte corrélation avec les haplotypes HLA B8, DR3 et DR4<sup>18, 248, 249</sup> et de faibles niveaux du facteur du complément C4a<sup>18, 250</sup>. Il est de plus courant de rencontrer d'autres atteintes auto-immunitaires chez les patients atteints de la maladie ainsi que chez les membres de leur famille au premier degré<sup>18, 251</sup>.

Les manifestations biochimiques et cliniques de la maladie sont multiples et varient selon les patients : en plus des éléments mentionnés précédemment, elles peuvent notamment inclure une élévation des transaminases hépatiques, une élévation de la bilirubine, de la fatigue, de l'anorexie, une perte de poids, la présence d'ictère, et/ou de l'arthralgie<sup>18, 248</sup>. Le diagnostic de la maladie s'effectue selon le système de pointage développé par l' « International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) » en 1993, puis révisé en 1999 (Tableau 1) : un score supérieur à 15 avant traitement ou à 17 en cours de traitement permet un diagnostic sans équivoque de la maladie alors qu'un score entre 10 et 15 avant traitement ou entre 12 et 17 après traitement permet d'établir que la maladie peut être considérée comme probable chez le patient<sup>18, 248</sup>.

Si en Amérique du Nord ainsi qu'en Europe, HLA-B8, HLA-DRB1\*0301 (DR3) et HLA-DRB1\*0401 (DR4) sont associés à une susceptibilité envers l'HAI, il n'en demeure pas moins que d'autres allèles de susceptibilité ont été identifiés<sup>252-254</sup>. De ceux-ci, mentionnons notamment DRB1\*0405 et DRB1\*1301, qui ont des facteurs de risque de respectivement 10,4 et 16,3 dans des populations argentines alors que HLA-DRB1\*0301 y a un facteur de risque de 3,0<sup>255</sup>. En Amérique du Nord et au Royaume-Uni, ce même HLA-DRB1\*0301 est associé à un facteur de risque de 3,39<sup>256</sup>.

La présence d'allèles de susceptibilité propres à certaines populations ou ayant des facteurs de risques différents d'une population à l'autre contribue positivement à l'hypothèse de l'importance de facteurs environnementaux en plus des facteurs génétiques

Paramètres	Pointage	Paramètres	Pointage
<b>Sexe féminin</b>	+2		
<b>Ratio ALP:AST (ou ALT)</b>		<b>Usage de drogues</b>	
< 1,5	+2	Oui	-4
1,5 - 3,0	0	Non	+1
> 3,0	-2	<b>Consommation d'alcool</b>	
<b>Globulines sériques ou IgG (fois la normale)</b>		<25 g/jour	+2
> 2,0	+3	> 60g/jour	-2
1,5 - 2,0	+2	<b>HLA DR3 ou DR4</b>	+1
1,0 - 1,5	+1	<b>Autre maladie auto-immune</b>	+2
<b>ANA, SMA ou LKM1</b>		<b>Histologie du foie</b>	
> 1:80	+3	Hépatite d'interface	+3
1:80	+2	Infiltrats lymphocytaires prédominants	+1
1:40	+1	Hépatocytes en rosettes	+1
< 1:40	0	Aucun des éléments précédents	-5
<b>AMA positif</b>	-4	Changements biliaires	-3
<b>Séropositivité pour d'autres autoanticorps</b>		Autres changements	-3
pANCA, LC-1, SLA/LP, ASGPR, actine	+2	<b>Réponse au traitement</b>	
<b>Marqueurs d'hépatites virales</b>		Complète	+2
Négatif	+3	Rechute	+3
Positif	-3		

**Tableau 1** Système de pointage révisé de l'IAIHG pour le diagnostic de l'HAI. Un score supérieur à 15 avant traitement ou à 17 en cours de traitement permet un diagnostic sans équivoque de la maladie alors qu'un score entre 10 et 15 avant traitement ou entre 12 et 17 après traitement permet d'établir que la maladie peut être considérée comme probable. Adapté de <sup>18</sup>.

pour le déclenchement de la maladie. En plus d'augmenter la prédisposition à la maladie, certains allèles influenceraient également le cours de celle-ci : par exemple, HLA-B8 est associé à une sévérité accrue de la maladie et à un plus haut risque de nécessité de transplantation hépatique et DRB1\*0401-DRB4\*0103 à un risque accru de développer d'autres affections auto-immunes<sup>249, 252</sup>.

Comme c'est le cas pour plusieurs autres MAI, les patients atteints d'HAI ont une susceptibilité accrue de développer d'autres MAI. L'HAI de type 1 est notamment associée à un risque accru de colite ulcéreuse, de maladie de Crohn, de vascularite, d'AR, de

thrombocytopénie, d'alvéolite fibrosante ainsi que d'anémie hémolytique alors que l'HAI de type 2 est entre autres liée à un risque accru d'entéropathie auto-immune, de thyroïdite, de diabète, de vitiligo et de syndrome lymphoprolifératif auto-immun<sup>251, 254</sup>. Elle est de plus présente chez de 10% à 20% des patients atteints de polyendocrinopathies auto-immunes – candidoses – dystrophies ectodermiques (PEACDE)<sup>254</sup>.

### 1.7.3 Histologie

De par ses manifestations cliniques et biochimiques proches de celles du LÉD, une biopsie hépatique est nécessaire à l'établissement d'un diagnostic d'HAI<sup>18</sup>. Les biopsies de patients atteints de la maladie montrent classiquement une hépatite d'interface (une inflammation des espaces portaux et péri-portaux) avec infiltrats nécrotico-inflammatoires lymphoplasmocytaires, avec ou sans infiltrats intralobulaires; d'autres types de manifestations histologiques, telles que des nécroses périportales en pont, des hépatocytes multinucléés ou en rosettes ou des lésions des canaux biliaires peuvent cependant également être rencontrées<sup>18, 251, 257, 258</sup>. Si la grande majorité des cellules infiltrantes sont des lymphocytes T CD4+, il peut également y avoir présence de cellules T CD8+, de cellules B et de plasmocytes dans les infiltrats<sup>257</sup>.

### 1.7.4 Pathogenèse

L'HAI demeure une maladie dont l'étiologie nous est encore inconnue et dont les conséquences peuvent s'avérer fatales lorsque non traitée<sup>248, 254</sup>. Il est cependant clair qu'il s'agit d'une maladie multifactorielle comportant des facteurs de prédisposition génétiques et environnementaux puisque certains allèles sont plus fortement représentés parmi certaines populations de patients atteints de la maladie, mais que la possession de ces allèles ne mène pas nécessairement au développement de la maladie.

Une des hypothèses quant à la pathogenèse de l'HAI repose sur le concept de mimétisme moléculaire. Cette hypothèse présuppose une réaction croisée où un agent exogène entraînerait le développement d'une réaction immunitaire qui se retournerait ensuite contre des autoantigènes similaires. Cette théorie est renforcée par le fait que de telles similarités ont en effet été trouvées dans le cadre de plusieurs maladies auto-

immunes : par exemple, des lymphocytes autoréactifs envers la protéine basique de la myéline ciblent également des épitopes du virus d'Epstein-Barr, des virus de l'influenza de type A et du papillomavirus humain lors de SP<sup>259</sup> et des autoanticorps anti-gangliosides se lient à des épitopes de *C. jejuni* lors du syndrome de Guillain-Barré<sup>260</sup>. Concernant l'HAI, les autoanticorps anti-cytosol hépatique (anti-LC1), dirigés contre la formiminotransférase cyclodéaminase (FTCD), ont une réaction envers des épitopes similaires à certains du virus humain de l'herpès de type 6 tandis que les anticorps anti-microsomes du foie et du rein (anti-LKM1), dirigés contre le cytochrome P450 2D6 (CYP2D6), reconnaissent des épitopes similaires à certains de l'herpès simplex de type 1 et du virus de l'hépatite C (VHC)<sup>261-263</sup>. Cette hypothèse reste cependant difficile à prouver chez l'humain puisque l'agent pathogène ayant potentiellement pu causer la maladie a de fortes chances d'avoir été éliminé longtemps avant le diagnostic.

Une autre hypothèse suppose que suite à une lyse cellulaire induite par la présence d'un élément pathogène, une présentation d'autoantigènes normalement non exposés au système immunitaire permettrait l'activation de clones autoréactifs dans un contexte pro-inflammatoire<sup>264</sup>. Une dérive de la réponse immunitaire ainsi engendrée permettrait également d'élargir le répertoire des autoantigènes reconnus, un mécanisme connu sous le terme d'étalement épitopique (« epitope spreading »)<sup>265</sup>.

D'autres hypothèses quant à la pathogenèse de la maladie incluent notamment un rôle des oestrogènes<sup>266</sup> ou de certains médicaments<sup>267, 268</sup>, une présence accrue de T CD4+ et d'anticorps chez les femmes<sup>4</sup> et une implication des Tregs<sup>269, 270</sup>. Une étude récente a également montré que des lymphocytes T possédant des RCT capables de reconnaître 2 antigènes, soit un étant un épitope viral et l'autre étant un autoantigène non similaire, sont capables de briser la tolérance périphérique et d'éliciter une réaction auto-immune après infection virale<sup>271</sup>. Un tel mécanisme pourrait aussi participer à la pathogenèse de l'HAI.

### 1.7.5 Types

Deux types d'HAI peuvent être distingués en fonction de la nature des autoanticorps retrouvés chez les patients : le type 1 est caractérisé par la présence d'anticorps anti-muscles lisses (SMA), anti-noyaux (ANA) et/ou anti-antigènes solubles hépatiques

(SLA)<sup>18, 272-275</sup> alors que le type 2 est caractérisé par la présence d'anti-LKM1 et/ou anti-LC1<sup>18, 276, 277</sup>. Des anti-SLA peuvent cependant également être retrouvés chez des patients de type 2<sup>272</sup>. Seuls les anticorps du type 2 ainsi que les anti-SLA ont des cibles déterminées : les anticorps anti-LKM1 ciblent des épitopes linéaires et conformationnels du CYP2D6<sup>254, 278</sup> alors que les anti-LC1 reconnaissent des épitopes linéaires et conformationnels de la FTCD<sup>262, 277</sup>, une enzyme impliquée dans le métabolisme du folate et hautement exprimée dans les hépatocytes<sup>279, 280</sup>. Pour ce qui est des SLA, ils sont dirigés contre trois épitopes d'une ribonucléine de transfert de 422 acides aminés (tRNP<sup>(ser)(sec)</sup>)<sup>281, 282</sup>. Les anti-LKM1 peuvent également être retrouvés lors d'infections chroniques par le VHC ou par le virus de l'hépatite D (VHD), d'hépatites médicamenteuses ou de PEACDE<sup>283</sup> alors que les anti-LC1 peuvent être également rencontrés chez des patients infectés par le VHC<sup>284</sup>. Quant aux anti-SLA, ils peuvent également être retrouvés chez des patients atteints de cholangite auto-immune ou lors d'infections par le VHC<sup>285, 286</sup>.

Les antigènes cibles des SMA et des ANA sont, pour leur part, hétérogènes et non clairement définis<sup>254</sup>. Les SMA sont dirigés contre des éléments du cytosquelette tels que l'actine, la tubuline, la vimentine, la desmine ou la squelettine<sup>283</sup> et peuvent se retrouver dans d'autres atteintes auto-immunes, hépatiques ou non<sup>254</sup>. Les ANA peuvent être, quant à eux, dirigés contre les centromères, des ribonucléoprotéines, la cycline A, les histones ou d'autres antigènes<sup>287, 288</sup> et peuvent également se retrouver lors de cirrhoses biliaires primitives, de cholangites sclérosantes primitives, d'hépatites virales, d'hépatites médicamenteuses ainsi que de cirrhoses d'origines alcooliques et non alcooliques<sup>283, 289</sup>. Les autoanticorps sont un des signes distinctifs de la maladie mais ne contribuent pas à la destruction hépatique.

Bien que les deux types d'HAI soient à prépondérance féminine, le type 2 l'est davantage, avec neuf fois plus de patients de sexe féminin que de sexe masculin, contre trois fois plus pour le type 1<sup>257</sup>. L'âge moyen au diagnostic diffère également pour les deux types d'HAI, mais demeure dans les deux cas pédiatrique : il est de 10 ans pour le type 1 et de 6,5 ans pour le type 2<sup>251, 273</sup>. Le diagnostic de la maladie n'est cependant pas restreint à l'âge pédiatrique et peut s'effectuer à tout âge<sup>18</sup>.

### 1.7.6 Thérapies

L'HAI est traitée par immunosuppression, mais des thérapies non immunosuppressives peuvent également y être associées (revues en <sup>254</sup>). La thérapie standard est la prise de predniso(lo)ne, en monothérapie ou en concomitance avec de l'azathioprine<sup>254</sup>. Cependant, d'autres thérapies, potentiellement mieux supportées et avec moins d'effets secondaires, ont émergé avec les années; c'est notamment le cas de la cyclosporine, qui peut être utilisée durant les 6 premiers mois de traitement et qui a l'avantage de limiter les changements corporels induits par les hautes doses de médication standard en début de traitement<sup>290</sup>.

La prise de médication permet normalement une normalisation clinique et biochimique dans les 3 à 6 mois suivant le début de la thérapie, mais les améliorations histologiques sont, elles, généralement plus lentes à être observées<sup>254</sup>. La thérapie peut s'accompagner de plusieurs effets secondaires, le plus souvent cosmétiques à court terme, mais également potentiellement plus graves, tels le diabète, l'ostéopénie ou l'hypertension dans le cas d'une monothérapie à la predniso(lo)ne, à long terme<sup>291</sup>. De plus, les effets cushingoïdes (i.e. similaires à ceux rencontrés lors d'un syndrome de Cushing, dû à une hyperproduction de glucocorticoïdes par le cortex de la glande surrénale et pouvant entraîner des changements corporels visibles tels une augmentation de volume au niveau du visage et du cou, des vergetures cutanées et de l'hirsutisme) des stéroïdes tendent à diminuer l'adhérence au traitement des patients<sup>291</sup>. L'HAI étant une maladie affectant souvent les jeunes femmes, une modification de l'image corporelle par la médication peut avoir des répercussions dépassant le simple cadre physique pour être de nature plus psychologique. Si la thérapie standard demeure un choix de prédilection pour plusieurs, il convient de prendre en considération qu'il pourrait ne pas convenir à tous les patients et de prendre une décision en fonction d'une vue globale du patient, et non centrée uniquement sur la maladie.

## 1.7.7 Modèles murins

### 1.7.7.1 Souris S-100

Un des premiers modèles murins expérimentaux utilisé dans l'étude de l'HAI a été la souris S-100, générée à partir de souris C57Bl/6 auxquelles étaient injectées par voie IP du surnageant d'homogénats de foies syngéniques centrifugés à 100 000 g (S-100) et de l'adjuvant (initialement avec du polysaccharide de *Klebsiella pneumoniae*<sup>292</sup> puis avec de l'adjuvant complet de Freund (ACF)<sup>293</sup>). Ce modèle biologique montrait une hépatite transitoire d'une durée de 6 mois, avec une élévation des transaminases et un score histologique maximaux à 4 semaines postinjection. Ces résultats étaient spécifiques à la souris, des rats Lewis ne montrant aucun signe d'inflammation après une injection similaire. L'histologie des souris montrait la présence de nécroses hépatiques ainsi que d'infiltrats inflammatoires périvasculaires.

D'autres similitudes avec l'HAI montrées par ce modèle étaient l'influence de la génétique (les souris C57Bl/6 s'avérant plus susceptibles à la maladie que les souris CH3 ou BALB/c) ainsi que la présence d'autoanticorps (ici des anti-épitopes du S-100). Prometteur à ses débuts, ce modèle s'est avéré non spécifique suite à une étude contredisant les témoins négatifs utilisés dans les études précédentes et montrant que l'administration d'ACF induisait à elle seule non seulement l'inflammation observée au foie, mais également des inflammations spléniques et pulmonaires<sup>294</sup>. Il a cependant permis des découvertes potentiellement applicables à l'HAI, notamment en démontrant l'importance que pourraient avoir les Tregs dans la résolution de la maladie en identifiant des cellules régulatrices parmi les splénocytes qui pouvaient supprimer la fonction des cellules autoréactives *in vitro*<sup>295</sup>.

### 1.7.7.2 Concanavaline A

La concanavaline A (ConA) est une lectine mitogène issue de la *Canavalia ensiformis*. Son action sur le système immunitaire est à la fois directe et indirecte : elle provoque une activation polyclonale des lymphocytes T, ce qui entraîne à son tour une relâche massive de cytokines et mène à une activation des cellules environnantes<sup>296, 297</sup>.

L'injection IV par voie caudale de ConA provoque chez les souris une hépatite transitoire ainsi qu'une augmentation dose-dépendante des transaminases sériques dans les 8 heures suivant l'injection<sup>296</sup>. Les dommages hépatiques causés chez les souris semblent indépendants de leur génétique puisque les BALB/c montrent des atteintes similaires aux C57Bl/6<sup>296, 297</sup>.

L'atteinte hépatique est médiée dans ce modèle par les lymphocytes T puisqu'aucune inflammation n'est observée chez les souris athymiques et SCID<sup>296, 298-300</sup> et qu'un traitement préalable des souris avec de la cyclosporine A ou du FK506, deux immunosuppresseurs, prévient l'apparition de dommages hépatiques<sup>296</sup>. La présence de cellules NK, NKT ainsi que de CK est également nécessaire au développement d'une atteinte hépatique dans ce modèle, car leur déplétion se solde par une absence d'atteinte hépatique<sup>296, 301</sup>.

Bien qu'ayant l'avantage de la rapidité et présentant certaines caractéristiques de l'HAI, ce modèle ne comporte pas de réaction spécifique contre des antigènes hépatiques, n'implique pas de développement d'autoanticorps, ne semble pas influencé par la génétique et ne présente qu'une atteinte hépatique temporaire, ce qui en fait un modèle difficilement représentatif pour l'étude de la maladie.

### 1.7.7.3 Souris IFN $\gamma$

L'équipe de Toyonaga et al. a présenté un modèle de souris transgénique chez lequel l'expression génique de l'IFN $\gamma$  est régulée par un promoteur hépatique, le composant sérique de l'amyloïde P<sup>302</sup>. La production hépatique de la cytokine pro-inflammatoire y est suffisante pour déclencher une inflammation nécrotique intralobulaire à partir de la 3<sup>e</sup> semaine, suivie par une infiltration lymphocytaire dans la région portale à partir de la 5<sup>e</sup> semaine, par la présence de fibrose à partir de la 26<sup>e</sup> semaine et par une prolifération ductale à partir de la 37<sup>e</sup> semaine. Une élévation des transaminases sériques est observée chez ces souris à partir de la 4<sup>e</sup> semaine.

Bien que ce modèle permette le déclenchement spontané d'une hépatite chronique et une inflammation spécifique au foie, on peut lui reprocher son manque de spécificité envers des antigènes hépatiques et l'absence d'autoanticorps, qui sont pourtant une des

caractéristiques menant au diagnostic de l'HAI. De plus, les mâles de ce modèle développent autant d'atteintes hépatiques que les femelles, ce qui est en opposition avec la prépondérance féminine observée chez les patients atteints d'HAI. Étant donné qu'il a été démontré que certains mâles murins étaient résistants au développement d'HAI de par un nombre accru de Tregs en circulation<sup>270</sup>, il demeure probablement plus prudent au stade actuel de préférer voir une prépondérance féminine dans les modèles animaux de la maladie.

#### **1.7.7.4 Souris Alb-GP-33**

La souris transgénique Alb-GP-33 exprime l'épitope majeur CD8+ de la glycoprotéine 33 (GP33) du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) sous le contrôle du promoteur d'albumine (Alb-GP33), ce qui lui assure une forte expression hépatique, mais également une expression de 100 à 1000 fois plus faible au thymus<sup>303</sup>. Environ 90% des clones autoréactifs de cette souris ne passent de ce fait pas l'étape de la sélection négative de la tolérance centrale et les 10% restants n'arrivent pas à déclencher d'atteintes hépatiques.

Afin de briser la tolérance des clones autoréactifs ayant échappé à la délétion, les créateurs de ce modèle ont tenté d'effectuer un transfert adoptif de cellules T naïves arborant un RCT transgénique spécifique à la GP33 et d'infecter les souris avec du LCMV puisqu'il exprime naturellement la GP33, et ce dans un contexte potentiellement plus pro-inflammatoire. Cependant, aucune de ces 2 méthodes n'a causé d'élévation des transaminases sériques, laissant deviner que les cellules étaient toujours dans un état d'ignorance. Suite à ce constat d'échec, les auteurs ont donc décidé de croiser la souris avec une autre souche murine exprimant un antigène de l'hépatite B afin de la rendre plus sensible aux cytokines pro-inflammatoires. Ils ont par la suite de nouveau effectué un transfert adoptif de cellules ayant un RCT transgénique spécifique à la GP33, mais cette fois-ci en concomitance avec une infection au LCMV, ce qui a su provoquer une atteinte hépatique transitoire.

De par sa nécessité de recourir à des conditions peu physiologiques et de par l'éphémérité de l'hépatite qu'il induit, ce modèle peut difficilement être utilisé comme modèle valide d'HAI.

#### **1.7.7.5 Souris invalidée pour le TGF- $\beta$ 1**

En 2001, l'équipe de Gorham et al. a proposé un modèle d'HAI à partir de souris BALB/c invalidées pour le TGF- $\beta$ 1<sup>304</sup>. Ces souris développent spontanément dans leurs 2 premières semaines de vie des inflammations nécrotiques au foie et une augmentation de leurs transaminases sériques. Dans ce modèle, les souris déplétées en cellules CD4+ ne développent pas d'atteintes hépatiques et les souris malades montrent des taux en moyenne 7 fois plus élevés de cellules CD4+ que les contrôles. Les cellules CD4+ des souris malades seraient des cellules effectrices ou mémoires produisant de grandes quantités d'IFN $\gamma$  et peu d'IL-4 alors que celles des contrôles seraient d'un phénotype naïf.

Ce modèle montre bien l'influence de la génétique, car des souris 129/CF-1 et C57Bl/6 invalidées pour le TGF- $\beta$ 1 ne développent pas d'atteintes hépatiques spontanées. Cependant, autant les souris BALB/c que 129/CF-1 et C57Bl/6 développent des atteintes pulmonaires et cardiaques. Les souris C57Bl/6 développent en plus des atteintes aux glandes salivaires ainsi qu'à l'intestin<sup>305</sup>.

Si ce modèle possède les avantages de la spontanéité, de la spécificité génétique ainsi que de l'implication des cellules CD4+ dans la pathogenèse de l'atteinte hépatique, il demeure aspécifique au foie, ne présente aucune spécificité antigénique ni aucun autoanticorps et ne démontre aucune prépondérance féminine, ce qui en fait un modèle difficilement utilisable pour l'étude de l'HAI.

#### **1.7.7.6 Souris TTR-NP**

La souris TTR-NP est un modèle murin d'hépatite auto-immune qui a été développé dans notre laboratoire<sup>306</sup>. Ce modèle présente plusieurs des caractéristiques humaines de la maladie : une présence d'autoanticorps (ici des anticorps anti-NP), un phénotype majoritairement Th1, une élévation des niveaux d'alanine aminotransférase (ALT) et la présence d'inflammation intralobulaire, portale et/ou périportale. Cette souris transgénique

sur fond C57Bl/6 exprime la nucléoprotéine (NP) du LCMV sous contrôle du promoteur modifié de la transthyrétine. Cette restriction permet à la NP de n'être exprimée que dans les hépatocytes, sans expression au thymus, et d'éviter de ce fait une délétion centrale des clones potentiellement autoréactifs telle que vue chez le modèle Alb-GP-33. La maladie a été dans un premier temps déclenchée dans ce modèle par trois injections IM à 14 jours d'intervalle d'un plasmide codant pour la protéine NP ainsi que pour la séquence sécrétoire de CTLA-4 et d'un plasmide codant pour l'interleukine-12 (IL-12) murine. Le contexte pro-inflammatoire induit par cette injection permet de briser la tolérance périphérique et d'engendrer une réponse immunitaire envers la protéine NP exprimée au foie. Tel que pour notre modèle de xénoimmunisation par autoantigènes humains, des expériences subséquentes ont permis d'établir qu'il était également possible de briser la tolérance immunitaire chez les souris TTR-NP grâce à l'injection IV d'un vecteur adénoviral codant pour la NP et développé dans notre laboratoire. Dans le cadre de mon projet, la maladie a été déclenchée chez la souris TTR-NP par des injections IV.

#### **1.7.7.7 Xénoimmunisation avec les autoantigènes humains de l'HAI de type 2**

Un modèle basé sur un principe de mimétisme moléculaire a été proposé par notre laboratoire en 2004<sup>307</sup>. Dans celui-ci, une atteinte hépatique chronique est provoquée grâce à une injection IM de plasmides codant pour la partie sécrétoire de CTLA-4 ainsi que pour les 2 antigènes humains principaux de l'HAI de type 2, soit le CYP2D6 et la FTCD, à des souris C57Bl/6 en concomitance avec des plasmides codant pour l'IL-12. Les xénoantigènes partagent environ 80% d'homologie avec leurs contreparties murines. Si dans un premier temps cette injection induit une réponse dirigée exclusivement vers le xénoantigène, cette dernière évolue progressivement vers une réponse contre les autoantigènes murins et provoque des infiltrations hépatiques intralobulaires, portales et périportales, majoritairement par des lymphocytes CD4+ ayant un profil Th1, mais également par des lymphocytes T CD8+ ainsi que par des macrophages. Le modèle montre en outre une élévation des transaminases sériques ainsi qu'une production d'autoanticorps anti-LKM1 et anti-LC1.

Des études subséquentes ont permis d'établir que ce modèle permettait également de démontrer une influence de la génétique, les souris C57Bl/6 étant plus susceptibles de développer la maladie que les souris BALB/c et 129/sv<sup>308</sup>. Une étude subséquente a également établi que les mâles xénoimmunisés possédaient de plus hauts taux de Tregs dans le sang périphérique, la rate et le foie que les femelles ayant reçu les mêmes injections, ce qui pourrait contribuer à expliquer la prépondérance féminine observée chez les patients atteints d'HAI de type 2<sup>270</sup>.

Une variante de ce modèle consiste à déclencher la maladie par injection IV ou IM d'un vecteur adénoviral codant pour les 2 xénoantigènes. Cette méthode permet d'étudier la théorie de la pathogenèse de l'HAI par mimétisme moléculaire viral en situation plus physiologique<sup>309, 310</sup>.

Encouragée par les résultats prometteurs du modèle de xénoimmunisation développé dans notre laboratoire, Holdener et ses collègues ont élaboré une variante du modèle en déclenchant la maladie via un vecteur adénoviral codant pour le CYP2D6 humain<sup>311</sup>, et ce préférentiellement en injectant une première dose par voie IV et une seconde par voie IP<sup>312</sup>. Ce modèle ne permet cependant pas une étude complète de l'HAI de type 2 puisqu'il n'implique pas de réponse contre la FTCD.

#### **1.7.7.8 Modèle Alb-HA/CL4-TCR**

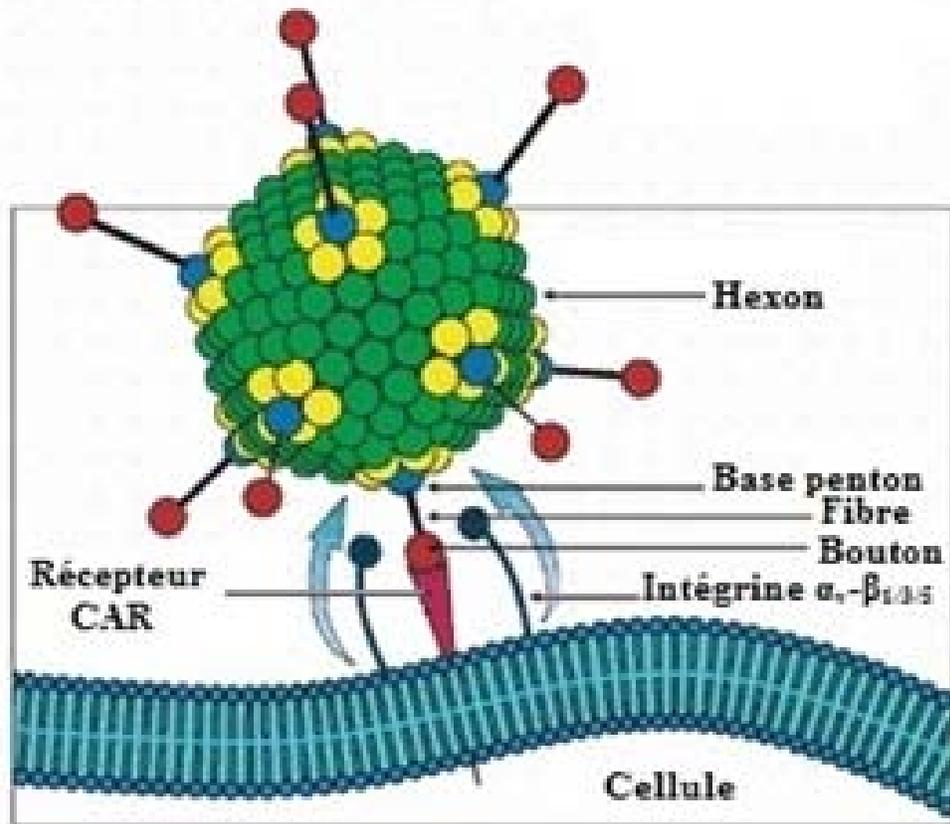
Un des plus récents modèles d'HAI est celui présenté par Zierden et ses collègues, qui ont croisé des souris BALB/C transgéniques exprimant l'hémagglutinine (HA) de l'influenza grâce au contrôle d'un promoteur modifié de l'albumine (alb) permettant une expression hépatique (souris Alb-HA) avec des souris dont les lymphocytes T CD8+ possèdent un RCT spécifique pour l'HA (souris CL4-TCR)<sup>313</sup>. Contrairement à ce qui avait été rencontré dans le modèle Alb-GP33, l'expression de l'HA semble être dans ce modèle circonscrite au foie et inexistante au thymus et il ne semble donc pas y avoir de délétion thymique des clones autoréactifs. De plus, l'hépatite chronique induite chez ce modèle ne peut l'être que chez les mâles, ce qui est contraire à ce qui est observé chez les patients atteints d'HAI, chez qui on dénote une forte prépondérance féminine. Ceci pourrait indiquer que la maladie est déclenchée chez ce modèle selon un mécanisme différent de

celui chez l'humain et pourrait par conséquent poser des questions quant à la pertinence des résultats obtenus pour l'avancement des connaissances quant à l'HAI humaine. Ce modèle se caractérise également par une accumulation accrue de Tregs au foie qui corrèle avec une augmentation des transaminases sériques.

## 1.8 Adénovirus

Les adénovirus (AdV) sont de larges virus non enveloppés d'ADN linéaire bicaténaire dont les génomes d'~36 kb encodent pour une quarantaine de protéines<sup>314</sup>. Des 53 différents sérotypes d'adénovirus humains connus à ce jour et classés en 6 espèces de A à G, l'adénovirus de sérotype 5 (AdV5), de l'espèce C, est un des plus caractérisés et des plus utilisés comme vecteur adénoviral<sup>314, 315</sup>.

Les données de microscopie cryoélectronique ont démontré que 2 éléments structuraux principaux forment la particule adénovirale, soient la capsid externe et le noyau<sup>316-318</sup>. La capsid icosaédrique est formée de 252 capsomères, soit de 240 hexons et de 12 pentons (Figure 4). Les pentons sont prolongés par des fibres terminées par des boutons; des acides aminés hautement conservés dans les faces latérales de ces derniers sont responsables de la liaison de certains AdV, dont celui de sérotype 5, au récepteur cellulaire CAR (coxsackie adénovirus récepteur)<sup>319-321</sup>. Cette protéine membranaire de 46 kDa, membre de la superfamille des immunoglobulines, n'a pas de fonction physiologique connue à ce jour dans la cellule hôte<sup>314</sup>. Après la liaison du virus au CAR, un motif arginine-glycine-acide aspartique présent sur les bases de pentons est reconnu par les intégrines  $\alpha_v\text{-}\beta_1$ ,  $\alpha_v\text{-}\beta_3$  ou  $\alpha_v\text{-}\beta_5$ <sup>322, 323</sup>, ce qui induit une cascade de signalisation menant à l'internalisation rapide du virus via des vésicules clathrinées<sup>324, 325</sup>. Le virus est alors dirigé vers les endosomes<sup>326, 327</sup> où est amorcée sa décapsidation<sup>328</sup> puis est transporté au noyau<sup>329</sup>.



**Figure 4 Représentation schématique de l'AdV5 et de ses principaux éléments.** L'AdV5 lie les récepteurs cellulaires CAR via ses boutons et les intégrines cellulaires  $\alpha$  et  $\beta$  lient le motif arginine-glycine-acide aspartique présent sur les bases de pentons, ce qui induit une cascade de signalisation menant à la rapide internalisation du virus via des vésicules clathrinées.

Des expériences par les groupes d'Alemanly et de Smith avec des virus déficients pour la liaison à CAR démontrent cependant que des voies alternatives d'entrée existent<sup>330, 331</sup>, potentiellement via des protéoglycans de l'héparine sulfate hépatiques ainsi que par liaison directe avec les fibres<sup>332</sup>, ou par liaison indirecte via une liaison préalable des hexons avec le facteur soluble de coagulation sanguine X<sup>333, 334</sup>. Cette voie semble être la cause de l'important tropisme hépatique des AdV puisque son abrogation limite fortement la transduction des hépatocytes et que les espèces d'AdV ne liant que faiblement le facteur X ont un tropisme hépatique faible ou inexistant<sup>334</sup>. Le tropisme hépatique des AdV

pourrait également être lié à leur liaison à d'autres adjuvants sanguins tels que des éléments du complément ou la lactoferrine<sup>335, 336</sup>.

L'AdV5 est rapidement internalisé par les CK et les cellules endothéliales du foie dès la première minute suivant son injection par voie intraveineuse<sup>337, 338</sup>. Chez les souris C57Bl/6, les cellules endothéliales hépatiques possèdent 2,9 fois plus de copies de vecteurs adénoviraux que les CK après 1h<sup>338</sup>. Dans le foie, les hépatocytes et, de façon moindre, les fibroblastes peuvent être infectés par l'AdV5<sup>339</sup>. L'absence d'intégrines  $\alpha_v\text{-}\beta$  sur les cellules endothéliales hépatiques et les CK pourrait expliquer pourquoi ces cellules ne sont infectables qu'*in vitro*, à de très fortes doses d'AdV5<sup>339</sup>.

L'AdV5  $\Delta$ E1/E3 est un vecteur adénoviral de première génération issu d'AdV5 dont les gènes E1 et E3 ont été supprimés. Les produits d'E1 étant nécessaires à la réplication du virus, la délétion de ce gène permet l'obtention d'un vecteur viral incapable de se répliquer dans les cellules et empêche une infection incontrôlée de l'hôte. Les gènes d'E3 servant à la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte lors d'infection, ils ont par conséquent été retirés afin de permettre au vecteur adénoviral de pouvoir coder pour un transgène de taille plus élevée<sup>340</sup>.

## 1.9 Vaccination ADN

La vaccination ADN se fait à partir de plasmides d'origine bactérienne codant pour des antigènes et exprimés *in vivo* par les cellules qu'ils ont transfectées. La première preuve de l'efficacité de ce type de vaccination en modèle animal a été faite en 1993 par l'équipe d'Ulmer, qui a prouvé qu'une vaccination avec de l'ADN codant pour une protéine de l'influenza pouvait protéger des souris contre la maladie<sup>341</sup>. Les plus grandes craintes quant à cette technologie étant initialement reliées à l'intégration de l'ADN plasmidique à l'ADN de l'hôte et à l'induction d'auto-immunité, son expérimentation clinique chez l'humain n'a été autorisée qu'après les résultats de l'étude préclinique sur des primates non humains de Liu et al. et démontrant l'innocuité de cette méthode<sup>342</sup>.

Si les premiers essais ont montré l'utilité de la vaccination ADN dans la prévention de maladies en augmentant les réponses immunitaires de ses hôtes, de nombreux essais ont également démontré une induction de tolérance par la vaccination ADN, et ce dans

plusieurs modèles de maladies auto-immunes. Plusieurs mécanismes expliqueraient cette tolérance : la vaccination ADN permet notamment dans certains cas de dévier la réponse Th1 d'un hôte vers une réponse Th2, d'augmenter le nombre de cellules régulatrices ou de mener les cellules à un état d'épuisement où elles sont incapables d'effectuer leurs fonctions premières. Le tableau Tableau 2 résume les protocoles ainsi que les mécanismes d'action impliqués dans certains modèles récents.

Maladies	Cibles antigéniques	Vecteurs	Molécules associées	Voies immunitaires induites	Références
EAE	RCT Vβ 8.2	Plasmidique et viral	Aucune	Activation Th2 par Th1	1-3
	PBM	Plasmidique	Protéine ZZ liant les IgG	Activation Th2 par Th1	6
	PLP	Plasmidique	Aucune et IL-4	Immunodéviations de Th1 vers Th2	7
	MOG	Plasmidique	Aucune	Th1	8
DT1	Insuline	Plasmidique	Aucune et IL-4	Immunodéviations de Th1 vers Th2	5, 9-11
	GAD65	Plasmidique et rétroviral	Ig-Fc ou IL-4	Immunodéviations de Th1 vers Th2	5, 9-14
	GAD65 soluble	Plasmidique	Aucune et Bax	Immunodéviations de Th1 vers Th2 et activation des Tregs	15
AR	Hsp60	Plasmidique	Aucune	Immunodéviations de Th1 vers Th2	16, 17
	Collagène type II	Plasmidique	IL-4	Immunodéviations de Th1 vers Th2	19
	Chémokines C-C	Plasmidique	Aucune	Anticorps neutralisants	20
	TNF-α	Plasmidique	Aucune	Anticorps neutralisants	21
Uvéite	Protéine S	Rétroviral	Aucune	Indéterminée	22
LÉD	Peptide consensus	Plasmidique	Aucune	Induction de T suppresseurs	24
Syndrome antiphospholipidique	TNF-α	Plasmidique	Aucune	Anticorps neutralisants	25

**Tableau 2 Protocoles de vaccination ADN appliqués avec succès à des maladies auto-immunes.** L'efficacité de la vaccination ADN repose sur différents mécanismes de modulation immunitaire en fonction de la maladie initiale et du type d'injection réalisé. Adapté de <sup>26</sup>.

Peu de l'ADN initialement injecté par voie intramusculaire est transfecté dans les myocytes qui servent à la synthèse de l'antigène<sup>343</sup>. Il peut être de prime abord surprenant qu'une présentation antigénique par des myocytes, qui ne sont pas des CPA professionnelles, puisse éliciter une réponse lymphocytaire efficace considérant qu'il est généralement admis que la présentation antigénique par une cellule présentatrice d'antigènes non professionnelle induit une anergie suite à un défaut de signaux de costimulation.

Dans le cas de la vaccination ADN, il a été montré que les myocytes peuvent présenter les antigènes issus de la vaccination par ADN aux CPA et éliciter via celles-ci une réponse immunitaire fonctionnelle<sup>344, 345</sup>. Il faut cependant noter que les myocytes ne sont pas les seules cellules transfectées, même si elles sont les seules où s'expriment les transgènes après une vaccination ADN par voie intramusculaire<sup>343</sup> : l'équipe d'Ulmer a démontré en 2000 que des CD étaient également transfectées<sup>346</sup>, ce qui pourrait entraîner une activation directe des lymphocytes.

Suite à des expériences menées avec le virus de l'influenza, il apparaît que la vaccination ADN par voie intramusculaire induise une réponse majoritairement Th1<sup>341, 347</sup> caractérisée par un niveau plus élevé d'IgG2a qu'IgG1<sup>348</sup>.

## **1.10 Hypothèse et objectifs**

### **1.10.1 Justification rationnelle**

Bien que la médication actuelle permette aux patients d'échapper au caractère mortel de la maladie, il n'en demeure pas moins que ceci se fait à des coûts substantiels concernant leur qualité et leur espérance de vie dû à la non spécificité des traitements actuellement utilisés. Le développement de thérapies plus ciblées pourrait permettre une diminution substantielle des comorbidités associées avec les traitements actuels et pourraient également contribuer à augmenter l'adhérence des patients à leur traitement.

Des études ont démontré que des injections d'ADN codant pour des autoantigènes pouvaient prévenir le développement de maladies auto-immunes via divers mécanismes

tolérogéniques. Ce même raisonnement pourrait être testé dans un modèle d'HAI développé au laboratoire.

### **1.10.2 Hypothèses**

1. Des injections de plasmides pCMV-CTLA4-NP protègent contre le développement d'HAI chez le modèle murin TTR-NP.
2. La protection observée est médiée par un ou plusieurs des mécanismes suivants :
  - une déviation de la réponse immune Th1 vers une réponse Th2
  - un épuisement des lymphocytes T cytotoxiques
  - une activation et une prolifération des cellules T régulatrices

### **1.10.3 Objectifs**

1. Évaluer l'efficacité de la protection conférée par l'injection de plasmides pCMV-CTLA4-NP contre le développement d'HAI dans le modèle murin TTR-NP.
2. Le cas échéant, caractériser le mécanisme par lequel la vaccination ADN confère une protection contre le développement d'HAI dans le modèle murin TTR-NP.

## Chapitre 2 : Méthodologie

### 2.1 Modèle murin

#### 2.1.1 Groupes murins

Toutes les souris utilisées étaient des souris transgéniques TTR-NP développées par le laboratoire<sup>306</sup> et issues d'une colonie locale. Seules des femelles de 6 à 8 semaines au moment de la première injection ont été utilisées. Les protocoles d'injections et les différents groupes murins utilisés ont été résumés dans le Tableau 3. Les expériences ont été approuvées par le comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche du centre de recherche du CHU Sainte-Justine et répondent aux exigences du Conseil canadien de la protection des animaux.

Groupes	n	Injections intraveineuses	Doses	Injections intramusculaires	Doses	Sacrifices
1	25	Ad-CTLA4-NP	10 <sup>9</sup> pfu	-	-	8 mois
2	8	Ad-CTLA4-NP	10 <sup>9</sup> pfu	-	-	3 mois
3	3	Ad-CTLA4-NP	10 <sup>9</sup> pfu	-	-	9 jours
4	17	Ad-CTLA4-NP	10 <sup>9</sup> pfu	pCMV-CTLA4-NP pVr-IL-12	100 µg 100 µg	8 mois
5	8	Ad-CTLA4-NP	10 <sup>9</sup> pfu	pCMV-CTLA4-NP pVr-IL-12	100 µg 100 µg	3 mois
6	12	Ad-CTLA4-NP	10 <sup>9</sup> pfu	pCMV-contrôle pVr-IL-12	100 µg 100 µg	8 mois
7	8	Ad-CTLA4-NP	10 <sup>9</sup> pfu	pCMV-CTLA4-NP	100 µg	3 mois

**Tableau 3 Groupes murins selon les injections réalisées et le temps de sacrifice post-injection IV.**

## 2.1.2 Injections

### 2.1.2.1 Production de plasmides pCMV-contrôle

Le plasmide pRc/CMV (Invitrogen, Grand Island, NY, États-Unis) (pCMV-contrôle) possède un promoteur humain du cytomégalovirus (CMV) afin de pouvoir être exprimé dans les cellules eukaryotes. Il a été préalablement propagé au laboratoire dans des bactéries *E.coli* DH5 $\alpha$ <sup>306</sup> et le tout était conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Une pré-culture était réalisée avec 20 ml de milieu Luria Bertani (LB) (1% peptone (BD, Franklin Lakes, NJ, États-Unis), 0,5% d'extrait de levure (Wisent, Saint-Bruno Québec, Canada) et 1% de NaCl (Bio Basic Inc., Toronto, ON, Canada)) stérile et conservé à température pièce et 1  $\mu$ l/ml d'ampicilline (Novopharm, Toronto, ON, Canada) auxquels était stérilement ajouté un inoculum d'*E. coli* contenant le plasmide. Après une incubation de 16 heures à 37°C avec agitation, 4 ml de la pré-culture étaient dilués dans 2 litres de LB avec ampicilline et à nouveau incubés pour 16 heures. L'isolation et la purification du plasmide étaient réalisées à l'aide d'un « Endo free plasmid giga kit » (Qiagen, MD, États-Unis) selon les directives du manufacturier. L'ADN plasmidique obtenu était dissout dans du tampon saline DPBS et quantifié à l'aide d'un DU 640 (Beckman, Coulter Inc., Fullerton, CA, États-Unis). Sa pureté était évaluée sur un gel d'agarose (Invitrogen, NY) 1% visualisé aux rayons UV et marqué à l'aide d'une solution de migration préparée à l'aide d'une dilution fraîche d'une solution stock 50X faite de 242 g Tris base (Sigma-Aldrich Co., St-Louis, MO, États-Unis), 57,1 ml d'acide acétique glaciale (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, États-Unis) et 37,2g de Na<sub>2</sub>EDTA·H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich Co., MO) par litre de solution dans de l'eau ultrafiltrée. À cette solution diluée à 1X était ajouté 0,005% de bromure d'éthidium (Sigma-Aldrich Co., MO).

### 2.1.2.2 Production de plasmides pCMV-CTLA4-NP

Le plasmide pCMV-CTLA4-NP a été produit au laboratoire à partir du plasmide pRc/CMV et d'ADNc de LCMV-NP gracieusement donné par R. Zinkernagel (Zürich, ZU, Suisse)<sup>306</sup>. Sa synthèse était effectuée selon le même protocole que pour la production des plasmides pCMV-contrôles.

### **2.1.2.3 Production de plasmides pVR-IL-12**

Le plasmide pVR-IL-12, codant pour l'IL-12 murine, est un don de G. Prud'Homme (Montréal, QC, Canada)<sup>306</sup>. Sa synthèse était effectuée selon le même protocole que pour la production de plasmides pCMV-CTLA4-NP.

### **2.1.2.4 Injections intraveineuses**

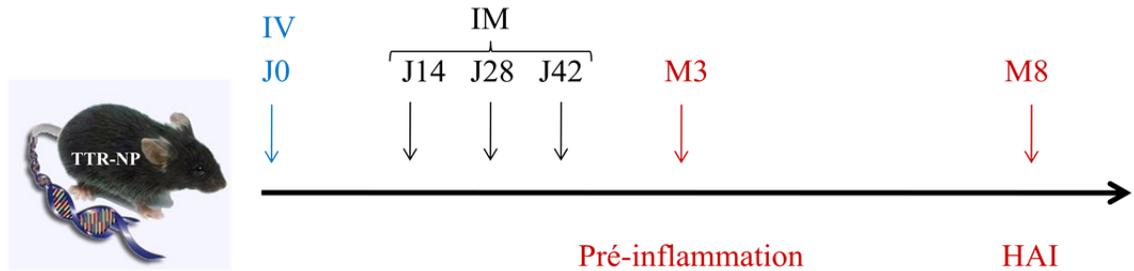
À l'aide de seringues à insuline munies d'aiguilles 28G1/2 (BD, NJ), 100 µl d'une dilution de 10<sup>9</sup> pfu d'Ad-CTLA4-NP stérile (aliquots produits au laboratoire<sup>309</sup> à partir du vecteur pAdeno-X (BD, NJ) et conservés à -80°C jusqu'à utilisation) dans du DPBS 1X stérile (Invitrogen, NY) étaient injectés dans une des veines caudales au jour 0 (J0) (Figure 5 et Tableau 3). La qualité de l'injection était notée par l'expérimentateur à l'aide d'une échelle en 5 grades allant de – à +++ selon la quantité de solution effectivement injectée par voie IV et l'impact tissulaire potentiel causé par l'injection.

### **2.1.2.5 Injections intramusculaires**

À l'aide de seringues à insuline munies d'aiguilles 28G1/2, 100 µl (50 µl par patte) d'une solution en DPBS de 100 µg de pCMV-CTLA4-NP avec ou sans 100 µg de pVR-IL-12 ou 100 µg de pVr-IL-12 + 100 µg de pCMV-contrôle étaient injectés dans les tibialis cranialis des souris aux jours 14, 28 et 42 postinjection IV (Figure 5 et Tableau 3). Les solutions stocks de plasmides étaient conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

### **2.1.3 Temps de sacrifices**

Les souris étaient sacrifiées au 3<sup>e</sup> ou au 8<sup>e</sup> mois postinjection IV d'AD-CTLA4-NP, soit respectivement en période pré-inflammatoire ou en période d'hépatite auto-immune (Figure 5 et Tableau 3). Certaines souris de contrôle ont également été sacrifiées au 9<sup>e</sup> jour postinjection IV afin de confirmer la présence d'inflammation due au vecteur adénoviral.



**Figure 5 Protocole d'injection et de sacrifice des souris TTR-NP.** Une injection IV d'Ad-CTLA-4 NP était réalisée à J0 afin de déclencher le processus pathologique menant à une atteinte hépatique chronique chez les souris, suivie ou non par un traitement avec 3 injections IM de pCMV-CTLA4-NP et de pVR-IL-12 ou par un traitement contrôle avec 3 injections IM de pCMV-CTLA4-NP contrôle et de pVR-IL-12 aux jours 14, 28 et 42. Les souris étaient sacrifiées après 3 ou 8 mois.

## 2.2 Tests sanguins

### 2.2.1 Prélèvements

Des prélèvements sanguins caudaux ont été réalisés aux 9<sup>e</sup>, 21<sup>e</sup> et 28<sup>e</sup> jours postinjection intraveineuse, puis mensuellement jusqu'au sacrifice dans des tubes Microtainer Z sans additifs (BD, NJ). Après 1 heure à température pièce, les tubes étaient centrifugés 7 minutes à 7000 RPM et les sérums étaient récoltés et conservés à -20°C s'ils n'étaient pas immédiatement utilisés.

### 2.2.2 Dosage des transaminases

L'alanine aminotransférase ainsi que l'aspartate aminotransférase des sérums dilués dans du DPBS étaient analysés à l'aide d'un Synchron CX9 (Beckman Coulter Inc., CA) et les résultats obtenus étaient multipliés en fonction de la dilution effectuée.

## 2.2.3 Caractérisation des anticorps

### 2.2.3.1 Production de NP-GST

Une préculture a été réalisée dans un bouillon de LB + ampicilline à partir de vecteur pGEX codant pour la NP-GST et développé au laboratoire. Après une nuit d'incubation à 37°C avec agitation, la préculture a été inoculée dans une culture de LB+ampicilline dans une proportion de 1:100 qui a été incubée à 37°C pour 3 heures. De l'IPTG (Invitrogen, NY) à une concentration finale de 0,5 mM a été ajouté à la culture, et celle-ci a été remise à incuber pour 2 heures puis centrifugée à 4000g pour 15 minutes à 4°C. Les culots ont été congelés à -80° pour la nuit. Le lendemain, ceux-ci ont été resuspendus dans 2x25 ml de DPBS froid puis passés au Sonifier 450 au réglage 5 (Branson, Danbury, CT, États-Unis) en séquences de 10 secondes pour un total de 2 minutes par tube. Les protéines ont été solubilisées en ajoutant 1% de triton (Sigma-Aldrich Co., MO) pendant 30 minutes à 4°C avec agitation. Les tubes ont par la suite été centrifugés 15 minutes à 10000g à 4°C. Les surnageants ont été purifiés par tube ou en colonne contenant 1 ml de Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Uppsala, Suède) lavée au DPBS par 25 ml de surnageant. La résine a été éluée avec une solution contenant 20% de glutathion 50 mM (Sigma-Aldrich Co., MO) et 0,75% de carbonate de sodium (Sigma-Aldrich Co., MO) dans du DPBS.

Le contenu en protéines des éluions a été dosé par colorimétrie sur un DU 640 et la pureté des éluions a été vérifiée sur des gels SDS-PAGE de 10% acrylamide/bis-acrylamide 37,5 :1 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, États-Unis) faits selon les indications du manufacturier. Après migration, les gels ont été fixés 15 minutes dans une solution à 25% d'isopropanol et à 10% acide acétique (Sigma-Aldrich Co., MO) puis incubés dans une solution contenant 1% de bleu de Coomassie (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, États-Unis), 40% de méthanol (ACP, Montréal, QC, Canada) et 10% d'acide acétique jusqu'à l'apparition de bandes nettes, à la suite de quoi l'excédent de colorant a été enlevé par incubation dans une solution d'acide acétique 10% pour une durée minimale d'une heure et maximale de 16 heures. Les gels ont finalement été séchés pour un minimum d'1 heure à l'aide d'un Gel Dryer 583 (Bio-Rad, CA).

### 2.2.3.2 Titration des anticorps

Sur des plaques de 96 puits à haute adsorption (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Allemagne), 0,2 µg de NP-GST dans 100 µl de NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich Co., MO) 0,1 M à pH 8,6 par puits a été adsorbé à 4°C pour la nuit. Le lendemain, chaque puits a été bloqué durant 2 heures à 4°C avec 300 µl d'une solution d'albumine sérique bovine (Sigma-Aldrich Co., MO) à 5 mg/ml dans du NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M à pH 8,6. Après 6 lavages d'une dilution 1X de TBST (0,121% de Tris-base (Sigma-Aldrich Co., MO), 0,876% de NaCl et 0,05% de Tween-20 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, États-Unis)) fraîchement préparé à partir d'une solution stock 10X aqueuse à pH 7,4 et conservée à 4°C, les sérums ont été mis sur plaques en dilutions sérielles de 1 :100 à 1 :12800 dans du TBST avec 5 mg/ml d'albumine sérique bovine, pour un volume final de 100 µl par puits et incubés 2 heures à température pièce avec agitation. Après 6 lavages au TBST, les puits ont été incubés avec 100 µl d'anticorps anti-Ig murines (Dako, Burlington, ON, Canada) dilués à 1 :500 dans du TBST avec 5 mg/ml d'albumine sérique bovine pour 1 heure à température pièce avec agitation. Après 6 lavages au TBST, chaque puits a été incubé avec 100 µl d'une solution de révélation composée de 0,05 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich Co., MO) à pH 9,8, de MgCl<sub>2</sub> 0,001 M (Amresco, Solon, OH, États-Unis), et d'1 mg/ml de p-nitrophénylphosphate (Sigma-Aldrich Co., MO), le tout dans de l'eau ultrafiltrée, jusqu'à ce que le témoin positif atteigne un titre de 1:800. La réaction colorimétrique engendrée a été mesurée à 405 et étaient considérées positives les valeurs ayant un minimum du double de la valeur du témoin négatif pour une même dilution.

### 2.2.3.3 Détermination des isotypes

Les étapes étaient les mêmes que pour la titration des anticorps, aux différences que seules des dilutions de 1 :200 des sérums étaient mises sur plaque, en duplicats, et que des anticorps anti-IgG1, IgG2a ou IgM murines (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, États-Unis) étaient utilisés comme anticorps secondaires. La lecture des plaques se faisait après 1 heure et les résultats étaient calculés comme étant la moyenne des densités optiques des duplicats moins la moyenne de celles des duplicats du témoin négatif.

### **2.3.3.4 Préparation de fractions cytosoliques et microsomaux de foies**

Les foies étaient homogénéisés à l'aide d'un Potter-Elvehjem avec 5 ml/g de foie d'une solution de lyse fraîchement préparée contenant 1% de Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich Co., MO), 1% de sodium déoxycholate (Sigma-Aldrich Co., MO), 0,1% de sodium dodécylsulfate (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH États-Unis), 150 mM de NaCl et 10 mM de Tris-HCl (Sigma-Aldrich Co., MO) à pH 7,4 puis incubés 30 minutes sur glace. L'homogénat a été centrifugé à 500 g pour 10 minutes et le surnageant a été centrifugé à 10 000 g pendant 20 minutes. Le surnageant a été recentrifugé 10 minutes à 30 PSI (équivalent à 100 000 g pendant 40 minutes). La fraction cytosolique correspond au surnageant de cette centrifugation alors que la fraction microsomale correspond au culot. Afin d'assurer la pureté de la fraction cytosolique, cette dernière a été recentrifugée 10 minutes à 30 PSI et seul le surnageant a été conservé.

### **2.3.3.5 Immunobuvardages de type Western**

Séparation et transfert des protéines: 3 µl de fractions cytosoliques ou microsomaux d'homogénats de foies ont été séparés par électrophorèse selon le même protocole que lors de la production de NP-GST (voir section 2.3.3.1). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C Extra (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) à l'aide d'un tampon à pH 8,3 de 25 mM Tris-base, 1,92 M glycine (Sigma-Aldrich Co., MO) et 20% méthanol.

Immunobuvardage: Les membranes ont été bloquées dans du TBST avec 5 % (poids/volume) de lait en poudre pendant 2 heures avec agitation à température pièce. Les membranes ont ensuite été incubées dans du TBST avec 1% de lait en poudre contenant 1 :500 de sérum murin pendant 2 heures, avec agitation et à température pièce. Les membranes ont ensuite été lavées trois fois (5, 5 et 15 minutes) dans du TBST et incubées avec le 2<sup>e</sup> anticorps, un anti-Ig murin couplé à la peroxydase de raifort à une concentration de 1 : 2000 (Biosource, Camarillo, CA USA), pendant 1 heure avec agitation et à température pièce. Les membranes ont été lavées comme précédemment avec du TBST et incubées 1 minute avec du BM Chemiluminescent Blotting Substrate (POD) (Roche Diagnostics GmbH, Allemagne) préparé selon le protocole du manufacturier. Les

membranes ont ensuite été exposées sur un film radiographique BiomaxMR (Kodak, NY, USA).

## **2.3 Isolation des lymphocytes**

### **2.3.1 Sacrifice des souris**

Les souris ont été anesthésiées avec une injection intra-péritonéale de 100 µl de Somnotol (pentobarbital sodium : Ceva, Libourne, France), puis leur sang a été collecté dans des tubes Eppendorf par ponction cardiaque à l'aide d'aiguilles 23G ou 28G (BD, NJ). La rate et le foie étaient par la suite immédiatement prélevés en milieu stérile.

### **2.3.2 Lymphocytes de la rate**

Les rates ont été coupées aux scalpels dans 5 ml d'une solution (RPMIc) de RPMI (Invitrogen, NY) contenant 10% de sérum fœtal de veau (SFV) (Gibco BRL, MD), du PSN Antibiotic Mixture à une dilution de 1X (Invitrogen, NY) et du β-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich Co., MO) puis broyées à l'aide de pistons de seringues de 5 ml. L'homogénat a été filtré par une aiguille 26G 3/8 (BD, NJ) afin de ne conserver qu'une suspension cellulaire sans débris tissulaires. Les globules rouges ont été lysés à l'aide d'une solution préalablement préparée au laboratoire et conservée à 4°C jusqu'à utilisation de 0,15 mM NH<sub>4</sub>Cl (Sigma-Aldrich Co., MO), 10 mM KHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich Co., MO) et 0,1 mM EDTA (Sigma-Aldrich Co., MO) à pH7,3 pendant 5 minutes. Les cellules ont par la suite été lavées deux fois dans du RPMI puis resuspendues dans 5 ml de RPMIc.

### **2.3.3 Lymphocytes du foie**

Les foies ont été coupés aux scalpels dans 4 ml de RPMIc puis broyés à l'aide de pistons de seringues de 10 ml. L'homogénat a été filtré sur des filtres autoclavables de 100 µm ou sur des Cell Strainers (BD, NJ), et ces derniers ont été rincés avec 5 ml de RPMIc afin d'extraire un nombre maximal de cellules. Chaque suspension cellulaire a été incubée 10 minutes à 37°C avec 1 ml de solution filtrée de RPMIc contenant 3 mg (approximativement 500 U) de collagénase. Les cellules ont été purifiées par gradients discontinus de Percoll (GE Healthcare, Suède) à 40% et à 80%. Les globules rouges ont été

lysés puis les cellules ont été lavées tel que précédemment décrit pour les cellules issues de rates puis resuspendues dans 1 ml de RPMIc.

## **2.4 Histologie**

Afin de déterminer le niveau d'inflammation hépatique des souris au 9<sup>e</sup> jour, au 3<sup>e</sup> mois ou au 8<sup>e</sup> mois, des coupes de foies colorées à l'hématoxyline et à l'éosine ont été évaluées selon l'échelle d'Ishak<sup>349</sup> en double aveugle par le Dr Fernando Alvarez, hépatologue et pédiatre au CHU Ste-Justine. L'échelle d'Ishak permet de donner un pointage de 0 à 18 indiquant la sévérité de l'atteinte hépatique lors d'HAI et basé sur la présence histologique d'infiltrats lymphocytaires intralobulaires, portaux ou périportaux et de fibrose. Les coupes proviennent d'une fraction du lobe hépatique principal fixé à la formaline 10% en tampon neutre (Sigma-Aldrich Co., MO).

## **2.5 Tests sur les lymphocytes**

Le nombre de souris sur lesquelles les tests ont été réalisés dépendait du nombre de souris par groupe sacrifié, qui lui-même était tributaire du nombre de femelles par naissance et/ou d'un maximum éthique de 5 souris par cage. Par conséquent, il est possible que certains tests aient été réalisés avec un nombre différent de souris par groupe.

### **2.5.1 Test de cytotoxicité**

Les lymphocytes ont été mis en culture pendant 4 heures à 37°C dans du RPMIc + 5% de surnageant d'EL4 en différentes proportions (10 :1, 5 :1 ou 1 :1) avec 10 000 cellules EL4 marquées au CFSE (Invitrogen, NY). Ces cellules présentent de façon constitutive des épitopes de la NP (EL4-NP) ou ont préalablement été mises en culture avec le peptide 396-404 de la NP. Les cellules ont été marquées au 7-AAD (BD Pharmingen, San Diego, CA, États-Unis) et à l'annexine V (eBioscience, San Diego, CA, États-Unis) selon les directives du manufacturier, puis analysées par cytométrie en flux à l'aide d'un FACScalibur (BD, NJ). Les résultats ont été compensés et évalués à l'aide du logiciel FlowJo 8.7 (Tree Star, Ashland, OR, États-Unis).

### 2.5.2 Tests de prolifération

Les cellules ont été marquées 10 minutes à 37°C dans une solution de DPBS contenant 5% de SFV et 10µM de carboxyfluorescéine succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen, NY) par 10<sup>6</sup> cellules. Les lymphocytes ont par la suite été mis en plaque de culture de 96 puits, en duplicats de 100 000 cellules pour celles issues de la rate et de 50 000 cellules pour celles issues du foie, par agent de prolifération testé. Aux puits contenant des cellules issues du foie a été ajouté un nombre égal de cellules présentatrices d'antigènes cultivées la veille. Toutes les cellules étaient resuspendues dans du RPMIc contenant 1 µl d'IL-2 (Invitrogen, NY) à 50 U par million de cellules pour un total de 100 µl par puits. Les agents de prolifération testés étaient ajoutés à raison de 0,2 µg de concanavalline A (ConA) (BD, NJ) par puits ou d'1 µl d'ionomycine 1 mM (Sigma-Aldrich Co., MO) et 0,02 ng de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) (Sigma-Aldrich Co., MO) par puits pour les contrôles positifs, de 10 µg de protéine NP produite au laboratoire par puits ou de 1 µl de peptide NP 396-404 (Genescript, Chine) par puits. Rien n'a été ajouté aux puits des contrôles négatifs. La plaque a été incubée à 37°C pour 3 jours puis les cellules ont été marquées à l'aide d'anticorps anti-CD4 et anti-CD8a (eBioscience, CA) pour 30 minutes puis lavées. Les cellules ont été marquées au 7-AAD 15 minutes avant d'être analysées par cytométrie en flux à l'aide d'un FACScalibur. Les données ont été compensées et analysées à l'aide de FlowJo 8.7.

### 2.5.3 Caractérisation de la balance Th1/Th2

La capacité des cellules à produire de l'IL-2, de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'IFN-γ a été mesurée par fluorescence à l'aide de la trousse « Mouse Th1/Th2 Flow Panel » (eBioscience, CA). Brièvement, les cellules ont été stimulées à la PMA et à l'ionomycine pendant 6 heures, avec ajout de bréfeldine A (BFA) (Sigma-Aldrich Co., MO) après 2 heures afin d'avoir une accumulation des protéines au réticulum endoplasmique. Les cellules ont par la suite été marquées à l'aide d'anticorps couplés à des agents fluorescents anti-CD4 et anti-CD8a (ciblant la chaîne α du CD8) puis lavées au DPBS + 5% SFV. Elles ont ensuite été fixées et perméabilisées et leurs cytokines intracellulaires ont été marquées à l'aide d'anticorps fluorescents selon les instructions du fabricant. Les cellules

marquées et lavées ont par la suite été analysées par cytométrie en flux sur un FACScalibur et les données compensées et analysées à l'aide de FlowJo 8.7.

#### **2.5.4 Détection de lymphocytes T régulateurs**

Le marquage des lymphocytes T régulateurs a été effectué à l'aide du « Mouse Regulatory T Cell Staining Kit » (eBioscience, CA) selon les directives du fabricant. Brièvement, les cellules ont été marquées à l'aide d'anticorps couplés à des agents fluorescents anti-CD4 FITC, anti-CD8a PerCP et anti-CD25 APC, puis fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-FoxP3. Les données de cytométrie en flux ont été récoltées à l'aide d'un FACScalibur et compensées et analysées à l'aide de FlowJo 8.7.

#### **2.5.5 Caractérisation du niveau d'épuisement des cellules**

Les cellules ont été marquées à l'aide d'anticorps fluorescents anti-PD1 FITC, anti-CD4 PE et anti-CD8 $\alpha$  APC et analysées par cytométrie en flux. Dans certains cas, elles ont également été marquées à l'aide d'anticorps anti-CD19 PerCP-Cy5.5. Tous les anticorps provenaient d'eBioscience, CA. Les données ont été récoltées à l'aide d'un FACScalibur puis compensées et analysées à l'aide du logiciel FlowJo 8.7.

### **2.6 Analyses statistiques et figures**

Toutes les analyses statistiques ainsi que les figures issues des résultats de ce mémoire ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, États-Unis). Une  $p < 0,05$  était considérée comme étant significative. Vu le nombre de données, seuls des tests statistiques ne présupposant pas une distribution normale des résultats ont été utilisés : des ANOVA bifactorielles avec post-tests de Bonferroni, des tests de Mann-Whitney ainsi que des tests de Kruskal-Wallis avec post-tests de comparaisons multiples de Dunn ont été employés.

## Chapitre 3 : Résultats

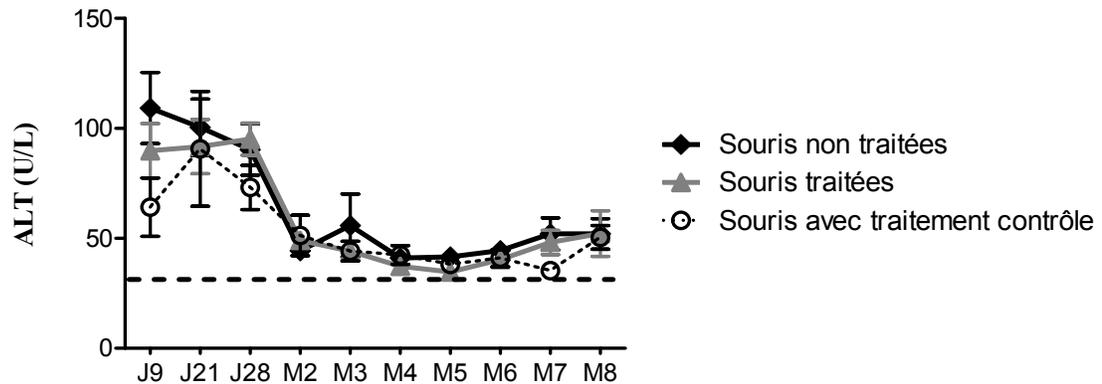
### 3.1 Effet de la vaccination ADN sur le développement d'HAI en modèle murin

Dans ce premier volet, le but était d'évaluer si le protocole de trois injections IM de pCMV-CTLA4-NP/pVR-IL-12 avait un effet protecteur contre le développement d'HAI déclenchée par injection IV d'AD-CTLA4-NP IV dans le modèle murin TTR-NP.

#### 3.1.1 Variation des niveaux d'ALT sériques

La lyse hépatocytaire lors d'une HAI entraîne la relâche d'ALT et leurs niveaux sanguins corèlent de ce fait avec le degré de l'atteinte hépatique. Un suivi de l'évolution de la maladie a donc été effectué en mesurant les niveaux de cette enzyme à partir de prélèvements sanguins caudaux réalisés trimensuellement lors du premier mois puis mensuellement jusqu'au sacrifice des souris (Figure 6). L'ALT étant une enzyme également retrouvée dans les cellules musculaires, un prélèvement caudal était réalisé avant le sacrifice des souris afin de ne pas modifier les niveaux finaux d'ALT par la ponction cardiaque. Le degré de significativité des résultats a été évalué par une ANOVA bifactorielle avec post-tests de Bonferroni.

L'injection de vecteur adénoviral cause généralement une hépatite transitoire qui est résorbée au courant du premier mois suivant l'injection, ce qui correspond à l'élévation des ALT de 2 à 3 fois le niveau normal dans les jours suivant l'injection d'AD-CTLA4-NP IV et à la normalisation des niveaux des ALT observée après 28 jours. Après la clairance adénovirale, un retour vers des niveaux plus physiologiques est observé et semble se maintenir pour les mois subséquents. Une certaine tendance vers une augmentation progressive des niveaux ALT et correspondant à la réponse auto-immune peut cependant être observée en moyenne à partir du 5<sup>e</sup> mois. Les niveaux d'ALT des souris traitées ( $n = 17-20$ ) ne sont pas significativement différents de ceux des souris non traitées ( $n = 15-21$ ) ou ayant reçu un traitement contrôle ( $n = 12$ ) (figure 6).

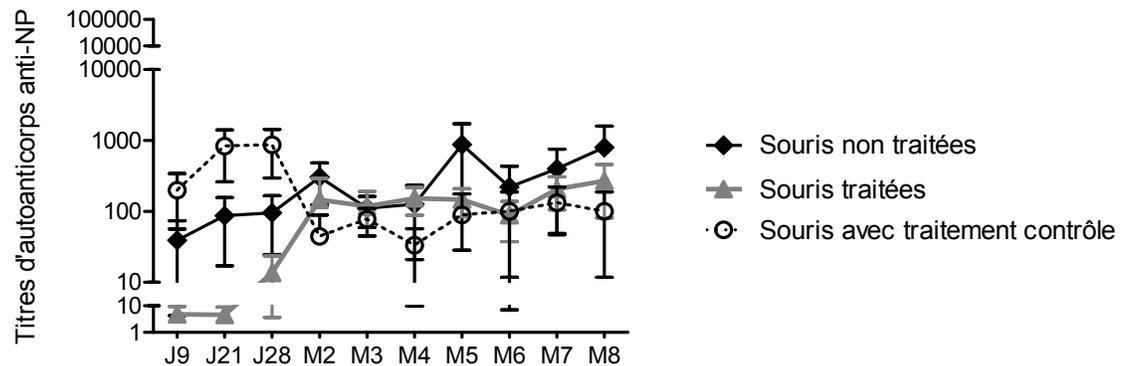


**Figure 6 Niveaux d'ALT des souris traitées ou non par vaccination ADN.** Toutes les souris recevaient le protocole d'immunisation pour l'HAI composé d'une injection IV d'Ad-CTLA4-NP à J0. Le traitement consiste en 3 injections IM de pCMV-CTLA4-NP/pVR-IL-12 et le traitement contrôle en 3 injections IM de pCMV-contrôle/pVR-IL-12, selon le protocole. Le trait horizontal pointillé représente le niveau moyen normal d'ALT chez les souris. J = jour, M = mois.  $p > 0,05$  par ANOVA bifactorielle, post-test de Bonferroni.

### 3.1.2 Influence sur la production d'autoanticorps

La présence d'autoanticorps est un des marqueurs biologiques menant au diagnostic de l'HAI. Leurs titres ont donc été évalués trimestriellement lors du premier mois puis mensuellement jusqu'au sacrifice des souris (Figure 7). Le degré de significativité des résultats a été évalué par une ANOVA bifactorielle avec post-tests de Bonferroni.

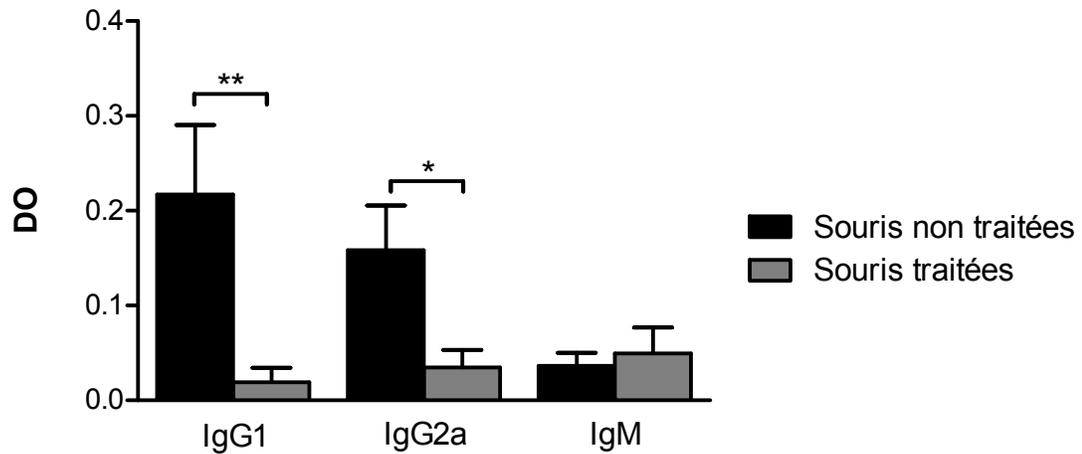
Si les niveaux restent relativement faibles pour tous les groupes murins, on peut cependant noter une évolution différente de ceux-ci chez les souris traitées ( $n = 17-22$ ) par rapport à leurs homologues non traitées ( $n = 4-23$ ) ou ayant reçu un traitement de contrôle ( $n = 12$ ). Les autoanticorps des souris traitées semblent se développer plus lentement et ne semblent rejoindre les niveaux de leurs homologues que vers le 2<sup>e</sup> mois, soit immédiatement après la fin des injections IM de pCMV-CTLA4-NP. Cette observation n'est cependant pas statistiquement significative.



**Figure 7 Titres d'autoanticorps des souris avec ou sans traitement par vaccination ADN.** Les souris traitées ont une tendance non significative à développer des autoanticorps plus tardivement que leurs homologues non traitées ou avec un traitement de contrôle. J = jour, M = mois.  $p > 0,05$  par ANOVA bifactorielle, post-test de Bonferroni.

Il est à noter que toutes les souris ne développent pas nécessairement d'autoanticorps. En effet, seules 39% (9/23) dans le groupe non traité, 55% (12/22) dans le groupe traité et 67% (8/12) dans le groupe avec traitement contrôle ont développé des autoanticorps anti-NP, et ce parfois de façon transitoire et à de faibles titres. De plus, les titres d'autoanticorps ne corrèlent pas avec les scores histologiques observés (données non montrées).

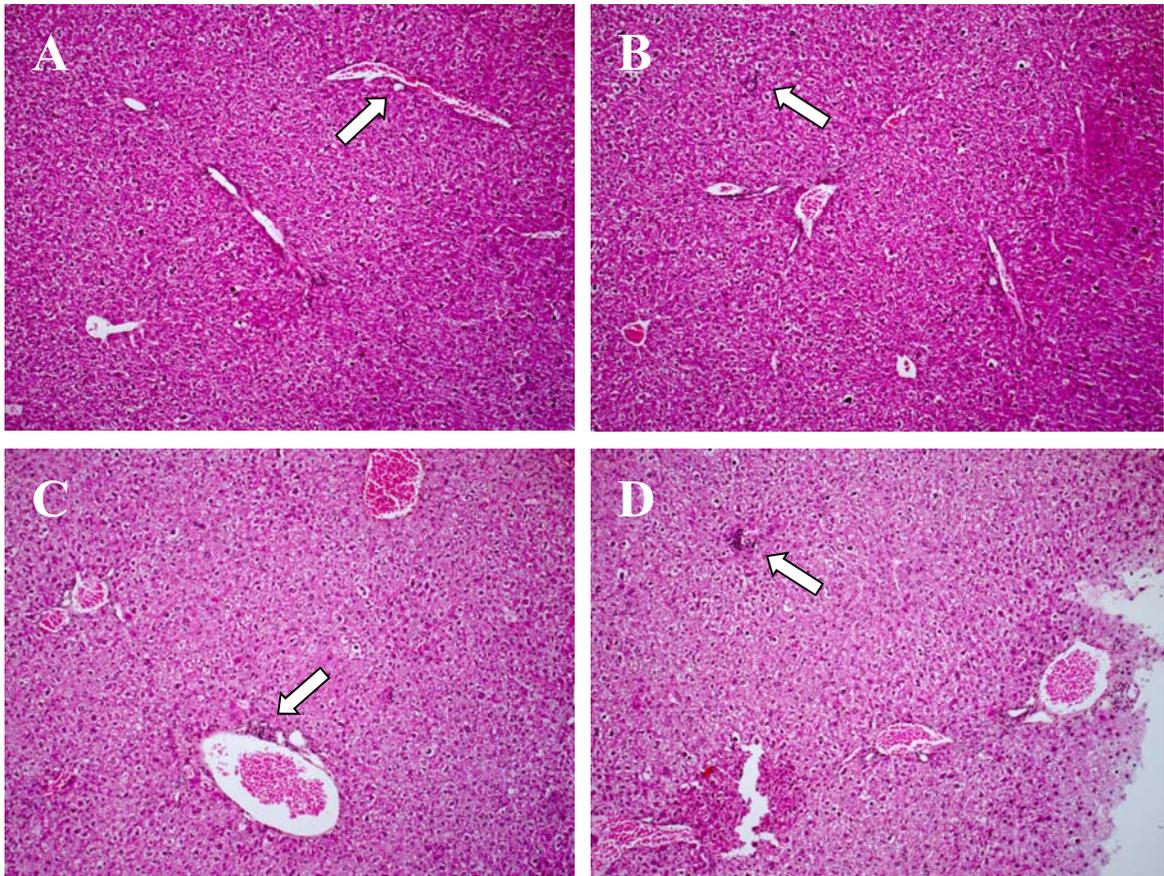
Les anticorps IgG1 sont généralement produits lors d'une réponse Th2 alors que les IgG2a le sont plutôt lors d'une réponse Th1. Les isotypes des autoanticorps des souris traitées et non traitées ont donc été analysés dans le but de pouvoir inférer sur l'état de la balance Th1/Th2 chez ces 2 groupes murins à 3 mois, soit au début de l'atteinte auto-immune (Figure 8). Le degré de significativité des résultats a été évalué par des tests de Mann-Whitney. Les souris traitées ( $n = 7$ ) possèdent significativement moins d'IgG1 et d'IgG2a que leurs homologues non traitées ( $n = 4$ ) mais semblent avoir une tendance non significative à avoir plus d'IgM (figure 8).



**Figure 8** Isotypes des autoanticorps des souris avec ou sans traitement à 3 mois. Les souris traitées possèdent significativement moins d'autoanticorps IgG1 et IgG2a que leurs homologues non traitées 3 mois après l'injection d'Ad-CTLA4-NP. Tests de Mann-Whitney : \*  $p = 0,0379$  \*\*  $p = 0,0023$ .

### 3.1.3 Variation des scores histologiques

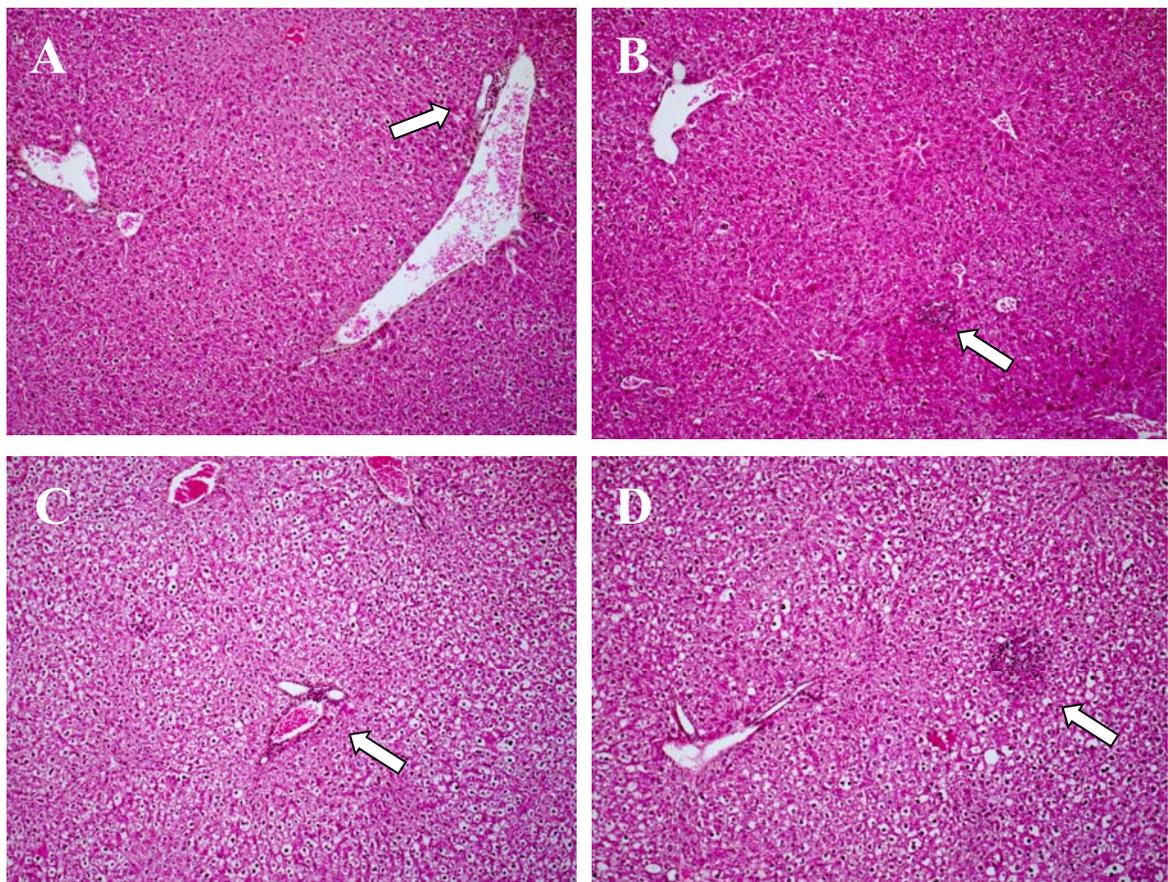
Lors d'HAI, la sévérité de l'atteinte hépatique corrèle avec le degré d'infiltration lymphocytaire observable dans des coupes histologiques. L'HAI montre classiquement des infiltrations portales, périportales et intralobulaires, des manifestations qui peuvent être engendrées dans le modèle TTR-NP par l'injection d'Ad-CTLA4-NP IV (Figure 9 et Figure 11).



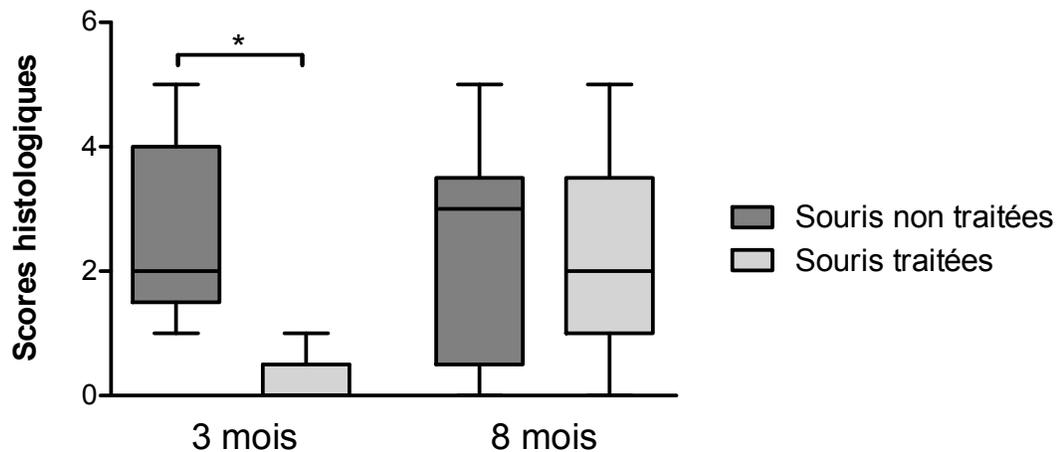
**Figure 9 Manifestations histologiques dans le foie des souris avec et sans vaccination ADN à 3 mois.** Les coupes histologiques issues de souris traitées montrent en moyenne des infiltrations lymphocytaires portales (ILP) (A) et intralobulaires (ILI) (B) de dimensions et d'occurrences réduites comparées à leurs homologues non traitées (ILP :C, ILI :D). Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, agrandissement à 100X.

Les souris traitées ( $n = 5$ ) montrent des scores histologiques significativement plus faibles que leurs homologues non traitées ( $n = 5$ ) après 3 mois (Figure 9 et Figure 11). S'il n'y a pas de différence significative entre ces scores au 8<sup>e</sup> mois, on peut cependant noter que la médiane des souris traitées ( $n = 17$ ) y est plus faible que celle de leurs homologues non traitées ( $n = 9$ ) (Figure 10 et Figure 11).

Le groupe murin non traité possède 22% (2/9) de souris ayant un score histologique nul à 8 mois : on peut cependant noter chez ces souris un développement d'autoanticorps et des niveaux d'ALT plus élevés que la normale (résultats non montrés).



**Figure 10 Histologies hépatiques médianes des souris avec et sans vaccination ADN à 8 mois.** Les coupes histologiques du foie correspondant aux scores médians et issues de souris traitées montrent généralement des ILP (A) ainsi que des ILI (B) de dimension réduite comparé à leurs homologues non traitées (ILP :C, ILI :D). Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, agrandissement à 100X.



**Figure 11 Scores histologiques hépatiques des souris avec ou sans vaccination ADN.** Les souris traitées par vaccination ADN ont des scores histologiques significativement plus bas que leurs homologues non traitées à 3 mois. Tests de Mann-Whitney : \*  $p = 0,0157$ .

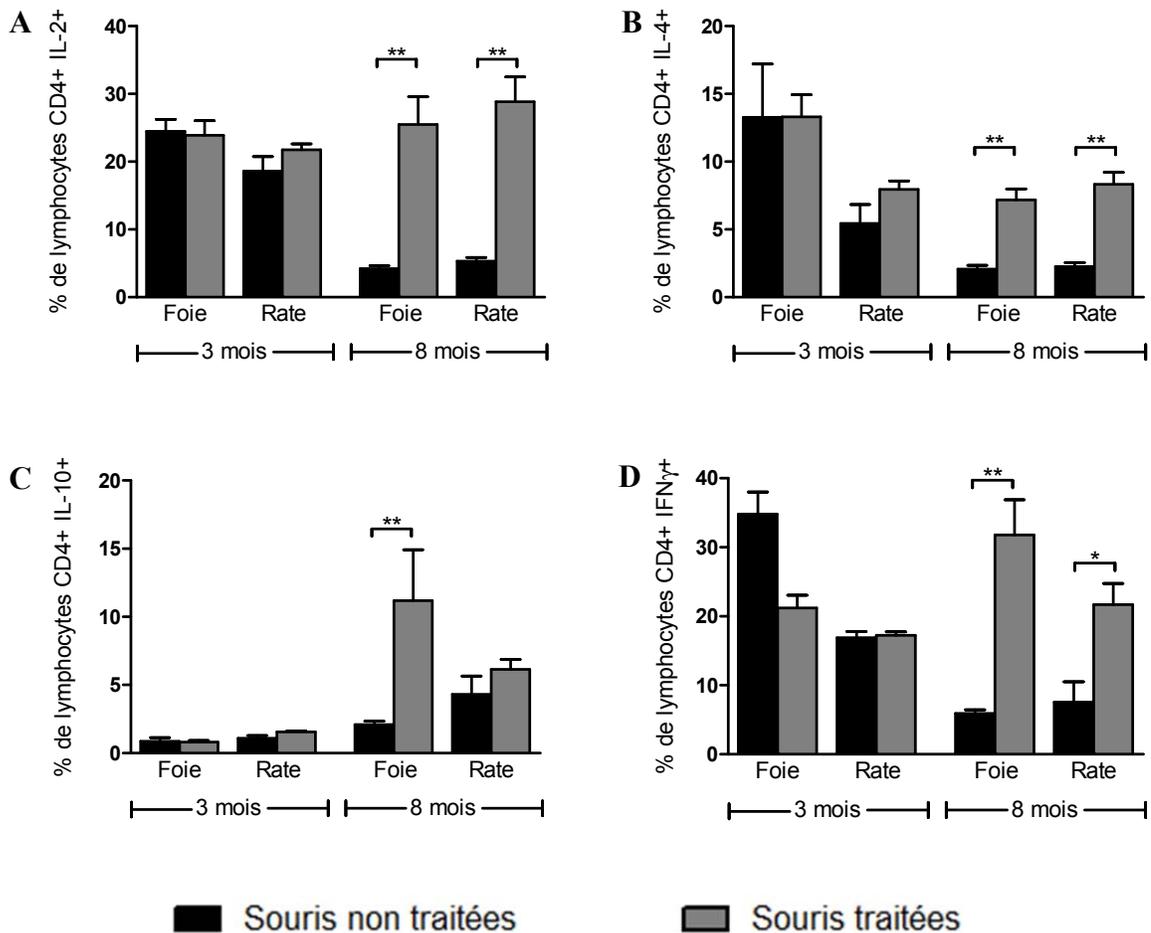
### 3.4 Impact de la vaccination ADN sur la réponse immunitaire

#### 3.4.1 Analyse des cytokines IL-2, IL-4, IL-10 et IFN $\gamma$

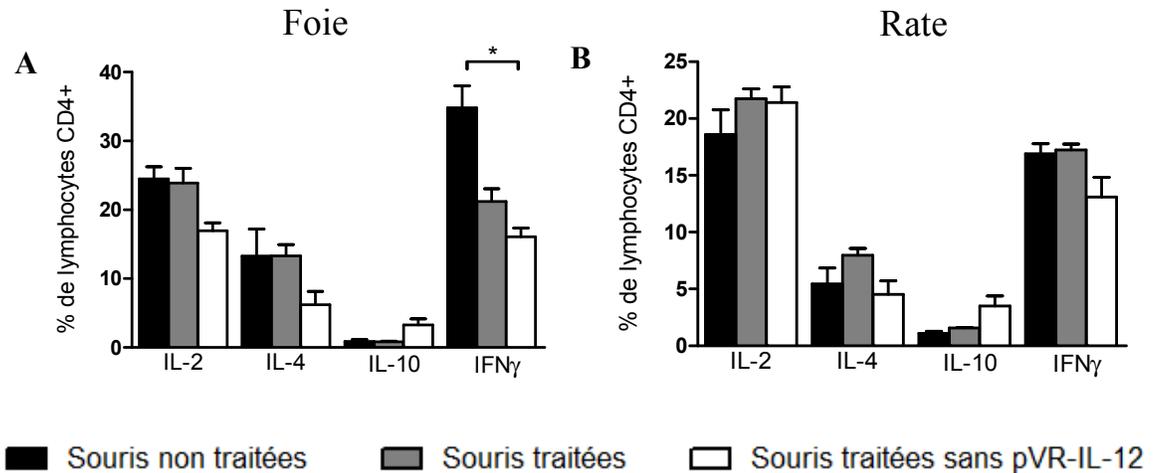
L'HAI étant une maladie à prédominance Th1, une réponse Th2 est de ce fait associée à une réponse plus tolérogénique. La production cytokinique des cellules CD4<sup>+</sup> a donc été analysée dans le but de voir si la vaccination ADN entraînait une modification de la balance Th1/Th2. Pour ce faire, la capacité des cellules à produire de l'IFN $\gamma$ , associé à une réponse Th1, ainsi que de l'IL-4, associée à une réponse Th2, a été analysée par cytométrie en flux (Figure 12). Les capacités de production d'IL-2, activatrice non-spécifique et d'IL-10, généralement suppressive, ont également été analysées. Le degré de significativité des résultats a été évalué par des tests de Mann-Whitney.

Si les souris traitées ( $n = 3$ ) ne montrent pas de différence significative au foie ou à la rate dans leur capacité de production de ces 4 cytokines à 3 mois comparé aux souris non-traitées ( $n = 3$ ), une différence significative peut être observée à 8 mois au foie, où les souris traitées ( $n = 5$ ) ont une plus forte proportion de cellules CD4<sup>+</sup> ayant produit ou étant capable de les produire que leurs homologues non traitées ( $n = 5$ ). Un phénomène similaire est observé chez les cellules CD4<sup>+</sup> spléniques (souris traitées :  $n = 6$ , non traitées :  $n = 5$ ),

mais significatif seulement pour l'IL-2, l'IL-4 et l'IFN $\gamma$ . Les souris n'ayant reçu que du pCMV-CTLA4-NP ( $n = 8$ ) montrent un nombre de cellules CD4 $^+$  hépatiques pouvant produire de l'IFN $\gamma$  significativement moindre que les souris non traitées, ce qui indique que la tendance similaire des souris traitées n'est pas attribuable au pVR-IL-12 (Figure 13).



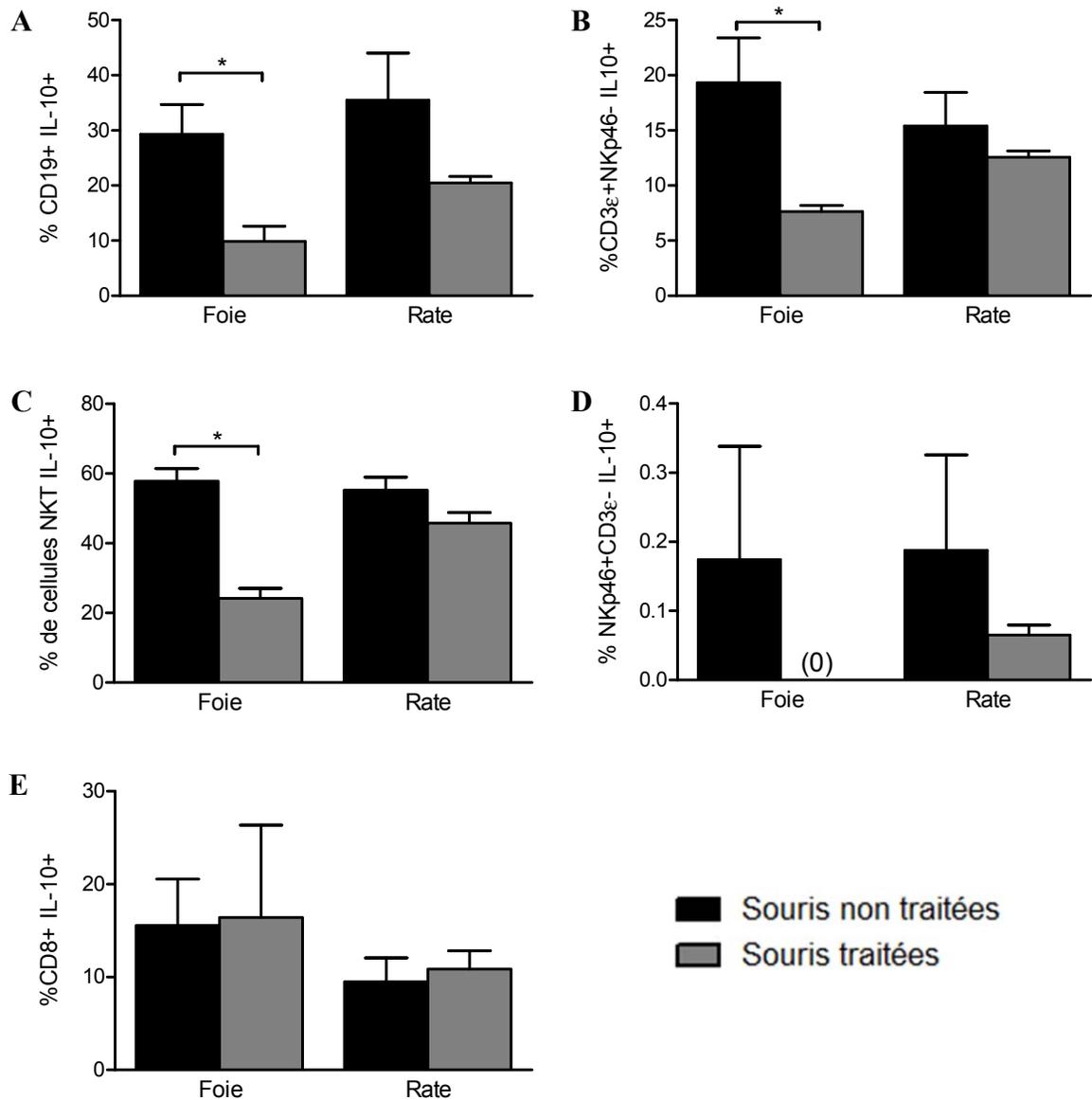
**Figure 12 Production cytokinique des cellules CD4 $^+$  hépatiques et spléniques.** Proportion de cellules CD4 $^+$  produisant (A) de l'IL-2, (B) de l'IL-4, (C) de l'IL-10 ou (D) de l'IFN $\gamma$  après une stimulation à la PMA chez des souris avec ou sans vaccination ADN, à 3 et 8 mois selon leur organe d'origine. À 8 mois, les souris traitées ont une proportion significativement plus élevée de cellules CD4 $^+$  positives pour la production des 4 cytokines au foie et pour la production d'IL2, d'IL-4 et d'IFN $\gamma$  à la rate. Tests de Mann-Whitney : \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .



**Figure 13 Proportion de cellules CD4<sup>+</sup> hépatiques et spléniques produisant de l'IL-2, de l'IL-4, de l'IL-10 ou de l'IFN $\gamma$  après une stimulation à la PMA chez des souris non traitées, traitées ou ayant reçu un traitement sans pVR-IL-12, à 3 mois.** Production cytokinique des cellules isolées (A) du foie et (B) de la rate. Les souris ayant reçu un traitement constitué uniquement de pCMV-CTLA4-NP sans pVR-IL-12 montrent une différence significative seulement avec les souris non traitées pour la proportion de cellules CD4<sup>+</sup> hépatiques ayant la capacité de produire de l'IFN $\gamma$ . Tests de Kruskal-Wallis, post-tests de comparaisons multiples de Dunn : \*  $p < 0,05$ .

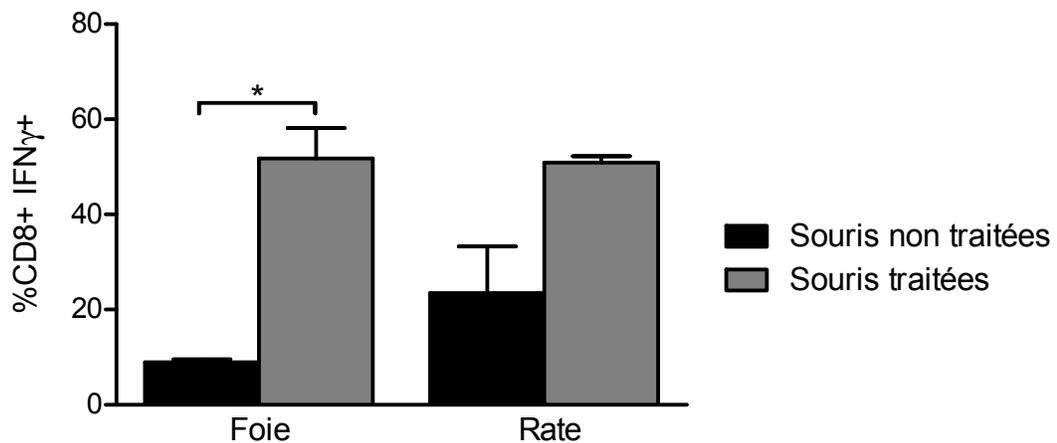
L'IL-10 étant une des principales cytokines tolérogéniques, des analyses supplémentaires ont été réalisées afin de mieux caractériser l'influence de la vaccination ADN sur sa production par les cellules B, T non NKT, NKT, NK et T cytotoxiques (Figure 14). Le degré de significativité des résultats a été évalué par des tests de Mann-Whitney.

Les cellules B (CD19<sup>+</sup>, souris traitées :  $n = 4$ , non traitées :  $n = 9$ ), T non NKT (CD3 $\epsilon$ +NKp46<sup>-</sup>, souris traitées :  $n = 4$ , non traitées :  $n = 5$ ) et NKT (CD3 $\epsilon$ +NKp46<sup>+</sup>, souris traitées :  $n = 4$ , non traitées :  $n = 5$ ) hépatiques des souris traitées ont une capacité significativement moindre à produire de l'IL-10 que celles de leurs homologues non traitées. Aucune différence significative n'a pu être observée chez les cellules spléniques ou chez les cellules T cytotoxiques (CD8<sup>+</sup>) hépatiques (souris traitées :  $n = 3$ , non traitées :  $n = 9$ ) ou spléniques (souris traitées :  $n = 3$ , non traitées :  $n = 8$ ).



**Figure 14 Production d'IL-10 par des cellules B, T non NKT, NKT, T cytotoxiques et NK hépatiques et spléniques à 8 mois.** (A) Les cellules B (CD19+), (B) T non NK (CD3 $\epsilon$ +NKp46-) et (C) NKT (CD3 $\epsilon$ +NKp46+) hépatiques des souris traitées ont une capacité significativement moindre à produire de l'IL-10 que leurs homologues non traitées. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les 2 groupes pour les cellules (D) NK (CD3 $\epsilon$ -NKp46+) et (E) T cytotoxiques (CD8+). Tests de Mann-Whitney : \*  $p < 0,05$ .

L'IFN $\gamma$  étant une des cytokines pro-inflammatoires majeures, sa production par les cellules T cytotoxiques CD8 $^+$  hépatiques et spléniques a été analysée à 8 mois (Figure 15). Il semblerait que les cellules CD8 $^+$  hépatiques des souris traitées soient capables de produire de l'IFN $\gamma$  dans une plus grande proportion que les cellules des souris non traitées. Une tendance similaire mais non significative peut être observée chez les cellules CD8 $^+$  spléniques.



**Figure 15 Capacité de production d'IFN $\gamma$  par les cellules CD8 $^+$  spléniques et hépatiques à 8 mois.** Les souris traitées montrent une proportion accrue de cellules CD8 $^+$  hépatiques ayant la capacité de produire de l'IFN $\gamma$ . Tests de Mann-Whitney, \*  $p = 0,0357$ .

### 3.4.2 Analyse du niveau d'épuisement des cellules

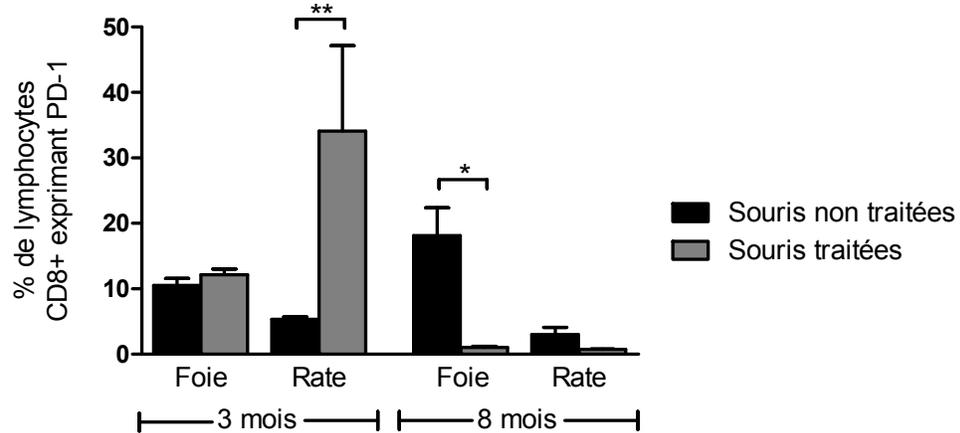
Le récepteur inhibiteur PD-1 est exprimé de façon croissante lors de la stimulation cellulaire et est massivement exprimé par les cellules en état d'épuisement. Son expression à la membrane cellulaire a donc été analysée afin d'inférer sur le niveau d'épuisement des cellules CD8 $^+$  (Figure 17), CD4 $^+$  (Figure 16) et CD19 $^+$  (Figure 18) à 3 et 8 mois. Le degré

de significativité des différences inter-résultats a dans tous les cas été évalué par des tests de Mann-Whitney.

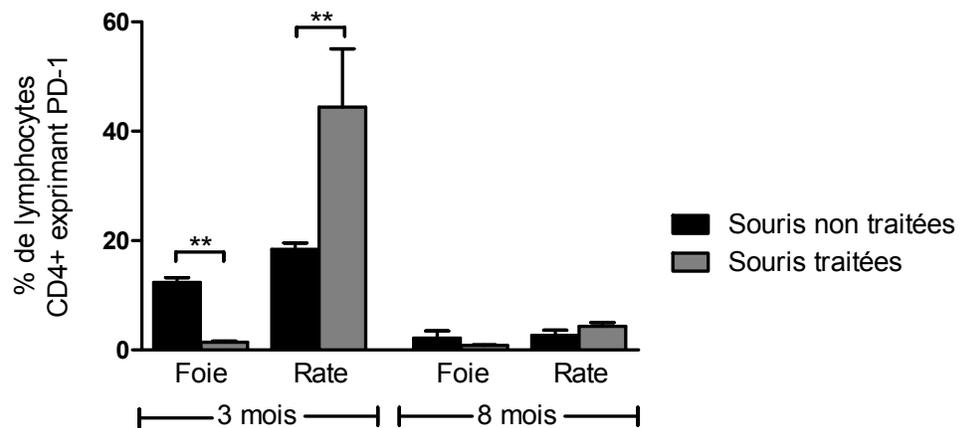
Relativement aux cellules CD8<sup>+</sup> exprimant PD-1, leur proportion est significativement plus élevée à la rate chez les souris traitées ( $n = 5$ ) que chez leurs homologues non traitées ( $n = 8$ ) à 3 mois et aucune différence significative n'est observable au foie après ce temps. À 8 mois, les cellules CD8<sup>+</sup> hépatiques des souris traitées ( $n = 3$ ) expriment PD-1 dans une proportion significativement moindre que celles des souris non traitées ( $n = 7$ ). Aucune différence significative en ce sens n'a pu être observée pour les cellules CD8<sup>+</sup> spléniques.

À 3 mois, une proportion significativement moindre de cellules CD4<sup>+</sup> hépatiques expriment PD-1 chez les souris traitées ( $n = 5$ ) que chez les souris non traitées ( $n = 8$ ) alors que l'inverse est observable chez les cellules CD4<sup>+</sup> spléniques. Aucune différence significative n'est observable chez ces cellules à 8 mois (souris traitées :  $n = 3$ , non traitées :  $n = 7$ ).

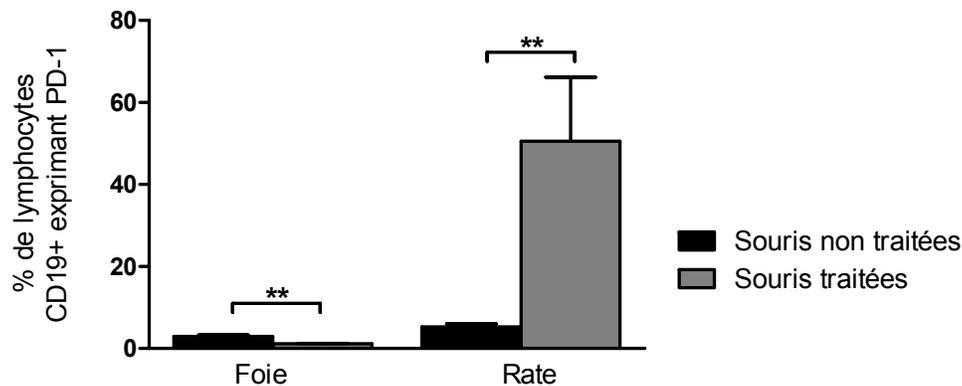
Quant aux cellules CD19<sup>+</sup> exprimant PD-1, leur proportion est significativement moindre chez les cellules hépatiques des souris traitées ( $n = 5$ ) comparativement à celles des souris non traitées ( $n = 5$ ) à 3 mois, mais ce pourcentage reste faible dans les 2 groupes. Les cellules CD19<sup>+</sup> de la rate montrent quant à elles des niveaux passablement plus dissociés, les cellules des souris traitées ( $n = 5$ ) exprimant dans une proportion significativement plus élevée PD-1 que celles de leurs homologues non traitées ( $n = 5$ ).



**Figure 16 Proportion de cellules CD8+ hépatiques et spléniques exprimant PD-1 chez des souris avec ou sans vaccination ADN après 3 et 8 mois.** Les cellules CD8+ spléniques expriment PD-1 dans une plus forte proportion chez les souris traitées à 8 mois. Les cellules CD8+ hépatiques expriment PD-1 dans une plus faible proportion chez les souris traitées à 8 mois. Tests de Mann-Whitney : \*  $p < 0,0238$  \*\*  $p < 0,0016$ .



**Figure 17 Proportion de cellules CD4+ hépatiques et spléniques exprimant PD-1 chez des souris avec ou sans vaccination ADN après 3 et 8 mois.** Les cellules CD4+ hépatiques des souris traitées expriment PD-1 dans une proportion moindre alors que les cellules spléniques des souris traitées expriment PD-1 dans une proportion plus élevée à 3 mois. Aucune différence significative n'est observée chez les 2 groupes à 8 mois. Tests de Mann-Whitney : \*\*  $p < 0,005$ .

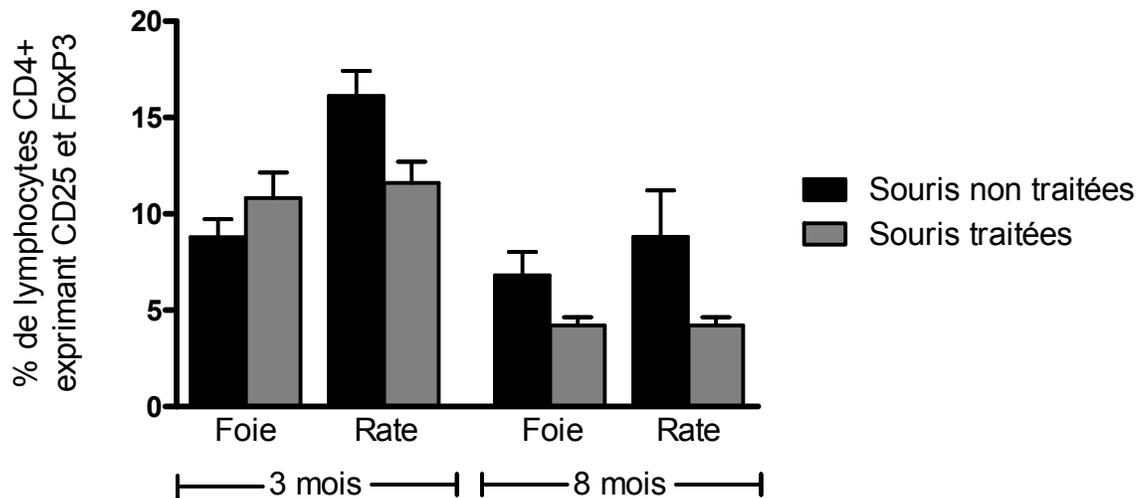


**Figure 18 Proportion de cellules CD19+ hépatiques et spléniques exprimant PD-1 chez des souris avec ou sans vaccination ADN après 3 mois.** Après 3 mois, les cellules CD19+ hépatiques des souris traitées expriment PD-1 dans une proportion significativement moins élevée que celles des souris non traitées alors qu’une proportion inverse est observée chez les cellules CD19+ spléniques. Tests de Mann-Whitney : \*\*  $p = 0,0079$ .

### 3.4.3 Analyse des lymphocytes T régulateurs

Les cellules régulatrices exprimant le facteur de transcription FoxP3 étant des effecteurs majeurs dans le maintien de la tolérance périphérique, l’effet de la vaccination ADN sur les cellules CD4+CD25+FoxP3+ et CD8+FoxP3+ hépatiques et spléniques a été analysé à 3 et à 8 mois. Le degré de significativité des résultats a été évalué par des tests de Mann-Whitney.

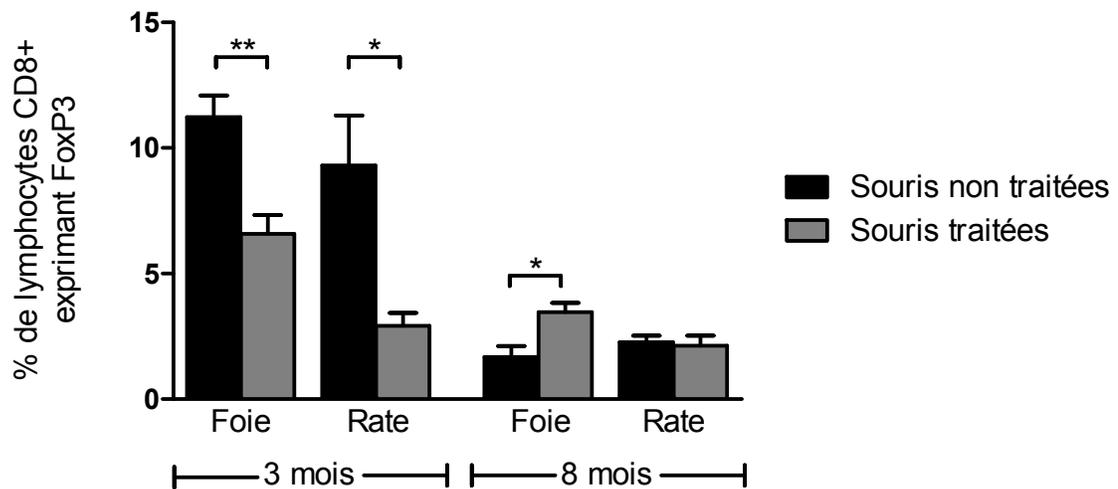
Aucune différence significative n’a pu être observée concernant les cellules CD4+CD25+FoxP3+ hépatiques (souris traitées :  $n = 5$  à 3 mois,  $n = 8$  à 8 mois, non traitées :  $n = 8$  à 3 mois,  $n = 7$  à 8 mois) ou spléniques (souris traitées :  $n = 10$  à 3 mois,  $n = 4$  à 8 mois, non traitées :  $n = 12$  à 3 mois,  $n = 7$  à 8 mois) (Figure 19). La donnée hépatique d’une souris traitée a été exclue des résultats considérés, sa valeur étant à plus de 30 déviations standards de la moyenne des autres données.



**Figure 19 Proportion de cellules CD4+ hépatiques et spléniques exprimant CD25 et FoxP3 à 3 et 8 mois chez des souris avec ou sans vaccination ADN.** Aucune différence significative n'a pu être observée entre les groupes traités et non traités par vaccination ADN, et ce autant à 3 mois qu'à 8 mois. Tests de Mann-Whitney :  $p > 0,05$ .

Une différence significative dans la proportion de cellules CD8+ hépatiques (souris traitées :  $n = 5$ , non traitées :  $n = 5$ ) et spléniques (souris traitées :  $n = 4$ , non traitées :  $n = 5$ ) exprimant FoxP3 est observée à 3 mois, les souris traitées en ayant des proportions moindres que les souris non traitées (Figure 20). À 8 mois cependant, les souris traitées ( $n = 8$ ) ont une proportion de CD8+ hépatiques exprimant FoxP3 plus élevée que leurs homologues non traitées ( $n = 5$ ). Aucune différence significative n'a pu être notée pour les cellules spléniques CD8+ à 8 mois (souris traitées :  $n = 10$ , non traitées :  $n = 6$ ).

Les données de 4 souris ont été exclues, celles-ci étant à plus de 10 déviations standards de la moyenne des autres échantillons. Ces données extrêmes sont présentes au foie et à la rate, indépendamment de la présence de vaccination ADN et ne corrélerent pas nécessairement avec des marqueurs biologiques moindres de l'atteinte hépatique chronique.



**Figure 20 Proportion de cellules CD8+ hépatiques et spléniques exprimant FoxP3 à 3 et 8 mois chez des souris avec ou sans vaccination ADN.** Les souris traitées ont une proportion significativement plus faible de cellules CD8+ exprimant FoxP3 à 3 mois que leurs homologues non traitées. À 8 mois, les souris traitées ont une proportion de cellules CD8+ exprimant FoxP3 significativement plus élevée au foie et similaire à la rate lorsque comparées à leurs homologues non traitées. Tests de Mann-Whitney : \*  $p = 0,0159$ , \*\*  $p = 0,0079$ .

## Chapitre 4 : Discussion

Tel que mentionné précédemment, l'HAI est une maladie dont la pathogenèse échappe encore à notre compréhension et qui est actuellement traitée à l'aide de thérapies non spécifiques basées sur une immunosuppression générale. En plus de mettre les patients à risque d'infections opportunistes, ces thérapies ont un lourd coût en effets secondaires qui peuvent avoir des répercussions physiques et psychologiques sur les patients, et de ce fait diminuer l'adhérence au traitement de ces derniers. Un des buts à long terme poursuivis par les expérimentations menées pour ce mémoire était de trouver des alternatives aux traitements conventionnels plus ciblées et entraînant moins d'effets secondaires.

Pour ce faire, une meilleure compréhension des mécanismes de tolérance prévenant le développement de la maladie se devait d'être au préalable acquise. L'HAI est une maladie à prédominance Th1 et la vaccination ADN s'est avérée tolérogénique dans d'autres modèles correspondant à ce type d'atteinte auto-immune. Un des buts à court et à moyen termes des expérimentations de ce mémoire était de voir dans un premier temps si la vaccination ADN (constituée de 3 injections IM à 2 semaines d'intervalle chacune de 100 µg de pCMV-CTLA4-NP et de 100 µg de pVR-IL-12 et commençant 2 semaines après l'injection IV d'Ad-CTLA4-NP) avait un effet protecteur sur le développement d'une atteinte hépatique auto-immune chronique dans un modèle murin d'HAI développé au laboratoire, la souris TTR-NP. Dans un deuxième temps, le but était d'élucider les mécanismes menant à cette tolérogénicité, le cas échéant. L'hypothèse était que la vaccination ADN allait avoir un effet protecteur contre le développement d'une HAI soit par une déviation de la réponse immunitaire d'un profil Th1 vers un profil Th2, soit par un épuisement des cellules immunitaires, soit par l'activation et par l'induction de la production de cellules T régulatrices, ou encore par plusieurs de ces mécanismes.

### 4.1 Impact de l'injection d'AdA4-NP IV à J0 sur le développement d'HAI en modèle murin

Dans le modèle murin TTR-NP, la vaccination IV initiale d'Ad-CTLA4-NP induit une réponse immunitaire menant à une atteinte hépatique qui se solde par la présence d'une

HAI établie après le 8<sup>e</sup> mois (C. Piché, résultats non publiés). Dans un premier temps, le vecteur adénoviral provoque chez les souris une hépatite initiale qui est résorbée dans les 4 semaines suivant l'injection et qui se traduit par une élévation des ALT d'au minimum environ 2 fois la normale de 30 U/l (Figure 6). La clairance du vecteur adénoviral correspond à un retour vers des niveaux plus normaux d'ALT chez toutes les souris au 2<sup>e</sup> mois. La présence de vecteur adénoviral a été testée par des réactions de polymérase en chaîne sur des homogénats de foies, qui ont montré des résultats similaires chez les souris traitées et non traitées et ce, à tous les temps de sacrifices (résultats non montrés).

La production de NP dans le modèle TTR-NP est sous contrôle du promoteur de la transthyrétine, ce qui lui assure une expression uniquement hépatocytaire : il y a par conséquent absence de délétion thymique des clones autoréactifs pour cet autoantigène. Le modèle TTR-NP ne développant pas d'atteinte hépatique auto-immune spontanée, la tolérance périphérique et le milieu tolérogénique engendré par le foie suffisent probablement à garder ces clones en état d'ignorance ou d'anergie. L'injection de vecteur adénoviral provoque la présentation de la NP dans un contexte pro-inflammatoire qui permet de briser la tolérance hépatique et d'initier une réponse immunitaire contre l'autoantigène. Cette réponse entraîne une atteinte hépatique graduelle qui se solde par une HAI établie au 8<sup>e</sup> mois et qui peut être confirmée par la présence de marqueurs biologiques de la maladie tels qu'une élévation des ALT sériques (Figure 6), une présence d'autoanticorps (Figure 7) et des infiltrations lymphocytaires portales, périportales et intralobulaires (Figure 9) au foie. Bien que l'HAI soit une maladie à prédominance Th1 et que ce profil soit reflété par une présence plus importante d'anticorps IgG2a qu'IgG1, aucune différence significative entre les DO de ces 2 isotypes n'était encore observable par ELISA 3 mois après l'injection IV d'Ad-CTLA4-NP (Figure 8). Cette observation pourrait cependant être attribuée à la méthodologie employée : si elle permet une comparaison d'échantillons de mêmes isotypes entre eux, la comparaison inter-isotypes est potentiellement plus hasardeuse. Le degré d'affinité des anticorps primaires utilisés pour leur détection n'étant potentiellement pas le même, il se pourrait par conséquent que des quantités égales d'IgG1 et d'IgG2a n'entraînent pas forcément les mêmes DO. De plus, l'atteinte auto-immune n'est encore qu'à ses balbutiements au 3<sup>e</sup> mois, ce qui pourrait

expliquer qu'on ne retrouve pas encore de prédominance d'IgG2a sériques. Une autre explication serait que le profil Th1 de la maladie ait plutôt induit la production d'IgG3, qui ne figuraient pas parmi les isotypes testés. Cette hypothèse est cependant peu probable puisque les IgG3 se retrouvent généralement en concentrations plasmatiques plus faibles que les IgG2<sup>4</sup>.

L'analyse des scores histologiques à 8 mois montre que l'injection IV d'Ad-CTLA4-NP arrive à induire une atteinte hépatique (score non nul) chez 78% (7/9) des souris. Les souris ayant un score histologique nul ne démontrent cependant pas nécessairement une absence d'autoanticorps ou des niveaux d'ALT sériques près de la normale : le vecteur adénoviral a donc bel et bien eu un impact immunologique chez ces souris, mais soit ce dernier n'a pas été suffisant pour briser la tolérance hépatique à long terme, soit la coupe histologique n'a pas été effectuée dans une région hépatique inflammée bien que de l'inflammation soit présente ailleurs au foie.

#### **4.1.1 La vaccination ADN n'influence ni la production d'autoanticorps, ni les niveaux d'ALT sériques**

La vaccination ADN, tout comme une vaccination ADN contrôle (avec du pCMV-contrôle et du pVR-IL-12), ne semble pas avoir d'impact significatif (test statistique : ANOVA bifactorielle, post-test de Bonferroni) sur les niveaux d'ALT sériques des souris comparativement aux résultats des souris non traitées et ce, de l'injection IV d'Ad-CTLA4-NP au sacrifice des souris (Figure 6). Il faut cependant noter que si une légère augmentation des ALT est perceptible chez tous les groupes à partir du 5<sup>e</sup> mois, celle-ci demeure encore limitée au 8<sup>e</sup> mois, avec une moyenne légèrement en deçà de 2 fois le niveau normal.

Tous les groupes murins testés ont développé des autoanticorps et aucune différence significative (test statistique : ANOVA bifactorielle, post-test de Bonferroni) concernant la production d'autoanticorps n'a pu être observée entre les groupes murins non traités, traités ou ayant reçu un traitement contrôle du J0 au sacrifice des souris (Figure 7). Les titres moyens restent relativement faibles chez tous les groupes et certaines souris ne développent jamais d'autoanticorps. Il ne s'agit cependant pas de faux positifs, la présence

d'autoanticorps ayant été confirmée chez plusieurs souris ayant de faibles titres par immunobuvardage (résultats non montrés). On peut noter une certaine tendance chez les souris traitées à développer leurs autoanticorps plus tardivement que leurs homologues, bien que cela ne soit pas significatif. On dénote également une tendance vers une production accrue d'autoanticorps durant le premier mois chez les souris avec traitement contrôle, qui ne pourrait s'expliquer que par un effet de l'IL-12 une fois le processus auto-immun enclenché puisque le groupe de souris non traitées semblent démontrer un taux légèrement moindre d'autoanticorps durant cette même période; il ne s'agit cependant pas d'une comparaison atteignant le seuil de significativité.

Les souris traitées ont significativement moins d'IgG1 et d'IgG2a à 3 mois que leurs homologues non traitées (test de Mann-Whitney) (Figure 8). Cependant, paradoxalement, les souris traitées et non traitées ont des titres d'autoanticorps similaires. Deux options pourraient expliquer cette dichotomie : soit les souris traitées possèdent d'autres isotypes en plus grand nombre que les souris non traitées pour contrer l'avantage de ces dernières au niveau des IgG1 et IgG2a, soit chez les deux groupes on retrouve des isotypes autres que IgG1 et IgG2a en fort plus grand nombre, et les différences vues ici entre IgG1 et IgG2a sont certes significatives lorsque ces isotypes sont comparés entre eux, mais sans importance comparé à la proportion qu'ils occupent par rapport aux autoanticorps totaux. En l'absence de courbes de titration permettant d'associer une DO à une quantité pour chaque isotype, il est quelque peu difficile de se prononcer sur la question. Bien que de façon non significative, la figure 8 montre une tendance chez les souris traitées à posséder plus d'IgM, ce qui serait compatible avec la première hypothèse. Les IgM peuvent être induites par les cellules Th1, ce qui tendrait également à corroborer le ratio IgG2a/IgG1 observé. De plus, les cellules B spléniques des souris traitées expriment fortement le récepteur inhibiteur PD-1 (voir analyse en 4.2.3), ce qui pourrait expliquer l'absence de commutation de classe vers les IgG plus spécifiques<sup>350</sup>.

### **4.1.2 La vaccination ADN induit une protection temporaire contre le développement d'une HAI**

Dû au nombre limité de souris disponibles et au fait qu'aucune protection ne semblait être conférée à 8 mois par l'IL-12 (résultats non montrés, scores histologiques non significativement différents de ceux des souris traitées et non traitées par tests de Kruskal-Wallis et post-tests de Dunn), les injections de traitement contrôle ont été stoppées afin de concentrer les ressources sur les souris traitées et non traitées. Les souris traitées montrent des scores histologiques significativement (tests de Mann-Whitney) plus faibles que leurs homologues non traitées à 3 mois, alors qu'aucune différence significative n'est observable à 8 mois, et ce malgré une médiane plus faible d'au moins 1 niveau de score (Figure 11). Deux hypothèses pourraient expliquer ces observations : la vaccination ADN pourrait n'induire qu'une tolérance totale mais transitoire, c'est-à-dire limitée à la durée de l'expression du vecteur au niveau des myocytes, ou elle pourrait également induire une tolérance partielle, mais incapable d'endiguer la réaction auto-immune, qui se développerait alors plus lentement que la réaction des souris non traitées. Une possibilité pour vérifier ces hypothèses serait de tester des groupes murins avec des vaccinations ADN répétées dans le temps et non limitées à 3 afin de voir si les souris développeraient tout de même des HAI à 8 mois : si tel est le cas, alors la tolérance conférée par la vaccination ADN n'est que partielle alors que si tel n'est pas le cas, la tolérance qu'elle confère est totale tant que durent les injections.

## **4.2 Impact de la vaccination ADN sur la réponse immunitaire**

Le volet précédent a permis d'établir que la vaccination induisait une certaine protection contre le développement d'HAI, mais ne permettait pas d'élucider le mécanisme sous-tendant cette tolérogénicité. Basées sur des observations relatives au traitement d'autres maladies auto-immunes, les hypothèses de départ étaient que la protection conférée par la vaccination ADN pourrait se faire via une déviation de la réponse immune Th1 vers une réponse Th2, via un épuisement des cellules immunitaires et/ou via l'activation et l'induction de la prolifération de cellules T régulatrices.

### **4.2.1 La vaccination ADN influence la capacité de production d'IL-2, d'IL-4, d'IL-10 et d'IFN $\gamma$ des cellules CD4+**

Il peut sembler de prime abord surprenant de constater qu'outre pour la production d'IL-10 par les cellules CD4+ spléniques, la vaccination ADN montre des proportions plus élevées de cellules ayant la capacité de produire de l'IL-2, de l'IL-4, de l'IL-10 et/ou de l'IFN $\gamma$  à 8 mois (Figure 12). Cependant, cette observation pourrait s'expliquer par le mécanisme d'action de la PMA, qui stimule non pas la synthèse de ce que la cellule produit normalement en situation physiologique, mais bien la synthèse de tout ce que la cellule a la capacité de produire<sup>351</sup>. Par conséquent il se pourrait, par exemple, que les cellules positives pour la production d'IFN $\gamma$  soient plutôt des cellules tolérogéniques en situation physiologique en ne produisant plus d'IFN $\gamma$ , mais plutôt de l'IL-10. Il demeure cependant évident que la vaccination ADN influence la production de cytokines par les cellules CD4+, et que cette influence perdure même après 8 mois. Il serait par conséquent intéressant dans des expériences ultérieures d'évaluer la production de cytokines en situations plus physiologiques, par exemple à l'aide de tests ELISpot ou par stimulation des cellules à l'aide de tétramères d'épitopes de NP.

Il est également surprenant de constater qu'aucune différence significative n'est observée dans la production des cytokines par les cellules CD4+ à 3 mois. Cependant, il convient de mentionner que les cellules CD4+ hépatiques montrent une tendance à être capable de produire de l'IFN $\gamma$  dans une proportion moindre chez les souris traitées. Puisque l'IFN $\gamma$  est une cytokine pro-inflammatoire, ceci pourrait être un des mécanismes sous-tendant l'effet protecteur de la vaccination ADN observé à 3 mois. Il semblerait également que cet effet soit spécifique aux injections de pCMV-CTLA4-NP puisqu'il est observable en présence ou en absence de pVR-IL-12 (Figure 13). Le pVR-IL-12 aurait en fait tendance à contrecarrer cet effet du pCMV-CTLA4-NP puisque la diminution observée dans la proportion de cellules CD4+ pouvant produire de l'IFN $\gamma$  n'est significative qu'en son absence.

#### **4.2.2 La vaccination ADN influence négativement la capacité des cellules B, T non NKT et NKT hépatiques à produire de l'IL-10 et positivement la capacité des cellules CD8+ à produire de l'IFN $\gamma$ à 8 mois**

L'IL-10 étant une cytokine majeure dans l'induction de tolérance, sa capacité de production a également été évaluée à 8 mois dans d'autres cellules que les CD4+, plus précisément dans les cellules B (CD19+), T non NKT (CD3 $\epsilon$ +NKp46-), NKT (CD3 $\epsilon$ +NKp46+), NK (CD3 $\epsilon$ -NKp46+) et T cytotoxiques (CD8+) (Figure 14). Les seules cellules hépatiques des souris traitées n'ayant pas une capacité moindre de production d'IL-10 parmi celles observées sont les cellules CD8+. La réponse splénique n'est pas significativement différente entre les 2 groupes mais semble suivre la même tendance. Les réactions pro-inflammatoires sont généralement suivies de production d'IL-10 dans le but de contracter la réponse et d'éviter des effets délétères par une activation prolongée du système immunitaire<sup>4</sup>. Il est connu que l'IL-10 inhibe la réponse mémoire et effectrice des cellules CD4+<sup>352</sup>. Les CD4+ des souris non traitées ayant une capacité moindre de production d'IL-10 que celles des souris traitées, il pourrait s'agir ici d'une réaction induite par la vaccination et visant à contracter la réponse des cellules CD4+.

La littérature fait état de cellules CD8+ productrices d'IL-10 qui exerceraient une activité tolérogénique en diminuant notamment la capacité des CD8+ cytotoxiques à produire de l'IFN $\gamma$ <sup>353, 354</sup>. On note chez les cellules CD8+ hépatiques des souris traitées une tendance vers une plus grande capacité de production d'IL-10, mais également une plus grande capacité de production d'IFN $\gamma$  (Figure 15). La vaccination ADN pourrait donc soit provoquer une augmentation de ces 2 populations de façon distincte, soit promouvoir la production d'IL-10 par des cellules ayant déjà eu la capacité de produire de l'IFN $\gamma$ . Un effet sur 2 populations distinctes impliquerait potentiellement une augmentation directe de l'une des populations qui serait indirectement compensée par l'augmentation de la seconde. Il serait intéressant de faire des essais de production de cytokines en situation plus physiologique afin de voir quelles cytokines sont naturellement produites par ces cellules CD8+.

### 4.2.3 La vaccination ADN influence l'expression de PD-1 par les cellules CD4+, CD8+ et CD19+

L'expression graduelle du récepteur inhibiteur PD-1 par les cellules survient lors de l'activation et permet une contraction de la réponse immunitaire en induisant un état hyporesponsif d'épuisement chez les cellules l'exprimant fortement. Les cellules CD4+ spléniques des souris traitées expriment fortement PD-1 (Figure 17), ce qui pourrait contribuer à l'effet protecteur de la vaccination ADN à 3 mois en diminuant l'aide apportée aux autres cellules immunitaires. Une plus grande proportion de cellules CD4+ hépatiques exprime PD-1 à 3 mois : il pourrait ici s'agir des cellules infiltrantes observées sur les coupes histologiques et stimulées en permanence. Il est important de se rappeler que l'expression de PD-1 est graduelle et que par conséquent, il est impossible de savoir si son expression est suffisante pour entraîner un état d'épuisement cellulaire. Malheureusement, les résultats des tests de cytotoxicité et de prolifération cellulaire utilisés se sont avérés incapables de générer des données pouvant nous renseigner sur l'état d'épuisement des cellules (résultats non montrés). Il serait également intéressant de voir si les cellules CD4+ exprimant PD-1 ont un profil Th1 ou un profil Th2.

Une observation similaire peut être faite chez les cellules CD8+ spléniques des souris traitées à 3 mois, mais non chez les cellules hépatiques (Figure 16), ce qui semble logique puisque les cellules infiltrantes lors d'HAI sont majoritairement des cellules CD4+. On peut cependant noter une expression plus importante de PD-1 à la surface des CD8+ hépatiques des souris non traitées à 8 mois, ce qui laisse présager une stimulation constante de ces cellules et pourrait laisser penser que malgré des scores histologiques similaires, les foies des souris non traitées seraient dans une situation moins tolérogénique que ceux des souris traitées.

Quant aux cellules CD19+, elles expriment PD-1 dans une proportion moindre chez les souris traitées à 3 mois au foie (Figure 18). Cependant, bien que la différence soit significative avec les cellules de leurs homologues, l'expression de PD-1 reste extrêmement faible chez les 2 groupes. Le tableau est tout autre à la rate cependant, où les cellules CD19+ des souris traitées expriment dans une plus grande proportion PD-1. Si les

cellules T spléniques expriment PD-1 de par une stimulation autoantigénique constante induite par la vaccination ADN, il est logique de supposer que les cellules B soient soumises au même type de stimulation et que, par conséquent, elles aient une expression similaire de PD-1.

#### **4.2.4 La vaccination ADN n'a pas d'impact significatif sur les cellules CD4+CD25+FoxP3+ mais a un impact sur la proportion de cellules CD8+ exprimant FoxP3**

Le facteur de transcription FoxP3 est connu pour être à l'origine de lignées CD4+ et CD8+ tolérogéniques. Si aucune différence significative n'est observable entre les cellules CD4+CD25+ exprimant FoxP3 des souris traitées et non traitées (Figure 19), on peut cependant observer une proportion plus faible de cellules CD8+ exprimant FoxP3 dans le foie et la rate des souris traitées à 3 mois (Figure 20). Cette différence pourrait être attribuable à un état plus tolérogénique chez les souris traitées, et ne nécessitant de ce fait pas de régulation par les CD8+FoxP3+. L'hypothèse d'une induction de cellules FoxP3+ tolérogéniques semble donc infirmée pour expliquer la protection induite par la vaccination ADN à 3 mois.

## Chapitre 5 : Conclusion et perspectives

La vaccination ADN induit une protection transitoire présente à 3 mois mais absente à 8 mois contre le développement d'HAI en modèle murin TTR-NP. Cette protection n'est médiée ni par des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+FoxP3+, ni par des lymphocytes T CD8+FoxP3+. Un épuisement des cellules spléniques CD4+, CD8+ et CD19+ exprimant PD-1 pourrait être à l'origine de la protection observée. La vaccination ADN entraîne une hausse de la proportion de cellules CD4+ spléniques et hépatiques pouvant produire de l'IL-2, de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'IFN $\gamma$  à 8 mois, mais seule la production d'IFN $\gamma$  par les cellules CD4+ semble négativement affectée à 3 mois et pourrait par conséquent être à l'origine de la protection observée. Cette diminution dans la production d'IFN $\gamma$  par les cellules CD4+ est spécifique à l'injection de pCMV-CTLA4-NP, soit au plasmide codant pour l'autoantigène.

Il serait intéressant dans des expériences ultérieures de caractériser la production d'IL-10 à 3 mois afin de confirmer ou d'infirmer son implication dans la tolérance induite par la vaccination ADN. De plus, des expériences permettant d'évaluer la production réelle, et non celle possible, d'IL-10 par les différentes cellules seraient nécessaires afin d'inférer relativement à un effet potentiel de la vaccination ADN sur la production de cette cytokine anti-inflammatoire.

## Bibliographie

1. Waisman, A., et al., *Suppressive vaccination with DNA encoding a variable region gene of the T-cell receptor prevents autoimmune encephalomyelitis and activates Th2 immunity*. Nat Med, 1996. **2**(8): p. 899-905.
2. Braciak, T.A., et al., *Protection against experimental autoimmune encephalomyelitis generated by a recombinant adenovirus vector expressing the V beta 8.2 TCR is disrupted by coadministration with vectors expressing either IL-4 or -10*. J Immunol, 2003. **170**(2): p. 765-74.
3. Chunduru, S.K., et al., *Exploitation of the Vbeta8.2 T cell receptor in protection against experimental autoimmune encephalomyelitis using a live vaccinia virus vector*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4940-5.
4. Goldsby, R.A., et al., *Kuby immunology*. 4th ed. 2000, New York: W.H. Freeman. xxv, 670 p.
5. Coon, B., et al., *DNA immunization to prevent autoimmune diabetes*. J Clin Invest, 1999. **104**(2): p. 189-94.
6. Lobell, A., et al., *Vaccination with DNA encoding an immunodominant myelin basic protein peptide targeted to Fc of immunoglobulin G suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 1998. **187**(9): p. 1543-8.
7. Ruiz, P.J., et al., *Suppressive immunization with DNA encoding a self-peptide prevents autoimmune disease: modulation of T cell costimulation*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3336-41.
8. Lobell, A., et al., *Suppressive DNA vaccination in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis involves a T1-biased immune response*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 1806-13.
9. Bot, A., et al., *Plasmid vaccination with insulin B chain prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2950-5.
10. Soukhareva, N., Y. Jiang, and D.W. Scott, *Treatment of diabetes in NOD mice by gene transfer of Ig-fusion proteins into B cells: role of T regulatory cells*. Cell Immunol, 2006. **240**(1): p. 41-6.
11. Glinka, Y., et al., *Regulatory cytokine production stimulated by DNA vaccination against an altered form of glutamic acid decarboxylase 65 in nonobese diabetic mice*. J Mol Med (Berl), 2003. **81**(3): p. 175-84.
12. Tisch, R., et al., *Antigen-specific mediated suppression of beta cell autoimmunity by plasmid DNA vaccination*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 2122-32.
13. Gallichan, W.S., et al., *Pancreatic IL-4 expression results in islet-reactive Th2 cells that inhibit diabetogenic lymphocytes in the nonobese diabetic mouse*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1696-703.
14. Every, A.L., et al., *Intranasal vaccination with proinsulin DNA induces regulatory CD4+ T cells that prevent experimental autoimmune diabetes*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4608-15.
15. Li, A., et al., *Pro-apoptotic DNA vaccination ameliorates new onset of autoimmune diabetes in NOD mice and induces foxp3+ regulatory T cells in vitro*. Vaccine, 2006. **24**(23): p. 5036-46.

16. Quintana, F.J., P. Carmi, and I.R. Cohen, *DNA vaccination with heat shock protein 60 inhibits cyclophosphamide-accelerated diabetes*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 6030-5.
17. Quintana, F.J., et al., *Inhibition of adjuvant arthritis by a DNA vaccine encoding human heat shock protein 60*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 3422-8.
18. Alvarez, F., et al., *International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 1999. **31**(5): p. 929-38.
19. Ho, P.P., et al., *Tolerizing DNA vaccines for autoimmune arthritis*. Autoimmunity, 2006. **39**(8): p. 675-82.
20. Youssef, S., et al., *C-C chemokine-encoding DNA vaccines enhance breakdown of tolerance to their gene products and treat ongoing adjuvant arthritis*. J Clin Invest, 2000. **106**(3): p. 361-71.
21. Wildbaum, G., S. Youssef, and N. Karin, *A targeted DNA vaccine augments the natural immune response to self TNF-alpha and suppresses ongoing adjuvant arthritis*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5860-6.
22. Agarwal, R.K., et al., *Retroviral gene therapy with an immunoglobulin-antigen fusion construct protects from experimental autoimmune uveitis*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 245-52.
23. Lapiere, P. and F. Alvarez, [*The liver: an organ of the immune system?*]. Med Sci (Paris), 2007. **23**(11): p. 985-90.
24. Ferrera, F., et al., *Protection against renal disease in (NZB x NZW)F(1) lupus-prone mice after somatic B cell gene vaccination with anti-DNA immunoglobulin consensus peptide*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(6): p. 1945-53.
25. Blank, M., et al., *TNFalpha DNA vaccination prevents clinical manifestations of experimental antiphospholipid syndrome*. Lupus, 2003. **12**(7): p. 546-9.
26. Ferrera, F., et al., *Gene vaccination for the induction of immune tolerance*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1110**: p. 99-111.
27. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
28. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 637-50.
29. Bendelac, A., P.B. Savage, and L. Teyton, *The biology of NKT cells*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 297-336.
30. Greenberg, A.H., et al., *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity due to a "null" lymphoid cell*. Nat New Biol, 1973. **242**(117): p. 111-3.
31. Kiessling, R., et al., *"Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell*. Eur J Immunol, 1975. **5**(2): p. 117-21.
32. Kiessling, R., E. Klein, and H. Wigzell, *"Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype*. Eur J Immunol, 1975. **5**(2): p. 112-7.
33. Greenberg, A.H. and J.H. Playfair, *Spontaneously arising cytotoxicity to the P-815-Y mastocytoma in NZB mice*. Clin Exp Immunol, 1974. **16**(1): p. 99-109.
34. Diefenbach, A. and D.H. Raulet, *Strategies for target cell recognition by natural killer cells*. Immunol Rev, 2001. **181**: p. 170-84.

35. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
36. Trinchieri, G., *Biology of natural killer cells*. Adv Immunol, 1989. **47**: p. 187-376.
37. Huntington, N.D., C.A. Voshenrich, and J.P. Di Santo, *Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 703-14.
38. Fernandez, N.C., et al., *A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4416-23.
39. Kim, S., et al., *Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 709-13.
40. Orr, M.T. and L.L. Lanier, *Natural killer cell education and tolerance*. Cell, 2010. **142**(6): p. 847-56.
41. Parham, P., *MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival*. Nature Reviews Immunology, 2005. **5**(3): p. 201-214.
42. Di Santo, J.P., *Natural killer cell developmental pathways: a question of balance*. Annu. Rev. Immunol., 2006. **24**: p. 257-286.
43. Lanier, L.L., *NK CELL RECEPTORS*. Annual Review of Immunology, 1998. **16**(1): p. 359-393.
44. Sivori, S., et al., *p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation*. J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 1129-36.
45. Pessino, A., et al., *Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity*. J Exp Med, 1998. **188**(5): p. 953-60.
46. Bottino, C., et al., *The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering*. Hum Immunol, 2000. **61**(1): p. 1-6.
47. Mandelboim, O., et al., *Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells*. Nature, 2001. **409**(6823): p. 1055-60.
48. Pende, D., et al., *Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells*. J Exp Med, 1999. **190**(10): p. 1505-16.
49. Cantoni, C., et al., *NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily*. J Exp Med, 1999. **189**(5): p. 787-96.
50. Kastrukoff, L.F., et al., *A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 1998. **86**(2): p. 123-33.
51. Erkeller-Yusel, F., et al., *Lymphocyte subsets in a large cohort of patients with systemic lupus erythematosus*. Lupus, 1993. **2**(4): p. 227-31.
52. Negishi, K., et al., *Natural killer cell and islet killer cell activities in type 1 (insulin-dependent) diabetes*. Diabetologia, 1986. **29**(6): p. 352-7.
53. Niiro, H. and E.A. Clark, *Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 945-56.
54. Reth, M., *The B-cell antigen receptor complex and co-receptors*. Immunol Today, 1995. **16**(7): p. 310-3.

55. Lam, K.P., R. Kuhn, and K. Rajewsky, *In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death*. *Cell*, 1997. **90**(6): p. 1073-83.
56. Meffre, E. and M.C. Nussenzweig, *Deletion of immunoglobulin beta in developing B cells leads to cell death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(17): p. 11334-9.
57. Hardy, R.R. and K. Hayakawa, *B cell development pathways*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 595-621.
58. Gazumyan, A., A. Reichlin, and M.C. Nussenzweig, *Ig beta tyrosine residues contribute to the control of B cell receptor signaling by regulating receptor internalization*. *J Exp Med*, 2006. **203**(7): p. 1785-94.
59. Shinohara, H. and T. Kurosaki, *Genetic analysis of B cell signaling*. *Subcell Biochem*, 2006. **40**: p. 145-87.
60. Depoil, D., et al., *CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(1): p. 63-72.
61. Trombetta, E.S. and I. Mellman, *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 975-1028.
62. Clark, M.R., et al., *B-cell antigen receptor signaling requirements for targeting antigen to the MHC class II presentation pathway*. *Curr Opin Immunol*, 2004. **16**(3): p. 382-7.
63. Hauser, S.L., et al., *B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(7): p. 676-88.
64. Pescovitz, M.D., et al., *Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(22): p. 2143-52.
65. Cohen, S.B., et al., *Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(9): p. 2793-806.
66. Levesque, M.C. and E.W. St Clair, *B cell-directed therapies for autoimmune disease and correlates of disease response and relapse*. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **121**(1): p. 13-21; quiz 22-3.
67. Liossis, S.N. and P.P. Sfikakis, *Rituximab-induced B cell depletion in autoimmune diseases: potential effects on T cells*. *Clin Immunol*, 2008. **127**(3): p. 280-5.
68. O'Garra, A., et al., *Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10*. *Eur J Immunol*, 1992. **22**(3): p. 711-7.
69. Fillatreau, S., D. Gray, and S.M. Anderton, *Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(5): p. 391-7.
70. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. *J Immunol*, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
71. Zhu, J. and W.E. Paul, *Heterogeneity and plasticity of T helper cells*. *Cell Res*, 2010. **20**(1): p. 4-12.
72. Manetti, R., et al., *Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones*. *J Exp Med*, 1994. **179**(4): p. 1273-83.

73. Parronchi, P., et al., *IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones*. J Immunol, 1992. **149**(9): p. 2977-83.
74. Rogge, L., et al., *The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6567-74.
75. Stevens, T.L., et al., *Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells*. Nature, 1988. **334**(6179): p. 255-8.
76. Kopf, M., et al., *Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses*. Nature, 1993. **362**(6417): p. 245-8.
77. van Panhuys, N., et al., *In vivo studies fail to reveal a role for IL-4 or STAT6 signaling in Th2 lymphocyte differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(34): p. 12423-8.
78. Bancroft, A.J., et al., *Gastrointestinal nematode expulsion in IL-4 knockout mice is IL-13 dependent*. Eur J Immunol, 2000. **30**(7): p. 2083-91.
79. Zhu, J., et al., *Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation*. Immunity, 2003. **19**(5): p. 739-48.
80. Mosmann, T.R., et al., *Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-5, IL-6, and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoabsorbent assay*. J Immunol, 1990. **145**(9): p. 2938-45.
81. Taniguchi, T., et al., *Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2*. Nature, 1983. **302**(5906): p. 305-10.
82. Kashima, N., et al., *Unique structure of murine interleukin-2 as deduced from cloned cDNAs*. Nature, 1985. **313**(6001): p. 402-4.
83. Yokota, T., et al., *Use of a cDNA expression vector for isolation of mouse interleukin 2 cDNA clones: expression of T-cell growth-factor activity after transfection of monkey cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(1): p. 68-72.
84. Caplan, B., C. Gibbs, and V. Paetkau, *Properties of sodium dodecyl sulfate-denatured Interleukin 2*. J Immunol, 1981. **126**(4): p. 1351-4.
85. Malek, T.R., *The biology of interleukin-2*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 453-79.
86. D'Souza, W.N. and L. Lefrancois, *IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 5727-35.
87. Williams, M.A., A.J. Tyznik, and M.J. Bevan, *Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 890-3.
88. Pipkin, M.E., et al., *Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells*. Immunity, 2010. **32**(1): p. 79-90.
89. Kalia, V., et al., *Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo*. Immunity, 2010. **32**(1): p. 91-103.
90. Papiernik, M., et al., *Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency*. Int Immunol, 1998. **10**(4): p. 371-8.
91. Malek, T.R. and I. Castro, *Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity*. Immunity, 2010. **33**(2): p. 153-65.

92. Malek, T.R. and A.L. Bayer, *Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(9): p. 665-74.
93. Paul, W.E., *Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine*. Blood, 1991. **77**(9): p. 1859-70.
94. Ben-Sasson, S.Z., et al., *IL-4 production by T cells from naive donors. IL-2 is required for IL-4 production*. J Immunol, 1990. **145**(4): p. 1127-36.
95. Howard, M., et al., *Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2*. J Exp Med, 1982. **155**(3): p. 914-23.
96. Noelle, R., et al., *Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(19): p. 6149-53.
97. Rabin, E.M., et al., *B cell stimulatory factor 1 (BSF-1) prepares resting B cells to enter S phase in response to anti-IgM and lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1986. **164**(2): p. 517-31.
98. Coffman, R.L., et al., *B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells*. J Immunol, 1986. **136**(12): p. 4538-41.
99. Vitetta, E.S., et al., *Serological, biochemical, and functional identity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1*. J Exp Med, 1985. **162**(5): p. 1726-31.
100. Ohara, J. and W.E. Paul, *Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(21): p. 8221-5.
101. Paul, W.E. and J. Ohara, *B-cell stimulatory factor-1/interleukin 4*. Annu Rev Immunol, 1987. **5**: p. 429-59.
102. Forbes, E., et al., *Differential requirements for IL-4/STAT6 signalling in CD4 T-cell fate determination and Th2-immune effector responses*. Immunol Cell Biol, 2010. **88**(3): p. 240-3.
103. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones*. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 2081-95.
104. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
105. Moore, K.W., et al., *Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1*. Science, 1990. **248**(4960): p. 1230-4.
106. Vieira, P., et al., *Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1172-6.
107. Walter, M.R., et al., *Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor*. Nature, 1995. **376**(6537): p. 230-5.
108. Zdanov, A., et al., *Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma*. Structure, 1995. **3**(6): p. 591-601.
109. Saraiva, M. and A. O'Garra, *The regulation of IL-10 production by immune cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 170-81.
110. Tone, M., et al., *IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 286-91.

111. Kaiser, F., et al., *TPL-2 negatively regulates interferon-beta production in macrophages and myeloid dendritic cells*. J Exp Med, 2009. **206**(9): p. 1863-71.
112. Saraiva, M., et al., *Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 209-19.
113. Banerjee, A., et al., *Diverse Toll-like receptors utilize Tpl2 to activate extracellular signal-regulated kinase (ERK) in hemopoietic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3274-9.
114. Rissoan, M.C., et al., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science, 1999. **283**(5405): p. 1183-6.
115. Khanna, A., et al., *Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo*. J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1346-54.
116. Go, N.F., et al., *Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells*. J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1625-31.
117. Itoh, K. and S. Hirohata, *The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation*. J Immunol, 1995. **154**(9): p. 4341-50.
118. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells*. J Immunol, 1991. **146**(10): p. 3444-51.
119. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 915-24.
120. Groux, H., et al., *Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3188-93.
121. Kennedy, M.K., et al., *Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery*. J Immunol, 1992. **149**(7): p. 2496-505.
122. Ishida, H., et al., *Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice*. J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 305-10.
123. Kobayashi, M., et al., *Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes*. J Exp Med, 1989. **170**(3): p. 827-45.
124. Stern, A.S., et al., *Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(17): p. 6808-12.
125. Gazzinelli, R.T., et al., *Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(13): p. 6115-9.
126. Trinchieri, G., *Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 251-76.
127. Mengel, J., et al., *An activated murine B cell lymphoma line (A-20) produces a factor-like activity which is functionally related to human natural killer cell stimulatory factor*. Eur J Immunol, 1992. **22**(12): p. 3173-8.

128. Schoenhaut, D.S., et al., *Cloning and expression of murine IL-12*. J Immunol, 1992. **148**(11): p. 3433-40.
129. Markiewicz, M.A., et al., *IL-12 enhances CTL synapse formation and induces self-reactivity*. J Immunol, 2009. **182**(3): p. 1351-61.
130. Wheelock, E.F., *Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin*. Science, 1965. **149**: p. 310-1.
131. Pace, J.L., et al., *Comparative effects of various classes of mouse interferons on macrophage activation for tumor cell killing*. J Immunol, 1985. **134**(2): p. 977-81.
132. Farrar, M.A. and R.D. Schreiber, *The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 571-611.
133. Scahill, S.J., et al., *Expression and characterization of the product of a human immune interferon cDNA gene in Chinese hamster ovary cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(15): p. 4654-8.
134. Fountoulakis, M., et al., *One interferon gamma receptor binds one interferon gamma dimer*. J Biol Chem, 1990. **265**(32): p. 19758-67.
135. Gray, P.W. and D.V. Goeddel, *Cloning and expression of murine immune interferon cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(19): p. 5842-6.
136. Schreiber, R.D., et al., *Macrophage-activating factor produced by a T cell hybridoma: physiochemical and biosynthetic resemblance to gamma-interferon*. J Immunol, 1983. **131**(2): p. 826-32.
137. Pamer, E. and P. Cresswell, *Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 323-58.
138. Bevan, M.J., *Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay*. J Exp Med, 1976. **143**(5): p. 1283-8.
139. Wong, P. and E.G. Pamer, *CD8 T cell responses to infectious pathogens*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 29-70.
140. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes*. Immunology, 1970. **18**(5): p. 723-37.
141. Sakaguchi, S., et al., *Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease*. J Exp Med, 1985. **161**(1): p. 72-87.
142. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
143. Walker, M.R., et al., *Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells*. J Clin Invest, 2003. **112**(9): p. 1437-43.
144. Schubert, L.A., et al., *Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37672-9.
145. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
146. Sakaguchi, S., K. Wing, and M. Miyara, *Regulatory T cells - a brief history and perspective*. Eur J Immunol, 2007. **37 Suppl 1**: p. S116-23.

147. Lahl, K., et al., *Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 57-63.
148. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1757-64.
149. Daniel, C. and H. von Boehmer, *Extra-thymically induced regulatory T cells: do they have potential in disease prevention?* Semin Immunol, 2011. **23**(6): p. 410-7.
150. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
151. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 68-73.
152. Wildin, R.S., et al., *X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 18-20.
153. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 20-1.
154. Doherty, D.G. and C. O'Farrelly, *Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver*. Immunological reviews, 2000. **174**(1): p. 5-20.
155. Cohen, N.R., S. Garg, and M.B. Brenner, *Antigen Presentation by CD1 Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity*. Adv Immunol, 2009. **102**: p. 1-94.
156. Brigl, M., et al., *Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1230-7.
157. Fox, L.M., et al., *Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes*. PLoS Biol, 2009. **7**(10): p. e1000228.
158. Cardell, S., et al., *CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice*. J Exp Med, 1995. **182**(4): p. 993-1004.
159. Behar, S.M., et al., *Diverse TCRs recognize murine CD1*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 161-7.
160. Benlagha, K., et al., *Characterization of the early stages of thymic NKT cell development*. J Exp Med, 2005. **202**(4): p. 485-92.
161. Chiu, Y.H., et al., *Multiple defects in antigen presentation and T cell development by mice expressing cytoplasmic tail-truncated CD1d*. Nat Immunol, 2002. **3**(1): p. 55-60.
162. Park, S.H., et al., *The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families*. J Exp Med, 2001. **193**(8): p. 893-904.
163. Chiu, Y.H., et al., *Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments*. J Exp Med, 1999. **189**(1): p. 103-10.
164. Kawano, T., et al., *CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides*. Science, 1997. **278**(5343): p. 1626-9.
165. Brossay, L., et al., *CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution*. J Exp Med, 1998. **188**(8): p. 1521-8.

166. Mattner, J., et al., *Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections*. Nature, 2005. **434**(7032): p. 525-9.
167. Kinjo, Y., et al., *Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells*. Nature, 2005. **434**(7032): p. 520-5.
168. Kobayashi, E., et al., *KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities*. Oncol Res, 1995. **7**(10-11): p. 529-34.
169. Geissmann, F., et al., *Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids*. PLoS Biol, 2005. **3**(4): p. e113.
170. Kyewski, B. and L. Klein, *A central role for central tolerance*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 571-606.
171. Teh, H.S., et al., *Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells*. Nature, 1988. **335**(6187): p. 229-33.
172. Kisielow, P., et al., *Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules*. Nature, 1988. **335**(6192): p. 730-3.
173. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 139-76.
174. von Boehmer, H., et al., *Thymic selection revisited: how essential is it?* Immunol Rev, 2003. **191**: p. 62-78.
175. von Boehmer, H. and P. Kisielow, *Negative selection of the T-cell repertoire: where and when does it occur?* Immunol Rev, 2006. **209**: p. 284-9.
176. Derbinski, J., et al., *Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1032-9.
177. Mathis, D. and C. Benoist, *Aire*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 287-312.
178. Anderson, M.S., et al., *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein*. Science, 2002. **298**(5597): p. 1395-401.
179. Hubert, F.X., et al., *A specific anti-Aire antibody reveals aire expression is restricted to medullary thymic epithelial cells and not expressed in periphery*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3824-32.
180. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
181. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
182. Zehn, D. and M.J. Bevan, *T cells with low avidity for a tissue-restricted antigen routinely evade central and peripheral tolerance and cause autoimmunity*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 261-70.
183. Kurts, C., et al., *Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 409-14.
184. Mueller, D.L., *Mechanisms maintaining peripheral tolerance*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 21-7.
185. Goodnow, C.C., *Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2264-71.
186. DeSilva, D.R., K.B. Urdahl, and M.K. Jenkins, *Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation*. J Immunol, 1991. **147**(10): p. 3261-7.

187. Mondino, A. and D.L. Mueller, *mTOR at the crossroads of T cell proliferation and tolerance*. Semin Immunol, 2007. **19**(3): p. 162-72.
188. Harding, F.A., et al., *CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones*. Nature, 1992. **356**(6370): p. 607-9.
189. Colombetti, S., et al., *Clonal anergy is maintained independently of T cell proliferation*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6178-86.
190. Greenwald, R.J., et al., *CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo*. Immunity, 2001. **14**(2): p. 145-55.
191. Probst, H.C., et al., *Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4*. Nat Immunol, 2005. **6**(3): p. 280-6.
192. Hawiger, D., et al., *Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 769-79.
193. Liu, K., et al., *Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ*. J Exp Med, 2002. **196**(8): p. 1091-7.
194. Kurts, C., et al., *CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity*. J Exp Med, 1997. **186**(12): p. 2057-62.
195. Kurts, C., et al., *Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells*. J Exp Med, 1997. **186**(2): p. 239-45.
196. Lohse, A.W., et al., *Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cells responding to activated T cells*. Science, 1989. **244**(4906): p. 820-2.
197. Brimnes, J., et al., *Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5814-22.
198. Jordan, M.S., et al., *Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 301-6.
199. Fontenot, J.D. and A.Y. Rudensky, *A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 331-7.
200. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 345-52.
201. Sakaguchi, S. and N. Sakaguchi, *Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease*. Int Rev Immunol, 2005. **24**(3-4): p. 211-26.
202. Shimamura, T., et al., *Feedback suppression of the immune response in vivo. III. Lyt-1+ B cells are suppressor-inducer cells*. Cell Immunol, 1984. **83**(1): p. 221-4.
203. Coquet, J.M., et al., *Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(32): p. 11287-92.
204. Hong, S., et al., *The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice*. Nat Med, 2001. **7**(9): p. 1052-6.
205. Miellot, A., et al., *Activation of invariant NK T cells protects against experimental rheumatoid arthritis by an IL-10-dependent pathway*. Eur J Immunol, 2005. **35**(12): p. 3704-13.

206. Singh, A.K., et al., *Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1801-11.
207. Jahng, A.W., et al., *Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1789-99.
208. Moskophidis, D., et al., *Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells*. Nature, 1993. **362**(6422): p. 758-61.
209. Wherry, E.J., et al., *Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 670-84.
210. Zajac, A.J., et al., *Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2205-13.
211. Nishimura, H., et al., *Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 141-51.
212. Nishimura, H., et al., *Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice*. Science, 2001. **291**(5502): p. 319-22.
213. Yi, J.S., M.A. Cox, and A.J. Zajac, *T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion*. Immunology, 2010. **129**(4): p. 474-81.
214. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. Nat Immunol, 2011. **131**(6): p. 492-9.
215. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. Nature, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
216. Ishida, Y., et al., *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death*. EMBO J, 1992. **11**(11): p. 3887-95.
217. Ostrov, D.A., et al., *Structure of murine CTLA-4 and its role in modulating T cell responsiveness*. Science, 2000. **290**(5492): p. 816-9.
218. Zhang, X., et al., *Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1*. Immunity, 2004. **20**(3): p. 337-47.
219. Agata, Y., et al., *Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes*. Int Immunol, 1996. **8**(5): p. 765-72.
220. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1027-34.
221. Latchman, Y., et al., *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 261-8.
222. Okazaki, T. and J. Wang, *PD-1/PD-L pathway and autoimmunity*. Autoimmunity, 2005. **38**(5): p. 353-7.
223. Lloyd, C.M., et al., *Three-colour fluorescence immunohistochemistry reveals the diversity of cells staining for macrophage markers in murine spleen and liver*. J Immunol Methods, 2008. **334**(1-2): p. 70-81.
224. Nemeth, E., A.W. Baird, and C. O'Farrelly, *Microanatomy of the liver immune system*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(3): p. 333-43.
225. Kern, M., et al., *Taking off the brakes: T cell immunity in the liver*. Trends Immunol, 2010. **31**(8): p. 311-7.

226. Knolle, P., et al., *Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge*. J Hepatol, 1995. **22**(2): p. 226-9.
227. Knolle, P.A. and G. Gerken, *Local control of the immune response in the liver*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 21-34.
228. Knolle, P.A., et al., *IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules*. Clin Exp Immunol, 1998. **114**(3): p. 427-33.
229. Roland, C.R., et al., *Outcome of Kupffer cell antigen presentation to a cloned murine Th1 lymphocyte depends on the inducibility of nitric oxide synthase by IFN-gamma*. J Immunol, 1994. **153**(12): p. 5453-64.
230. Gregory, S.H. and E.J. Wing, *Accessory function of Kupffer cells in the antigen-specific blastogenic response of an L3T4+ T-lymphocyte clone to Listeria monocytogenes*. Infect Immun, 1990. **58**(7): p. 2313-9.
231. Klugewitz, K., et al., *Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4+ effector cells and suppression of IFN-gamma-producing cells after intravenous protein immunization*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2407-13.
232. Yrlid, U., et al., *Plasmacytoid dendritic cells do not migrate in intestinal or hepatic lymph*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 6115-21.
233. Bishop, G.A., et al., *Tolerance to rat liver allografts. III. Donor cell migration and tolerance-associated cytokine production in peripheral lymphoid tissues*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4925-31.
234. Sumpter, T.L., et al., *Dendritic cells, the liver, and transplantation*. Hepatology, 2007. **46**(6): p. 2021-31.
235. Geerts, A., *History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells*. Semin Liver Dis, 2001. **21**(3): p. 311-35.
236. Winau, F., et al., *Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses*. Immunity, 2007. **26**(1): p. 117-29.
237. Gressner, A.M., et al., *Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d793-807.
238. Chen, C.H., et al., *In vivo immune modulatory activity of hepatic stellate cells in mice*. Hepatology, 2006. **44**(5): p. 1171-81.
239. Jiang, G., et al., *Hepatic stellate cells preferentially expand allogeneic CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells in an IL-2-dependent manner*. Transplantation, 2008. **86**(11): p. 1492-502.
240. Herkel, J., et al., *MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes*. Hepatology, 2003. **37**(5): p. 1079-85.
241. Wiegand, C., et al., *Defective T helper response of hepatocyte-stimulated CD4 T cells impairs antiviral CD8 response and viral clearance*. Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 2010-8.
242. Baumann, H. and J. Gauldie, *The acute phase response*. Immunol Today, 1994. **15**(2): p. 74-80.
243. Kelsall, A.R., A. Stewart, and L.J. Witts, *Subacute and chronic hepatitis*. Lancet, 1947. **2**(6467): p. 195-8.

244. Waldenström, J.G., *Blutproteine und Nahrungseiweiß*. Dtsch Z Verdau Stoffwechselkr, 1950. **15**: p. 113-119.
245. Bearn, A.G., H.G. Kunkel, and R.J. Slater, *The problem of chronic liver disease in young women*. Am J Med, 1956. **21**(1): p. 3-15.
246. Cowling, D.C., I.R. Mackay, and L.I. Taft, *Lupoid hepatitis*. Lancet, 1956. **271**(6957): p. 1323-6.
247. Mackay, I.R., S. Weiden, and J. Hasker, *Autoimmune hepatitis*. Ann N Y Acad Sci, 1965. **124**(2): p. 767-80.
248. Johnson, P.J. and I.G. McFarlane, *Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group*. Hepatology, 1993. **18**(4): p. 998-1005.
249. Czaja, A.J., et al., *Significance of HLA DR4 in type 1 autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 1993. **105**(5): p. 1502-7.
250. Vergani, D., et al., *Genetically determined low C4: a predisposing factor to autoimmune chronic active hepatitis*. Lancet, 1985. **2**(8450): p. 294-8.
251. Gregorio, G.V., et al., *Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience*. Hepatology, 1997. **25**(3): p. 541-7.
252. Czaja, A.J., et al., *Associations between alleles of the major histocompatibility complex and type 1 autoimmune hepatitis*. Hepatology, 1997. **25**(2): p. 317-23.
253. Strettell, M.D., et al., *Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 1997. **112**(6): p. 2028-35.
254. Manns, M.P. and A. Vogel, *Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S132-44.
255. Pando, M., et al., *Pediatric and adult forms of type 1 autoimmune hepatitis in Argentina: evidence for differential genetic predisposition*. Hepatology, 1999. **30**(6): p. 1374-80.
256. Donaldson, P.T., *Genetics in autoimmune hepatitis*. Semin Liver Dis, 2002. **22**(4): p. 353-64.
257. Alvarez, F., *Autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis*. Clin Liver Dis, 2006. **10**(1): p. 89-107, vi.
258. Czaja, A.J. and H.A. Carpenter, *Autoimmune hepatitis with incidental histologic features of bile duct injury*. Hepatology, 2001. **34**(4 Pt 1): p. 659-65.
259. Wucherpfennig, K.W. and J.L. Strominger, *Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein*. Cell, 1995. **80**(5): p. 695-705.
260. Yuki, N., *Pathogenesis of Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes subsequent to Campylobacter jejuni enteritis*. Jpn J Infect Dis, 1999. **52**(3): p. 99-105.
261. Manns, M.P., et al., *LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase*. J Clin Invest, 1991. **88**(4): p. 1370-8.
262. Lapierre, P., C. Johanet, and F. Alvarez, *Characterization of the B cell response of patients with anti-liver cytosol autoantibodies in type 2 autoimmune hepatitis*. Eur J Immunol, 2003. **33**(7): p. 1869-78.
263. Marceau, G., et al., *LKM1 autoantibodies in chronic hepatitis C infection: a case of molecular mimicry?* Hepatology, 2005. **42**(3): p. 675-82.
264. Horwitz, M.S., et al., *Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry*. Nat Med, 1998. **4**(7): p. 781-5.

265. Vanderlugt, C.L., et al., *The functional significance of epitope spreading and its regulation by co-stimulatory molecules*. Immunol Rev, 1998. **164**: p. 63-72.
266. Bynoe, M.S., C.M. Grimaldi, and B. Diamond, *Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naive B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2703-8.
267. Arndt, P.A., R.M. Leger, and G. Garratty, *Serology of antibodies to second- and third-generation cephalosporins associated with immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests*. Transfusion, 1999. **39**(11-12): p. 1239-46.
268. Charles, P.J., et al., *Assessment of antibodies to double-stranded DNA induced in rheumatoid arthritis patients following treatment with infliximab, a monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha: findings in open-label and randomized placebo-controlled trials*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(11): p. 2383-90.
269. Wilson, S.B., et al., *Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes*. Nature, 1998. **391**(6663): p. 177-81.
270. Lapierre, P., et al., *Forkhead box p3+ regulatory T cell underlies male resistance to experimental type 2 autoimmune hepatitis*. Hepatology, 2010. **51**(5): p. 1789-98.
271. Ji, Q., A. Perchellet, and J.M. Goverman, *Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs*. Nat Immunol, 2010. **11**(7): p. 628-34.
272. Vitozzi, S., et al., *Anti-soluble liver antigen/liver-pancreas (SLA/LP) antibodies in pediatric patients with autoimmune hepatitis*. Autoimmunity, 2002. **35**(8): p. 485-92.
273. Maggiore, G., et al., *Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1993. **17**(4): p. 376-81.
274. Toh, B.H., *Anti-cytoskeletal autoantibodies: diagnostic significance for liver diseases, infections and systemic autoimmune diseases*. Autoimmunity, 1991. **11**(2): p. 119-25.
275. Worman, H.J. and J.C. Courvalin, *Autoantibodies against nuclear envelope proteins in liver disease*. Hepatology, 1991. **14**(6): p. 1269-79.
276. Maggiore, G., et al., *Liver disease associated with anti-liver-kidney microsome antibody in children*. J Pediatr, 1986. **108**(3): p. 399-404.
277. Lapierre, P., et al., *Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 1999. **116**(3): p. 643-9.
278. Gueguen, M., et al., *Anti-liver-kidney microsome antibody type 1 recognizes human cytochrome P450 db1*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **159**(2): p. 542-7.
279. Kohls, D., et al., *The crystal structure of the formiminotransferase domain of formiminotransferase-cyclodeaminase: implications for substrate channeling in a bifunctional enzyme*. Structure, 2000. **8**(1): p. 35-46.
280. Renous, R., et al., *Characterization of the antigenicity of the formiminotransferase-cyclodeaminase in type 2 autoimmune hepatitis*. Exp Cell Res, 2004. **292**(2): p. 332-41.
281. Wies, I., et al., *Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis*. Lancet, 2000. **355**(9214): p. 1510-5.
282. Herkel, J., et al., *Fine specificity of autoantibodies to soluble liver antigen and liver/pancreas*. Hepatology, 2002. **35**(2): p. 403-8.

283. Strassburg, C.P. and M.P. Manns, *Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis*. Semin Liver Dis, 2002. **22**(4): p. 339-52.
284. Beland, K., et al., *Anti-LCI autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection*. J Autoimmun, 2004. **22**(2): p. 159-66.
285. Vitozzi, S., et al., *Anti-soluble liver antigen (SLA) antibodies in chronic HCV infection*. Autoimmunity, 2004. **37**(3): p. 217-22.
286. Ma, Y., et al., *Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease*. Hepatology, 2002. **35**(3): p. 658-64.
287. Strassburg, C.P., et al., *Identification of cyclin A as a molecular target of antinuclear antibodies (ANA) in hepatic and non-hepatic autoimmune diseases*. J Hepatol, 1996. **25**(6): p. 859-66.
288. Czaja, A.J., et al., *Patterns of nuclear immunofluorescence and reactivities to recombinant nuclear antigens in autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 1994. **107**(1): p. 200-7.
289. Adams, L.A., K.D. Lindor, and P. Angulo, *The prevalence of autoantibodies and autoimmune hepatitis in patients with nonalcoholic Fatty liver disease*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(7): p. 1316-20.
290. Cuarterolo, M., et al., *Follow-up of children with autoimmune hepatitis treated with cyclosporine*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2006. **43**(5): p. 635-9.
291. Strassburg, C.P. and M.P. Manns, *Therapy of autoimmune hepatitis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(6): p. 673-87.
292. Kuriki, J., et al., *Experimental autoimmune hepatitis in mice after immunization with syngeneic liver proteins together with the polysaccharide of Klebsiella pneumoniae*. Gastroenterology, 1983. **84**(3): p. 596-603.
293. Lohse, A.W., et al., *Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity*. Hepatology, 1990. **11**(1): p. 24-30.
294. Howell, C.D. and T.D. Yoder, *Murine experimental autoimmune hepatitis: nonspecific inflammation due to adjuvant oil*. Clin Immunol Immunopathol, 1994. **72**(1): p. 76-82.
295. Lohse, A.W., H.P. Dienes, and K.H. Meyer zum Buschenfelde, *Suppression of murine experimental autoimmune hepatitis by T-cell vaccination or immunosuppression*. Hepatology, 1998. **27**(6): p. 1536-43.
296. Tiegs, G., J. Hentschel, and A. Wendel, *A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A*. J Clin Invest, 1992. **90**(1): p. 196-203.
297. Nicoletti, F., et al., *Murine concanavalin A-induced hepatitis is prevented by interleukin 12 (IL-12) antibody and exacerbated by exogenous IL-12 through an interferon-gamma-dependent mechanism*. Hepatology, 2000. **32**(4 Pt 1): p. 728-33.
298. Mizuhara, H., et al., *T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6*. J Exp Med, 1994. **179**(5): p. 1529-37.
299. Gantner, F., et al., *Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor*. Hepatology, 1995. **21**(1): p. 190-8.
300. Mizuhara, H., et al., *Critical involvement of interferon gamma in the pathogenesis of T-cell activation-associated hepatitis and regulatory mechanisms of interleukin-6 for the manifestations of hepatitis*. Hepatology, 1996. **23**(6): p. 1608-15.

301. Toyabe, S., et al., *Requirement of IL-4 and liver NK1+ T cells for concanavalin A-induced hepatic injury in mice*. J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1537-42.
302. Toyonaga, T., et al., *Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-gamma in the liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(2): p. 614-8.
303. Voehringer, D., et al., *Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis*. J Immunol, 2000. **165**(5): p. 2415-22.
304. Gorham, J.D., et al., *Genetic regulation of autoimmune disease: BALB/c background TGF-beta 1-deficient mice develop necroinflammatory IFN-gamma-dependent hepatitis*. J Immunol, 2001. **166**(10): p. 6413-22.
305. Kulkarni, A.B., et al., *Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 770-4.
306. Djilali-Saiah, I., et al., *DNA vaccination breaks tolerance for a neo-self antigen in liver: a transgenic murine model of autoimmune hepatitis*. J Immunol, 2002. **169**(9): p. 4889-96.
307. Lapiere, P., et al., *A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoinmunization with human antigens*. Hepatology, 2004. **39**(4): p. 1066-74.
308. Lapiere, P., et al., *Type 2 autoimmune hepatitis murine model: the influence of genetic background in disease development*. J Autoimmun, 2006. **26**(2): p. 82-9.
309. Piché, C., *Étude de l'autoimmunité contre le foie induite par mimétisme moléculaire*, in *Microbiologie et Immunologie 2008*, Université de Montréal: Montréal.
310. Piche, C., et al., *Different sites of xenoantigen delivery lead to a virally induced late-onset hepatitis in mice through molecular mimicry*. Liver Int, 2011. **31**(9): p. 1306-14.
311. Holdener, M., et al., *Breaking tolerance to the natural human liver autoantigen cytochrome P450 2D6 by virus infection*. J Exp Med, 2008. **205**(6): p. 1409-22.
312. Hintermann, E., J. Ehser, and U. Christen, *The CYP2D6 animal model: how to induce autoimmune hepatitis in mice*. J Vis Exp, 2012(60).
313. Zierden, M., et al., *Effects and regulation of autoreactive CD8+ T cells in a transgenic mouse model of autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 2010. **139**(3): p. 975-86, 986 e1-3.
314. Smith, J.G., et al., *Adenovirus*. Curr Top Microbiol Immunol, 2010. **343**: p. 195-224.
315. Nemerow, G.R., *Cell receptors involved in adenovirus entry*. Virology, 2000. **274**(1): p. 1-4.
316. Fabry, C.M., et al., *A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid*. EMBO J, 2005. **24**(9): p. 1645-54.
317. Saban, S.D., et al., *CryoEM structure at 9A resolution of an adenovirus vector targeted to hematopoietic cells*. J Mol Biol, 2005. **349**(3): p. 526-37.
318. Saban, S.D., et al., *Visualization of alpha-helices in a 6-angstrom resolution cryoelectron microscopy structure of adenovirus allows refinement of capsid protein assignments*. J Virol, 2006. **80**(24): p. 12049-59.
319. Bergelson, J.M., et al., *Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5*. Science, 1997. **275**(5304): p. 1320-3.

320. Bewley, M.C., et al., *Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR*. Science, 1999. **286**(5444): p. 1579-83.
321. Law, L.K. and B.L. Davidson, *What does it take to bind CAR?* Mol Ther, 2005. **12**(4): p. 599-609.
322. Wickham, T.J., et al., *Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment*. Cell, 1993. **73**(2): p. 309-19.
323. Li, E., et al., *Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor*. J Virol, 2001. **75**(11): p. 5405-9.
324. Wang, K., et al., *Regulation of adenovirus membrane penetration by the cytoplasmic tail of integrin beta5*. J Virol, 2000. **74**(6): p. 2731-9.
325. Wang, K., et al., *Adenovirus internalization and infection require dynamin*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3455-8.
326. Greber, U.F., et al., *Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells*. Cell, 1993. **75**(3): p. 477-86.
327. Svensson, U., *Role of vesicles during adenovirus 2 internalization into HeLa cells*. J Virol, 1985. **55**(2): p. 442-9.
328. Lawrence, W.C. and H.S. Ginsberg, *Intracellular uncoating of type 5 adenovirus deoxyribonucleic acid*. J Virol, 1967. **1**(5): p. 851-67.
329. Chardonnet, Y. and S. Dales, *Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome*. Virology, 1970. **40**(3): p. 462-77.
330. Alemany, R. and D.T. Curiel, *CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors*. Gene Ther, 2001. **8**(17): p. 1347-53.
331. Smith, T., et al., *In vivo hepatic adenoviral gene delivery occurs independently of the coxsackievirus-adenovirus receptor*. Mol Ther, 2002. **5**(6): p. 770-9.
332. Dechecchi, M.C., et al., *Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions*. Virology, 2000. **268**(2): p. 382-90.
333. Kalyuzhniy, O., et al., *Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5483-8.
334. Waddington, S.N., et al., *Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer*. Cell, 2008. **132**(3): p. 397-409.
335. Shayakhmetov, D.M., et al., *Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity*. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7478-91.
336. Zinn, K.R., et al., *Bioluminescence imaging reveals a significant role for complement in liver transduction following intravenous delivery of adenovirus*. Gene Ther, 2004. **11**(19): p. 1482-6.
337. Alemany, R., K. Suzuki, and D.T. Curiel, *Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 11): p. 2605-9.
338. Snoeys, J., et al., *Lipid emulsions potently increase transgene expression in hepatocytes after adenoviral transfer*. Mol Ther, 2006. **13**(1): p. 98-107.
339. Hegenbarth, S., et al., *Liver sinusoidal endothelial cells are not permissive for adenovirus type 5*. Hum Gene Ther, 2000. **11**(3): p. 481-6.
340. Danthinne, X. and M.J. Imperiale, *Production of first generation adenovirus vectors: a review*. Gene Ther, 2000. **7**(20): p. 1707-14.

341. Ulmer, J.B., et al., *Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1745-9.
342. Liu, M.A., et al., *Immunization of non-human primates with DNA vaccines*. Vaccine, 1997. **15**(8): p. 909-12.
343. Dupuis, M., et al., *Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice*. J Immunol, 2000. **165**(5): p. 2850-8.
344. Fu, T.M., et al., *Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes*. Mol Med, 1997. **3**(6): p. 362-71.
345. Ulmer, J.B., et al., *Expression of a viral protein by muscle cells in vivo induces protective cell-mediated immunity*. Vaccine, 1997. **15**(8): p. 839-41.
346. Ulmer, J.B. and G.R. Otten, *Priming of CTL responses by DNA vaccines: direct transfection of antigen presenting cells versus cross-priming*. Dev Biol (Basel), 2000. **104**: p. 9-14.
347. Robinson, H.L., L.A. Hunt, and R.G. Webster, *Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA*. Vaccine, 1993. **11**(9): p. 957-60.
348. Deck, R.R., et al., *Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine*. Vaccine, 1997. **15**(1): p. 71-8.
349. Ishak, K., et al., *Histological grading and staging of chronic hepatitis*. Journal of hepatology, 1995. **22**: p. 696-699.
350. Gotot, J., et al., *Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(26): p. 10468-73.
351. DeChatelet, L.R., P.S. Shirley, and R.B. Johnston, Jr., *Effect of phorbol myristate acetate on the oxidative metabolism of human polymorphonuclear leukocytes*. Blood, 1976. **47**(4): p. 545-54.
352. Brooks, D.G., et al., *IL-10 directly suppresses CD4 but not CD8 T cell effector and memory responses following acute viral infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(7): p. 3018-23.
353. Shi, Z., et al., *Human CD8+CXCR3+ T cells have the same function as murine CD8+CD122+ Treg*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2106-19.
354. Endharti, A.T., et al., *Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7093-7.

